

15. Soverini S., Martinelli G., Amabile M., Poerio A., Bianchini M., Rosti G., et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. *Clin. Chem.* 2004; 50(7): 1205–13.
16. Schumacher J.A., Szankasi P., Bahler D.W., Ho A.K., Kelley T.W. A pyrosequencing-based test for detection and relative quantification of the BCR-ABL1 T315I point mutation. *J. Clin. Pathol.* 2011; 64(7): 618–25.
17. Sorel N., Chazelas F., Brizard A., Chomel J.C. Double-gradient-denaturing gradient gel electrophoresis for mutation screening of the BCR-ABL tyrosine kinase domain in chronic myeloid leukemia patients. *Clin. Chem.* 2005; 51(7): 1263–6.
18. Chomel J.C., Sorel N., Bonnet M.L., Bertrand A., Brizard F., Saulnier P.J., et al. Quantitative monitoring of the T315I mutation in patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk. Res.* 2009; 33(4): 551–5.
19. Manrique Arechavaleta G., Scholl V., Perez V., Bittencourt R., Moellmann A., Hassan R., et al. Rapid and sensitive allele-specific (AS)-RT-PCR assay for detection of T315I mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosinekinase inhibitors. *Clin. Exp. Med.* 2011; 11(1): 55–9.
20. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–67.
21. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003; 17: 2318–57. Available at: <http://www.nature.com/leu/journal/v17/n12/pdf/2403135a.pdf>
22. Lange T., Ernst T., Gruber F.X., Maier J., Cross M., Müller M.C., et al. The quantitative level of T315I mutated BCR-ABL predicts for major molecular response to second-line nilotinib or dasatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2013; 98(5): 714–17.
23. Willis S.G., Lange T., Demehri S., Otto S., Crossman L., Niederwieser D., et al. High sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* 2005; 106(6): 2128–37.

Поступила 21.07.14  
Received 21.07.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 616.155.194.7-085.275.2-036.8

## КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОВТОРНЫХ КУРСОВ АНТИТИМОЦИТАРНОГО ГЛОБУЛИНА

Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н., Троицкая В.В., Гальцева И.В., Шитарева И.В.,  
Цыба Н.Н., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва

**Резюме.** Цель настоящей работы – изучить эффективность повторных курсов терапии антитимоцитарным глобулином (АТГ), алгоритм их проведения в сочетании с длительным приемом циклоспорина А (ЦСА) и определить частоту выявления и динамику клона клеток, характерного для пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ-клон) у больных апластической анемией (АА) на различных этапах иммуносупрессивной терапии (ИСТ). Используемый алгоритм лечения позволил у большинства больных АА (84,9%) получить положительный ответ, а у 76,7% ответивших больных была отмечена ремиссия, из них у 76,8% полная ремиссия. Большинство больных (61,6%) ответили на терапию после 1-го курса АТГ, при этом через 3 мес от начала лечения клинико-гематологическое улучшение было достигнуто уже у 52,8%, а общий ответ через 6 мес – у 83,4% больных. Этот период времени (3–6 мес от начала ИСТ) в случаях отсутствия ответа на 1-й курс АТГ следует рассматривать как оптимальный для проведения 2-го курса АТГ. После 2-го курса АТГ в данном исследовании положительный ответ был получен еще у 16 больных, т.е. после двух курсов АТГ положительно ответили 80,2% больных. Больные АА, не ответившие после 2-го курса АТГ через 6–9 мес от начала ИСТ, могут быть отнесены к группе больных рефрактерной АА. Общая и бессобытийная 7-летняя выживаемость больных АА, получавших комбинированную ИСТ, составила 89% (95% доверительный интервал – ДИ 83–96%) и 93% (95% ДИ 88–97%) соответственно. До проведения ИСТ ПНГ-клон был выявлен у 20 (61%) из 33 больных АА, прослеженных в динамике. Медиана ПНГ-клона по гранулоцитам составила 1,93% (0,1–99,5%). Появление и дальнейшая персистенция клона отмечены у 6 (46%) из 13 больных, у которых ПНГ-клон до начала ИСТ не обнаруживали. У всех 6 больных был получен ответ на ИСТ. У 17 (85%) из 20 больных АА, протекающей с ПНГ-клоном, обнаруженным до начала ИСТ, наблюдался ответ на лечение. У остальных 3 (15%) больных отмечено уменьшение размера ПНГ-клона более чем в 5 раз, вплоть до полной элиминации у 1 больного. Среди больных АА, у которых до начала лечения ПНГ-клон не обнаруживался, на лечение ответили 8 (61%) больных. Результаты нашего исследования подтверждают вероятность ответа на ИСТ больных АА, протекающей с ПНГ-клоном. Анализ результатов комбинированной ИСТ у больных АА показал высокую эффективность программы, включающей повторные курсы АТГ и длительную терапию ЦСА.

**Ключевые слова:** апластическая анемия; иммуносупрессивная терапия; повторные курсы антитимоцитарного глобулина; пароксизмальная ночная гемоглобинурия; ПНГ-клон.

### COMBINED IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA: EFFICIENCY OF REPEATED ANTITHYMOCYTIC GLOBULIN COURSES

Mikhailova E.A., Fidarova Z.T., Ustinova E.N., Troitskaya V.V., Galtseva I.V., Shitareva I.V., Tsyba N.N., Parovichnikova E.N.,  
Savchenko V.G.

Hematology Research Center, Moscow, 125167, Russia.

**Summary.** The efficiency of repeated courses of antithymocytic globulin (ATG) and algorithm thereof in combination with long-term cyclosporin A (CsA) therapy were studied. The incidence and time course of the cell clone characteristic of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH clone) were studied in patients

with aplastic anemia (AA) at different stages of immunosuppressive therapy (IST). The therapeutic algorithm used in the study led to positive response in the majority (84.9%) of AA patients. Remission was attained in 76.7% responding patients, complete remission in 76.8% of these. The majority of patients (61.6%) responded to therapy after the first course of ATG. Clinical hematological improvement was attained in 52.8% patients after 3 months of therapy; after 6 months common response was recorded in 83.4% patients. This period (3–6 months after the beginning of IST) should be regarded, in cases without response to ATG course 1, as the optimal for ATG course 2. Course 2 of ATG led to positive response in 16 more patients, that is, 80.2% patients responded to therapy after two ATG courses. Patients with AA not responding to therapy after two courses of ATG 6–9 months after the beginning of treatment could be referred to the group of patients with refractory AA. Overall and uneventful 7-year survival of AA patients after combined IST was 89% (95% CI 83–96%) and 93% (95% CI 88–97%), respectively. The PNH clone was detected before IST in 20 (61%) of 33 patients with AA. The median of PNH clone for granulocytes was 1.93% (0.1–99.5%). The clone emerged and persisted in 6 (46%) of 13 patients in whom it was detected before IST. All six patients responded to IST. Seventeen (85%) of 20 AA patients with PNH clone, detected before IST, responded to IST. In the remaining 3 (15%) patients the PNH clone reduced more than 5-fold, up to complete elimination. Of AA patients without PNH clone before therapy, 8 (61%) responded to therapy. Our results confirmed the probability of response to IST in AA patients with PNH clone. The results of combined IST in AA patients indicated high efficiency of the protocol including repeated ATG courses and linc CsA therapy.

**Key words:** aplastic anemia; immunosuppressive therapy; repeated antithymocytic globulin courses; paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PNH clone.

Апластическая анемия (АА) на протяжении многих десятилетий, с момента первых клинических описаний П.Эрлихом в 1888 г., оставалась одним из тяжелейших заболеваний системы крови. Большинство больных погибали в течение от первых нескольких месяцев до 1 года от момента диагностики заболевания в результате инфекционных и геморрагических осложнений, обусловленных глубокой цитопенией и аплазией костного мозга [1]. Значительные успехи в лечении больных АА были достигнуты благодаря изучению патогенеза АА, выявлению нарушений иммунной системы, проявляющейся аплазией костного мозга [2]. Использование в программах лечения иммуносупрессивных препаратов и трансплантации костного мозга позволило улучшить выживаемость больных АА с 10–20% в 1960-е годы, 40–50% в 1980–90-е годы до 80–90% в настоящее время. Но далеко не все вопросы лечения больных АА решены. Особенно это касается лечения так называемой рефрактерной АА (РАА), не отвечающей на первые курсы иммуносупрессивной терапии (ИСТ), лечения рецидивов и клональных осложнений.

Трансплантацию аллогенного костного мозга от HLA-совместимого родственного донора в современной клинической гематологии рассматривают как терапию 1-й линии для молодых больных (до 35–40 лет), обеспечивающую длительную выживаемость 70–80% больных [3–5]. В связи с тем что у большинства больных нет HLA-совместимого родственного донора, у них терапией выбора остается

**Для корреспонденции:**

*Михайлова Елена Алексеевна*, доктор мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии гемобластозов и депрессий кровотока ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России.

Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а.

Телефон: +7(495) 613-26-90

E-mail: mea@blood.ru

**Corresponding author:**

*Mikhailova Elena*, MD, PhD, DSc, prof. (mea@blood.ru).

комбинированная ИСТ. В результате клинических исследований сравнительной эффективности трансплантации костного мозга (ТКМ) и ИСТ в течение последних 10 лет были получены близкие результаты. В 2006 г. опубликованы результаты исследования Европейской рабочей группы по изучению тяжелой АА (ТАА) в рамках ВМТ (SAA-WP, ВМТ): 10-летняя общая выживаемость больных ТАА, которым была проведена ТКМ или ИСТ, составила 73 и 68% соответственно [6]. В 2014 г. этой же группой были представлены результаты сравнительного анализа в группе больных юношеского возраста (12–18 лет) эффективности таких методов лечения АА, как ТКМ от родственного донора при 1-й линии терапии, ИСТ 1-й линии и ТКМ после неэффективной ИСТ 1-й линии, при этом общая выживаемость и бессобытийная выживаемость составили 86, 90, 78% и 83, 64, 71% соответственно [7].

Основными препаратами программы комбинированной ИСТ остаются антиtimoцитарный глобулин (АТГ) и циклоспорин А (ЦсА), позволяющие получить стабильные ремиссии у 60–75% больных АА [3, 8]. Попытки повысить эффективность лечения, включая в протоколы ИСТ такие препараты, как алемтузумаб, циклофосфамид, микофенолата мофетил, сиролимус, ростовые факторы, не привели к улучшению результатов [8–12]. В протоколах ИСТ больных АА длительное время использовались два вида АТГ: лошадиный (лАТГ) и кроличий (крАТГ). При этом обсуждались их преимущества и эффективность с позиции использования как препарата 1-й линии ИСТ. В проспективном рандомизированном исследовании P. Scheinberg и соавт. [13] показано значимое различие между эффективностью лАТГ и крАТГ на первом этапе лечения в пользу первого: 68 и 37% положительных ответов соответственно. В дальнейших исследованиях [14] установлено, что лАТГ и крАТГ различаются по фармакокинетике, по воздействию на нейтрофилы, на субпопуляции лимфоцитов и на характер цитокинового ответа. Возможно, это объясняет особен-

ности воздействия того и другого препарата на кроветворение при АА.

Отсутствие гематологического ответа на первый курс АТГ в течение 6 мес обычно расценивают как рефрактерное течение АА, требующее интенсификации проводимого лечения. Проблема терапии РАА, касающаяся 30–40% больных АА, остается во многом нерешенной [15]. В тех случаях, когда на первом этапе лечения не была реализована ТКМ от гистосовместимого родственного донора, считается необходимым проведение этого метода лечения, позволяющего добиться хорошего результата у большинства больных АА. ТКМ от неродственного донора, несмотря на значительное повышение эффективности этого метода лечения в последние годы, как правило, не рассматривают как метод терапии 1-й линии больных АА [3, 4, 16]. Тем не менее поиск донора костного мозга (родственного или неродственного) должен начинаться с момента установления диагноза АА, а проведение ТКМ – на первом или втором этапах лечения в зависимости от возраста больного, клинической ситуации, согласно существующим клиническим рекомендациям.

Повторные курсы АТГ (как лАТГ, так и крАТГ) в сочетании с ЦсА могут оказывать эффективными [17] только у 30% больных, не ответивших на 1-й курс АТГ, и лишь у 18% больных, резистентных к первым двум курсам АТГ. Опубликованные результаты рандомизированного исследования эффективности монотерапии алемтузумабом и терапии крАТГ в сочетании с ЦсА у больных РАА свидетельствуют об одинаковой эффективности этих двух методов с положительным ответом у 30–40% больных [18]. Авторы [18] полагают, что терапия алемтузумабом может рассматриваться как альтернативный АТГ метод лечения больных АА, не ответивших на 1-й курс АТГ.

Несмотря на повторные курсы АТГ, применение других иммуносупрессивных препаратов и различных альтернативных протоколов лечения, у 10–20% больных АА сохраняется глубокая панцитопения, зависимость от трансфузий компонентов крови (эритроцитов и/или тромбоцитов) и опасность развития тяжелых, угрожающих жизни, инфекционных и геморрагических осложнений. Длительная гемотрансфузионная терапия на фоне нарушения обмена железа, связанного с патогенезом АА, достаточно быстро приводит к функциональным изменениям, обусловленным перегрузкой железом, не только костного мозга, но и таких органов, как печень и сердце. Поэтому в программах лечения РАА очень важную роль играет хелаторная терапия. В последних публикациях корейских исследователей [19] отмечена возможность положительной динамики гематологических показателей у больных АА при длительном применении деферазирокса. Разработка оптимальных программ и алгоритмов лечения больных АА остается актуальной задачей

исследований в области современной клинической гематологии.

Последние годы активно изучаются особенности течения заболевания и ответа на ИСТ в случаях выявления у больных АА клона клеток, характерных для пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ-клона) с недостаточностью белков GPI-комплекса, защищающего мембраны клеток от воздействия терминальных компонентов системы комплемента. Прогностическое значение этого феномена с точки зрения эффективности ИСТ является предметом исследований [20, 21].

Цель настоящей работы – изучение эффективности повторных курсов терапии АТГ, алгоритм их проведения в сочетании с длительным приемом ЦсА, определение частоты выявления и динамику ПНГ-клона у больных АА на разных этапах ИСТ.

### Материалы и методы

В исследование включены 86 больных АА (51 мужчина и 35 женщин) в возрасте от 17 до 65 лет (медиана 23 года), получавших ИСТ и находившихся на лечении в Гематологическом научном центре (ГНЦ), Москва, с 2007 по 2013 г. Давность заболевания с момента диагностирования АА до начала ИСТ (1-й курс АТГ): от 1 до 25 (медиана 4) мес. Диагноз и вариант течения АА устанавливали по общепринятым критериям [22]: ТАА диагностирована у 66 больных, нетяжелая АА (НАА) – у 20 больных.

С целью дифференциальной диагностики, а также выявления возможных клональных осложнений, таких как миелодиспластический синдром, всем больным, включенным в исследование, в момент установления диагноза и далее проводили цитогенетическое исследование костного мозга. Хромосомные aberrации в данной группе больных не обнаружены. До 2011 г. всем больным в начале и в течение заболевания для исключения ПНГ определяли сахарозную пробу и пробу Хема. При выявлении клинических и лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза больных в данное исследование не включали. С 2011 г. в протокол обследования всех больных АА для определения ПНГ-клона включен метод проточной цитометрии. Исследование на наличие ПНГ-клона проводили в 2011–2012 гг. в лаборатории клинической и лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования (зав. – д-р мед. наук С.А. Луговская), в 2012–2013 гг. в лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга ФГБУ ГНЦ Минздрава России (зав. – канд. мед. наук И.В. Гальцева) с помощью стандартного протокола выявления ПНГ-клона в эритроцитах и лейкоцитах, опубликованного в практических рекомендациях по высокочувствительной проточной цитометрии для выявления и мониторинга ПНГ-клона. [23]. Клетки с недостаточностью GPI-белков выявляли с помощью моноклональных антител: линейно-специфичных – CD45-PerCP, CD15-APC, CD64-APC, CD235-FITC, антител к GPI-белкам – CD24-PE (гранулоциты), CD14-PE (моноциты), CD59-PE (эритроциты) и FLAER-Alexa488. С помощью данной методики размеры ПНГ-клона по гранулоцитам, моноцитам и эритроцитам были прослежены у 33 больных. В настоящей работе представлен анализ динамики ПНГ-клона по гранулоци-



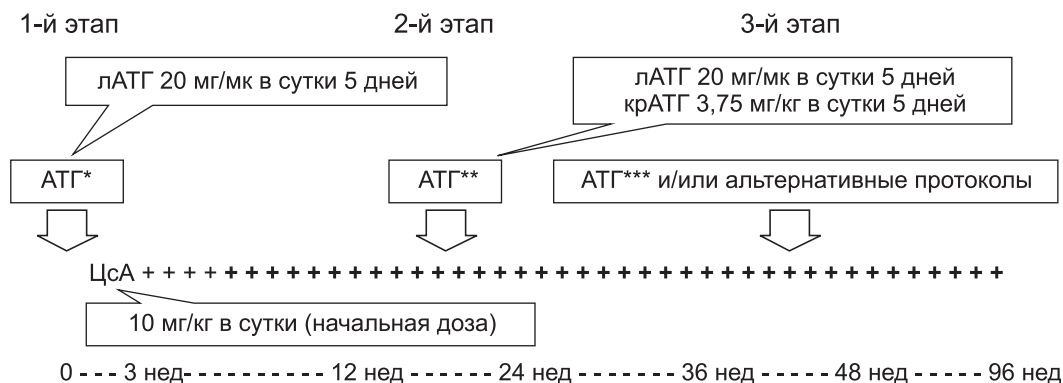


Рис. 1. Алгоритм иммуносупрессивной терапии у больных апластической анемией.

\* – 1-й курс АТГ; \*\* – 2-й курс АТГ; \*\*\* – 3-й курс АТГ.

там, среди которых ПНГ-клон до проведения ИСТ был выявлен у 20 (61%) больных: у 11 (33%) больных ТАА, у 9 (28%) больных НАА. Медиана ПНГ-клона по гранулоцитам составила 1,93% (0,1–99,5%). При этом ПНГ-клон менее 1% (минорный) был выявлен у 10 (50%) из 20 больных и более 1% – у 10 (50%) больных.

Комбинированную ИСТ проводили по протоколам [22]. Она включала: 1-й курс – лАТГ (АТГАМ) 20 мг/кг в сутки в течение 5 дней, 2-й курс – лАТГ 20 мг/кг в сутки (20 больных) и крАТГ (тимоглобулин) 3,75 мг/кг в сутки в течение 5 дней (5 больных), 3-й курс – лАТГ 20 мг/кг в сутки (5 больных). ЦсА назначали после окончания введения АТГ в дозе 10 мг/кг в сутки с последующим индивидуальным подбором дозы в зависимости от переносимости и токсичности препарата и продолжением курса не менее 2 лет (не менее 1 года после достижения стабильной ремиссии). Отмену препарата проводили по 50 мг каждые 2 нед. Алгоритм проводимой ИСТ представлен на рис. 1.

На предшествующих этапах течения заболевания все больные получали заместительную терапию компонентами крови, у 17 больных проведена спленэктомия.

Результаты лечения оценивали по следующим критериям: ремиссия (полная или частичная) – полная или частичная нормализация показателей гемограммы (гемоглобин более 100 г/л, гранулоциты более  $1,5 \cdot 10^9/л$ , тромбоциты более  $100 \cdot 10^9/л$ ) и отсутствие потребности в заместительной терапии компонентами крови; клинико-гематологическое улучшение – улучшение показателей гемограммы (гемоглобин более 80 г/л, гранулоциты более  $0,5 \cdot 10^9/л$  (для ТАА) и более  $1 \cdot 10^9/л$  (для НАА), тромбоциты более  $20 \cdot 10^9/л$ ), исчезновение или значительное уменьшение зависимости от трансфузий компонентов крови [20].

Смерть больного в первые 3–4 мес от начала ИСТ расценивали как раннюю. С целью оценки эффективности ИСТ больных обследовали через 3, 6, 9, 12, 18, 24 мес и далее ежегодно. Медиана наблюдения за больными от момента начала ИСТ (1-го курса АТГ) составила 36 (6–84) мес.

Статистический анализ данных осуществляли с помощью методов описательной статистики. Вероятность выживаемости общей и бессобытийной анализировали с помощью построения кривых по методу Каплана–Мейера.

### Результаты

Комбинированная ИСТ, включавшая несколько курсов АТГ и длительное лечение ЦсА, оказалась эффективной у 73 (84,9%) из 86 больных АА: у 54 (81,8%) из 66 больных ТАА и у 19 (95%) из 20 больных НАА было достигнуто клинико-гематологическое улучшение. В дальнейшем у 56 (65,1%) из 86 отмечено развитие ремиссии. Не ответили на лечение 13 (15,1%) из 86 больных АА: 12 (18,2%) из 66 больных ТАА и 1 (5%) из 20 больных НАА.

На 1-й курс АТГ, проведенный 86 больным, положительный ответ (клинико-гематологическое улучшение) получен у 53 (61,6%) больных, при этом из 66 больных ТАА на лечение ответили 36 (54,5%) больных, 17 (85%) из 20 больных НАА. Ремиссии в дальнейшем были получены у 47 (54,5%) из 86 больных, а полные ремиссии у 40 (46,5%) из 86 больных (табл. 1).

Через 3 мес после 1-го курса клинико-гематологическое улучшение отмечено у 19 (28,8%) из 66 больных ТАА и у 12 (60%) из 20 больных НАА. Общий ответ в течение первых 6 мес был получен

у 30 (45,5%) из 66 больных ТАА и у 17 из 20 (85%) больных НАА.

Анализ характера и времени развития ответа на 1-й курс АТГ у больных АА, ответивших на лечение, выявил следующие особенности развития ответа (табл. 2).

Клинико-гематологическое улучшение у 19 (52,8%) из 36 ответивших больных

Эффективность курсов лечения АТГ у больных АА

Курс АТГ	Тяжесть АА	Число больных	Положительный ответ, гематологическое улучшение		Ремиссия		Полная ремиссия		Отсутствие ответа	
			абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1-й курс АТГ	ТАА	66	36	54,5	32	48,5	29	44	30	45,5
	НАА	20	17	85	15	75	11	55	3	15
	Всего...	86	53	61,6	47	54,5	40	46,5	33	38,4
2-й курс АТГ	ТАА + НАА	25	16	64	7	28	3	12	9	36

Таблица 2

## Характер и время развития ответа на 1-й курс АТГ у 53 больных АА

Характер ответа у больных ТАА и НАА	Время развития ответа в зависимости от тяжести АА															
	ТАА (n = 36)								НАА (n = 17)							
	3 мес		6 мес		12 мес		более 12 мес		3 мес		6 мес		12 мес		более 12 мес	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Клинико-гематологическое улучшение	19	52,8	11	30,6	3	8,3	3	8,3	12	70,6	1	5,9	3	17,6	1	5,9
Ремиссия	6	16,7	4	11,1	16	44,4	3	8,3	2	11,8	6	35,3	3	17,7	4	23,5

ТАА отмечено уже через 3 мес от начала лечения, а еще 11 (30,6%) ответили через 6 мес. Первоначальный ответ на лечение был получен через 3 мес у 12 (70,6%) из 17 больных НАА. Медиана развития клинико-гематологического улучшения как у больных ТАА, так и у больных НАА составила 3 мес. У 47 (88,7%) из 53 больных, ответивших на 1-й курс АТГ, были достигнуты ремиссии. Полные ремиссии были зарегистрированы у 40 (85,1%) из 47 больных. Ремиссия в течение первых 6 мес лечения была достигнута только у 10 (27,8%) из 36 больных ТАА, медиана развития ремиссии составила 9 мес. Через 6 мес от начала ИСТ ремиссия была установлена у 8 (47,1%) из 17 больных НАА, медиана развития ремиссии 6 мес.

Не ответили на 1-й курс АТГ 33 (38,4%) из 86 больных. Ранняя летальность составила 5,8%. Причиной смерти у всех 5 больных были тяжелые инфекционные осложнения бактериальной и грибковой природы. Из не ответивших на лечение больных АА 1 больная (ТАА) умерла через 6 мес после проведения 1-го курса АТГ в связи с развитием тяжелых инфекционных и геморрагических осложнений. Течение болезни после 1-го курса АТГ у 2 больных на момент анализа неизвестно.

Эффективность 2-го курса АТГ оценивали у 25 больных (ТАА – 21 и НАА – 4), не ответивших на 1-й курс АТГ (см. табл. 1). Медиана интервала между 1-м и 2-м курсами АТГ составила 6 (3–18) мес. Эффективность повторных курсов АТГ определяли независимо от варианта течения болезни. Положительный ответ получен у 16 (64%) из 25 больных. Через 3 мес на лечение ответили 5 (20%) из 25 больных, через 6 мес – 8 (32%) из 25 больных. Общее число больных, ответивших на лечение в течение 6 мес после 2-го курса АТГ, 13 (52%) из 25 больных, а в течение 1 года 15 (60%) из 25 больных. Ремиссии в дальнейшем были достигнуты у 7 (28%) из 25 больных, полные ремиссии – только у 3 (12%) из 25 больных.

Анализ характера и времени развития ответа у больных АА, ответивших на 2-й курс АТГ, позволил отметить следующие особенности развития ответа (табл. 3).

Клинико-гематологическое улучшение

у 5 (31,3%) из 16 ответивших больных наступило уже через 3 мес после 2-го курса АТГ; еще через 3 мес, фактически через 6 мес, ответили дополнительно 3 (18,8%) из 16 больных. Через 12 мес после 2-го курса АТГ ответ получен еще у 7 (43,8%) больных. Медиана развития клинико-гематологического улучшения составила 6 мес. Ремиссии в дальнейшем были достигнуты у 7 (43,8%) из 16 больных, ответивших на 2-й курс АТГ, полные ремиссии – только у 3 (42,9%) из 7 больных. У 5 из 7 больных развитие ремиссии отмечено на 6–12 месяце от момента проведения 2-го курса АТГ, медиана развития ремиссии 10 мес.

Не ответили на 2-й курс АТГ 9 (36%) из 25 больных. Из не ответивших на лечение больных АА 1 больная умерла через 16 мес после проведения 2-го курса АТГ от инфекционных и геморрагических осложнений. У 8 больных после 2-го курса АТГ сохранялись выраженная анемия, тромбоцитопения и зависимость от трансфузий донорских эритроцитов и тромбоцитов. В программу лечения у 6 из 8 больных была включена спленэктомия. У 2 больных после спленэктомии через 6 и 10 мес отмечено клинико-гематологическое улучшение со значительным снижением зависимости от гемотрансфузий, у 1 больного сохранялись цитопения (анемия и тромбоцитопения).

У 5 больных (ТАА – 4, НАА – 1), не ответивших на 2-й этап лечения (2 больных после 2 курсов АТГ и 3 – после 2 курсов АТГ и спленэктомии), был проведен 3-й курс АТГ. Медиана интервала между 2-м и 3-м курсами составила 9 (3–15) мес. Положительный ответ был получен у 3 из 5 больных, ремиссия (частичная) была достигнута у 2 из 3 больных. Через 33 мес от начала ИСТ 1 больная умерла из-за про-

Таблица 3

## Характер и время развития ответа на 2-й курс АТГ у больных АА

Характер ответа на 2-й курс больных АА	Время развития ответа у больных АА, не ответивших на 1-й курс АТГ (n = 16)							
	3 мес		6 мес		12 мес		более 12 мес	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Клинико-гематологическое улучшение	5	31,3	3	18,8	7	43,8	1	6,3
Ремиссия	1	6,3	2	12,6	3	18,9	1	6,3

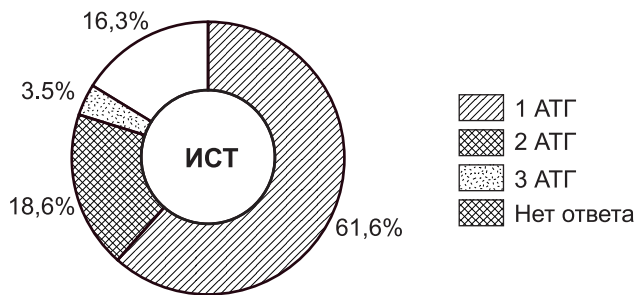


Рис. 2. Объем иммуносупрессивной терапии, необходимый для достижения ответа.

Ответ на 1 курс АТГ получен у 53 (61,6%) больных, на 2 курса АТГ ответили еще 16 (18,6%) больных, на 3 курса АТГ – 3 (3,5%) больных.

грессирующего геморрагического синдрома (кровотечение в головной мозг) на фоне рефрактерности к проводимой заместительной терапии трансфузиями донорских тромбоцитов. У 1 больного сохранялись цитопения и зависимость от гемотрансфузий.

Таким образом, на комбинированную ИСТ ответили 72 (83,7%) из 86 больных. Для достижения положительного ответа проведение 1-го курса АТГ оказалось достаточным для большинства больных АА – 53 (61,6%) из 86. Еще 16 (18,6%) больных ответили на терапию развитием стабильного клинико-гематологического улучшения после 2-го курса, у 3 (3,5%) больных потребовалось проведение 3 курсов АТГ (рис. 2).

При этом ремиссии были получены у 56 (65,1%) из 86 больных. Общая медиана достижения положительного ответа от начала ИСТ составила 6 (1–43) мес, общая медиана развития ремиссии – 8 (2–31) мес, медиана продолжительности ремиссии к моменту анализа – 25 (1–81) мес.

Рецидивы диагностированы у 5 (8,9%) из 56 больных, у которых ранее была получена ремиссия. Все рецидивы протекали с возобновлением панцитопении и возвращением зависимости от трансфузий донорских тромбоцитов и эритроцитов; медиана развития рецидива 29 (14–39) мес. Рецидив АА развивался у больных в сроки от 2 до 15 (медиана 7) мес после отмены ЦсА. Положительно ответили после возобновления курса лечения ЦсА 2 больных. У 3 больных был проведен курс АТГ, на который 2 ответили развитием повторных ремиссий через 4 и 6 мес. Умер 1 больной в результате прогрессирования АА и развития тяжелого геморрагического синдрома и инфекционных осложнений.

Общая и бессобытийная 7-летняя выживаемость больных АА, получавших комбинированную ИСТ, составила 89% – 95% доверительный интервал (95% ДИ 83–96%) и 93% (95% ДИ 88–97%) соответственно (рис. 3).

Определение ПНГ-клона у 33 больных АА до начала ИСТ, в процессе проведения ИСТ и на различных этапах течения заболевания позволило выявить следующую динамику. Из 20 больных АА с ПНГ-клоном, обнаруженным до начала ИСТ, у 16 больных размеры клона не менялись в процессе

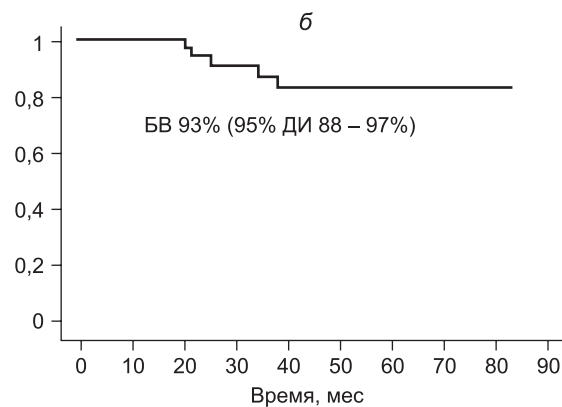
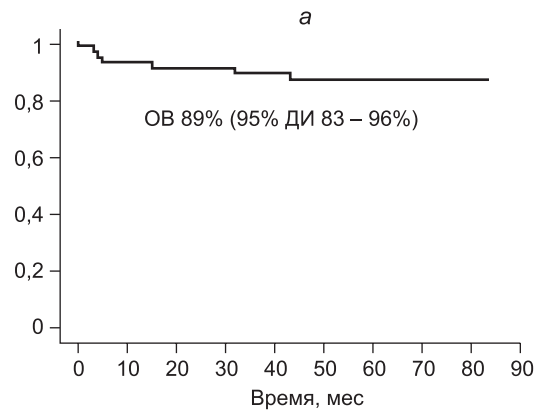


Рис. 3. Общая (а) и бессобытийная (б) выживаемость больных апластической анемией.

наблюдения за больными, у 3 больных размеры клона по гранулоцитам уменьшились более чем в 5 раз: у 1 больного с 18,4 до 2,6%, у 1 – с 22,4 до 3,2%, у 1 – с 15,7 до 2,7% и у 1 больного произошло полное исчезновение ПНГ-клона.

На лечение ответили 17 (85%) из 20 больных АА, протекавшей с ПНГ-клоном, обнаруженным до начала ИСТ.

У 6 из 13 больных АА без ПНГ-клона до начала ИСТ в процессе лечения и наблюдения зафиксированы появление и дальнейшая персистенция ПНГ-клона, размеры которого по гранулоцитам колебались от 0,1 до 5,8% (медиана 2,5%). Появление ПНГ-клона у этих больных обнаружено на фоне положительной динамики гематологических показателей с последующим развитием стойкого гематологического ответа.

Среди больных АА, у которых до начала лечения ПНГ-клон не был обнаружен, на лечение ответили 8 (61%) больных, включая 6 больных, у которых в дальнейшем был обнаружен ПНГ-клон. К моменту анализа 5 из 13 больных на лечение не ответили.

#### Обсуждение

Анализ результатов комбинированной ИСТ у 86 больных АА показал высокую эффективность программы, включающей повторные курсы АТГ и длительную терапию ЦсА. Используемый алгоритм лечения позволил у большинства (84,9%) больных АА получить положительный ответ, а у 76,7% ответивших больных было отмечено развитие ремис-



сии, из них у 76,8% полной ремиссии. 53 (61,6%) из 86 больных ответили после 1-го курса АТГ, при этом через 3 мес от начала лечения клинико-гематологическое улучшение было достигнуто уже у 52,8% больных, а общий ответ через 6 мес наблюдался у 83,4% больных. Этот период времени (3–6 мес от начала ИСТ) в случаях отсутствия ответа на 1-й курс АТГ следует рассматривать как оптимальный для проведения 2-го курса АТГ. После 2-го курса АТГ положительный ответ был получен еще у 16 больных, т. е. после двух курсов АТГ положительно ответили 69 (80,2%) из 86 больных. Больные АА, не ответившие после 2-го курса АТГ, через 6–9 мес от начала ИСТ могут быть отнесены к группе больных РАА. Эти больные, несомненно, требуют продолжения интенсивной ИСТ (возможен 3-й курс АТГ), реализации ТКМ, если она не была проведена ранее, а также включения в программу лечения альтернативных методов (спленэктомия, агонисты тромбопоэтина, алемтузумаб, хелаторная терапия).

Все 86 больных на 1-м этапе и 5 больных на 3-м этапе лечения получали лАТГ; на 2-м этапе у 5 из 25 больных был использован крАТГ. Сравнительный анализ эффективности этих препаратов в данной работе не проводили. Повторные курсы лАТГ не сопровождались усилением аллергических реакций на введение препарата или более тяжелыми проявлениями сывороточной болезни.

Программа лечения больных АА, используемая в ГНЦ (Москва), включает длительный прием ЦсА (не менее 24 мес) с медленной отменой препарата при получении хорошего стабильного ответа (частичной или полной ремиссии). Продолжительность курса применения ЦсА в программах комбинированной ИСТ до настоящего времени является предметом обсуждения в статьях, посвященных эффективности современной терапии больных АА. В 1990-е годы использовали короткие курсы терапии ЦсА (6 мес) в сочетании с АТГ, в дальнейшем рекомендовалось длительное лечение ЦсА: не менее 1 года после становления ремиссии. В 2014 г. опубликованы результаты изучения влияния продолжительности курса терапии ЦсА на время и частоту развития рецидивов АА [24]. Авторы установили, что частота развития рецидива не зависит от продолжительности курса лечения ЦсА, но при длительном курсе (не менее 2 лет) увеличивается продолжительность ремиссии и отдалается на 1 год время развития рецидива. Известно, что к 5 годам рецидив может развиться у  $\frac{1}{3}$  больных АА, ранее ответивших на лечение. Возможно, небольшое число (8,9%) рецидивов среди больных нашей группы можно объяснить не только длительным приемом ЦсА, но и тем, что медиана наблюдения за больными, включенными в данную работу, от момента начала ИСТ и до времени проведения анализа результатов лечения еще невелика и составляет 36 мес. Дальнейшее наблюдение за больными позволит определить частоту рецидивов в более поздние сроки.

Результаты нашего исследования подтверждают вероятность лучшего ответа на ИСТ больных АА, протекающей с ПНГ-клоном [20, 25]. Несомненно, этот факт требует дальнейшего изучения и тщательного наблюдения за динамикой ПНГ-клона и характером ответа на ИСТ у больных АА. Это позволит выработать наиболее эффективные программы лечения этой категории больных.

Вероятность длительной бессобытийной и общей выживаемости у больных АА, получавших комбинированную ИСТ поэтапно в определенной последовательности в рамках данной работы, оказалась достаточно высокой. Однако 15% больных не ответили на проведенное лечение. Разработка эффективных методов терапии больных рефрактерной АА остается актуальной задачей дальнейших исследований.

*Авторы благодарят заведующую кафедрой клинической и лабораторной диагностики РМАПО Минздрава России, доктора мед. наук, проф. С.А. Луговскую и сотрудников лаборатории клинической и лабораторной диагностики РМАПО Минздрава России за помощь в диагностике ПНГ-клона методом проточной цитометрии в течение 2011 и 2012 гг.*

#### ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Владос Х.Х. Анемия. В кн.: Кончаловский М.П., ред. *Учебник внутренних болезней*. М.–Л.: Медгиз; 1939: 531–2.
- [Vladov Kh.Kh. Anemia. In: *Konchalovskiy M.P., ed. Textbook of internal medicine: clinical diseases of the hematopoietic system*. Moscow–Leningrad: Medgiz; 1939: 531–2]. (in Russian)
2. Young N.S., Calado R.T., Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*. 2006; 108(8): 2509–19.
3. Marsh J.C., Ball S.E., Cavenagh J., Darbyshire P., Dokal I., Gordon-Smith E.C., et al. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 2009; 147(1): 43–70.
4. Scheinberg P. Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2012; 2012: 292–300. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.292.
5. Gupta V., Eapen M., Brazauskas R., Carreras J., Aljurf M., Gale R.P., et al. Impact of age on outcomes after bone marrow transplantation for acquired aplastic anemia using HLA-matched sibling donors. *Haematologica*. 2010; 95(12): 2119–25.
6. Locasciulli A., Oneto R., Bacigalupo A., Socie G., Korthof E., Bekassy A., et al. Outcome of patients with acquired aplastic anemia given first line bone marrow transplantation or immunosuppressive treatment in the last decade: a report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2007; 92(1): 11–8.
7. Dufour C., Pillon M., Passweg J., Socie G., Bacigalupo A., Franceschetto G., et al. Outcome of aplastic anemia in adolescence: a survey of the Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica*. 2014; 99 (10):1574–81. doi: 10.3324/haematol.2014.106096.
8. Scheinberg P., Young N.S. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012; 120(6): 1185–96. doi: 10.1182/blood-2011-12-274019.
9. Scheinberg P., Nunez O., Young N.S. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. *Br. J. Haematol.* 2006; 133(6): 606–11.
10. Scheinberg P., Wu C.O., Nunez O., Scheinberg P., Boss C., Sloand E.M., Young N.S. Treatment of severe aplastic anaemia with combination of horse antithymocyte globulin and ciclosporin,

- with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica*. 2009; 94(3): 348–54.
11. Brodsky R.A., Chen A.R., Dorr D., Fuchs E.J., Huff C.A., Luznik L., et al. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. *Blood*. 2010; 115(3): 2136–41. doi: 10.1182/blood-2009-06-225375.
  12. Zhang F., Zhang L., Jing L., Zhou K., Wang H., Peng G., et al. High-dose cyclophosphamide compared with antithymocyte globulin for treatment of acquired severe aplastic anemia. *Exp. Hematol.* 2013; 41(4): 328–34. doi: 10.1016/j.exphem.2013.01.001.
  13. Scheinberg P., Nunez O., Weinstein B., Scheinberg P., Biancotto A., Wu C.O., Young N.S. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(5): 430–8. doi: 10.1056/NEJMoa1103975.
  14. Feng X., Scheinberg P., Biancotto A., Rios O., Donaldson S., Wu C.O., et al. In vivo effects of horse and rabbit antithymocyte globulin in patients with severe aplastic anemia. *Haematologica*. 2014; 99(9): 1433–40. doi: 10.3324/haematol.2014.106542.
  15. Marsh J.C., Kulasekararaj A.G. Management of the refractory aplastic anemia patient: what are the options? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2013; 2013: 87–94. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.87.
  16. Socie G. Allogeneic BM transplantation for the treatment of aplastic anemia: current results and expanding donor possibilities. *ASH Education Program Book. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2013; 2013: 82–6. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.82.
  17. Gupta V., Goron-Smith E.C., Cook G., Parker A., Duguid J.K.M., Keith M.O. A third course of anti-thymocyte globulin in aplastic anaemia is only beneficial in previous responders. *Br. J. Haematol.* 2005; 129(1): 110–7.
  18. Scheinberg P., Nunez O., Weinstein B., Scheinberg P., Wu C.O., Young N.S. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naïve, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. *Blood*. 2012; 119(2): 345–54. doi: 10.1182/blood-2011-05-352328.
  19. Cheong J.W., Kim H.J., Lee K.H., Yoon S.S., Lee J.H., Park H.S., et al.; Korean Society of Hematology Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome Working Party. Deferasirox improves hematologic and hepatic function with effective reduction of serum ferritin and liver iron concentration in transfusional iron overload patients with myelodysplastic syndrome or aplastic anemia. *Transfusion*. 2014; 54(6): 1542–51. doi: 10.1111/trf.12507.
  20. Nakao S., Sugimori C., Yamazaki H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int. J. Hematol.* 2006; 84(2): 118–22.
  21. Scheinberg P., Marte M., Nunez O., Young N.S. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica*. 2010; 95(7): 1075–80. doi: 10.3324/haematol.2009.017889.
  22. Михайлова Е.А., Савченко В.Г. Протокол программного лечения больных апластической анемией: комбинированная иммуносупрессивная терапия. В кн.: Савченко В.Г., ред. *Программное лечение заболеваний системы крови*. М.: Практика; 2012. т. 2: 135–50.
  - [Mikhaylova E.A., Savchenko V.G. The protocol of program treatment of patients with aplastic anemia: a combined immunosuppressive therapy. In: *Savchenko V.G., ed. The program treatment of blood system diseases*. Moscow: Praktika; 2012]. (in Russian)
  23. Sutherland D.R., Keeney M., Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2012; 82(4): 195–208. doi: 10.1002/cyto.b.21023.
  24. Scheinberg P., Rios O., Scheinberg P., Weinstein B., Wu C.O., Young N.S. Prolonged cyclosporine administration after antithymocyte globulin delays but does not prevent relapse in severe aplastic anemia. *Am. J. Hematol.* 2014; 89(6): 571–4.
  25. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M., Golubovskaya I., Kruchkova I., Bodarenko S., et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol.* 2014; 164(4): 546–54. doi: 10.1111/bjh.12661.

Поступила 16.10.14  
Received 16.10.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 615.382.03:616.151.514].012

## ВЫДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА ФVIII/ФВ ИЗ ПЛАЗМЫ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

Кутюрова О.Г., Дереза Т.Л., Скрялева И.А., Берковский А.Л.

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва

**Резюме.** Разработан лабораторный метод выделения и очистки комплекса фактора VIII (ФVIII) с фактором Виллебранда (ФВ), основанный на сочетании анионообменной хроматографии с методами осаждения. Оптимизированы условия осаждения с использованием ПЭГ-4000, позволяющие удалить не менее 65% основного балластного белка, фибриногена, со средним выходом ФVIII на данной стадии не менее 70%. Выход по ФVIII на ступени ионообменной хроматографии составил не менее 98%. Установлено, что основным параметром, определяющим соотношение компонентов в получаемом комплексе ФVIII/ФВ, является величина нагрузки на сорбент по специфической активности. Разработанный метод позволяет варьировать содержание ФВ от 1,9 до 0,23 МЕ на 1 МЕ ФVIII. Полученные результаты могут быть положены в основу технологии получения препаратов, оказывающих терапевтическое действие как при гемофилии А, так и при болезни Виллебранда.

**Ключевые слова:** свежемороженая плазма; криопреципитат; полиэтиленгликоль; ионообменная хроматография; комплекс ФVIII/ФВ.

## ISOLATION OF FVIII/VWF COMPLEX FROM DONOR PLASMA

Kutyurova O.G., Dereza T.L., Skryleva I.A., Berkovsky A.L.

Hematology Research Center, Moscow, 125167, Russia

**S u m m a r y.** Laboratory method for isolation and purification of factor VIII (FVIII) - von Willebrand's factor (vWF) complex is based on a combination of anion exchange chromatography with precipitation methods. The PEG-4000 precipitation conditions are optimized, due to which at least 65% main ballast protein (fibrinogen) is removed, and the mean output of FVIII at this stage reaches at least 70%. At the ion exchange chromatography