

Кобильанская В.А., Шилова Е.Р., Морозова Т.В., Тарковская Л.Р., Бессмельцев С.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА У ПАЦИЕНТОВ С АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ПНГ – КЛОНА

Резюме

Апластическая анемия (АА) – тяжелое заболевание системы крови, этиология которого в 70% – 80% случаев неизвестна. В основе патогенеза лежит повреждение стволовой клетки с замещением кроветворной ткани жировой тканью, с последующим развитием панцитопении в периферической крови. Одним из основных клинических симптомов заболевания является кровоточивость. Сама по себе группа больных с АА неоднородна не только по тяжести течения, но и по особенностям патогенеза заболевания. Так, более чем у половины больных данной группы при использовании современных

методов диагностики может выявляться АА, ассоциированная с пароксизмальной ночной гемоглобинурией (АА/ПНГ) – фенотипом клеток, для которого характерны нарушения в системе свертывания, способствующие повышенному тромбообразованию. В связи с этим, исследование особенностей изменений в системе гемостаза представляет значительный интерес. Целью настоящего исследования являлась оценка показателей системы гемостаза у пациентов с АА без ПНГ – клон, или имеющих минимальный клон (до 2%) с показателями пациентов, имеющих значимый ПНГ клон (более 25%) и группой с ПНГ – клоном > 90%.

Kobilyanskaya V.A., Shilova E.R., Morozova T.V., Bessmeltsev S.S.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology

DYNAMICS OF HYPERCOAGULABLE CHANGES IN THE HEMOSTASIS SYSTEM IN PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA IN THE PRESENCE OF A CLINICALLY SIGNIFICANT PNH CLONE

Abstract

Aplastic anemia (AA) is a serious disease of the blood system, the etiology of which is unknown in 70% - 80% of cases. The main clinical symptom of the disease is bleeding. By itself, the group of patients with AA is heterogeneous not only in terms of the severity of the course, but also in terms of the pathogenesis of the disease. Thus, more than half of the patients in this group, using modern methods of diagnostics, can detect AA associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH) a cell phenotype

characterized by disturbances in the coagulation system that contribute to increased thrombus formation, expressed in severe forms of the disease. In this regard, the study of the features of changes in the hemostasis system, both coagulation and platelet level, is of interest. The aim of this study was to compare the parameters of the hemostasis system in patients with AA without PNH-clone, or having a minimal clone (up to 2%) with those of patients with a significant PNH clone (more than 25%) and in the group with PNH-clone > 90.

Введение. Апластическая анемия (АА) – тяжелое заболевание системы крови, характеризующееся панцитопенией в периферической крови и гипоклеточным (вплоть до полной аплазии) костным мозгом с замещением децельной кроветворной ткани жировой тканью. Первое описание заболевания, сделанное П. Эрлихом (P.Ehrlich), относится к 1888 г. Этиологический фактор более чем в половине случаев неизвестен (идиопатические формы), а в остальных – возникновение АА связывают с различными химическими, физическими факторами, инфекциями (постгепатитные АА, формы, ассоциированные с цитомегаловирусной, парвовирусной инфекцией и др.) [1]. Согласно современным представлениям, основанным на многочисленных электронно-микроскопических, иммунологических и культуральных

методах исследования, основным патогенетическим механизмом развития аплазии кроветворения при АА является иммуноопосредованное повреждение кроветворной стволовой клетки. Одновременно не исключаются функциональный дефект стволовых кроветворных клеток и патология кроветворного микроокружения [1,3,9]. В результате этого развивается панцитопения, одним из основных проявлений которой является геморрагический синдром. Заболевание встречается в большинстве регионов Европы и Америки с частотой 2-3 случая в год на 1 млн. населения. Отмечается два пика заболеваемости: в возрасте от 10 до 25 лет и у лиц старше 60 лет без существенных различий по полу. Выраженный геморрагический синдром у больных АА связывают с тромбоцитопенией, снижением активности некото-

рых факторов свертывания крови, отсутствием ретракции кровяного сгустка [1]. Вместе с тем, у пациентов, находящихся в периоде частичной или полной ремиссии, отмечаются некоторые особенности при исследовании системы гемостаза, которые не так широко описаны в научной литературе, как геморрагические проявления. Согласно современным представлениям, более чем у половины больных АА может быть выявлен ПНГ-клон [3,10]. Пароксизмальная ночная гемоглинурия (ПНГ) – это редкое, жизнеугрожающее, прогрессирующее, инвалидизирующее заболевание, характерным проявлением которого является неконтролируемая активация системы комплемента, в результате чего усиливается внутрисосудистый гемолиз, приводящий к высвобождению свободного гемоглобина. Термином ПНГ-клон называют клоны клеток со своеобразным нарушением структуры мембраны – сниженной экспрессией или отсутствием на поверхности клеток белковых структур, обеспечивающих защиту собственных клеток от деструктивного воздействия активированного комплемента. У страдающих ПНГ данный дефект является самостоятельной патологией, и размер клона колеблется в широких пределах. Наряду с самостоятельным заболеванием ПНГ-клон встречается почти у 70% больных АА [2,4,8]. Исследованиями последних лет показано, что для ПНГ характерно выраженное протромботическое состояние, которое имеет сложный патофизиологический механизм и клинически проявляется как венозными, так и артериальными тромбозами различной локализации. Обусловленный ПНГ хронический гемолиз значительно увеличивает риск тромботических событий, которые наблюдаются у 29%–44% больных, являясь причиной летального исхода в 40%–67% случаев тяжелого течения ПНГ. Существенно, что первый эпизод тромбоза может стать фатальным, увеличивая при этом риск летального исхода в 5–10 раз [3].

Цель работы. Оценить динамику изменений в системе гемостаза у пациентов с апластической анемией при выявлении клинически значимого ПНГ-клона.

Материалы и методы. Исследование показате-

лей системы гемостаза было проведено у 21 пациента. Выделено 2 группы (I и II): в первую вошли 8 пациентов с АА в стадии полной ремиссии с клинически незначимым ПНГ-клоном (менее 10% общей популяции клеток крови), во вторую – 8 пациентов со значительным (от 25% до 50%) клоном. Пациенты обеих групп были сопоставимы по возрасту и степени тяжести АА. Группой сравнения (III) служили 5 больных с первичным диагнозом ПНГ, аналогичные по возрасту и имевшие лабораторные и клинические проявления внутрисосудистого гемолиза с повышением уровня ЛДГ и билирубина, периодическим потемнением мочи и снижением уровня гемоглобина. У всех пациентов, вошедших в исследование, геморрагических проявлений на момент обследования не отмечалось и уровень тромбоцитов колебался от 90 до 190x10⁹/л. Все три группы сравнивались между собой и с группой из 20 практически здоровых доноров. Для оценки системы гемостаза использовались следующие скрининговые показатели: активированное парциальное тромбoplastинное время (индекс АПТВ), протромбиновый тест по Квику (ПТ), концентрация фибриногена (Фг), активность фактора VIII. Также оценивалась антикоагулянтная система: анти-тромбин III (АТ III) и протеин С (РС). Исследование агрегационной функции тромбоцитов с различными агрегирующими агентами проводили на агрегометрах AP-2110 (СОЛАР) и AT-02 (НПФ «МЕДТЕХ»). Измерялась максимальная амплитуда (МА) агрегации кровяных пластинок с использованием раствора АДФ в конечной концентрации 5 мкМ, коллагена в концентрации 2 мкг/мл и ристомицина в концентрации 1,2 мг/мл. Для статистической обработки использовали программу STATISTICA 6.1.

Результаты. При сравнении показателей I и II группы больных с группой здоровых лиц, а также между собой и с III группой достоверных различий в показателях скрининговых тестов не выявлено. Как видно из таблицы 1, достоверное (p<0,05) изменение АПТВ по сравнению с группой здоровых лиц было выявлено лишь в группе III, что свидетельствует о гиперкоагуляции в данной группе больных.

Таблица 1

Показатели скрининговых тестов системы гемостаза у пациентов с апластической анемией

Обследованные группы	N	Показатели Медиана (Q1-Q2)		
		Индекс АПТВ,	Протромбин, %	Фибриноген, г/л
Здоровые лица	36	1,02 (0,98-1,07)	93,4 (91,0-105,4)	2,73 (2,34-3,15)
I группа больных (АА)	8	0,98 (0,9-1,2)	98,5 (89,5-110,0)	2,83 (2,83-3,3)
II группа больных (АА + ПНГ-клон)	8	0,95 (0,88-1,0)	94,5 (89,5-109,5)	2,35 (1,93-3,3)
III группа больных (ПНГ)	5	0,81* (0,88-0,8)	91,0* (89,0-99,0)	2,8 (2,3-3,0)

*– различия достоверны по сравнению с группой здоровых лиц

У пациентов I группы, отмечалось значимое повышение активности фактора VIII (таблица 2), что, как известно, является признаком гиперкоагуляции (160,5%; $p < 0,001$). Активность антитромбина оставалась в норме, а активность РС была существенно выше относительно нормальных значений (108,5%; $p < 0,001$), что может свидетельствовать о компенсаторной функции системы гемостаза. Во II группе больных активность фактора VIII была выше, а уровень антитромбина значимо ниже по сравнению с пациентами I группы ($p < 0,001$), что указывает на растущую гиперкоагуляцию на фоне появления

ПНГ-клона. Активность РС в данной группе больных была ниже не только нормальных значений, но и по сравнению с активностью РС у больных первой группы (83,5%, $< 0,001$).

В третьей группе пациентов с ПНГ значимо было увеличение активности фактора VIII по сравнению с группой здоровых лиц. Между собой по активности фактора VIII, группы больных I, II и III групп достоверно не различались, хотя наблюдалась тенденция роста активности этого фактора при появлении ПНГ-клона (табл. 2).

Таблица 2

Некоторые показатели активности факторов свертывания и антикоагулянтов у пациентов с АА

Обследованные группы	N	Активность факторов свертывания крови и антикоагулянтов Медиана (Q1-Q2)		
		Активность ф. VIII, %	Активность АТ III, %	Активность РС, %
Здоровые лица	20	132 (99-157)	89 (85-92)	96,95 (80,1-105,9)
I группа больных (АА)	8	160,5 (136,5-171)*	99 (90,5-106)	108,5 (102-119,5)*
II группа больных (АА + ПНГ-клон)	8	188 (148,5-190,5)*	86 (80,5-90) #	83,5 (80-91,5)*,#
III группа больных (ПНГ)	5	209 (204-212)*	92 (92-100)	90 (87-100)

* – различия достоверны по сравнению с группой здоровых лиц

– различия достоверны по сравнению с группой АА

Представлял также интерес изучение агрегационной функции тромбоцитов при исследовании данных групп больных. Индивидуальный анализ,

индуцированной агрегации тромбоцитов, представлен в таблице 3.

Таблица 3

Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с АА, максимальная амплитуда (МА), %

Индукторы агрегации	АДФ5 мкМ	Коллаген 2 мкг/мл	Ристомицин 1,2 мг/мл
Нормальные колебания	33-65	38-73	51-95
Пациенты I группы			
1.	28,2	35,8	49,8
2.	32,4	37,8	50,6
3.	30,8	37,2	50,1
4.	31,9	36,3	48,2
5.	67,4*	75,6*	94,5
Пациенты II группы			
1.	31,4	37,3	48,7
2.	35,1	36,9	51,6
3.	34,8	38,5	50,9
4.	33,9	37,1	52,3
5.	68,7*	76,9*	92,6

Пациенты III группы			
1.	64,4	56,6	57,4
2.	57,4	52,0	53,4
3.	48,3	47,4	65,8
4.	72,2*#	76,6*#	91,1
5.	70,1*#	77,4*#	92,8

* - повышение агрегации тромбоцитов (МА) по сравнению с нормой

- повышение агрегации тромбоцитов (МА) в III группе по сравнению с группой I

Как видно из этой таблицы, у 4 пациентов I и II группы (всего 8 больных) наблюдалось снижение агрегации тромбоцитов при исследовании с АДФ и коллагеном. Но, в то же время, по 1 больному из каждой группы имели явно повышенную агрегацию тромбоцитов по сравнению с группой здоровых лиц. В III группе у 2 из 5 пациентов также агрегация тромбоцитов с АДФ и коллагеном была увеличена. При сравнении полученных данных в III и I группе выявлено увеличение количества больных с повышенными показателями, одновременно возросло значение максимальной амплитуды агрегации кровяных пластинок. При этом обращало на себя внимание, что значение МА увеличивалось по мере роста ПНГ-клона.

Обсуждение. Со времени первого описания Паулем Эрлихом апластической анемии прошло более 100 лет, но и сегодня это заболевание остается в центре внимания гематологов и врачей смежных специальностей. Известно, что основой патогенеза АА в большинстве случаев является иммунологически опосредованное угнетение гемопоэза. При этом, согласно современным представлениям, более чем у половины больных АА выявляется ПНГ-клон, что оказывает значительное влияние на течение болезни [3,11,12]. Выраженный геморрагический синдром у больных АА связывают с тромбоцитопенией, снижением активности некоторых факторов свертывания крови, отсутствием ретракции кровяного сгустка. Данные показатели приходили к нормальным значениям после адекватной терапии [2,9,11,13]. Вместе с тем, у пациентов, находящихся в периоде частичной или полной ремиссии, наблюдались некоторые особенности при исследовании системы гемостаза, которые, не так широко описаны в научной литературе, как геморрагические проявления [5,6,7,9].

Нами было проведено сравнение некоторых показателей системы гемостаза у пациентов с АА без ПНГ-клона, или имеющих минимальный клон (менее 10%) с показателями пациентов, имеющих клинически значимый ПНГ-клон (более 25%) и группой пациентов с ПНГ-клоном > 90%. На фоне нормальных показателей скрининговых тестов у пациентов с АА отмечалось значимое повышение активности фактора VIII, что, как известно, является признаком гиперкоагуляции. Активность антитромбина оставалась в норме, а уровень протеина С был достоверно

но выше нормальных значений, что, на наш взгляд, может свидетельствовать о компенсаторной функции антикоагулянтной системы гемостаза. В группе больных АА+ПНГ - клон активность фактора VIII была достоверно выше, а уровень антитромбина значимо ниже по сравнению с пациентами с АА, что указывает на гиперкоагуляцию на фоне появления ПНГ-клона. Активность РС в данной группе была ниже не только нормальных значений, но и по сравнению с первой группой больных. В группе больных с ПНГ также наблюдалось значимое увеличение активности фактора VIII. По мере увеличения ПНГ-клона при исследовании тромбоцитов значение МА увеличивалось, хотя ни у одного больного АА тромбоцитических осложнений не зарегистрировано. Тем не менее, в отношении таких больных, по-видимому, должна быть настороженность в плане риска тромбоцитических событий при становлении ремиссии с повышением уровня тромбоцитов и при наличии дополнительных тромбогенных факторов риска.

Заключение

У больных АА с выявленным ПНГ – клоном наблюдалось повышение активности фактора VIII, снижение уровня антитромбина и протеина С, что является маркерами гиперкоагуляционного состояния. Тромбоциты также вносят свой вклад в активацию системы гемостаза. Немногочисленность исследованной группы не позволяет провести достоверный статистический анализ, но полученные данные отражают характерные изменения, ассоциированные с наличием ПНГ-клона, что диктует необходимость дальнейших исследований в этом направлении. Выявленные особенности системы гемостаза при АА и сопутствующем ей ПНГ - клоном открывают новые возможности предупреждения развития опасных для жизни тромбоцитических событий у больных, что будет способствовать снижению летальности и повышению качества их жизни.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Вклад авторов

Концепция и дизайн: все авторы

Сбор и обработка данных: все авторы

Предоставление материалов исследования: все авторы
Анализ и интерпретация: все авторы

Подготовка рукописи: все авторы
Окончательное одобрение рукописи: Бессмельцев С.С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С. Апластическая анемия - СПб.: Наука: KN – 1995. – 232 с.
2. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Козлов В.А. Апластическая анемия: иммунопатогенез, клиника, диагностика, лечение. – Новосибирск: Наука – 2008. - №1. – 236 с.
3. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобуринемии. // Клиническая фармакология и терапия. – 2015. - № 1. – С. 18-26.
4. Kilick S. B., Bown N. Cavenagh J. et al. Cuidelines for the diagnosis and management adult aplastic anaemia // J. Haematology. - 2016 – Vol. 172, N 2 – P. 187-207.
5. Кобилянская В.А., Бессмельцев С.С., Морозова Т.В., Шилова Е.Р. Изменение некоторых показателей в системе гемостаза у пациентов с апластической анемией в стадии ремиссии. // Вестник гематологии. – 2017. – Т. XIII, №3. – С. 41-42.
6. Морозова Т.В., Кобилянская В.А., Шилова Е.Р., Гельцер И.В. Исследование функциональной активности тромбоцитов у больных апластической анемией. //Вестник гематологии - 2017. – Т.XIII, №3. – С. 52.
7. Шилова Е.Р., Морозова Т.В., Кобилянская В.А. Особенности изменений в тромбоцитарном звене гемостаза у больных апластической анемией // Вестник гематологии - 2018. – Т. XIV, №1. – С. 47-48.
8. Шилова Е.Р. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия вчера и сегодня – проблемы и решения. //Вестник гематологии – 2021. – Т.XVII, №1. – С. 73-77.
9. Chaparro C.M., Suchdev P.S. Anemia epidemiology, pathophysiology and middle-income countries //Ann. N Y Acad. Sci. – 2019 – Vol. 1450, N 1. – P.15-31.
10. Contejean A., Resche – Rigon M., Jerom Tamburini J. et al. Aplastic anemia in elderly: a nationwide survey on the French Reference Centre for Aplastic Anemia // Haematologica. – 2019. – Vol. 104, N 2. – P. 256-262.
11. Gaspar B.L., Sharma P., Das R. Anemia in malignancies: pathogenetic and diagnostic considerations // Hematology. – 2015. – Vol. 20. - P. 18-25.
12. Tichelli A., Rovo A., Marsh J. Congenital and Acquired Bone Marrow Failure. Chapter 12 – Treatment of Elderly Patients with Aplastic Anemia. – 2017. – P. 141-151.
13. Федорова З.Д., Котовщикова М.А., Абдулкадыров К.М., Бессмельцев С.С., Кацадзе Ю.Л., Попова Т.И. Система гемостаза у больных гипопластической анемией в процессе лечения антилимфоцитарным глобулином// Гематол. и трансфузиол. -1987. - №4. - С.7-11.