

На правах рукописи

НИКУЛИНА ОЛЬГА ФЕДОРОВНА

ЛЕЧЕНИЕ ОСТРЫХ И РЕЗИСТЕНТНЫХ ФОРМ АУТОИММУННОЙ  
ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ И МОНИТОРИНГ АКТИВНОСТИ ГЕМОЛИЗА

Специальность 14.00.29 – гематология и переливание крови

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва 2008

Работа выполнена в государственном некоммерческом учреждении  
Гематологический научный центр Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

Старший научный сотрудник,  
кандидат медицинских наук                      Н.В. Цветаева

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор А.К. Голенков  
доктор медицинских наук, профессор С.А. Луговская

Ведущее научное учреждение:

Федеральный Научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и  
иммунологии федерального агентства по здравоохранению и социальному  
развитию РФ

Защита состоится «.....» ..... 2008 г. в ..... час  
на заседании диссертационного совета Д 001.042.01  
в Гематологическом научном центре РАМН  
по адресу: Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4а

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Гематологического научного  
центра Российской Академии медицинских наук

Автореферат разослан «.....» ..... 2008

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук    Е.Е. Зыбунова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Аутоиммунные гемолитические анемии (АИГА) – группа заболеваний, обусловленных выработкой аутоантител против антигенов эритроцитов. В результате происходит ускоренное разрушение эритроцитов, аутоенсибилизованных иммуноглобулинами различных классов и комплементом.

Стандарты диагностики и терапии аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) остаются неизменными уже много лет. Однако при проведении первой линии терапии преднизолоном ремиссии составляют всего 7,3-22% (А.И. Воробьев, 2005, Dacie J. 1962, Paskman C., Leddy J.1995). Актуальность поиска новых возможностей лечения АИГА определяется необходимостью длительного приема кортикостероидных препаратов, приводящих к тяжелым осложнениям, возвратом гемолитических кризов при попытке их отмены, укорочением продолжительности ответа при повторном применении и противоречивыми результатами использования других видов иммуносупрессивной терапии. Первостепенной задачей лечения острых АИГА является выбор пути наиболее быстрого прерывания гемолиза. В этих случаях пульс-терапия метилпреднизолоном может стать альтернативой «стандартным» дозам преднизолона, поскольку она давно и успешно используется при тяжелых формах других аутоагрессивных заболеваний (Liebling M.R, 1981, Caldwell D. 1991, Hari P, 1998, Pasricha J.S, 2003). В литературе нет достаточных сведений об эффективности пульс-терапии при АИГА, (Ozsoylu S. 1990, 2000, Meyer O. et al. 1997) как и нет ответа, может ли она уменьшить число инвалидизирующих последствий общепринятого длительного режима кортикостероидной терапии (Stanbury R., Grham E. 1998, Bialas M, Routledge P. 1998, Lester . R. et al. 1998).

В 1998 году в клинической практике применен препарат Ритуксимаб - моноклональное антитело к антигену CD20, экспрессируемому на поверхности зрелых В-лимфоцитов (Coiffer V.et al. 1998, Leget G., et al. 1998). В зарубежных исследованиях была показана высокая эффективность Ритуксимаба при разных аутоиммунных процессах, в том числе, у небольшого числа больных с резистентными АИГА (Stasi R. Et al. 2001, Lee E. Et al. 2000, Kakaiya R. 2003, Szodoray P., Alex P, 2004). Новая терапия на первом этапе позволила получить ремиссии в 50-80% случаев (Zecca M, 2003, Erdozain J.G., Irastorza R., 2004, Petz L.,

Garatty G. 2004). Однако, необходим дальнейший научно-практический анализ значимости Ритуксимаба, поскольку стабильность полученных результатов, оптимальная дозировка, спектр и частота побочных эффектов, а также возможность повторного введения при рецидиве заболевания и отдаленные последствия остаются мало изученными.

Основные симптомы и лабораторные признаки гемолиза (гемоглобин, ретикулоциты, билирубин, ЛДГ) позволяют констатировать уже состоявшийся гемолитический криз. Поэтому очень важен поиск других, доступных показателей гемолитической активности, мониторинг которых дает возможность подтвердить стабильность достигнутой ремиссии, выявить ранние проявления рецидива и обосновать либо прекращение поддерживающей терапии, либо проведение превентивного, противорецидивного курса. Было показано, что при АИГА в разные периоды течения болезни такие биофизические свойства эритроцитов, как плотность и деформируемость существенно изменяются, что создало перспективу их использования в контроле ответа на лечение (Шурхина Е.С, Лисовская И.Л, 2004). Кроме того, исследование плотности и деформируемости эритроцитов, расширяет информацию о свойствах эритроцитов при различных патологиях и может быть использовано в дифференциальной диагностике некоторых анемии, а в дальнейшем для коррекции терапии. Биохимическое определение среднего содержания креатина в эритроцитах может стать еще одним рациональным методом измерения активности гемолиза на разных этапах АИГА. Колебания уровня креатина эритроцитов, как и количество ретикулоцитов в крови, являются интегральным показателем активности эритропоэза (Griffiths W., Fitzpatrick M., 1967). Однако, поскольку высокое содержание креатина свойственно только молодым эритроцитам и по мере их старения оно постепенно снижается, этот показатель более полно отражает изменение доли всех молодых эритроцитов, а не только ретикулоцитов (Griffiths W., Fitzpatrick M. 1967, Дмитриева М.Г. 1998). Иными словами креатин эритроцитов остается высоким даже тогда, когда уже нет ретикулоцитоза, так как молодые эритроциты продолжают циркулировать еще 2-3 недели.

Важно, что все три метода просты в исполнении, не требуют дорогостоящих реактивов и оборудования и могут найти применение в широкой клинической

практике в качестве методов оценки активности гемолиза, а также диагностики некоторых форм анемий и контроля терапии.

**Цель исследования** - разработать оптимальные режимы лечения острых и резистентных форм АИГА и новый алгоритм мониторинга активности гемолиза с использованием оценки деформируемости, плотности и количества креатина эритроцитов.

### **Задачи исследования**

1. Проанализировать эффективность пульс-терапии при острых формах АИГА и выработать оптимальную тактику ведения данной группы больных.
2. Оценить эффективность и проанализировать особенности лечения Ритуксимабом резистентных форм АИГА.
3. Выявить характерные различия деформируемости и плотности эритроцитов при некоторых формах анемий и АИГА. Оценить клиническое значение мониторинга изменений деформируемости, плотности и количества креатина эритроцитов на разных этапах течения АИГА для контроля активности гемолиза.
4. Создать оптимальный алгоритм лечения и контроля за его эффективностью при острых и резистентных формах АИГА с неполными тепловыми агглютинами.

**Научная новизна.** Выявлены преимущества пульс-терапии метилпреднизолоном острых форм АИГА перед «стандартным» режимом лечения преднизолоном: а) отсутствие серьезных побочных эффектов, свойственных длительному лечению преднизолоном; б) быстрота первичного ответа не только без потери в отдаленных результатах, но и с большей частотой ремиссии. Доказана высокая эффективность лечения Ритуксимабом резистентных форм АИГА. Выработан новый подход к контролю эффективности лечения АИГА с помощью мониторинга деформируемости, плотности и уровня креатина эритроцитов, определяющего степень стабильности ремиссии и ранние признаки рецидива гемолиза. Выявлены характерные различия деформируемости и плотности эритроцитов при некоторых формах анемий, улучшающие их дифференциальную диагностику и контроль ответа на терапию.

**Практическая значимость.** Оптимизирована тактика лечения острых и резистентных форм АИГА с использованием пульс-терапии метилпреднизолоном и Ритуксимаба. Разработан новый алгоритм контроля активности гемолиза в процессе лечения АИГА, включающий измерение деформируемости, плотности и содержания креатина эритроцитов, который позволяет констатировать глубину ремиссии или раннее проявление рецидива. Показано, что измерение в динамике фильтрационно-осмотических свойств и креатина эритроцитов - информативный и простой в исполнении комплекс тестов, повышающий достоверность дифференциальной диагностики анемий и улучшающий возможности контроля лечения не только АИГА, но и ряда других анемий.

**Внедрение результатов в практику.** Результаты внедрены в работу отделения химиотерапии лейкозов и патологии эритрона и других отделений Гематологического Научного Центра РАМН, а также Московского консультативного гематологического центра и кафедры гематологии РМАПО.

Настоящая работа является фрагментом темы, выполняемой по плану НИР ГНЦ РАМН «Создание программ скрининговой диагностики и мониторинга лечения больных гемолитическими анемиями» (2003-2007 гг.), N 01200301559

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 научных работ в отечественной и зарубежной литературе.

**Апробация работы.** Тема настоящей работы утверждена на Ученом Совете ГУ ГНЦ РАМН 30.03.2004 г. (протокол N2). Работа апробирована 28.05.07 на заседании проблемной комиссии ГНЦ РАМН «Опухоли лимфатической системы, патология красной крови. Порфирии». Основные положения диссертации доложены на научной конференции: «Новое в гематологии и трансфузиологии» (апрель 2004, Москва), на Всероссийских декадах по гематологии (ГНЦ РАМН апрель 2005, 2006, 2007, Москва), терапевтическом обществе г. Москвы (октябрь 2006).

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 159 страницах. Состоит из введения, 4 глав, включая обзор литературы, материалы и методы, результатов собственных исследований, заключения и выводов. Библиографический указатель

содержит 143 источника, в том числе 36 работ отечественных авторов. В работе 44 рисунка и 14 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Общая характеристика больных.** Обследовано 50 больных АИГА, выявленных среди 578 пациентов, направленных в ГНЦ РАМН с подозрением на гемолитическую анемию в 2001-2007 гг., 46 из них были с первичной формой заболевания. Среди наблюдавшихся было 33 женщины и 17 мужчин в возрасте от 17 до 68 лет. Продолжительность наблюдения (Me) составила 52 (9-120) мес. Диагноз АИГА устанавливали до начала лечения на основании общепринятых критериев - анемии, повышения уровня ретикулоцитов, непрямого билирубина, ЛДГ и положительной прямой пробы Кумбса. По типу антител диагностировали АИГА с неполными тепловыми агглютинами (n=38), с полными холодowymi агглютинами (n=6), смешанными антителами (n=2). В связи с рецидивами гемолиза на кортикостероидной терапии 22 больным была удалена селезенка (ремиссии в 54% случаев). Специальный подбор больных не проводили. Поскольку в ГНЦ РАМН направляли наиболее тяжелых пациентов, это создавало определенный характер выборки, что следует учитывать в будущем при экстраполяции результатов. Ошибочный первичный диагноз АИГА при обследовании в ГНЦ РАМН был изменен у 38% больных (наиболее часто это были пароксизмальная ночная гемоглобинурия и В12 дефицитная анемия, а также болезнь Мошковица, септический эндокардит, наследственный сфероцитоз).

Длительный анализ динамики изменений гемограммы, биофизических свойств эритроцитов и количества в них креатина проводили в основной (n=38) группе больных -АИГА с неполными тепловыми агглютинами.

При хроническом течении АИГА снижение гемоглобина и развитие симптомов анемии было постепенным, в течение 1-2 месяцев. Данной категории больных (n=28) была проведена общепринятая терапия преднизолоном - 1 мг/кг/день (далее называемая «стандартной»). Острое течение АИГА наблюдали у 17 пациентов. Быстрое падение гемоглобина, повышение ретикулоцитов и непрямого билирубина, нарастание слабости, головокружения, бледности, адинамии, одышки без физической нагрузки происходили в течение 2 -14 дней. Такой темп анемизации опасен

развитием комы и требовал неотложной терапии, что способствовало разработке нового алгоритма ведения больных острой АИГА.

**Критерии оценки эффективности терапии.** Эффективность терапии оценивалась по достижению клинко-гематологической ремиссии. Вариант ответа констатировали, если показатели крови больного соответствовали одной из трех нижеуказанных совокупностей критериев на фоне проводимой терапии.

*Клинической ремиссией* заболевания считали полное восстановление показателей гемограммы (Hb > 120 г/л, Rt менее 10%, непрямого билирубин менее 20 мкмоль/л), на период не менее двух месяцев. *Частичная ремиссия* определена, как подъем гемоглобина более 100 г/л, снижение ретикулоцитов и непрямого билирубина в два раза по сравнению с началом гемолитического криза. *Отсутствие ответа на терапию или резистентность* констатировали при незначительной положительной динамике или улучшении, продолжительностью менее одного месяца.

Из ряда дополнительных тестов оценки активности гемолиза для мониторинга были выбраны следующие: определение распределения эритроцитов по плотности (РЭПП), измерение деформируемости эритроцитов с помощью фильтрационно-осмотического метода (ФИОМ) и среднюю концентрацию креатина в них, которые сравнивали с основными параметрами, характеризующими активность гемолиза.

**Методы исследования.** Динамическое наблюдение и лечение пациентов осуществлялось в отделении химиотерапии лейкозов и патологии эритрона (научный руководитель – д.м.н, профессор Н.Д. Хорошко) Гематологического Научного Центра РАМН (директор – академик РАН и РАМН, профессор А.И.Воробьев). В процессе обследования больных помимо рутинных лабораторных и инструментальных методов гематологической практики использовали специализированные методы выявления и дифференциации гемолитических и других форм анемий, перечисленные ниже.

- Скрининговые гемолитические тесты - в.н.с. ГНЦ к.м.н. С.В. Колодей в отд. химиотерапии лейкозов и патологии эритрона (научный руководитель – д.м.н., профессор Н.Д.Хорошко).
- Исследование прямой пробы Кумбса, холодовых антител проводили в лаборатории иммуногематологии (зав. лабораторией к.м.н. Головкина Л.Л.);



- Место секвестрации эритроцитов с Cr51 исследовала с.н.с., к.м.н. Н.Ш Сагдиева в радиоизотопной лаборатории (руководитель – д.м.н. профессор Я.Д. Сахибов)

- Тесты, используемые для мониторинга показателей активности гемолиза (далее обозначаемые как «дополнительные»), которые в процессе наблюдения за больными сопоставляли с основными параметрами активности гемолиза (Hb, ретикулоциты, билирубин):

1. исследование среднего содержания креатина в эритроцитах (методом Griggiths, на спектрофотометре «Spectrum») проведено с.н.с., к.б.н. М.Г. Дмитриевой (отд. химиотерапии гематологических заболеваний и интенсивной терапии, научн. руководитель - доц., к.м.н. С.К. Кравченко);

2. исследование деформируемости эритроцитов фильтрационно-осмотическим методом (ФИОМ) и распределения эритроцитов по плотности (РЭПП) выполнено автором диссертации совместно со с.н.с., к.б.н. Шурхиной Е.С. (лаб. физической биохимии системы крови (руководитель лаборатории - проф. Ф.И.Атауллаханов).

*Определение деформируемости эритроцитов фильтрационно-осмотическим методом (ФИОМ) проводили в период диагностики заболевания, в процессе проведения лечения и достижения клинко-гематологической ремиссии. У большинства больных исследования повторяли через 1-2 месяца, в острый период болезни – каждые 2 недели. Тщательный мониторинг позволил более полно охарактеризовать биофизические свойства эритроцитов в разные периоды течения АИГА. Известно, что фильтруемость эритроцитов (ФЭ) определяется их способностью к обратимому изменению формы - деформируемостью. Для исследования фильтруемости венозной крови использовали гемореометр Ида-1, разработанный и изготовленный в лаборатории физической биохимии ГНЦ РАМН (патент РФ N 2052194). В основе метода лежит измерение фильтруемости эритроцитов при различных осмолярностях среды через фильтры с диаметром пор 3 мкм. Оценивали значение осмолярности, при котором эритроциты из-за гипоосмотического набухания перестают фильтроваться – критическую осмолярность ( $U_{cr}$ ). Продолжительность исследования занимает 15 минут.*

*Распределение эритроцитов по плотности (РЭПП) исследовали с помощью фталатного метода Данон-Мариковского (Danon D., Marikovsky Y.J, 1964).*

Определяли процентное содержание легкой ( $d_{лег}$  - клетки с плотностью менее

1,086г/мл) и тяжелой ( $d_{\text{тяж}}$  - клетки с плотностью более 1,112 г/мл) фракций эритроцитов, первая из которых представлена ретикулоцитами и гипохромными эритроцитами, а другая дегидратированными, «поврежденными» эритроцитами. Метод заключается в разделении суспензий эритроцитов по плотности с помощью набора смесей диметил- и дибутил-фталатов известной плотности. Гематокритные капилляры последовательно заполняли смесями фталатов известных плотностей ( $d$ ) от 1,068 г/мл до 1,138 г/мл, добавляли исследуемый образец крови (высота столбика 50 мм). После центрифугирования (10' при 12000 g) эритроциты, имеющие плотность выше фталатов попадали в нижнюю часть капилляров и отделялись от более легких клеток и плазмы смесью фталатов. Высоту столбиков эритроцитов измеряли (мм) и рассчитывали их процентное содержание.

В процессе терапии Ритуксимабом также проводили мониторинг:

- а) показателей трех классов иммуноглобулинов крови путем иммунохимического исследования (лаб. гуморального иммунитета, зав. - к.м.н. Варламова Е.Ю.);
- б) количества В- и Т-лимфоцитов периферической крови, до и после курса Ритуксимаба, на проточном цитофлуориметре (марка FACS Calibur) с использованием ограниченной панели (CD19-FITC, CD20-PE, CD22-PE, CD45-PECy5, CD3- PECy5) проведено Е.М. Грецовым в лаборатории функциональной морфологии гемобластозов (зав. лаборатории профессор Воробьев И.А.);

Статистический анализ результатов исследования проводился совместно с руководителем отдела компьютеризации ГНЦ РАМН Б.В. Зингерманом и лабораторией медицинской статистики ГНЦ РАМН (руководитель к.т.н. С.М. Куликов).

За коллегиальную помощь и содействие в проведении работы автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам этих отделений и лабораторий: д.м.н. проф. Н.Д. Хорошко, д.б.н. проф. Ф.И.Атауллаханову, проф. Г.И. Козинцу, к.м.н. В.С. Журавлеву, к.б.н. Е.С. Шурхиной, к.м.н. С.В. Колодей, к.б.н. М.Г. Дмитриевой, к.б.н. А.А. Левиной, д.м.н. проф Л.Г. Ковалевой, Е.М. Грецову, к.м.н. О.А. Дягилевой, к.б.н. О.В. Поповой, к.м.н. Н.Ш.Сагдиевой, Л.Ю. Тихоновой.

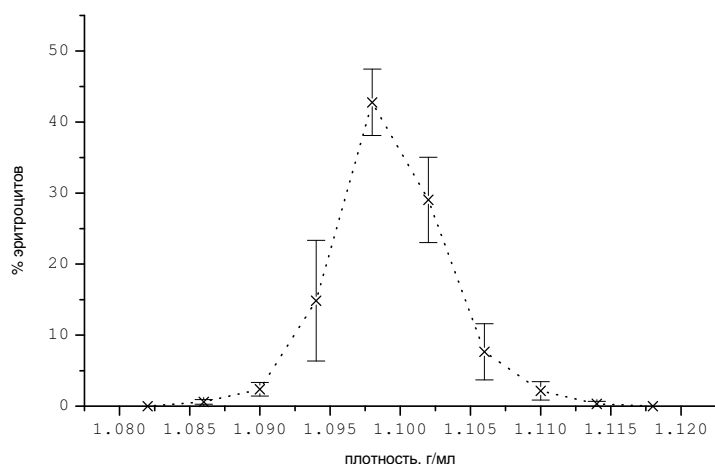
## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Изменение деформируемости и плотности эритроцитов при различных видах анемий.

Чтобы оценить возможности метода при АИГА, его клиническую значимость и объективность получаемых результатов, плотность и деформируемость эритроцитов исследовали у доноров (n=21), а также в контрольных группах больных другими формами анемий – наследственной микросфероцитарной (МСЦ) (n=30), пароксизмальной ночной гемоглобинурией (ПНГ) (n=8), железодефицитной анемией (ЖДА) (n=20).

У здоровых доноров распределение эритроцитов по плотности (РЭПП) находились в пределах 1,086 – 1,114 г/мл (рис.1). Средняя плотность эритроцитов доноров ( $d_{\text{ср}}$ ) составила  $1,099 \pm 0,001$  г/мл. В норме доли легкой ( $d_{\text{лег}} 0,3 \pm 0,3\%$ ) и тяжелой ( $d_{\text{тяж}} 0,5 \pm 0,3\%$ ) фракций эритроцитов были минимальными.

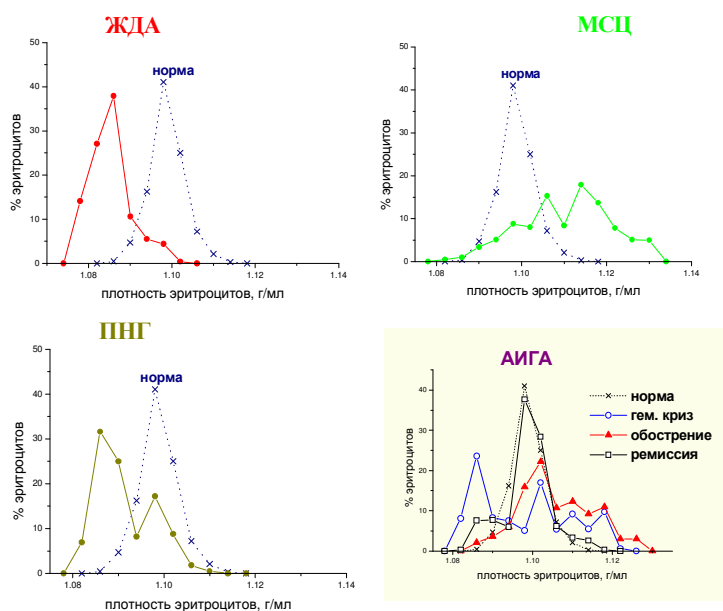
Было показано, что при некоторых патологиях РЭПП существенно меняется. Так у больных с ЖДА, за счет снижения содержания гемоглобина в эритроцитах, выявлено увеличение легкой фракции эритроцитов ( $d_{\text{лег}} 8,5 \pm 3,9\%$ ) и уменьшение эритроцитов средней плотности. При МСЦ преобладают эритроциты тяжелой фракции ( $d_{\text{тяж}} - 24,5 \pm 13\%$ ), состоящей из дегидратированных эритроцитов с высокой концентрацией гемоглобина, превышающих норму в 10-20 раз.



**Рис. 1** Распределение эритроцитов по плотности (РЭПП) у здоровых доноров (n=21).

При ПНГ присутствуют эритроциты как легкой фракции ( $d_{\text{лег}} 21,5 \pm 5,7\%$ ), так и нормальной плотности, создающих два пика на кривой РЭПП, что помогает в

дифференциальной диагностике с ЖДА. При определении РЭПП у больных АИГА в период активного гемолиза отмечено увеличение эритроцитов как легкой, так и тяжелой фракции. Их уровень значительно, в 10-50 раз, превышал норму и отличался от изменений в эритроцитах при всех других видах анемии ( $d_{\text{лег}}$  -  $12,0 \pm 8\%$  и  $d_{\text{тяж}}$  -  $25,6 \pm 9\%$ ). В ремиссии АИГА форма кривой распределения эритроцитов по плотности поэтапно возвращалась к параметрам плотности эритроцитов здоровых лиц. Для наглядности характерные отличия РЭПП отдельных больных с различными формами анемий представлены на.



**Рис. 2** Различия распределения эритроцитов по плотности у отдельных больных с разными анемиями

Деформируемость эритроцитов также различается в зависимости от патологии. Среднее значение параметра  $U_{cr}$  было значительно увеличено при МСЦ -  $231 \pm 23$  мОсм ( $n=30$ ), в отличие от ПНГ -  $U_{cr} = 197 \pm 2$  мОсм ( $n=8$ ). При ЖДА ( $n=20$ ) и гетерозиготной форме  $\beta$ -талассемии ( $n=19$ ) средние значения  $U_{cr}$  равны соответственно  $184 \pm 7$  и  $166 \pm 8$  мОсм и достоверно отличаются друг от друга ( $p < 0,001$ ).

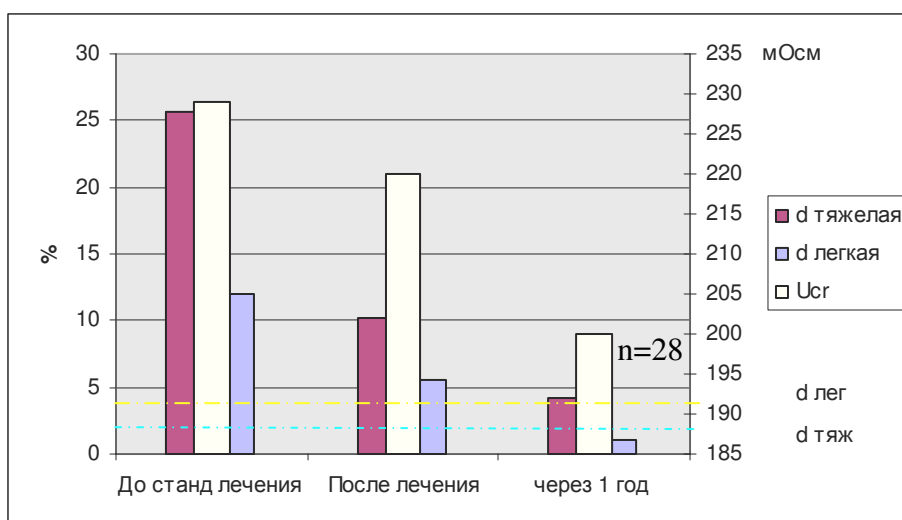
Таким образом, учет биофизических свойств эритроцитов, во-первых, упрощает дифференциальную диагностику анемий, что способствует уменьшению

диагностических ошибок, а во-вторых, динамика их изменений может использоваться для подтверждения верного выбора тактики лечения.

### Оценка эффективности лечения АИГА «стандартными» дозами преднизолона.

«Стандартное» лечение преднизолоном в дозе 1 мг/кг провели 28 больным АИГА (9 мужчин и 19 женщин) с неполными тепловыми агглютинами. Возраст больных находился в диапазоне 17 – 68 (Me=43) лет. При первичном обследовании уровень Hb, в среднем, составил  $68,2 \pm 13,8$  г/л, ретикулоцитоз  $91,3 \pm 70,6\%$ , непрямого билирубин –  $56,1 \pm 27,2$  мкмоль/л, ЛДГ превышала норму в 2 – 4 раза. Прямая проба Кумбса была положительная. При первичном исследовании, в период гемолитического криза, дополнительные тесты, контролирующие активность гемолиза, выявили расширение РЭПП за счет обеих патологических фракций эритроцитов ( $d_{\text{лег}}$  –  $12,0 \pm 8,0\%$  и  $d_{\text{тяж}}$  –  $25,6 \pm 9\%$ ), их ухудшенную фильтруемость  $U_{\text{cr}}$   $229 \pm 42$  мОсм (N 190-200 мОсм) и увеличение содержания креатина в эритроцитах ( $28,6 \pm 13,0$  мг/дл при норме  $5,7 \pm 1,5$  мг/дл). Корреляция ( $r=0,69$ ,  $p<0,05$ ) между уровнем креатина и долей легкой фракции эритроцитов, подтвердила, что  $d_{\text{лег}}$  представлена в основном ретикулоцитами. Повышение уровня гемоглобина до 80 г/л через 10 – 21 день от начала терапии отмечено у всех 28 больных (через десять дней – у 20%, 14 дней – у 50%, 21 день – у 30% больных).

Достоверное улучшение показателей ( $p<0,05$ ) РЭПП выявили через 2-4 недели после назначения преднизолона, на неделю позже, по сравнению с изменениями гемоглобина, ретикулоцитов, непрямого билирубина.



**Рис. 3 Изменение легкой, тяжелой фракции и фильтруемости ( $U_{cr}$ ) эритроцитов под влиянием стандартной терапии (n=28).**

Динамика показателей плотности и деформируемости эритроцитов представлена на Рис. 3. Так у двух больных, достигших клинической ремиссии (6,7%), при нормализации гемоглобина и ретикулоцитов, легкая и тяжелая фракции эритроцитов были по-прежнему в 4 – 7 раз выше нормы, в меньшей степени отклонялась от нормы фильтруемость эритроцитов ( $U_{cr}$  200 - 230 мОсм) и количество в них креатина (9,1 и 10,0 мг/дл). Дальнейший мониторинг в течение года ремиссии, на фоне поддерживающей терапии плаквенилом показал, что  $U_{cr}$  и  $d_{лег}$  продолжали снижаться и достигли 195 - 200 мОсм и 1,8 – 0,8% соответственно, а тяжелые фракции все равно превышали норму ( $d_{тяж}$  – 2,8 - 4,4 %). Прямая проба Кумбса у всех больных сохранялась положительной (титр 1:2). Это объясняет, почему у больных АИГА с неполными тепловыми агглютининами, несмотря на нормализацию Hb, Ret, билирубина и ЛДГ, при снижении дозы преднизолона до 5-10 мг, через 1-2 месяца наступал рецидив гемолиза, требующий повторного назначения преднизолона. В течение года у этих больных наблюдалось от двух до трех рецидивов. Таким образом, отмена преднизолона согласно основным критериям достижения клинической ремиссии, приводила к рецидиву гемолиза. В то время как, «дополнительные» параметры активности гемолиза указывали на увеличение легкой фракции эритроцитов без клинической манифестации гемолиза, т.е. свидетельствовали об отсутствии полной ремиссии.

«Стандартная» терапия преднизолоном у всех больных сопровождалась большим количеством сочетанных осложнений, уже в первые месяцы лечения: «кушингоид» (100%), ожирение (100%), сахарный диабет (>25%), артериальная гипертензия (42%), развитие бактериальных, грибковых инфекций (10%), пиодермия (20%), вирусные инфекции (30%), явления остеопороза (>20%), венозные тромбозы (>20%). При повторных курсах частота и тяжесть осложнений возрастали (у 2 больных остеопороз с деструкцией позвоночника). В итоге подтверждается вывод, к которому давно пришли многие клиницисты: «стандартная» терапия преднизолоном подавляет активность гемолиза однако, эффект редко удается сохранить без длительной индукционной и поддерживающей терапии (Ю.И. Лорие 1964).

Небольшой процент ремиссии, необходимость длительного приема преднизолона с большим количеством сочетанных осложнений, с первых месяцев

лечения, побудил нас попытаться изменить режим кортикостероидной терапии на пульс-терапию метилпреднизолоном с целью уменьшения частоты осложнений без потери в эффективности лечения.

### **Анализ эффективности пульс-терапии метилпреднизолоном больных АИГА.**

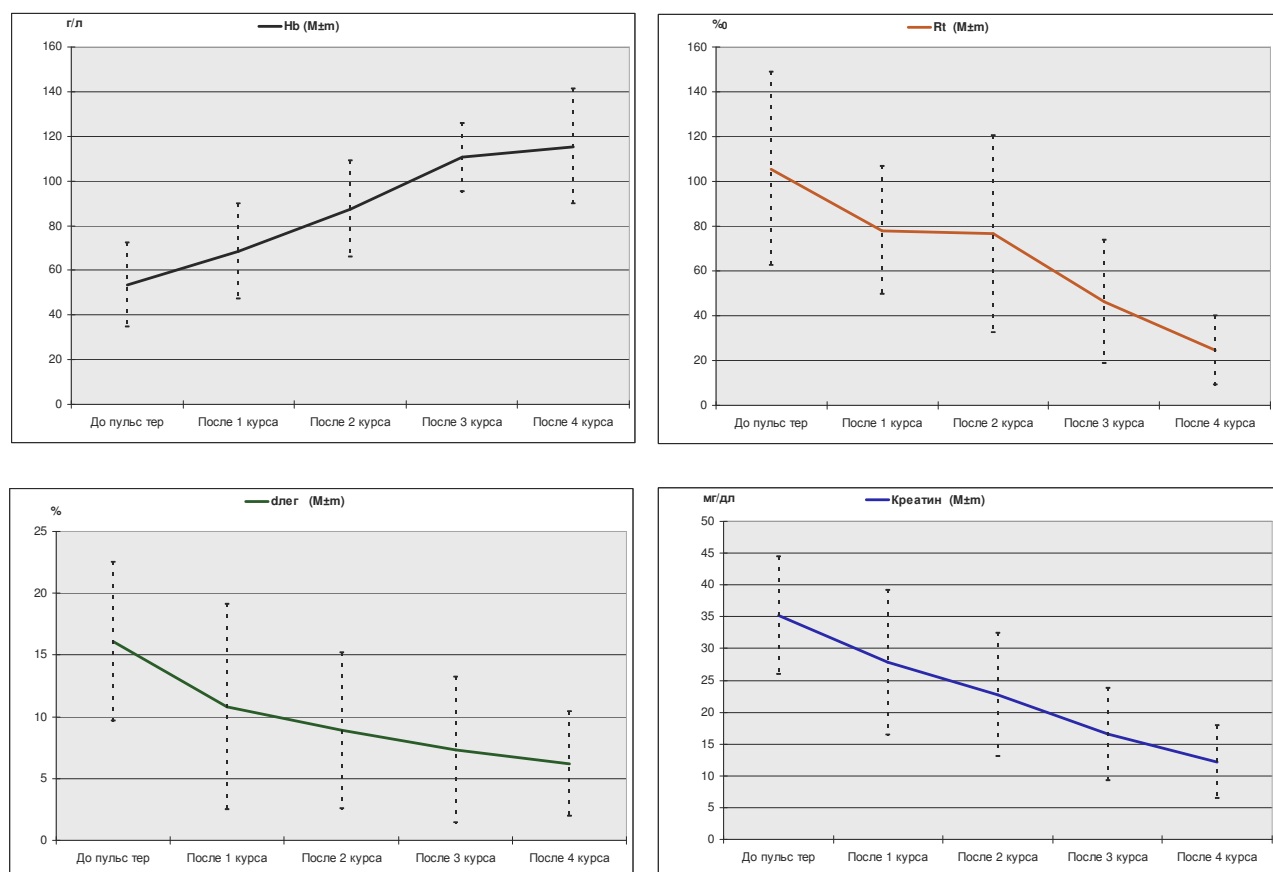
Пульс-терапия метилпреднизолоном проведена 17 больным АИГА (11-мужчин и 6-женщин 18-66 лет): 13 – АИГА с неполными тепловыми агглютинидами, 2 - АИГА со смешанным типом антител (тепловые и холодные антитела), 1 - с синдромом Фишера - Эванса, 1 - с сочетанием АИГА и ПНГ. У 10 больных диагностирована острая форма АИГА, у 7 тяжелый повторный гемолитический криз.

У всех 17 больных отмечались сходные клинические и лабораторные проявления АИГА: снижение гемоглобина в течение 2-7 суток и нарастание ретикулоцитоза. Состояние больных было тяжелым, из-за отсутствия адаптации к быстрому снижению гемоглобина. Семь больных (36%) поступили в ГНЦ из других стационаров, в связи с продолжающимся гемолизом, несмотря на терапию преднизолоном в дозе 1 - 2 мг/кг и заместительные трансфузии отмытыми эритроцитами. При поступлении Hb составил  $53,6 \pm 18,8$  г/л, эритроциты менее  $1,7 \pm 0,6 \times 10^{12}$ /л, а число ретикулоцитов  $105,6 \pm 43,3\%$ , у одного из этих больных гемолитический криз сопровождался транзиторной ретикулоцитопенией (0,9%). Уровень билирубина в среднем составлял  $51 \pm 28,1$  мкмоль/л, уровень ЛДГ максимально повышался до 2500 у/л. Прямая проба Кумбса была положительной у всех больных (1:4 – 1:2000). С момента первичной диагностики заболевания при проведении мониторинга дополнительных показателей активности гемолиза, выявлялось: повышение креатина эритроцитов  $35,2 \pm 15,0$  мг/дл, изменение их биофизических свойств -  $d_{\text{лег}}$  ( $16,1 \pm 6,4\%$ ),  $d_{\text{тяж}}$  ( $16,0 \pm 6,7\%$ ), которые на порядок превышали норму, выраженная регидность эритроцитов -  $U_{\text{сг}}$   $248 \pm 32$  мОсм.

*Режим пульс-терапии метилпреднизолоном.* Всем больным с острым гемолизом провели от 2-х до 6-ти циклов пульс - терапии метилпреднизолоном, в дозах 5 - 10 мг/кг в/в, в течение 3-х дней. Между первым и вторым курсом перерыв составил 7-10 дней. При уменьшении гемолиза перерыв между последующими курсами был увеличен до 2-3 недели. При получении эффекта после 2-х курсов пульс-терапии

проводили еще 3-4 курса. При отсутствии ответа после 2-х курсов принималось решение о проведении спленэктомии или другой альтернативной терапии.

*Результаты лечения.* У 14 (82%) больных АИГА после проведения первого курса пульс-терапии уже в течение первых суток уменьшалась слабость, одышка, нормализовалась температура и цвет мочи. Тенденция к повышению гемоглобина и снижению уровня билирубина зафиксирована на 2-3 день лечения. Положительная динамика развивалась поступательно и после второго курса пульс-терапии - гемоглобин повысился, а ретикулоцитоз снизился в 2 раза, нормализовался уровень непрямого билирубина. Динамика уровней гемоглобина, ретикулоцитов, легкой фракции эритроцитов и количества креатина в них представлена на Рис. 4, где показано, что после проведения 4-х курсов пульс-терапии (2 месяца от начала терапии), эти показатели уменьшились в два раза и практически нормализовался уровень гемоглобина.

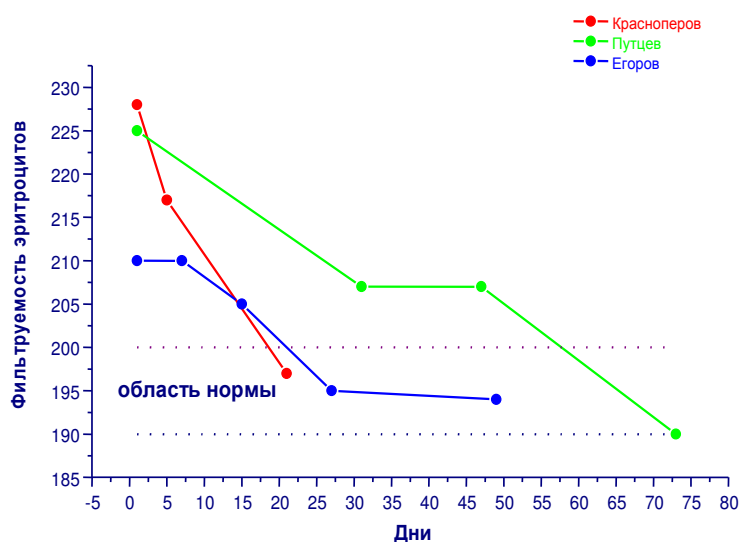


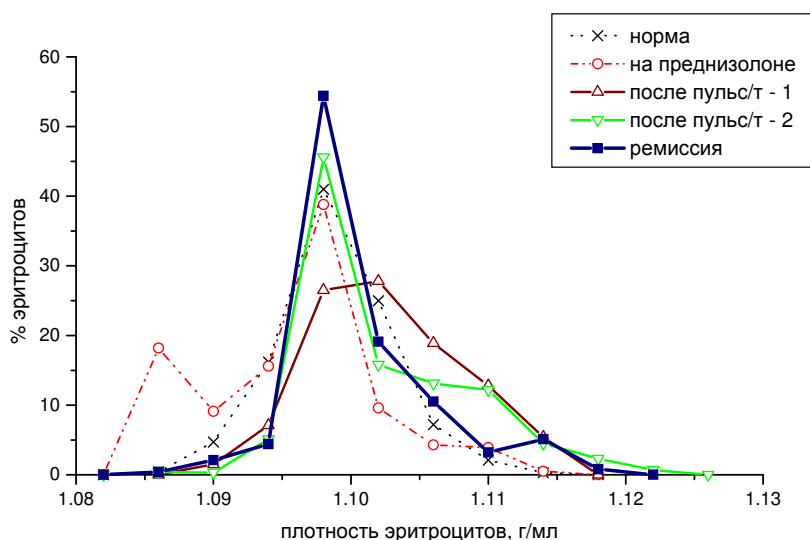
**Рис. 4** Динамика показателей гемолиза (Hb, ретикулоцитов, легкой фракции и креатина эритроцитов) до и после 1-4 курсов пульс-терапии больных АИГА



У больных с частичной ремиссией выявляли высокий процент легкой, тяжелой фракции ( $d_{\text{лег}}-15,9\pm 7,5\%$ ,  $d_{\text{тяж}} - 19,2\pm 9,1\%$ ) эритроцитов и концентрации в них креатина  $38,3\pm 19,7$  мг/дл.

В ремиссии АИГА, при мониторинге, наряду с нормализацией уровня гемоглобина и ретикулоцитов, отмечалась постепенная нормализация биофизических свойств эритроцитов –  $U_{\text{ст}}$ , уменьшение доли  $d_{\text{лег}}$  ( $1,15\pm 0,07\%$ ) и  $d_{\text{тяж}}$  ( $0,4\pm 0,05\%$ ), а также количества креатина эритроцитов -  $7,9\pm 1,9$  мг/дл. Однако «дополнительные» показатели активности гемолиза возвращались к нормальным значениям позже «основных». Клинический пример мониторинга фильтруемости и РЭП в процессе пульс-терапии, завершившийся ремиссией, представлен на Рис. 5, где видна, медленная и постепенная положительная динамика изучавшихся показателей.





**Рис. 5** Динамика улучшения показателей фильтруемости и плотности эритроцитов больных АИГА в период лечения завершившегося клинической ремиссией

Изменения данных показателей в период гемолитического криза и постепенная их нормализация уже во время ремиссии, дает возможность более полно охарактеризовать интенсивность гемолиза и внести коррекцию в трактовку понятия клинической ремиссии.

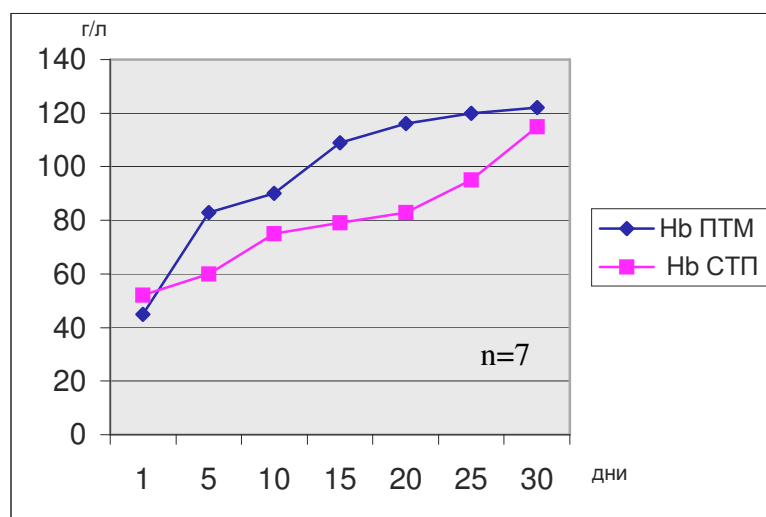
У 14 больных (82%), положительная динамика на лечение отмечена уже после первого курса и в дальнейшем она стала более очевидна. Полная клиническая ремиссия достигнута у пяти пациентов (29%) – 4-х с острой формой АИГА и у 1-ого с повторным гемолитическим кризом АИГА. У больного с синдромом Фишер-Эванса нормализовалось также число тромбоцитов ( $182 \times 10^9/\text{л}$ ). Продолжительность полной ремиссии у пяти больных составляет на сегодня – 8, 10, 14, 32 и 55 месяцев. У 9 пациентов (54%) достигнута частичная ремиссия. Трём больным АИГА с частичной ремиссией и трём, не ответившим на два цикла пульс-терапии, проведена спленэктомия, с достижением клинической ремиссии у 4-х из 6 больных (8, 36, 56 и 60 мес) и частичной - у двух. При анализе взаимосвязи основных и «дополнительных» показателей активности гемолиза в группе больных ( $n=17$ ), получивших пульс-терапию, выявлены ожидаемые закономерности: обратная корреляция между снижением ретикулоцитов и повышением уровня гемоглобина и эритроцитов ( $r = 0,69$  и  $r = 0,76$ ,  $p < 0,05$ ) и установлена прямая корреляция между количеством ретикулоцитов и креатина ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,05$ ) эритроцитов, последним и

легкой фракцией эритроцитов ( $r=0,66$ ,  $p<0,05$ ). Все это демонстрирует равнозначную клиническую информативность, как совокупности, так и отдельно взятых показателей активности гемолиза.

**Анализ осложнений.** При оценке результатов пульс-терапии метилпреднизолоном заслуживает особого внимания ее хорошая переносимость и отсутствие серьезных осложнений, свойственных пероральному применению кортикостероидов. Ни у одного из пациентов не развились признаки «кушингоида», остеопороза или ожирения. У больных с сопутствующей патологией (сахарный диабет, гипертоническая болезнь) не зафиксировано серьезной декомпенсации этих болезней. Единственной проблемой стал синдром отмены у 2-х больных (17%), купированный назначением таблетированного преднизолона (20 мг), с постепенной отменой в течение 3-5 дней.

Таким образом, получены обнадеживающие результаты, которые являются серьезным аргументом в пользу применения пульс-терапии на первом этапе лечения острых АИГА.

**Сравнительный анализ результатов пульс-терапии и «стандартной» терапии преднизолоном.** Сравнение скорости ответа на пульс-терапию метилпреднизолоном (ПТМ) и «стандартную» терапию преднизолоном (СТП) в виде нарастания концентрации гемоглобина наглядно показаны на Рис. 6.



**Рис. 6 Сравнительный анализ скорости восстановления средних величин гемоглобина при пульс - терапии и стандартной терапии**

Как видно из представленной диаграммы, при пульс-терапии метилпреднизолоном (ПТМ), восстановление показателей красной крови происходило быстрее, чем на «стандартной» схеме лечения преднизолоном (СТП). Причем различия были наиболее заметны в первые 5 дней лечения, что важно для острых гемолитических кризов. Пульс-терапия повышала уровень гемоглобина в среднем на 3 г/л через сутки от ее начала и на 4-е сутки его уровень достигал 80 г/л. У другой категории больных сходный результат был только через 15-20 дней от начала лечения, тогда как при ПТМ к этому сроку гемоглобин достигал нормы. Эти различия сохранялись между группами в течение месяца с постепенным сближением кривых, но отдаленные результаты по достижению длительной ремиссии все же указывали на преимущество пульс-терапии. Что касается динамики изменения РЭПП, то доля легкой и тяжелой фракций эритроцитов были меньше в группе, получавшей ПТМ. В период клинической ремиссии, даже после года «стандартного» лечения сохранялись отклонения биофизических свойств эритроцитов ( $d_{\text{лег}} 1,1 \pm 0,5\%$ ,  $d_{\text{тяж}} 4,2 \pm 3,3\%$ ), в отличие от другой группы, где данные показатели фактически достигали нормы уже через 3-5 месяцев. Торпидность нарушений биофизических свойств эритроцитов, объясняет высокую частоту рецидивов, возникающих сразу после отмены преднизолона.

Анализ сроков достижения ремиссии при двух видах терапии выявил более быстрое ее достижение при пульс-терапии (Me 75 дней), чем при «стандартной» терапии (151 день).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о ряде преимуществ пульс - терапии метилпреднизолоном перед длительной терапией преднизолоном в виде значительного уменьшения побочных эффектов, свойственных кортикостероидной терапии; увеличения процента ремиссий (29% против 6,7%); более быстрого ответа, оцениваемого по основным и дополнительным тестам, характеризующим активность гемолиза и, наконец, возможностью оперативного принятия решения об изменении тактики терапии при отсутствии положительного воздействия первых двух курсов пульс терапии.

**Лечение больных резистентной формой АИГА Ритуксимабом (РТМ).** Одной из серьезных проблем является лечение резистентных форм АИГА, где процент ремиссий при последовательном применении нескольких видов иммуносупрессивной

терапии минимален. Лечение Ритуксимабом (РТМ) было проведено 8 больным с резистентной АИГА, в возрасте от 23 - 66 лет (Me=48). Длительность наблюдения от момента диагностики АИГА до введения РТМ составило от 12 до 108 мес.

Ранее всем больным проводили «стандартную» терапию повторными курсами преднизолона, длительностью от 6-12 месяцев, с последующим присоединением альтернативных видов лечения (плаквенил, циклофосфан, азатиоприн) без достижения ремиссии. У 6 из 8 больных была удалена селезенка. В 2-х случаях от спленэктомии воздержались, в связи с преимущественной секвестрацией эритроцитов в печени и предполагаемой неэффективностью операции. У двух пациентов течение очередного гемолитического криза осложнилось пневмоцистной пневмонией, тромбозом вен голени, Gr+ сепсисом и ТЭЛА (диагностированной по сцинтиграфии легких).

В период гемолитического криза гемоглобин составлял в среднем  $62 \pm 15,6$  г/л, ретикулоцитоз  $145 \pm 35,6\%$ , гипербилирубинемия  $56 \pm 18,5$  мкмоль/л, ЛДГ 3-4 нормы. После проведения одного цикла пульс-терапии, как экстренной меры, гемоглобин повысился на 25 г/л ( $89 \pm 16,5$  г/л), ретикулоцитоз снизился в 1,5 раза, уровень непрямого билирубина в 2 раза. Тем не менее, показатели уровня креатина эритроцитов, а также их легкой и тяжелой фракций оставались высокими (соответственно  $32,6 \pm 6,7$  мг/дл,  $d_{\text{лег}}$   $22,3 \pm 13,9\%$  и  $d_{\text{тяж}}$   $11,7 \pm 11,1\%$ ) фильтруемость эритроцитов также была ухудшена ( $U_{\text{cr}}$   $245 \pm 35$  мОсм).

*Показаниями для введения Ритуксимаба* явились: резистентные формы АИГА, с нарастающим количеством инфекционных осложнений и тромбозов; у двух пациентов - отсутствие ожидаемого эффекта от спленэктомии. *Выбор дозы Ритуксимаба* осуществлялся по следующему принципу: стандартную дозу  $375 \text{ мг/м}^2$ , вводили в 1-ый и 8-ой дни курса, контролируя количество В-лимфоцитов (CD20+, CD19+, CD22+) периферической крови. При количестве В-лф менее 1% на 7 день курса, ограничивались 2-мя введениями препарата, если количество В-лф было более 1% курс лечения увеличивали до 4-х введений с недельным интервалом.

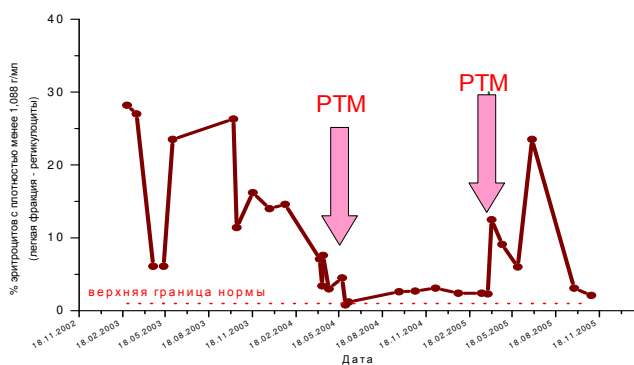
Чтобы оценить закономерности действия РТМ осуществляли мониторинг как основных, так и дополнительных показателей активности гемолиза, а также численности В-лф и иммуноглобулинов сыворотки (G, A, M). После введения РТМ отмечалось постепенное улучшение показателей гемограммы. Через 2 недели после

введения РТМ у пяти больных уровень гемоглобина повысился в среднем до  $121,4 \pm 13,2$  г/л. У 2-х из них он достиг нормальных значений, еще у 3-х превысил 100 г/л. У 3-х других из 8-ми пациентов гемоглобин повысился на 20 г/л и составил 77, 81 и 89 г/л, ретикулоцитоз снизился в среднем на 20%. К этому сроку только у одной больной нормализовалось число ретикулоцитов. У шести (80%) из восьми больных нормализовался непрямой билирубин –  $15,6 \pm 2,3$  мкмоль/л, лишь у двух больных этот показатель гемолиза не изменился и вдвое превышал норму. Уровень креатина эритроцитов оставался закономерно выше нормы и составил в среднем  $22,4 \pm 16,2$  мг/дл (у одной больной - отмечалась нормализация креатина 6,5 мг/дл). Следует подчеркнуть, что у одной из самых тяжелых больных, одномоментно нормализовались все пять показателей активности гемолиза – Hb, Rt, билирубин, уровень креатина и легкая фракция эритроцитов, чего не наблюдалось ранее. У всех больных вдвое уменьшилась доля легкой фракции эритроцитов –  $9,0 \pm 7,4\%$ , тогда как доля эритроцитов высокой плотности повысилась по сравнению с исходной величиной. У 3-х пациентов с тромбозами она не определялась. Незначительно улучшилась фильтруемость эритроцитов ( $U_{cr}$   $230 \pm 42$  мОсм). Через месяц после введения РТМ в большинстве случаев контролируемые показатели продолжали улучшаться. Спустя 2 месяца у 5 из 8 больных уровень гемоглобина соответствовал норме, а у трех больных гемоглобин по прежнему составил 87, 78 и 73 г/л. У 5 больных снизился ретикулоцитоз и составил в среднем  $49,8 \pm 28,9\%$ , у всех нормализовался уровень билирубина. Лишь у одной больной появилась тенденция к повышению ретикулоцитов со 115% до 180%, при низком гемоглобине, незначительно повысилась тяжелая фракция и креатин эритроцитов. Это послужило поводом для повторного двукратного введения РТМ. В течение последующих трех месяцев от введения РТМ отмечалась стабилизация показателей гемограммы и дополнительных тестов, характеризующих активность гемолиза. *Через 5 мес* от момента введения РТМ уже у 7 из 8 пациентов нормализовался гемоглобин, у 4-х больных число ретикулоцитов и уровень креатина эритроцитов уменьшились. Продолжала снижаться легкая фракция эритроцитов –  $d_{лег}$   $2,5 \pm 0,28\%$ , впервые за время наблюдения, которая в отличие от других параметров ( $U_{cr}$   $215 \pm 37$  мОсм) теперь существенно не отличалась от нормы.

В группе больных, получивших терапию РТМ (n=8), выявлена прямая корреляция между ретикулоцитами, уровнем билирубина и тяжелой фракцией эритроцитов ( $r = 0,74$ ,  $r = 0,66$ ,  $p < 0,05$ ); между уровнем креатина и легкой фракцией эритроцитов ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,05$ ). Обратная корреляция наблюдалась между уровнем гемоглобина, легкой фракцией эритроцитов и содержанием в них креатина ( $r = - 0,70$ ,  $r = -0,82$ ,  $p < 0,05$ ). Эта взаимосвязь аналогична полученной при пульс-терапии и свидетельствует об информативности, как каждого из тестов, так и их совокупности.

Таким образом, при проведении терапии Ритуксимабом, ответ на терапию в той или иной степени получен у всех 8-ми больных (100%). Клиническая ремиссия достигнута у четырех из них (50%). Причем отмечена как нормализация показателей гемограммы, так и других показателей активности гемолиза. В настоящее время продолжительность ремиссии составляет 30, 17, 16 и 14 месяцев. Важно, что у всех этих больных ремиссия сохранялась без поддерживающего лечения. Частичная ремиссия достигнута у 4 других больных, что выражалось в подъеме гемоглобина от 105 до 120 г/л, снижении ретикулоцитов более чем в два раза (140 до 60‰), нормализации непрямого билирубина. Мониторинг биофизических параметров эритроцитов показал постепенное снижение процента легкой и тяжелой фракций эритроцитов, а также снижение креатина эритроцитов в 2,5 раза. Продолжительность частичной ремиссии составляет 6, 13, 13, 15 месяцев.

Основанием для *повторного введения РТМ* двум больным явились: в первом случае «доклинические» признаки рецидива гемолиза, выявленные с помощью мониторинга плотности, деформируемости эритроцитов и содержания в них креатина; во втором - недостаточная эффективность первого курса РТМ и нарастание гемолиза после 2 месяцев стабилизации, без какой-либо поддерживающей терапии.

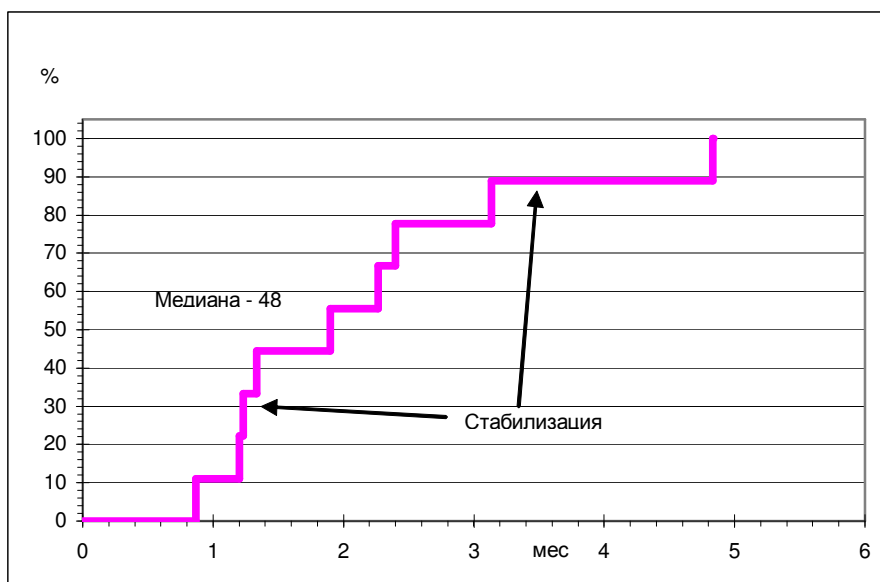


**Рис. 7 Мониторинг изменения легкой фракции эритроцитов в процессе лечения РТМ (до и после 2 –х курсов) у больной МЛС, 63 лет.**

Динамика изменений легкой фракции эритроцитов на примере больной (МЛС) представлен на Рис. 7, где показана нормализация легкой фракции эритроцитов после 1-ого введения РТМ, впервые за весь период заболевания и ее повторное повышение, связанное с первыми латентными признаками рецидива АИГА. После повторного введения РТМ последовало постепенное нивелирование признаков начинающегося гемолиза, что подтвердило ценность и необходимость мониторинга показателей активности гемолиза для прогнозирования рецидива АИГА. На сегодня общая продолжительность ремиссии составила 27 месяцев без медикаментозной поддержки. У второй больной получена частичная ремиссия, сохраняющаяся 6 месяцев.

Сроки достижения ремиссии АИГА ранее резистентных к терапии больных представлены на Рис. 8. Медиана времени достижения ремиссии после введения РТМ составила 48 дней (минимальный срок - 1 месяц, максимальный - 4 месяца).



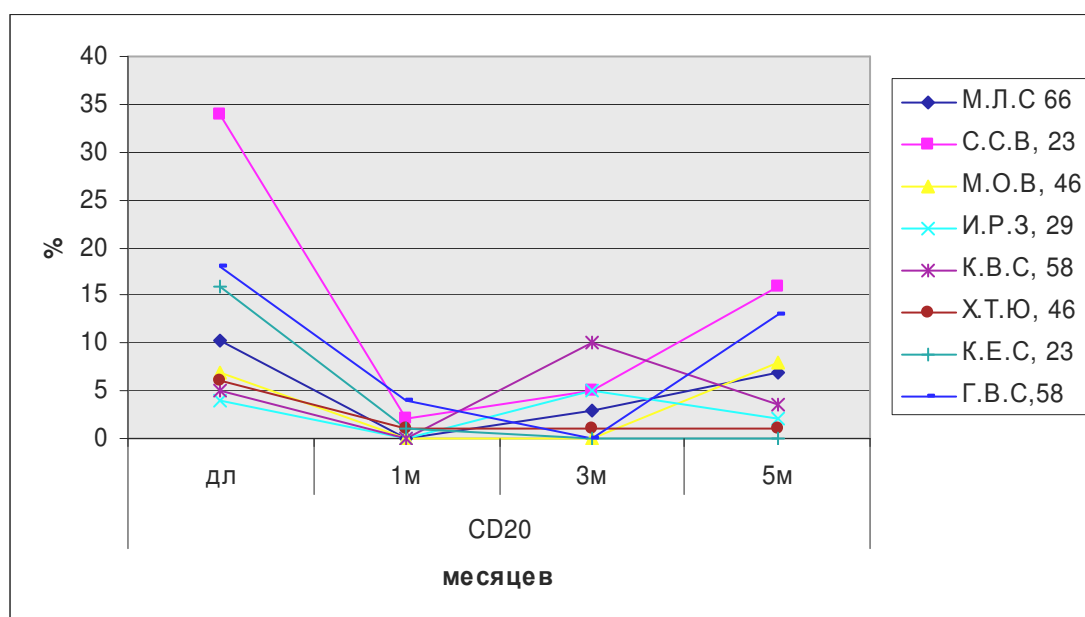


**Рис. 8 Сроки достижения ремиссии при резистентных АИГА после проведения лечения Ритуксимабом**

При введении Ритуксимаба осложнений не отмечено. Мониторинг концентрации Ig G, A и M сыворотки крови не выявил угнетения гуморального иммунитета. Серьезных инфекционных эпизодов не было. Сопутствующая соматическая патология не прогрессировала.

**Мониторинг количества В-лимфоцитов периферической крови.** С целью выработки рационального режима терапии Ритуксимабом проводили мониторинг количества В-лимфоцитов периферической крови. Количественная оценка Т и В-лимфоцитов (В-лф) проводилась методом проточной цитофлуориметрии, используя следующую панель – CD45, CD3, CD19, CD20, CD22, позволяющую охарактеризовать изменения количества циркулирующих Т- и В-лимфоцитов на различных этапах лечения. После введения препарата кровь на исследование брали один раз в неделю в течение месяца, затем один раз в месяц. Через неделю после первого введения Ритуксимаба у всех больных выявлено снижение численности CD20+ лимфоцитов практически до нуля (только у 3-х больных этот показатель достигал 1 - 4%). В течение 1-2 месяцев число В-лф продолжало снижаться и достигло нулевой отметки у четырех больных. В то время как у одной больной ко второму месяцу численность В-лф (CD20+, CD19+, CD22+) восстановилась и составила 7%, что совпало с развитием рецидива гемолиза, потребовавшего повторного введения препарата. Количество В-лимфоцитов восстановилось через 4 мес у 3 больных и к пятому месяцу у 5 из восьми больных. Причем у двух пациенток

через 8 и 17 месяцев мониторинг биофизических свойств эритроцитов и уровня в них креатина выявил «доклинические» признаки гемолиза, в связи с чем РТМ ввели повторно одной больной, а второй лишь при развитии тяжелого гемолитического криза (Hb 34 г/л, Rt 175‰). У остальных больных рецидив гемолиза пока не выявлен. После 2 курса Ритуксимаба у двух больных число В-лимфоцитов с фенотипом CD19+, CD20+, CD22+ стало восстанавливаться в те же сроки – к четвертому и двенадцатому месяцу. Изменение количества В-лф CD20+ с антигеном наглядно представлено на Рис. 9.



**Рис. 9 Мониторинг количества В лимфоцитов CD20+ в процессе лечения ритуксимабом у 8 больных.**

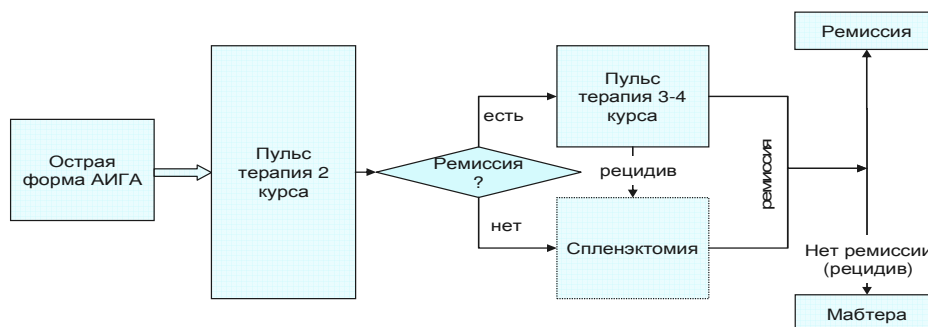
Численность Т-лимфоцитов колебалась в пределах нормальных значений.

Таким образом, ответ на введение РТМ в большей или меньшей степени получен у всех восьми больных: у четырех из них (50%) достигнута полная клиническая ремиссия, продолжительностью от 4 до 27 месяцев, у другой половины - частичная ремиссия, включая двух больных без спленэктомии. Важно, что впервые за длительный период наблюдения этим больным не проводится поддерживающая терапия.

В итоге данного пилотного исследования мы пришли к заключению, что, во-первых, при рефрактерной АИГА удалось полностью купировать гемолиз редуцированной курсовой дозой Ритуксимаба. Причем частота и продолжительность ремиссий не уступала результатам представленным в зарубежных публикациях (Motto D.G 2003, Shanafelt T.D, 2003, Webster D, Wakin, 2004). Во-вторых, при

повторном введении РТМ сохранял свой лечебный эффект; в-третьих, мониторинг лабораторных показателей, включающих определение деформируемости, плотности эритроцитов и уровня в них креатина, улавливают «доклинические» проявления рецидива гемолиза и помогают определить срок противорецидивного курса РТМ. Кроме того, Ритуксимаб не приводил к угнетению гуморального иммунитета и не вызывал увеличения частоты инфекционных осложнений.

Результаты нашей работы позволили выработать алгоритм ведения больных с острыми и резистентными формами АИГА, схема которого представлена на Рис. 10



**Рис. 10** Схема лечения больных острой формой АИГА и гемолитическим кризом

При диагностике острой формы АИГА показано проведение 2-х курсов пульс-терапии метилпреднизолоном в дозе 5-10 мг/кг в/в капельно 3 дня. Результативность лечения оценивали с помощью мониторинга параметров основных и дополнительных тестов, контролирующих активность гемолиза. При подавлении гемолиза, проведение еще 3-4-х аналогичных курсов. При отсутствии ответа на терапию – либо подготовка больного к спленэктомии с учетом прогноза ее эффективности, либо проведение иммуносупрессивной терапии (циклофосфан, азатиоприн). При достижении ремиссии в результате пульс-терапии или спленэктомии, возможно проведение поддерживающей терапии плаквенилом (400-600 мг/сутки 4-6 месяцев). Резистентность к проводимой терапии, включая

иммунодепрессанты, определяет показания к назначению Ритуксимаба в дозе 375 мг /м<sup>2</sup>, дважды (в 1-ый и 8-ой день) под контролем количества В-лф периферической крови и мониторинга тестов, характеризующих активность гемолиза. При сохраняющемся числе В-лф >1% перед вторым введением, курс терапии Ритуксимабом проводится в полном объеме – до 4-х еженедельных введений. При ухудшении показателей контроля активности гемолиза или явном рецидиве резистентной АИГА – целесообразно повторное введение Ритуксимаба.

Анализ наших наблюдений показал эффективность проведения пульс-терапии метилпреднизолоном при острых формах и гемолитических кризах АИГА, а также терапии резистентных форм Ритуксимабом, что было подтверждено ежемесячным мониторингом биофизических параметров и уровня креатина эритроцитов. Такой мониторинг увеличивает информативность общепринятых параметров активности гемолиза и имеет прогностическое значение: он позволяет доказать стабильность достигнутой ремиссии и аргументировать отмену или продление поддерживающего лечения, а также уловить минимальные признаки рецидива и провести своевременную коррекцию терапии. Полученные результаты создают перспективу для «превентивной» терапии, предупреждающей развитие тяжелых гемолитических кризов АИГА.

## **ВЫВОДЫ:**

1. Разработана оптимальная тактика лечения аутоиммунной гемолитической анемии (АИГА) с неполными тепловыми агглютинами; при остром течении – пульс-терапия метилпреднизолоном, при резистентных формах гемолиза – введение Ритуксимаба, включающая новый алгоритм мониторинга интенсивности гемолиза, с использованием показателей деформируемости, плотности эритроцитов и концентрации в них креатина.
2. Пульс-терапия метилпреднизолоном острых форм аутоиммунной гемолитической анемии по сравнению со «стандартным» режимом лечения преднизолоном позволила уменьшить количество осложнений, присущих кортикостероидам и увеличить частоту клинических ремиссии с 6,7 до 29%, а также ускорить купирование гемолитического криза и в минимальные сроки оценить перспективу эффективного лечения больного (продолжение пульс-терапии, спленэктомия, иммуносупрессивная терапия).

3. Мониторинг биофизических параметров эритроцитов и содержания в них креатина, увеличивает информативность общепринятых показателей активности гемолиза и имеет прогностическое значение, так как позволяет оценить полноту и стабильность ремиссии и аргументировать отмену или продление поддерживающего лечения, а также уловить минимальные признаки активации гемолиза необходимые для своевременной коррекции терапии.
4. У всех восьми больных с резистентной аутоиммунной гемолитической анемией, пролеченных Ритуксимабом был купирован гемолиз, причем у половины больных (50%) достигнута полная ремиссия длительностью от 4 до 36 мес, не требующая поддерживающей терапии.
5. Выделены особенности ответа на лечение Ритуксимабом: а) отсроченный эффект с медианой развития ремиссии 48 дней; б) возможность получения ответа при повторном введении препарата; 3) хорошая его переносимость; в) возможность обоснованной редукции курсовой дозы за счет сокращения кратности введения. Ритуксимаб не угнетал гуморальный иммунитет и не повышал частоту бактериальных инфекций.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для достижения быстрого результата и уменьшения побочных эффектов при лечении острых форм АИГА рекомендовано проведение пульс-терапии метилпреднизолоном в дозах 5-10 мг/кг, под контролем мониторинговых тестов, в виде определения плотности, деформируемости эритроцитов, а также уровня креатина в них. Это позволит подтвердить стабильность ремиссии и ранние признаки рецидива.
2. Отсутствие стабилизирующего действия двух курсов пульс-терапии метилпреднизолоном. является показанием к проведению спленэктомии, с учетом прогноза ее эффективности, или иммуносупрессивной терапии.
3. Рекомендовано лечение резистентных форм АИГА Ритуксимабом под контролем количества В-лимфоцитов CD20+: при снижении количества В-лф менее 1% после первого введения, возможно двукратное введения препарата; если численность лимфоцитов более 1% показано 4-х кратное введение Ритуксимаба в общепринятой дозе 375 мг/м<sup>2</sup>.

4. При возникновении рецидива АИГА рекомендованы повторные курсы Ритуксимба.
5. Для выявления минимальных лабораторно-регистрируемых изменений, которые потребуют профилактики предупреждения гемолитических кризов рекомендуется проводить мониторинг основных и дополнительных тестов контроля гемолиза (определение плотности, деформируемости и креатина эритроцитов).
6. При достижении ремиссии после пульс-терапии МТП или спленэктомии показано проведение поддерживающей терапии плаквенилом
7. Показатели плотности и деформируемости эритроцитов могут использоваться для скрининговой диагностики различных форм анемий (наследственной сфероцитарной анемии, ЖДА, гетерозиготной формы  $\beta$  талассемии и пароксизмальной ночной гемоглобинурии).

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Цветаева Н.В., Колодей С.В., Никулина О.Ф., Хорошко Н.Д. Лечение острых форм аутоиммунных гемолитических анемий. // Врач, 2003 , №11, с.32-34
2. Никулина О.Ф., Цветаева Н.В., Колодей С.В., Шулуток Е.М., Шурхина Е.С., Левина А.А., Карагюлян С.Р., Гржималовский А.В., Казаринова А.А., Головкина, Л.Л., Мамукова Ю.И., Гаранжа Т.А., Хорошко Н.Д. Спленэктомия при острых формах аутоиммунных гемолитических анемий (АИГА). // Проблемы гематологии и переливания крови, 2004, 2, стр.51
3. Шурхина Е.С., Нестеренко В.М., Лисовская И.Л., Цветаева Н.В., Колодей С.В., Никулина О.Ф., Атаулаханов Ф.И. Выявление этапов аутоиммунной гемолитической анемии с помощью исследования деформируемости и плотности эритроцитов. // Бюлл. Экспериментальной биологии и медицины, 2004, т. 138, №.9 с. 316 – 319.
4. Никулина О.Ф., Цветаева Н.В., Колодей С.В., Шурхина Е.С., Дмитриева М.Г., Аутоиммунные гемолитические анемии (АИГА): мониторинг активности гемолиза и лечение. // Проблемы гематологии N 1, 2005, стр 46.
5. Никулина О.Ф., Цветаева Н.В., Шурхина Е.С., Колодей С.В., Нестеренко В.М. Значение мониторинга деформируемости и фильтруемости эритроцитов в

- определении активности гемолиза при аутоиммунной гемолитической анемии. // Проблемы гематологии N 1, 2005, стр 45.
6. Гаранжа Т.А., Цветаева Н.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Никулина О.Ф. Динамика маркеров вирусных инфекций в ходе лечения больных аутоиммунной гемолитической анемией. // Русский журнал СПИД, рак и общественное здоровье 2006 г, том 10, N2 стр10-11.
  7. Сагдиева Н.Ш., Сахибов Я.Д., Цветаева Н.В., Хорошко Н.Д., Ковалева Л.Г., Гржимоловский А.В., Мигунова Е.В., Никулина О.Ф. Тс- теоксим в оценке секвестрирующей способности печени и селезенки при гемолитических анемиях. // Проблемы гематологии N1, 2005, стр 53.
  8. Цветаева Н.В., Никулина О.Ф., Грецов Е.В., Шурхина Е.С. Ритуксимаб – новая возможность лечения рефрактерных аутоиммунных гемолитических анемий (АИГА). // Проблемы гематологии N1, 2006 стр 82.
  9. Nikulina O.F., Tsvetaeva N.V., Shurhina E.S., Khoroshko N.D. Evaluation of density and deformability of erythrocytes in complete remission of АИНА. // Congress of the European Hematology Association. Sweden, Stockholm, June 2005.