

терозиготных носителей β -талассемии, а наиболее распространенной оказалась замена IVSII+654C→T – у 18 (20%), найденная в России ранее всего один раз (1,6%). Следует отметить, что эта мутация практически не встречается в Средиземноморье и очень широко распространена в Китае (21,4%), Японии (12%) и странах Юго-Восточной Азии (5,1–46,3%). Вполне вероятно, что в Россию она проникла через Дальний Восток или Среднюю Азию (аналогичный мутантный аллель был найден нами у пациента из Казахстана). Мутация CD8delAA скорее всего пришла в Россию с Ближнего Востока через Кавказ. По нашим данным, она является мажорной в Азербайджане (35,8%) и Армении (52,4%), а также в Грузии

и Дагестане (малые выборки, нет статистики). С достаточно высокой частотой встречаются в России мутации IVSI+1G→A (13,3%), IVSI+110G→A (12,2%), IVSII+745C→G (8,9%) и IVSI+6T→C (7,8%). Все они имеют средиземноморское происхождение и могли прийти на территорию России через Кавказ или Балканы. Интерес представляет мутация IVSII+745, которая у всех российских пациентов, в отличие, например, от пациентов из Азербайджана или стран Ближнего Востока, сочетается с очень редким полиморфизмом CAP+20C→T, имеющим, вероятно, более позднее происхождение. Аналогичное сочетание до настоящего времени было найдено только в Болгарии и Испании.

Применение препарата анти тромбин III при лечении тромбозов у больных хроническими миелопролиферативными неоплазиями

Суханова Г.А., Вахрушева М.В., Колосова Л.Ю., Меликян А.Л.
ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Введение. Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ) – это обширная группа клональных Ph-позитивных и Ph-негативных неоплазий (ХМПН). Венозные тромбозы различной локализации встречаются при всех формах ХМПН. Частота портальных тромбозов составляет 10–20% при ХМПН и может развиваться на любой стадии заболевания. При острых портальных тромбозах рекомендуется антикоагулянтная терапия – гепарин, низкомолекулярные гепарины (НМГ), которая приводит к полному или частичному восстановлению просвета вен у 70–80% больных, у 20–30% больных лечение оказывается неэффективным.

Цель работы. Разработка методов повышения эффективности терапии тромботических осложнений при Ph-негативных ХМПН при резистентности к терапии антикоагулянтами и антиагрегантами в острой и подострой период тромбоза.

Материалы и методы. Для лечения острых и подострых портальных тромбозов мы впервые применили препарат Анти тромбин III ("Бакстер", Австрия) у 5 больных с различными вариантами ХМПН (3 – с первичным миелофиброзом и 2 – с эссенциальной тромбоцитемией). Препарат применяли у больных как с низким, так и с нормальным содержанием эндогенного АТIII в сочетании с НМГ в лечебных или профилактических дозах и базовой специфической (циторедуктивной) терапией. Препарат вводили в дозе 1000 МЕ 1 раз в 3 дня, 3–5 введений, т.е. курс лечения составлял 3000–5000 МЕ.

Результаты. Во всех случаях применения препарата Анти тромбин III отмечен положительный клинический эффект, заключающийся в быстром купировании болевого синдрома, у 3 из 5 больных после первого введения, и сравнительно с рутинной терапией ранней реканализацией тромбированных сосудов (от 3 нед до 1,5–2 мес). Препарат Анти тромбин III

применяли у больных, резистентных к стандартной терапии антикоагулянтами (гепарин, НМГ) и антиагрегантами. У 3 больных успешное лечение препаратом Анти тромбин III проведено в подострой стадии тромбоза (через 1,5; 2 и 5 мес от начала тромбоза), т.е. на сроках, когда рутинные методы малоэффективны. По коагулологическим показателям до и после лечения препаратом Анти тромбин III отмечены нормализация показателя растворимых фибрин-мономерных комплексов и D-димера и повышение уровня эндогенного АТIII.

Заключение. Анализ клинического применения препарата Анти тромбин III позволяет заключить следующее:

- применение данного препарата в дозе 1000 МЕ, 3–5 введений (суммарно 3000–5000 МЕ) способствует более быстрой реканализации тромбированных вен, чем при традиционной терапии гепарином или НМГ;
- выявлена высокая клиническая эффективность на разных стадиях тромбоза, в том числе при подострых тромбозах давностью от 1,5 до 5 мес;
- продемонстрирована высокая клиническая эффективность при тромбозах, резистентных к антикоагулянтной терапии (гепарин, НМГ);
- отмечена независимость клинического эффекта от исходного уровня эндогенного АТIII в плазме;
- важна возможность применения у больных при состояниях, связанных с высоким риском кровотечений (варикозно-расширенные вены пищевода, язвы желудка или двенадцатиперстной кишки с кровотечениями в анамнезе), и использования его в амбулаторных условиях;
- применение данного препарата у больных ХМПЗ при лечении портальных тромбозов не препятствует проведению специфической циторедуктивной терапии и применению антикоагулянтов.

ПЦР-диагностика болезней накопления – наследственного гемохроматоза, болезней Вильсона–Коновалова и Гоше

Февралева И.С., Лукина Е.А., Судариков А.Б.
ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Введение. Болезни накопления минеральных или органических веществ обусловлены наличием полиморфизмов в генах, кодирующих ферменты, которые участвуют в метаболизме этих веществ. Показано, что во многих случаях к накоплению железа приводят мутации C282Y, H63D и S65C в гене *HFE* (наследственный гемохроматоз), к накоплению меди – мутация H1069Q в гене *ATP7B* (болезнь Вильсона–Коновалова), к накоплению глюкоцереброзида – мутации N370S, IVS2+1, 84GG и L444P в гене *GBA* (болезнь Гоше).

Цель работы. Создание тест-систем на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для выявления наиболее часто встречающихся полиморфизмов, приводящих к возникновению наследственного гемохроматоза, болезней Вильсона–Коновалова и Гоше.

Материалы и методы. Геномную ДНК выделяли из периферической крови больных. С помощью базы данных GenBank проводили анализ последовательности ДНК в районе мутаций, на основании которого, используя программы BLAST и Primer 3, подбирали по 2 прямых праймера,

флюоресцентный зонд и обратный праймер для выявления каждого полиморфизма. 3'-конец одного из каждой пары прямых праймеров соответствовал нуклеотиду нормальной последовательности ДНК исследуемого гена, а другой соответствовал нуклеотиду мутантной последовательности. Для идентификации мутаций в функциональном гене *GVA* и исключения выявления мутаций в псевдогене подбирали обратный праймер, полностью гомологичный участку последовательности функционального гена и имеющий различия на 3'-конец с соответствующим участком псевдогена. Амплификация псевдогена в таком случае была исключена. Все олигонуклеотиды были синтезированы для проведения мультиплексной ПЦР-РВ в формате Taqman.

Результаты и обсуждение. Разработаны тест-системы для специфичного и быстрого выявления указанных полиморфизмов. Каждая из тест-систем предусматривает параллельное проведение двух мультиплексных ПЦР-РВ: первая –

с нормальными праймерами, вторая – с мутантными. При появлении соответствующего ПЦР-продукта только в первой реакции образец классифицируют как "без мутаций", при появлении ПЦР-продукта только во второй реакции – как "гомозигота по мутации", в обеих реакциях – как "гетерозигота по мутации".

Заключение. Тест-системы для выявления наиболее часто встречаемых мутаций, вызывающих наследственный гемохроматоз, болезни Вильсона–Коновалова и Гоше апробированы в ФГБУ Гематологический научный центр (Москва) и являются незаменимым инструментом для выявления и верификации диагнозов этих болезней. Кроме того, мы полагаем, что применение метода аллель-специфической ПЦР-РВ для обнаружения заведомо известных точечных мутаций, делеций и инсерций является высокоспецифичной, быстрой и недорогой заменой секвенированию и другим методам исследования мутаций.

Определение ПНГ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии

Фидарова З.Т.¹, Михайлова Е.А.¹, Гальцева И.В.¹, Устинова Е.Н.¹, Троицкая В.В.¹, Луговская С.А.², Наумова Е.В.², Почтарь М.Е.², Паровичникова Е.Н.¹, Савченко В.Г.¹

¹ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, Москва; ²Кафедра клинической лабораторной диагностики ГОУ ДПО РМАПО, Москва

Введение. Современная иммуносупрессивная терапия (ИСТ) значительно повышает эффективность лечения больных апластической анемией (АА), но 20–30% больных остаются рефрактерными к проводимой терапии. По данным международных исследований выявление ПНГ-клона при АА может расцениваться как фактор, предопределяющий хороший ответ на ИСТ.

Цель работы. Выявление и мониторинг ПНГ-клона у больных АА и определение его значения для оценки эффективности ИСТ.

Материалы и методы. В исследование включены 38 больных *de novo* АА в период с 05.2011 по 11.2013 г., медиана наблюдения 12 мес, медиана возраста 26 лет. Больных разделили на группы: 1-я группа – с наличием ПНГ-клона, 2-я группа – с отсутствием ПНГ-клона. Всем проводили ИСТ (АТГ и ЦА). Ответ на лечение оценивали как гематологическое улучшение – ГУ [Hb > 80 г/л, Гр > 1,0 (для ТАА > 0,5), Тр > 30]. ПНГ-клон определяли методом проточной цитометрии. Минорный клон менее 1%.

Результаты. До начала ИСТ ПНГ-клон выявлен у 55,2% больных: медиана эр. – 0,1%, гр. – 0,76%, мон. – 5%. К 3 мес лечения ГУ достигнуто у 47,4% больных, из которых 77,8% из 1-й группы и только 22,2% из 2-й группы. Среди больных, у которых не достигнуто ГУ к 3-му месяцу терапии (52,6%), соответственно преобладали больные из 2-й группы (65%), а у больных 1-й группы (35%) отличие было только по большему значению ПНГ-клона на моноцитах – 5,8% против 0,7% у ответивших на лечение. На момент анализа ГУ получено у 73,7% больных: в 1-й группе – у 47,4%, во 2-й группе – у 26,3%. У 6 больных 2-й группы отмечались появление и персистенция ПНГ-клона. Среди больных 1-й группы с ГУ у 1 больного наблюдалось исчезновение клона, а у 3 – увеличение клона и появление клинически выраженного внутрисосудистого гемолиза.

Заключение. Положительный ответ чаще достигался в группе больных с изначально выявленным ПНГ-клоном. Появление и персистенция ПНГ-клона у 6 больных после проведения ИСТ наблюдались при положительном ответе на терапию, что указывает на связь ответа на ИСТ с присутствием ПНГ-клеток.

Текстурный анализ морфологических особенностей лейкоцитов при заболевании лейкозом

Фурман О.Г., Глушен С.В.

Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова; Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение. Актуальность проблемы своевременной диагностики лейкозов обусловлена высокой степенью распространенности этой группы заболеваний. Современные методы терапии позволяют излечивать таких больных, которые еще в недавнем прошлом считались безнадежными. Однако жизнь пациента во многом зависит от того, как скоро начато лечение, поэтому своевременная постановка диагноза приобретает особое значение. Применение методов диагностики, отличающихся повышенной точностью, объективностью и высокой скоростью получения результатов, на первом этапе обследования позволило бы существенно упростить задачу выявления и дифференциальной диагностики лейкозов.

Цель работы. Изучить перспективность компьютерного анализа цитологических препаратов периферической крови больных с различными формами лейкозов с помощью текстурных параметров для дифференцировки заболеваний кроветворной системы на основе различий в фенотипах лейкоцитов.

Материалы и методы. Для изучения фенотипических особенностей лейкоцитов периферической крови была разработана методика количественной оценки их морфологии после окрашивания их флюорохромом Rhodamin В. Данная методика, реализованная с помощью флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse 50i (объектив Nikon 60x/0.80) и камеры Nikon DS-5M (цифровую съемку проводили программой Nis-elements F 3.0), позволила измерить текстурные параметры изображений клеток. Компьютерную обработку изображений производили с помощью программы CellProfiler (CellProfiler.com). Фенотипы лейкоцитов регистрировали по 13 параметрам: Angular Second Moment, Contrast, Correlation, Variance, Sum Variance, Difference Variance, Inverse Difference Moment (IDM), Sum Average, Entropy, Sum Entropy, Difference Entropy, Information Measure of Correlation 1, Information Measure of Correlation 2. Для обработки результатов использовали метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).