

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

**КОМПЛЕКСНАЯ ПРОГРАММА
ДИАГНОСТИКИ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ
С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ПРОГНОСТИЧЕСКИ
ЗНАЧИМЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ
ОСОБЕННОСТЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург
2015

ВВЕДЕНИЕ

Апластическая анемия (АА) — тяжёлое заболевание системы крови, характеризующееся количественной недостаточностью гемопоэза.

В основе развития АА лежит несколько патофизиологических компонентов:

1. Внутренний дефект стволовых кроветворных клеток
2. Иммунная реакция на гемопоэтическую ткань
3. Дефект поддерживающей функции микроокружения
4. Наследственный генетический дефект

Причиной развития заболевания могут быть различные факторы экзогенного и эндогенного происхождения: ионизирующая радиация, химические вещества (включая бензол, органические растворители, минеральные удобрения, инсектициды), лекарственные средства (цитостатические и сульфаниламидные препараты, левомицетин, противотуберкулезные средства, препараты золота и др.). Встречаются вирусассоциированные формы АА, в частности — постгепатитная АА. В большинстве случаев этиологический фактор остаётся неизвестным и заболевание расценивается, как идиопатическая АА.

Биологическая гетерогенность группы больных АА, отмечаемая всеми исследователями, по всей вероятности, обусловлена преобладающим патогенетическим механизмом или различным сочетанием патогенетических нарушений без прямой зависимости от этиологических факторов.

Несмотря на гетерогенность группы с определёнными патогенетическими различиями, считается, что деструктивные иммунные механизмы играют важную роль при всех вариантах АА и это служит основой для проведения иммуносупрессивной терапии (ИСТ) при данной патологии. Данными многочисленных исследований показана патогенетическая роль активации отдельных звеньев Т-клеточного иммунитета и дисбаланса лимфоидных субпопуляций Т-клеточного звена, нарушения цитокиновой регуляции гемопоэза в патогенезе АА [1,2,6,7 и др.]. Иммунологические нарушения при АА характеризуются изменением соотношения хелперов и супрессоров в крови и костном мозге с преобладанием клеток с фенотипом супрессоров, повышенным содержанием активированных Т-лимфоцитов и цитотоксических лимфоцитов в костном мозге, увеличением содержания гамма-интерферона и повышенным уровнем продукции фактора некроза опухоли (ФНО α), интерлейкинов — 1 β (ИЛ-1 β) и интерлейкина-6 (ИЛ-6).

Комплексная программа диагностики апластической анемии с определением прогностически значимых патогенетических особенностей заболевания. Методические рекомендации. 2015. — СПб., Агентство «ВиТ-принт», 2015. — 32 с.

Методические рекомендации посвящены методам обследования больных апластической анемией на этапе диагностики и определения программы терапии с учётом оценки прогностически значимых показателей. Представленный комплекс методов может быть применен для обследования больных с апластической анемией в целях подтверждения диагноза и определения варианта заболевания, для оценки прогностических критериев у обследуемых больных и выбора методов терапии. Предлагаемый методический подход важен также для определения на этапе диагностики показателей, динамика изменения которых может служить критерием эффективности иммуносупрессивной терапии в процессе лечения.

*Предназначены для врачей
клинической лабораторной диагностики, врачей-гематологов.*

Область применения: специализированная гематологическая помощь, лабораторная диагностика.

Авторы: К. М. Абдулкадыров, С. С. Бессмельцев, А. В. Четкин, Е. Р. Шилова, О. Е. Розанова, В. И. Ругаль, Т. В. Глазанова, И. Е. Павлова, Л. Н. Бубнова, И. С. Мартынкевич, Н. А. Потихонова, Ж. В. Чубукина, М. Н. Зенина, Н. Ю. Семёнова

Рецензенты: доктор медицинских наук доцент А. Г. Максимов
кандидат биологических наук доцент И. Ю. Стюф

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

*Утверждены заместителем руководителя
Федерального медико-биологического агентства
Е. Ю. Хавкиной 27.02.2015, Рег. № 13-2015*

© Коллектив авторов, 2015
© ООО «Агентство “ВиТ-принт”», 2015

Клинически заболевание проявляется обычно анемическим и геморрагическим синдромом. Реже наблюдаются инфекционные осложнения. Изменения в гемограмме характеризуются панцитопенией различной степени выраженности. Поскольку подобные изменения могут наблюдаться при ряде заболеваний системы крови и патологических состояний, сопровождающихся депрессией кроветворения, диагноз АА является, в значительной степени, диагнозом исключения. Соответственно, обследование таких пациентов предполагает, наряду с тщательным сбором анамнеза, исследования для исключения инфекционных агентов и онкообследование.

Основанные диагностические данные получают при изучении периферической крови, миелограммы и трепанобиопсии. Диагноз апластической анемии следует считать достоверным при наличии обязательных 2 из трёх следующих критериев по данным периферической крови: уровень гемоглобина ≤ 100 г/л; число лейкоцитов $\leq 3,5 \times 10^9$ /л (или гранулоцитов $\leq 1,5 \times 10^9$ /л); число тромбоцитов $\leq 50 \times 10^9$ /л — при характерной картине костного мозга [1, 2, 3]. Костный мозг (КМ) при АА гипоклеточный с отсутствием признаков лейкозной трансформации и диспластических изменений, характерных для миелодиспластического синдрома (МДС).

Основным диагностическим методом для постановки диагноза АА считается трепанобиопсия костного мозга с проведением гистологического исследования. Указанный метод позволяет не только верифицировать диагноз АА и исключить вторичные аплазии, фиброз КМ, но и даёт возможность оценить степень угнетения кроветворения. Для проведения дифференциальной диагностики АА с другими заболеваниями, получения материала для иммунологических, цитогенетических и других исследований большое значение имеет также пункция КМ. Диагностическими критериями при АА являются: гипоклеточный КМ с повышением объёма жировой ткани; менее 20–30% «остаточных» гемопоэтических клеток в КМ при уменьшении количества всех гемопоэтических клеток, в меньшей степени — клеток лимфоидного ряда [1, 2, 4]

В соответствии с международной классификацией, принято выделять тяжёлую и нетяжёлую формы АА. Основной целью такой классификации было выделение группы больных, которым в первую очередь показана трансплантация костного мозга (ТКМ) из-за риска ранней смерти. Модифицированные критерии различных форм АА, известные как «критерии Camitta», приведены ниже:

Тяжёлая АА (ТАА) — клеточность костного мозга $< 25\%$ или 25–50% при $< 30\%$ остаточных гемопоэтических клеток в сочетании с 2 из 3 критериев по гемограмме:

- число нейтрофилов $< 0,5 \times 10^9$ /л
- число тромбоцитов $< 20 \times 10^9$ /л
- число ретикулоцитов $< 20 \times 10^9$ /л (или с коррекцией по гематокриту менее 1%)

Нетяжёлая АА (НАА) — показатели не соответствуют критериям ТАА

Выделяют также сверх-ТАА при числе нейтрофилов менее $0,2 \times 10^9$ /л [2, 3, 4, 5].

ТАА и сверх-ТАА требуют не только активного терапевтического подхода в связи с высоким риском жизнеугрожающих осложнений, но и решения вопроса о возможности и целесообразности проведения ТКМ — метода выбора для данной категории больных.

Пациентам не имеющим показаний к проведению ТКМ, а также не имеющим совместимого донора при наличии таких показаний или больным ТАА пожилого возраста с серьёзной сопутствующей патологией, проводится иммуносупрессивная терапия (ИСТ), направленная на подавление деструктивных иммунологических процессов. Первые стойкие положительные результаты при проведении ИСТ отмечаются обычно через 2–3 месяца, а эффективность терапии оценивается через 3–6 месяцев от начала лечения. При этом определённая часть больных оказывается резистентной к проводимой ИСТ, а у трети больных результаты бывают нестойкими [1, 2, 3, 6, 8]. В подобных случаях рассматривается вопрос об использовании альтернативных методов ИСТ или проведении ТКМ, результаты которой являются оптимальными на ранних сроках болезни. В связи с этим важным является выявление и использование критериев прогнозирования как положительного терапевтического ответа на ИСТ, так и неблагоприятных факторов для изменения тактики лечения на ранних этапах.

Прогноз заболевания зависит, преимущественно, от степени тяжести аплазии и раннего начала активной терапии [2, 6, 9]. Долговременное наблюдение за больными, получавшими ИСТ показало, что выживаемость больных ассоциируется с наличием ранних критериев ремиссии [10]. Определённое значение в выявлении иммунообусловленных форм АА имеет анализ исходного уровня цитокинов — негативных регуляторов кроветворения, патогенетически значимых изменений в субпопуляционном составе лимфоидных клеток.

Для выявления форм АА, при которых значима патогенетическая роль изменений стромы костного мозга, учитывая сложность тестов с культивированием стромальных клеток и определением их функциональной активности, целесообразно проведение углубленных исследований отдельных структур кроветворного микроокружения более доступными методами. В частности, важную информацию о состоянии микроокружения могут дать иммуногистохимические методы исследований, включая исследования микрососудов [11, 12].

По данным различных авторов, у 4–10% больных АА и более могут быть выявлены патологические клоны, что может считаться неблагоприятным фактором в отношении развития клональных осложнений [1, 16, 17]. Имеются указания на наличие определённой иммуногенетической предрасположенности к развитию заболевания. Так, наличие в HLA генотипе аллеля HLA-DRB1*15:01, по данным многих исследователей, является одним из предрасполагающих к АА факторов, а также фактором, прогнозирующим положительный ответ на стандартную ИСТ [1, 2, 17].

Исследование динамики выявленных иммунологических нарушений под влиянием ИСТ показало, что в период становления ремиссии наблюдается закономерное снижение спонтанной продукции ФНО α и ИЛ-1 β , уменьшение числа активированных Т-клеток в крови и костном мозге больных АА, в том числе минорных субпопуляций — Т-лимфоцитов с маркерами натуральных киллеров — (NKT-клеток), что может рассматриваться, как ранний благоприятный прогностический фактор [13, 14]. Многочисленные исследования свидетельствуют о лучшем ответе на ИСТ больных АА, ассоциированной с наличием ПНГ-клона [2, 15 и др.].

При прогнозировании течения заболевания и ответа на ИСТ важными являются показатели степени сохранности остаточного гемопоэза. Наряду с рутинными исследованиями, косвенным свидетельством наличия остаточных очагов активного гемопоэза могут быть такие показатели, как индекс продукции ретикулоцитов (ИПР), ранний ретикулоцитарный и нейтрофильный ответ с повышением показателей в первые недели и месяцы терапии даже при первоначальном отсутствии клинико-гематологических признаков ремиссии [2, 17].

Основные диагностические методы при АА остаются неизменными на протяжении последних десятилетий и существуют руководства по диагностике и лечению АА, разработанные международными группами специалистов, в которых описаны принципы обследования и необходимые методы исследований для проведения

дифференциальной диагностики. Тем не менее, появляются новые данные об особенностях течения заболевания, основанные на исследованиях отдельных патогенетических аспектов и оценке результатов терапии в различных группах больных. В связи с этим имеются новые возможности разделения больных на подгруппы с преобладающими иммунными нарушениями, с наличием патологически изменённых клеток-предшественников, с изменениями кроветворной ниши. Учёт особенностей, которые могут быть выявлены при более глубоком обследовании больных на этапах первичной диагностики, а также мониторинг значимых показателей на ранних этапах терапии, позволяют прогнозировать результаты ИСТ и своевременно планировать изменения в проводимом лечении.

Таким образом, на этапе диагностики АА необходимо определить комплекс показателей, которые не только имеют диагностическое значение и определяют тяжесть заболевания, но также

- позволяют выделить иммунообусловленные формы, варианты с хорошим прогнозом в отношении использования ИСТ, уточнить показания к проведению ТКМ;
- при исследовании в динамике дают возможность оценить на ранних этапах адекватность проводимой ИСТ и своевременно планировать изменения в программе лечения.

Для реализации перечисленных задач важным является выбор наиболее доступных и достаточно информативных тестов, позволяющих оценивать состояние системы кроветворения у больных АА, а также определять прогностически значимые патогенетические особенности заболевания.

Нами предложен комплекс морфологических, гистологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов исследований для оценки особенностей заболевания на этапе первичной диагностики АА. Приведены стандартные методы исследований, дополненные определением патогенетически и прогностически значимых показателей, а также предложены методики, позволяющие расширить представления об особенностях патогенеза заболевания и предполагаемой эффективности ИСТ у отдельных больных АА.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АА	— апластическая анемия
ИГХ	— иммуногистохимические исследования
ИЛ-6	— интерлейкин-6
ИЛβ	— интерлейкин-β
ИСТ	— иммуносупрессивная терапия
ИПР	— индекс продукции ретикулоцитов
КМ	— костный мозг
МДС	— миелодиспластический синдром
НАА	— нетяжёлая апластическая анемия
ПНГ	— пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ТАА	— тяжёлая апластическая анемия
ТКМ	— трансплантация костного мозга
ФНО	— фактор некроза опухоли
ARC	— абсолютное значение ретикулоцитов
CRC	— скорректированный счет ретикулоцитов
Hb, HGB	— концентрация гемоглобина
GPI	— гликозилфосфатидилинозитол
MCH	— среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCHC	— средняя концентрация гемоглобина в эритроците
MCV	— средний объем эритроцита
NK-клетки	— натуральные киллеры
NKT-клетки	— активированные Т-лимфоциты
PLT	— тромбоциты
RDW	— показатель анизоцитоза эритроцитов
RET	— ретикулоциты
RBC	— эритроциты
WBC	— лейкоциты

ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Методики проведения исследований

1.1. Методика оценки гемограмм

В план обследования больных с подозрением на АА входит полный клинический анализ крови с определением числа тромбоцитов и ретикулоцитов.

Анализ проводится на образцах периферической крови, стабилизированной любым антикоагулянтом, полученной отбором в специальные вакуумные пробирки или иным способом.

Материалы:

- Стандартное оборудование клинической лаборатории, включая гематологические анализаторы, световые микроскопы

Методы:

Используются рутинные методы подсчёта числа клеток и исследования гемограммы. Для проведения дифференциальной диагностики, оценки морфологии клеток крови необходим визуальный контроль мазков.

При анализе ретикулоцитов используются две группы методов:

- Подсчет ретикулоцитов при микроскопии специально окрашенных мазков крови. В основе метода лежит способность рибосом клеток реагировать с некоторыми красителями с образованием преципитатов в виде гранул или нитей. Унифицированным методом является суправитальная, т.е. без предварительной фиксации клеток, окраска мазков бриллиантовым крезоловым синим.
- Автоматизированные методы анализа и подсчета ретикулоцитов: компьютеризированный анализ изображения и проточная цитометрия. Компьютеризированный метод анализа ретикулоцитов позволяет стандартизировать метод суправитальной окраски ретикулоцитов, что существенно повышает точность получаемых результатов по сравнению с визуальным анализом клеток.

Определение количества ретикулоцитов может быть использовано для определения продукции эритроцитов и вычисления срока жизни эритроцитов.

Приготовленные вышеуказанным способом мазки микроскопируют с иммерсионным объективом. Подсчитывают 1000 эритроцитов и отмечают среди них количество ретикулоцитов. Результат выражают в % или ‰.

Оценка результатов:

Для диагностики, дифференциальной диагностики и определения степени тяжести АА важны следующие показатели периферической крови, полученные с использованием гематологических анализаторов:

- количество эритроцитов (RBC — red blood cell) — $\times 10^{12}/л$;
- концентрация гемоглобина (Hb, HGB, hemoglobin) — г/л;
- гематокрит (Hct, HCT, hematocrit) — % или л/л;
- число тромбоцитов — PLT (plateletes) $\times 10^9/л$;
- общее число лейкоцитов — WBC (white blood cells) и абсолютное число нейтрофилов $\times 10^9/л$.

При оценке анемии обращается внимание на эритроцитарные индексы:

- MCV — средний объем эритроцита (mean corpuscular volume) измеряется в $мкм^3$ или фемтолитрах (фл);
- MCH — среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците (mean corpuscular hemoglobin) измеряется в абсолютных единицах норма 27–31 пг;
- MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците (mean corpuscular hemoglobin concentration) концентрация гемоглобина внутри эритроцита, норма 33–37 г/дл.
- RDW (red cell distribution width) — показатель анизоцитоза эритроцитов. Рассчитывается как коэффициент вариации среднего объема эритроцитов (норма 11,5–14,5 %). RDW характеризует колебания объема эритроцитов.

Тщательное изучение мазков крови позволяет исключить наличие диспластически изменённых, бластных и других аномальных клеток.

При оценке гемограммы больных АА обращается внимание на такие прогностические показатели, как число ретикулоцитов (процентное, скорректированное с учётом гематокрита и абсолютное), абсолютное число нейтрофилов, уровень тромбоцитов.

Для оценки резервов кроветворения и регенераторной способности эритроидного ростка целесообразно определение процентного и абсолютного числа ретикулоцитов, определение расчётного показателя — индекса продукции ретикулоцитов.

У здоровых лиц число ретикулоцитов составляет 2–12‰, или 0,2–1,2%.

Определение процентного содержания ретикулоцитов с коррекцией по гематокриту проводится по следующей формуле:

$$CRC = [RET (\%) \times Hct (л/л)] : 0,45$$

Где: CRC — скорректированный счет ретикулоцитов,

Где: RET — количество ретикулоцитов (%),

Где: Hct — гематокрит (л/л),

Где: 0,45 — гематокрит при нормальных показателях крови.

Абсолютное значение ретикулоцитов (ARC) отображает число ретикулоцитов в 1 л крови. Расчет производится по формуле:

$$ARC = [RET (\%)/100] \times RBC (\times 10^9/л)$$

Где ARC — абсолютное значение ретикулоцитов, а RBC — количество эритроцитов. Референтные значения от 10 до 110 $\times 10^9/л$.

В норме примерно 1% ретикулоцитов попадает в периферическую кровь за 1 день и там дозревает до эритроцита также в течение одного дня. При стимуляции эритропоэтином сокращается время созревания эритробластов и ретикулоцитов костного мозга с 3,5 дней в норме до 1,5–1 дня. Как следствие, увеличивается время циркуляции ретикулоцитов в периферической крови, что обязательно должно быть учтено при определении индекса продукции ретикулоцитов. Для учета этого явления предложен индекс созревания ретикулоцитов или индекс продукции ретикулоцитов (ИПР), определяемый по формуле:

$$ИПР = [RET (\%) \times Hct (л/л)] : 0,45 \times \text{время созревания RET}$$

Время созревания ретикулоцитов определяется по приведенной ниже таблице.

Таблица 1.

Изменение длительности созревания ретикулоцитов при анемии (по Hillman R. S., Finch C. A., 1994) [17]

Гематокрит (л/л)	Время созревания ретикулоцитов (дни)
0,40–0,45	1,0
0,35–0,39	1,5
0,25–0,34	2,0
0,15–0,24	2,5
< 0,15	3,0

Для больных апластической анемией характерны признаки выраженной нормохромной анемии с резким снижением концентрации Hb (25–80 г/л), количества эритроцитов (RBC $0,7\text{--}2,5 \times 10^{12}/\text{л}$), умеренным анизоцитозом (RDW↑) с тенденцией к макроцитозу (MCV↑). Характерным для АА является выраженная лейкопения (WBC $2,5\text{--}0,55 \times 10^9/\text{л}$) с абсолютной нейтропенией и относительным лимфоцитозом.

Резко выражена тромбоцитопения (PLT $2,0\text{--}25,0 \times 10^9/\text{л}$), иногда в мазках периферической крови тромбоциты могут отсутствовать. В большинстве случаев АА ускорена СОЭ.

К тяжелым формам АА относят случаи с количеством гранулоцитов в крови менее $0,5 \times 10^9/\text{л}$, тромбоцитов менее $20,0 \times 10^9/\text{л}$, числом ретикулоцитов, скорректированным по гематокриту, менее 1%.

Значительное снижение ИПР является свидетельством глубокого подавления эритропоэза и снижения резервов кроветворения.

При исследовании в динамике в процессе терапии показателями хорошего прогноза проводимой ИСТ могут служить абсолютное число гранулоцитов (нейтрофилов) в периферической крови и ретикулоцитов. Повышение указанных показателей в первые 1–2 месяца терапии — свидетельство благоприятного результата и ранние предвестники достижения ремиссии.

1.2. Методы исследования костного мозга

1.2.1. Гистологические методы исследования

Гистологическое исследование трепанобиоптатов подвздошной кости проводится с определением объёма, занимаемого кроветворной и жировой тканью, оценкой имеющихся изменений в составе и расположении кроветворных клеток и структур кроветворного микроокружения, наличия кровоизлияний. Дополнительное исследование препарата трепанобиоптата на возможное наличие отложений гемосидерина проводится у больных с длительным трансфузионным анамнезом.

Материалы и оборудование:

- иглы-трепаны для проведения трепанобиопсии;
- стандартное оборудование гистологической лаборатории (гистологический процессор, термостаты, микротом, водяная баня, емкости и колбы для окрашивания образцов);
- реагенты для обезвоживания и депарафинирования;
- предметные и покровные стекла;
- наборы реагентов для гистологических и гистохимических окрасок;
- набор реагентов для проведения иммуногистохимического исследования.

Методика исследования:

Учитывая неравномерность поражения гемопоэза при АА, для достоверной оценки состояния кроветворения важное значение имеет хорошее качество трепанобиоптата с размерами не менее 2 см.

Основываясь на большом опыте работы с трепанобиоптатами, мы рекомендуем проводить фиксацию и декальцинацию с использованием набора Mielodec (BioOptica). В состав набора входит фиксатор (формалин с хлоридом ртути) и декальцинатор на основе ЭДТА в кислотном буфере. Обезвоживание и заливка в парафин проводятся по общепринятой стандартной методике. Изготавливаются срезы толщиной 2–4 мкм.

Для гистологической оценки препараты окрашиваются стандартными общепринятыми методами — гематоксилин-эозином, азур-II-эозином.

Для выявления железа (гемосидерина) проводится гистохимическая окраска по Перльсу с использованием набора для окраски по

Перльсу (BioOptica) и среды для заключения препаратов (BioMount, BioOptica).

Методика исследования:

- Срезы депарафинировать по стандартной методике. Промыть срезы в дистиллированной воде.
- Смешать 10 мл ферроцианида калия, 30 мл дистиллированной воды и 4 мл активирующего кислотного буфера. Поместить срезы в полученную смесь на 20 мин.
- Тщательно промыть срезы в дистиллированной воде.
- Нанести на срез 10 капель Кармалауна Майера — 5 мин.
- Промыть срезы в дистиллированной воде.
- Обезводить препараты в спиртах восходящей концентрации, просветлить в ксилоле по стандартной методике. Заключить в BioMount.

Окраска гемосидерофагов — синяя, ядра — красные.

С целью анализа сосудов микроциркуляции интрамедуллярных пространств рекомендуется проведение ИГХ исследования с использованием антител CD 34 cl II (клон QBEnd 10), CD 31 (клон JC70A). Для проведения морфометрических исследований структур трепанобиоптатов рекомендовано использование пакета программ VideoTest® (Видеотест, Санкт-Петербург).

1.2.2. Иммуногистохимическое выявление микрососудов в трепанобиоптатах

Материалы и оборудование:

- водяная баня, РТ-модуль для демаскировки;
- дозаторы механические переменного объема 0,5–10 мкл, 20–200 мкл;
- одноразовые наконечники на дозаторы;
- стекла с поли-L-лизинном;
- гидрофобный карандаш;
- TBS-буфер, Dako;
- цитратный буфер для демаскировки (pH 6,0), Dako;
- антитела CD 34 cl.II (клон QBEnd 10), Cd 31 (клон JC70A), Dako;
- система визуализации EnVision FLEX, Dako;
- BioMount, BioOptica (либо другая среда для заключения препаратов — полистирол, канадский бальзам).

Методика исследования:

- Срез поместить на стекло с поли-L-лизинном, высушить в термостате при 37 °С в течение 12 часов. Затем срезы поместить на 30 мин в термостат 56 °С.
- Удалить парафин и регидратировать срезы стандартным способом.
- После промывки в дистиллированной воде (5 мин) срезы провести демаскировку антигенов на водяной бане в цитратном буфере (pH 6,0), 98 °С 20 мин. Остудить в буфере — 15–20 мин (примерно до 60 °С).
- Промыть срезы в дистиллированной воде, нанести на срезы по 100 мкл пероксидазного блока — 5 мин.
- Промыть срезы в дистиллированной воде (5 мин), промыть срезы в TBS буфере (5 мин).
- Удалить избыток жидкости с предметного стекла вокруг срезов, срезы обвести гидрофобным карандашом. Перенести стекла во влажную камеру.
- Нанести первичные антитела — 100 мкл на срез. Инкубация 20–30 мин при комнатной температуре.
- Промыть срезы в TBS буфере — 3 раза по 5 мин.
- Нанести 100 мкл HRP системы для визуализации. Инкубация 30 мин.
- Промыть срезы в TBS буфере — 3 раза по 5 мин.
- Срезы инкубировать в свежеприготовленном буферном растворе 3,3'-диаминобензидинтетрахлорида. В течение 1–3 мин происходит образование окрашенного продукта реакции. Процесс желательно контролировать под микроскопом, чтобы остановить реакцию до появления неспецифического фона.
- Промыть срезы в дистиллированной воде — 3 мин.
- Окрасить срезы гематоксилином — 1–3 мин. Смыть краситель дистиллированной водой, дифференцировать окраску в TBS буфере (2 мин). Промыть срезы в дистиллированной воде (3 мин).
- Обезводить препараты в спиртах восходящей концентрации, просветлить в ксилоле по стандартной методике.
- Заключить в BioMount.

Оценка результатов:

При микроскопическом анализе трепанобиопсий оценивается общая клеточность костного мозга, процентное соотношение деятельной кроветворной и жировой ткани, морфология гемопоэтиче-

ских клеток, наличие фиброза и аномальной инфильтрации, не характерных для АА, наличие гемосидерофагов и свободного гемосидерина, состояние микроциркуляторного русла [18, 19].

Основным дифференциально-диагностическим признаком апластической анемии является гистологическая картина костного мозга: жировой костный мозг с редкими очагами эритроцитарного и гранулоцитарного кроветворения (более 70–80% жировой ткани), мегакариоциты единичные или не встречаются совсем.

Количество сосудов микроциркуляторного русла при развитии и прогрессии апластической анемии сокращается по сравнению с нормой. Сведения о состоянии сосудов микроциркуляции, важного элемента гемопозитической ниши костного мозга, могут служить для уточнения диагноза, оценки эффективности лечения и прогнозирования течения заболевания.

Наличие отложений гемосидерина — следствия неэффективного эритропоэза и посттрансфузионной перегрузки железом — является фактором, неблагоприятным для приживления трансплантата и должно учитываться при определении показаний к ТКМ.

1.2.3. Оценка миелограмм

Материалы и оборудование:

- стандартное оснащение клинично-диагностической лаборатории;
- иглы для пункции костного мозга с упором (по типу иглы Касирского).

Методы:

Используются стандартные методы подсчёта миелограммы.

Фиксация и окрашивание мазков пунктата костного мозга может выполняться вручную или автоматически с помощью специальных устройств, в которые загружаются нефиксированные мазки. Методика окрашивания мазков пунктата костного мозга — по Паппенгейму (фиксация фиксатором-красителем по Май–Грюнвальду в течение 2 мин; окраска красителем Романовского–Гимзы, разведенным фосфатным буфером 1 к 10 в течение 10 мин).

Морфологическое исследование и подсчет форменных элементов костного мозга (миелограммы) проводят по стандартному методу Аринкина.

Предварительное изучение окрашенных препаратов костного мозга проводится под малым увеличением (40×10). После предварительного (обзорного) изучения мазка на препарат наносится капля иммерсионного масла, в которую погружают иммерсионный объектив, и проводится подсчет клеток под увеличением (100×10). Подсчитывают все, встречающиеся в поле зрения миелокариоциты, не менее 500 клеток в разных участках трёх или более препаратов, регистрируя их число с помощью счетчика. Вычисляется процентное соотношение каждого вида клеток.

Оценка результатов:

Результатом цитологического исследования пунктата костного мозга является характеристика костномозгового кроветворения, которая включает в себя оценку клеточности костного мозга; процентного состава миелокариоцитов, описание миелограммы и морфологических особенностей гемопоэза.

Полученные результаты подсчета количества миелокариоцитов, мегакариоцитов, миелограммы и индексов мозгового кроветворения сравниваются с референтными значениями состава клеток пунктата костного мозга, полученными при обследовании здоровых взрослых пациентов и детей. После дифференцированного подсчета оцениваются морфологические особенности клеток, кинетика созревания и составляется заключение по миелограмме в целом, при обязательном сопоставлении с показателями гемограммы.

Характерные особенности картины костного мозга у больных с апластической анемией следующие:

Количество миелокариоцитов снижено. При обзоре костного мозга встречаются макрофаги, липофаги, тучные клетки, участки синцития с клетками стромы.

В миелограмме на фоне сужения гранулоцитарного ростка повышено относительное содержание лимфоцитов, плазматических клеток. Эритропоэз характеризуется абсолютным уменьшением количества эритрокариоцитов и нарушением их дифференцировки.

Резко снижено количество мегакариоцитов, а в тяжелых случаях они могут отсутствовать.

Поражение костного мозга имеет очаговый характер. В местах опустошения активный костный мозг замещается жировой тканью. Однако даже при крайне тяжелом угнетении гемопоэза возможны активные очаги кроветворения. Учитывая наличие «горячих точек» («горячих карманов») в связи с неоднородным поражением КМ иногда аспират бывает нормоцеллюлярным.

Для АА характерна гипоклеточность КМ при отсутствии признаков лейкозной трансформации. Нередко при АА, особенно вариантах заболевания с присутствием ПНГ-клона, выявляются признаки дизэритропоэза, что само по себе не является признаком миелодиспластического синдрома (МДС).

Оценка степени тяжести заболевания, степени сохранности гемопоэза наиболее достоверна при одновременной оценке аспирата и трепанобиоптата при сопоставлении полученных результатов с данными периферической крови.

1.3. Методы иммунологических исследований

Для выявления патогенетически значимых изменений при АА информативным является исследование продукции мононуклеарами периферической крови и/или костного мозга цитокинов — негативных регуляторов гемопоэза (в первую очередь ФНО), а также определение основных продуцентов цитокинов, наиболее значимых в патогенезе АА субпопуляций лимфоцитов. К таким субпопуляциям относятся зрелые Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺/CD4⁺), цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺/CD8⁺), НК-клетки (CD3⁺/CD16/56⁺), НКТ-клетки (CD3⁺/CD16/56⁺).

С целью выявления вариантов заболевания, ассоциированных с наличием ПНГ-клона, всем пациентам с АА показано тестирование клеток крови больных на ПНГ методом высокочувствительной проточной цитометрии. Оценивается экспрессия GPI-связанных протеинов.

1.3.1. Методы определения субпопуляций лимфоцитов и ПНГ-клона

Анализ гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якорных белков методом проточной цитометрии способствует достоверному выявлению ПНГ-клонов, в том числе минорных, и даёт количественную оценку клона.

Определение иммунофенотипических характеристик мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови и костного мозга проводится с помощью двух-пятицветного анализа на проточном лазерном цитофлуориметре. В основе метода проточной цитометрии лежит

проведение фотометрических и флуоресцентных измерений клеток в потоке жидкости лазерным лучом цитометра. Фотометрические каналы используются для оценки размеров клетки и ее гранулярности. При одновременной регистрации бокового и прямого светорассеяния можно выделить все клеточные популяции лейкоцитов. Таким образом, параметры светорассеяния позволяют провести анализ в регионе клеточной популяции с определенными характеристиками.

Для исследования используется панель моноклональных антител (MoAT) («Beckman Coulter», США), меченных флуоресцирующими красителями (FITC, PE, ECD, Pс5, Pс7), к дифференцировочным антигенам, позволяющим идентифицировать следующие популяции клеток: CD3⁺ — зрелые Т-лимфоциты, CD3⁺/CD4⁺ — Т-хелперы, CD3⁺/CD8⁺ — цитотоксические Т-лимфоциты, CD3⁺/CD16/56⁺-NK-клетки, CD3⁺/CD16/56⁺ — НКТ-клетки.

Тестирование на ПНГ-клон проводится методом многоцветной проточной цитометрии с определением клеток с ПНГ-фенотипом среди гранулоцитов (FLAER/CD24/CD15/CD45), моноцитов (FLAER/CD14/CD64/CD45) и эритроцитов (CD235a/CD59). Анализ гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-якорных белков методом проточной цитометрии способствует достоверному выявлению ПНГ-клонов, в том числе минорных, и даёт количественную оценку клона. Определение процента гемопоэтических клеток с мутацией PIG-A может влиять на выбор терапии.

Материалы:

- центрифуга лабораторная медицинская настольная с ротором (типа ЦЛМН-Р10-01-«Элекон»);
- микроскоп биологический (лабораторный);
- дозаторы пипеточные автоклавируемые с фиксированными и переменными объемами;
- наконечники полимерные к дозаторам пипеточным РР;
- реагенты и расходные материалы для цитометрических исследований (типа Beckman Coulter Inc., Immunotech S.A.S., США, ФРГ, Франция);
- скрининговая панель для диагностики ПНГ: маркеры CD235a/CD59 для эритроцитов, CD24/FLAER для гранулоцитов и CD14/FLAER для моноцитов;
- проточный цитофлуориметр (типа Cytomics FC 500 с принадлежностями);
- среда для разделения клеток Lympholyte-H («Cedarlane», Canada).

В качестве материала исследования используют мононуклеары периферической крови, цельную венозную кровь и мононуклеары костного мозга, полученного путем стерильной пункции, и стабилизированные антикоагулянтом (гепарин натрия, 25 Ед/мл). Мононуклеары выделяются методом градиентного центрифугирования с использованием среды для разделения клеток Lympholyte-H («Cedarlane», Canada).

Методика:

По 100 мкл образцов цельной крови с антикоагулянтом помещают в пластиковые пробирки для проточного цитометра, добавляют 20 мкл моноклональных антител и инкубируют согласно прилагаемым к каждому реагенту инструкциям.

Далее образцы подвергаются лизису с помощью реагентов ImmunoPrep Reagent system, Beckman Coulter, США с использованием автоматической станции пробоподготовки Beckman Coulter, США.

Учет антиген-положительных клеток осуществляют на проточном цитофлуориметре при регистрации не менее 5 000 событий в области мононуклеарных клеток (CD45+/CD14-).

Для диагностики ПНГ-клона дополнительно используются моноклональные антитела CD235a/CD59 для эритроцитов, FLAER/CD24/CD15/CD45 для гранулоцитов и FLAER/CD14/CD64/CD45 для моноцитов. При проведении исследований руководствуются протоколами высокочувствительных исследований на ПНГ, основанных на принципах, которые были разработаны Международным обществом клинических цитометристов (ICCS) с целью предоставления стандартизированной методологии проточной цитометрии для обнаружения клеток ПНГ [20, 21].

Оценка результатов:

Характерным для АА является существенное повышение в периферической крови и особенно в костном мозге количества CD3+ Т-лимфоцитов, нарушение соотношения основных иммунорегуляторных субпопуляций CD3+CD4+ /CD3+CD8+ как в сторону повышения, так и в сторону инверсии иммунорегуляторного индекса (CD3+CD4+/CD3+CD8+ < 1), снижение количества CD3⁻/CD16/56⁺ NK-клеток и повышение активированных CD3⁺/CD16/56⁺ NKT-лимфоцитов.

Успешная терапия, как правило, сопровождается снижением уровня CD3+Т-клеток, нормализацией соотношения иммунорегуляторных Т-лимфоцитов (CD3+CD4+/CD3+CD8+ = 1,2–1,5), повышении

ем количества CD3⁻/CD16/56⁺ NK-клеток и снижением активированных CD3⁺/CD16/56⁺ NKT-лимфоцитов.

ПНГ-клоном считаются клетки с отсутствием экспрессии перечисленных поверхностных маркеров. Наличие клона подтверждается при выявлении ≥ 0,01% лейкоцитов с полным или частичным дефицитом GPI-связанных белков. Для наиболее достоверной оценки общего размера клона обычно используется величина клона, определённого среди гранулоцитов.

Следует учитывать, что доля определяемых патологических клеток зависит как от чувствительности используемой проточной цитометрии, так и от таких факторов, как трансфузии гемокомпонентов, в первую очередь, донорских эритроцитов. При оценке размера ПНГ-клона среди эритроцитов определяется процентное содержание клеток II и III типа: с частичным и полным дефектом специфических поверхностных маркеров соответственно. При выявлении ПНГ-клона свыше 1% показано дополнительное обследование больного для определения признаков внутрисосудистого гемолиза: развёрнутый биохимический анализ, определение уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ), гаптоглобина.

Небольшой размер ПНГ-клона при отсутствии признаков гемолиза является показанием для динамического наблюдения с контролем теста на ПНГ 1 раз в 6–12 месяцев и благоприятным для проведения ИСТ прогностическим фактором. Размер клона свыше 5–10%, особенно при наличии признаков скрытого гемолиза, считается показанием к более тщательному наблюдению и регулярному (1 раз в 6 месяцев и дополнительно — при появлении новых симптомов) контролю ПНГ-клона и тестов на гемолиз ввиду повышенного риска трансформации в манифестную ПНГ.

1.3.2. Метод определения спонтанной продукции ФНО

Материалы и оборудование:

- центрифуга лабораторная;
- термостат водяной комбинированный;
- фотометр иммуноферментный планшетный;
- планшеты для иммуноферментного анализа;
- дозаторы пипеточные многоканальные с варьируемым объемом;
- камера Горяева;
- фосфатно-буферный раствор;

- фитогемагглютинин;
- стерильная среда RPMI-1640 (Москва);
- стерильный раствор для выделения мононуклеаров — Histopaque (Sigma);
- эмбриональная телячья сыворотка («Биолот», Санкт-Петербург);
- гентамицин;
- тест-наборы для определения ФНО α .

Методика:

1. Выделенные в стерильных условиях мононуклеарные клетки в концентрации 2×10^6 /мл культивируют в течение 24 часов при 37 °С и 5% CO $_2$ в 96-луночных планшетах в объёме 100 мкл на лунку в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина. Супернатанты клеток после завершения культивирования отсасывают с помощью пипетки и исследуют на наличие цитокинов.
2. Реакция проводится в 96-луночных плоскодонных планшетах в несколько этапов:
 - наложение моноклональных антител к ФНО α на дно лунки — чаще проводится фирмой-изготовителем;
 - внесение стандартов ФНО α , разведенных в буфере, в ячейки планшета по 100 мкл или в количестве, указанном в инструкции, для получения калибровочной кривой;
 - внесение в оставшиеся ячейки исследуемых образцов по 100 мкл. Стандарты и образцы инкубируют 1 час при 37 °С. По окончании инкубации планшеты трёхкратно промывают промывочным буфером;
 - инкубация с поливалентными «вторыми» антителами, закрывающими «сэндвич» антиген-антитело и являющимися, в свою очередь, антигеном для третьего вида антител. Антитела разводят согласно инструкции, вносят по 100 мкл в лунку и 45 мин. инкубируют при 37 °С с последующим трёхкратным промыванием;
 - инкубация с «третьими» антителами — конъюгатом стрептавидина с пероксидазой хрена — проводится так же, как с предыдущими антителами;
 - инкубация с раствором субстрата для проявления окраски согласно инструкции. По окончании инкубации добавляется 50 мкл 1N раствора серной кислоты для остановки реак-

ции и определяется оптическая плотность на автоматическом спектрофотометре при длине волны 450 нм.

После построения калибровочной кривой по стандартам рассчитывают концентрацию ФНО α в исследуемых образцах.

Оценка результатов:

Для иммунообусловленных форм АА характерно существенное (в 5–10 раз) повышение спонтанной продукции ФНО α мононуклеарами как периферической крови, так и костного мозга. Высокий уровень данного цитокина, как правило, является залогом успешной ИСТ. Показателем успешности терапии на ранних сроках может служить ниже уровня спонтанной продукции ФНО α в течение первых месяцев лечения.

1.4. Молекулярно-генетическое HLA-типирование

С целью определения важного прогностического фактора при планировании ИСТ всем больным рекомендуется проводить молекулярно-генетическое типирование HLA-генов класса II (HLA DRB1).

Материалы и оборудование:

- микроцентрифужные колонки;
- набор реагентов (DNA BOX), фирмы “PROTRANS” (Германия);
- наборов реагентов PROTRANS Ceclerplate System Protrans HLA-DRB1*;
- фермент taq-полимераза;
- спектрофотометр Smart Spect Plus, BioRad;
- одноразовые кюветы Truview Cuvette, BioRad.
- термоциклер.

Методика:

Геномную ДНК для проведения молекулярного типирования HLA DRB1-гена выделяют из лейкоцитов периферической крови с использованием микроцентрифужных колонок при помощи коммерческого набора реагентов (DNA BOX). Оценка количества и качества выделенной ДНК осуществлялась с помощью спектрофотометрии. Измерение оптической плотности каждого образца ДНК проводится при 260 nm и 280 nm. Концентрация выделенной ДНК — 50–100 нг/мкл.

Типирование генов системы HLA II класса (локус DRB1*) на базовом разрешении осуществляется посредством полимеразной цепной реакции (PCR-SSP) с панелью сиквенс-специфических праймеров с помощью стандартных коммерческих наборов реагентов PROTRANS Ceclerplate System Protrans HLA-DRB1*, позволяющих определить следующие группы аллелей HLA DRB1 *01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16. Визуализация продуктов, полученных в результате полимеразной цепной реакции, проводится посредством электрофореза в горизонтальном 2% агарозном геле. Фоторегистрация продуктов электрофореза и архивирование электрофореграмм осуществляется с помощью системы фоторегистрации GelDoc (США). Интерпретация полученных результатов осуществляется с помощью таблиц, прилагаемых к набору праймеров.

1.5. Цитогенетические методы исследований

Цитогенетический анализ проводится для дифференциальной диагностики с гипоклеточным вариантом МДС и выявления вариантов АА с цитогенетическими клональными аномалиями, а также обнаружения хромосомной нестабильности — повышенного уровня индуцированных аномалий хроматидного характера (разрывы хромосом, кольца, множественные радиальные фигуры, ацентрические фрагменты, дицентрики) с целью диагностики врожденных форм заболевания у пациентов молодого возраста.

Костный мозг, полученный при аспирации и обладающий высокой спонтанной митотической активностью, непосредственно используется для приготовления хромо-сомных препаратов. Периферическая кровь используется для теста с митомицином С с целью выявления нестабильности хромосомного аппарата.

Материалы и оборудование:

- аспират костного мозга;
- периферическая кровь;
- центрифуга лабораторная;
- термостат;
- микроскоп биологический (лабораторный);
- компьютерная система анализа изображений «ВидеоТест»;
- дозаторы пипеточные с фиксированными и переменными объемами;

- наконечники полимерные к дозаторам пипеточным РП;
- стерильная среда RPMI-1640;
- 20% эмбриональная телячья сыворотка;
- фосфатно-буферные растворы;
- краситель Гимза;
- митомицин С;
- фитогемаглютинин (ФГА).

Методика:

а) Кариологический анализ

Костный мозг (не менее 1 мл) отбирается в стерильный флакон — вакуумную пробирку типа вакутейнер с напылением гепарина. Подсчитывается число ядерных клеток. Проба считается адекватной, если количество миелокариоцитов составляло не менее $15-20 \times 10^9$ /мл. Зная число клеток в исходной суспензии, материал разделяется на две или более культур, выдержав оптимальную концентрацию — 2×10^9 /мл клеток на 1 мл среды RPMI — 1640, дополненной 20% эмбриональной телячьей сывороткой, антибиотиком, глутамином (292,3 мг/л). В момент посадки культуры добавляется колцемид. Клетки костного мозга культивируются в течение 24 часов при температуре 37°C в термостате, что обеспечивает получение необходимого для исследования количества качественных метафазных пластин.

Полученный материал делится на две пробирки и центрифугируется в течение 10 минут при 1000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости, полученная клеточная суспензия обрабатывается гипотоническим раствором хлорида калия в течение 30 минут при температуре 37°C. Остановку воздействия гипотонического раствора производят 5% уксусной кислотой, что позволяет более щадяще воздействовать на клетки, или фиксатором, состоящим из 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Использование уксусной кислоты предпочтительно, поскольку при цитогенетическом исследовании клеток костного мозга больных АА имеются определенные трудности, связанные с особенностями заболевания, в первую очередь это недостаточное количество метафазных пластин либо отсутствие митозов. Модифицированный нами метод позволяет улучшить качество и увеличить количество метафазных пластин, пригодных для анализа.

После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости, материал подвергается 3–4 кратной фиксации по 10 минут смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1 при комнатной температуре. После этого полученную суспензию

клеток наносили на холодные обезжиренные предметные стекла.

После высушивания препаратов хромосом в течение 1 суток в термостате при температуре 37 °С, выполняется процедура дифференциальной окраски на G-диски по методу Seabright [22]. Для этого препараты обрабатываются 0,25% раствором трипсина, нагретым до 37 °С в течении 2–10 секунд и промывают в трех сменах дистиллированной воды. Затем стекла покрывают краской Гимзы, разведенной на фосфатном буфере (рН = 6,8) и промывают под проточной водой. Далее высушивают препараты при комнатной температуре и анализируют качество окраски хромосом под световым микроскопом. В каждом наблюдении окрашивается 5–10 стекол.

Оценка результатов

В каждом отдельном случае анализируется 20–30 метафазных пластин. При обнаружении патологической клетки анализируются все имеющиеся митозы для подтверждения клональности хромосомных aberrаций и установления процентного соотношения между нормальным и патологическими клонами клеток. Если одни и те же структурные нарушения кариотипа или дополнительные хромосомы были обнаружены в двух и более клетках, а потери хромосом — в трех, констатируется наличие патологического клона клеток. Интерпретация патологии кариотипа производится в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2005).

Использование компьютерной системы анализа изображений «ВидеоТест» при проведении цитогенетических исследований позволяет ускорить время кариотипирования и создать базу результатов цитогенетических исследований.

Следует отметить, что проведение анализа может быть затруднено из-за крайне низкой клеточности КМ. В таких случаях рекомендуется проведение анализа хромосом, в первую очередь 5 и 7, методом FISH [22].

При выявлении цитогенетических аномалий у больных АА в связи с повышенным риском трансформации в клональные опухолевые заболевания требуется проведение повторных исследований в динамике и наблюдение за пациентами, а наличие аномалий кариотипа является дополнительным показанием к проведению ТКМ.

б) Тест с митомицином С

Подсчитав количество лейкоцитов, кровь разделяют на две или более культур, выдержав оптимальную концентрацию — $3-5 \times 10^9$ /мл клеток на 1 мл среды RPMI — 1640, дополненной 20% эмбриональной телячьей сывороткой, антибиотиком, глутамином

(292,3 мг/л). В момент посадки культуры добавляют митоген ФГА и митомицин С (40 нг/мл). Периферическая кровь культивируется в термостате 72 часа при температуре 37 °С. За 24 часа до окончания культивирования добавляется колцемид, что обеспечивает получение необходимого для исследования количества качественных метафазных пластин.

Далее фиксация культуры и приготовление препаратов хромосом осуществляется по протоколу костномозговых препаратов.

Для оценки теста с митомицином С препараты окрашиваются только краской Гимзы, разведенной на фосфатном буфере (рН = 6,8) и промывают под проточной водой. Трипсинизация и дифференциальная окраска хромосом на G-диски не нужна.

Оценка результатов

В каждом отдельном случае анализируется 50–200 метафазных пластин пациента и здорового донора. Подсчитывается количество хроматидных аномалий и высчитывается процент нестабильности хромосомного аппарата согласно формуле:

$$\frac{\text{количество хроматидных поломок}}{\text{количество метафаз}} \times 100 = \underline{\hspace{2cm}} \%$$

Данный подсчет осуществляется как у здорового донора, так и у пациента и проводится сравнительный анализ полученных результатов с целью выявления врожденных форм заболевания и определения показаний к проведению ТКМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен комплекс исследований, учитывающий наряду со стандартными критериями диагностики и степени тяжести заболевания, также дополнительные факторы, отражающие патогенетические особенности заболевания у отдельных групп больных АА. Данные такого комплексного обследования, дополняющего общепринятые методики, позволяют более достоверно оценить предполагаемую эффективность различных методов терапии больных АА, а при исследовании в динамике определить перспективы лечения по данной программе у конкретного больного и принять необходимые меры по изменению программы лечения на ранних сроках.

Использование разработанного комплексного подхода с определением прогностически значимых критериев, позволит применять наиболее эффективные программы терапии больных АА и проводить своевременную коррекцию лечения для получения наиболее полных и стойких результатов терапии.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Абдулкадыров К. М., Бессмельцев С. С. Апластическая анемия — СПб: Изд-во «Наука»; «Издательство KN», 1995. — 232 с.
2. Кулагин А. Д., Лисуков И. А., Козлов. Апластическая анемия: иммунопатогенез, клиника, диагностика, лечение — Новосибирск: Изд-во «Наука», 2008. — 236 с.
3. Guinan E. C. Diagnosis and Management of Aplastic Anemia // ASH Education Book, December 10. — 2011. — Vol. 2011. — P. 76–81.
4. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia / J. C. Marsh, S. E. Ball, J. Cavenagh et al. // Br. J. Haematology. — 2009. — Vol. 147. — P. 43–70.
5. Selection of patients of bone marrow transplantation in severe aplastic anemia/B.M. Camitta, J.M. Rapoport, R. Parkman, D.G. Nathan//Blood. — 1975. — Vol. 45. — P. 355–363.
6. Young N. S. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia//ASH Education Book, December 6. — 2013. — Vol. 2013. — P. 76–81.
7. Продукция цитокинов клетками периферической крови и костного мозга больных апластической анемией/О.Е. Розанова, Л. Н. Бубнова, Т. В. Глазанова и др. // Русский журнал «ВИЧ/СПИД и родственные проблемы». — 2001. — № 1. — С. 58–59.
8. Marsh J. C. W., Kulasekararaj A. G. Management of the refractory aplastic anemia patient: what are the options? // ASH Education Book. — 2013. — Vol. 2013. — P. 87–94.
9. Immune suppression therapy in aplastic anemia: influencing factors on response and survival / J. Y. Jin, D. W. Kim, J.W Lee et al. // Korean J. Intern. Med. — 1995. — Vol. 10. — P. 25–31.
10. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome / S. Rosenfeld, D. Follmann, O. Nunez, N. S. Young // JAMA. — 2003. — Vol. 289. — P. 1130–1135.
11. Комплексная оценка уровня цитокинов в периферической крови и костном мозге больных апластической анемией при прогнозировании течения заболевания. Методические рекомендации / К. М. Абдулкадыров, Л. Н. Бубнова Л. Н., О. Е. Розанова и др. — 2001, Санкт-Петербург. — 15 с.
12. Balance of NK, NKT cells and main cytokines — positive and negative regulators of haemopoiesis — in patients with aplastic anaemia at different stages: relapse and remission / T. Glazanova, O. Rozanova, E. Shilova, L. Bubnova // Haematologica. — 2012. — Vol. 97. —

Abstract Book. 17-th Congress of the European Hematology Association, Amsterdam, the Netherlands June 14–17, 2012. — Abst. 0341. — P. 137.

13. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia / P. Scheinberg, J. N. Cooper, E. M. Sloand et al. // JAMA. — 2010. — Vol. 304. — P. 1358–1364.
14. HLA-DR-15 is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome / Y. Sauntharajah, R. Nakamura, J. M. Nam et al. // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 1570–1574.
15. Cytogenetic abnormalities in patients with severe aplastic anemia / N. Mikhailova, M. Sessarego, G. Fugazza et al. // Haematologica. — 1996. — Vol. 81. — P. 418–422.
16. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leucemia after immunosuppressive therapy in children / S. Kojima, A. Ohara, M. Tsuchida et al. // Blood. — 2002. — Vol. 100. — P. 786–790.
17. Луговская С. А., Почтарь М. Е. Ретикулоциты. Москва. 2006. — 60 с.
18. Метод гистологической оценки стромы костного мозга здоровых лиц и больных острым миелобластным лейкозом: Метод. рекомендации / ЛНИИГиПК; Сост. К. М. Абдулкадыров, В. И. Ругаль — Л., 1988. — 20 с.
19. The illustrated guide to bone marrow diagnosis. Dako A / S. — 2003. — PP. 30
20. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry / M. J. Borowitz, F. E. Craig, J. A. Diguseppe et al. // Cytometry B. Clin. Cytom. — 2010. — Vol. 78. — P. 211–230.
21. Stherland D. R., Keney 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. — Vol. 82. — P. 195–208.
22. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosome // Lancet . — 1971. — Vol. 2. — P. 970–975.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Обозначения и сокращения.....	8
Основные нормативные положения.....	9
1. Методики проведения исследований	9
1.1. Методика оценки гемограмм	9
1.2. Методы исследования костного мозга.....	13
1.2.1. Гистологические методы исследования	13
1.2.2. Иммуногистохимическое выявление микрососудов в трепанобиоптатах	14
1.2.3. Оценка миелограмм	16
1.3. Методы иммунологических исследований	18
1.3.1. Методы определения субпопуляций лимфоцитов и ПНГ-клона.....	18
1.3.2. Метод определения спонтанной продукции ФНО.....	21
1.4. Молекулярно-генетическое HLA-типирование.....	23
1.5. Цитогенетические методы исследований.....	24
Заключение	28
Библиография	29

КОМПЛЕКСНАЯ ПРОГРАММА ДИАГНОСТИКИ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Методические рекомендации

Технический редактор: Кронберг Т. В.
Компьютерная верстка: Дмитриева О. С.

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.
Гарнитура «Times New Roman». Подписано в печать 30.04.2015 г.
Печ. л. 2. Формат 60×90 ¹/₁₆.
Тираж ____ экз. Заказ № ____.

Отпечатано в типографии ООО «Агентство “ВиТ-принт”».
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. «Б».
Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93
E-mail: vit-print@mail.ru