

DOI: 10.26693/jmbs03.04.212

УДК 616.155.194+616-006.44

Тимошенко У. В., Мироненко Г. А., Сивкович С. А., Паєлюк Р. П.

АУТОИММУННЫЙ ГЕМОЛИЗ У ПАЦИЕНТОВ С В-КЛЕТОЧНЫМИ НЕХОДЖКИНСКИМИ ЛИМФОМАМИ

ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», Киев, Украина

immunogematolog@gmail.com

При исследовании частоты встречаемости иммунных гемолитических осложнений при В-клеточных неходжкинских лимфомах выявлены антиэритроцитарные аутоиммунные антитела у 42,9% пациентов, принимавших полихимиотерапию без ритуксима. Из всего количества пациентов в группе IgG/C3 обнаружены у 28,6%, холодовые агглютинины у 7,1%, кислотные гемолизины у 21,4%, C3d и/или C3c у 14,3%. В группе пациентов, принимавших ритуксим, антитела были у 12,9% обследованных, при этом: IgG у 3,2%, кислотные гемолизины у 6,4%, C3d и/или C3c у 3,2% (среди многих пациентов обнаружены несколько их серологических типов). В группе пациентов, не принимавших терапию вовсе, антитела обнаружены у 16,7 % (IgG – 8,3%, кислотные гемолизины также у 8,3%). Таким образом, в группе пациентов, принимавших терапию без ритуксима, по сравнению с пациентами на ритуксиме или не принимавших лечение, наблюдался более широкий спектр антиэритроцитарных антител, компонентов компонента, в том числе наличие холодовых агглютининов при отсутствии тепловых IgG агглютининов, т.е. выявлена холодная аутоиммунная реакция. У подавляющего большинства пациентов с антителами, принимавших полихимиотерапию без ритуксима, имелись лабораторные признаки вне- или внутрисосудистого гемолиза и снижение уровня гемоглобина крови; признаки аутоиммунного гемолитического процесса обнаружены практически у половины всех обследованных больных этой группы. У не принимавших лечение и принимавших ритуксим обнаружены признаки только внесосудистого гемолиза.

Ключевые слова: антиэритроцитарные аутоиммунные антитела, гаптоглобин, свободный гемоглобин, непрямой билирубин.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Исследование являлось фрагментом научно-исследовательской работы, выполненной в ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины» «Изучить механизмы им-

мунного гемолиза при заболеваниях различного генеза», № гос. регистрации 0113U000461.

Введение. Аутоиммунная гемолитическая анемия (АИГА) осложняет течение от 3 до 6% неходжкинских лимфом [13]. В то же время В-клеточные лимфомы в 39% случаев являются причиной вторичной АИГА [19]. Ассоциация между лимфопролиферативными заболеваниями и аутореактивностью некоторыми авторами объясняется хронической иммунной стимуляцией в результате аутоиммунизации [3, 17].

АИГА может развиваться как вследствие самого онкологического процесса [12], так и являться осложнением медикаментозной терапии [7, 10, 11], в том числе химиотерапии [14]. Развитие АИГА, индуцированной флударабином, зафиксировано почти у 20% пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) [9]. Другими исследователями сообщается о 5,8% случаев развития гемолитической анемии у пациентов с ХЛЛ при приеме флударабина, циклофосфида и ритуксимаба (FCR), но у 82,4% этих пациентов прямой антиглобулиновый тест (DAT) был отрицателен, то есть на фоне циклофосфида и ритуксимаба тяжесть индуцированной флударабином АИГА снижается. Однако авторы предположили, что FCR может лишь маскировать DAT, приводя к DAT-отрицательной АИГА [6].

В течение последних 40–50 лет существенно увеличилось количество медикаментов с доказанной способностью индуцировать АИГА. Так, начиная с 1967 года в данный список входили 13 препаратов, а в 2007 году зарегистрировано уже 125 препаратов. Некоторые медикаментозные препараты могут стимулировать выработку антиэритроцитарных антител с последующим развитием гемолитической анемии (тяжелым внутрисосудистым гемолизом, снижением гемоглобина крови), или без таковой [9]. Механизм развития таких иммунных реакций до сих пор недостаточно изучен.

В случае медикаментозно индуцированной иммунной гемолитической анемии частота встречаемости тепловых аутоантител может достигать

от 30 до 81% [11, 16], холодовые же антитела наблюдаются крайне редко (0,2–1%) [18], по другим данным – до 4,8% [12]. Из серологических вариантов антиэритроцитарных аутоантител при неходжкинских лимфомах чаще наблюдаются IgG (31%), на IgM приходится 25% [16], встречается и комбинация IgG/C3. Некоторые исследователи приводят частоту встречаемости комбинации IgG/C3 при лимфомах 78%, C3d – 9%, IgA не обнаруживают [19].

Установлено, что развитие АИГА у больных неходжкинскими лимфомами ухудшает общую и медианную выживаемость [16]. Особенно тяжело поддаются терапии пациенты с холодовой формой АИГА [12].

При АИГА, когда увеличивается скорость лизиса эритроцитов, а утилизация свободного гемоглобина из крови недостаточна, повышенный уровень выделяемого из разрушенных эритроцитов при внутрисосудистом гемолизе свободного гемоглобина (fHb) и гема способствует гибели клеток посредством механизма перекисного окисления липидов [4, 14].

Гемолиз при В-клеточных неходжкинских лимфомах (В-НХЛ) имеет важное клиническое значение, поскольку гем способен напрямую связываться с первичным звеном классического пути активации комплемента, субкомпонентом C1q, являясь его ингибитором. Гем препятствует связыванию C1q с IgG, что в итоге значительно снижает активацию комплемента по классическому пути [15]. При лечении В-НХЛ ритуксимом (гуманизированные моноклональные антитела IgG анти-CD20, одним из цитолитических механизмов действия которых является запуск классического пути активации комплемента [12]) гемолиз может влиять на эффективность терапии. Таким образом, своевременная диагностика гемолитических осложнений при В-НХЛ и их устранение, будет способствовать повышению эффективности терапии.

Цель исследования. Установить частоту встречаемости аутоиммунных антиэритроцитарных антител и лабораторных признаков гемолиза у больных В-клеточными неходжкинскими лимфомами в зависимости от стадии заболевания и режима терапии.

Материалы и методы исследований. В исследовании приняли участие пациенты, обращавшиеся за консультацией в Киевский городской гематологический центр, в отделение цитогенетической диагностики и лечения онкогематологических заболеваний, а также в отделение трансфузиологии и интенсивной терапии и отделение иммуногематологии, которые находятся на базе ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины». От пациентов было получено информации

рованное согласие на участие в научных исследованиях.

Обследовано 57 больных В-НХЛ в возрасте 22–79 лет. В исследовании приняли участие 38 пациентов с индолентными лимфомами (мелкоклеточная фолликулярная, MALT, лимфома из клеток маргинальной зоны) и 19 пациентов с агрессивными (крупноклеточная диффузная). Среди пациентов с агрессивными лимфомами у 13 человек диагностирована I стадия заболевания, у 6 – II, у 8 – III, у 11 – IV. Среди пациентов с индолентными лимфомами – 3 с I стадией заболевания, 5 – с II, 4 – с III и 7 – с IV.

Все пациенты были распределены на 3 группы: группа I – первичные пациенты, не получавшие ранее специфического лечения;

группа II – пациенты, получавшие терапию по схемам CHOP, CHOP, COP, FC;

группа III – пациенты, прошедшие от 1 до 9 курсов лечения по режимам R-CHOP, R-CHOP, R-COP, R-FC (т.е. с включением в терапию ритуксима – моноклонального анти-CD20 антитела).

По уровню гемоглобина крови у пациентов выделяли три степени тяжести анемии: легкая (уровень гемоглобина не ниже 90 г/л), средней тяжести (90–70 г/л), тяжелая (уровень гемоглобина ниже 70 г/л).

Определение и идентификацию аутоиммунных тепловых и холодовых антиэритроцитарных антител производили в сыворотке венозной крови микрометодом в гелевом тесте BioRad (США) согласно оригинальной методике с помощью ID-Card Liss/Coombs (IgG+C3d) (для определения тепловых аутоагглютининов), ID-Card NaCl, enzyme test and cold agglutinins (для определения холодовых аутоагглютининов), ID-Card DC-Screening I (для идентификации классов IgG, IgA, IgM и субкомпонентов комплемента C3c и C3d).

Холодовые и тепловые кислотные гемолизины определяли по методу Дыгина В. П. в модификации Тимошенко У. В. и Мироненко Г. А. [2]. Сыворотку крови и эритроциты исследуемых лиц вносили в разных комбинациях в микропробирки с вытянутым конусным дном. После добавления донорского комплемента и 1/3 N соляной кислоты соответствующие пробирки подвергали инкубации. Для определения тепловых гемолизинов образцы инкубировали при 37 °C 1 час; для холодовых – по 30 мин поочередно при 4 °C и 18–22 °C. По истечении времени инкубации пробирки подвергали центрифугированию 10 мин при 1000 об/мин и оценивали результат по наличию или отсутствию продуктов гемолиза в надосадочной среде.

Уровень гаптоглобина (Hp) в сыворотке крови определяли иммунотурбидиметрическим методом

с помощью набора реагентов DIALAB (Австрия) согласно оригинальной инструкции. Сыворотку крови разводили 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:10. К 20 мкл этой смеси добавляли 900 мкл буфера PEG6 (из оригинального набора) и измеряли оптическую плотность смеси (A1) при длине волны 340 нм. После чего сюда же вносили 50 мкл реагента антител из набора, смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Вновь измеряли оптическую плотность (A2) в том же режиме. Далее вычисляли $\Delta A = A2 - A1$ и определяли уровень Hb в мг/мл по референтной кривой. Для построения калибровочной кривой использовали калибратор протеиновый высокий DIALAB (Австрия), рекомендованный производителем набора реагентов для определения гаптоглобина. С калибратором и 0,9% раствором NaCl делали ряд разведений: 1:16, 1:20, 1:40, 1:80, 1:140. В качестве нулевой точки взят 0,9% раствор NaCl. Подготовку образцов, измерение и вычисление каждого из разведений производили аналогично описанной процедуре для сыворотки. Строили калибровочный график, обозначая на осях X и Y значения ΔA и вычисленных в разведениях протеинового калибратора показателей Hb в мг/мл соответственно. Нормальные показатели содержания Hb в сыворотке крови человека следующие: в возрасте 0,5–16 лет – 25–138 мг/дл, 16–60 лет – 18–200 мг/дл, старше 60 лет – 35–175 мг/дл [8, 20].

Уровень свободного гемоглобина (fHb) в плазме крови определяли гемиглобинцианидным методом. Методика определения гармонизирована на заседании ученого совета ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», протокол № 9 от 25 ноября 2003 г. Готовили реактивы: трансформирующий раствор и фосфатный буфер pH 7,4. Для приготовления трансформирующего раствора использовали коммерческие наборы для определения гемоглобина гемиглобинцианидным методом. К 1 мл плазмы крови добавляли 2 мл фосфатного буфера, смесь центрифугировали при 4000 об/мин на протяжении 15 мин, 2 мл полученной надосадочной жидкости вносили в пробирку с 5 мл трансформирующего раствора. Измеряли оптическую плотность смеси (E1) при длине волны 540 нм и оптическом пути 10 мм против дистиллированной воды. Также измеряли оптическую плотность готового раствора гемоглобина, входящего в состав коммерческого набора. Концентрацию fHb плазмы крови определяли по формуле:

$$Hb = 1,6 \left[\left(\frac{E1}{E2} \times 150 \times 3,0 \right) : 71,7 \right] - 0,6,$$

где E1 – оптическая плотность fHb плазмы крови; E2 – оптическая плотность стандартного раствора

гемоглобина из набора; 150 – концентрация гемоглобина в стандартном растворе; 3,0 – разведение плазмы; 71,7 – коэффициент поправки между разведением плазмы и цельной крови; 0,6 и 1,6 – коэффициенты поправки к стандартному бензидиновому методу.

Референтные значения содержания fHb в плазме крови, определенные данным методом, находятся в пределах 0,00–0,07 г/л [1].

Показатели содержания в крови гемоглобина и непрямой фракции билирубина взяты нами из архивных документов истории болезни обследуемых пациентов.

В группах наблюдения нами вычислена частота встречаемости (в процентах) разных серологических типов антител у пациентов с В-НХЛ на разных стадиях заболевания.

Результаты исследования и их обсуждение.

Частота и серологические подтипы аутоиммунных антиэритроцитарных антител. При исследовании большинство пациентов с аутоиммунными антиэритроцитарными антителами относились к группе II наблюдения, в группах I и III их количество было приблизительно одинаковым (табл. 1).

Таблица 1 – Частота антител и их распределение в зависимости от стадии заболевания среди пациентов с В-НХЛ разных групп наблюдения

Группы наблюдения	Количество больных с антителами						
	Абс.	%	По стадиям заболевания, абс.				С признаками анемии, абс.
			I	II	III	IV	
Группа I, n = 12	2	16,7	2	0	0	0	0
Группа II, n = 14	6	42,9	0	2	4	0	4
Группа III, n = 31	4	12,9	2	1	1	0	1

В группе II у большинства больных диагностирована III стадия заболевания, в группах I и III – большинство обследованных находилось на I стадии. Среди больных с антителами не выявлено ни одного с IV стадией заболевания. Таким образом, в группе пациентов, получавших химиотерапию, оказалось больше всего лиц не только с аутоиммунными антиэритроцитарными антителами, но и с тяжелой стадией течения заболевания. Применение ритуксима препятствовало как прогрессированию заболевания, так и аутоиммунным осложнениям.

В группах наблюдения мы проанализировали серологическую характеристику выявленных антител (табл. 2).

Таблиця 2 – Серологическая характеристика антител у пациентов с В-НХЛ разных групп наблюдения

Группы наблюдения	Серологическая характеристика антител						СЗ*, %
	Тепловые агглютинины, %			Холодовые агглютинины, %	Кислотные гемолизины, %		
	IgM	IgG	IgG/C3		Тепловые	Холодовые	
Группа I, n = 12	0	8,3	0	0	8,3	0	0
Группа II, n = 14	0	0	28,6	7,1	14,3	7,1	14,3
Группа III, n = 31	0	3,2	0	0	3,2	3,2	3,2

Примечание: * – имеется ввиду остаточные субкомпоненты С3d и/или С3с.

Наибольшее серологическое разнообразие антител наблюдалось у больных, находившихся на химиотерапии без применения ритуксима (группа II). У пациентов этой группы частота встречаемости выявленных видов антител и СЗ была больше, чем в остальных группах, а также только у данной категории больных выявлены комбинация IgG/C3 и холодовые агглютинины. Известно, что наличие на эритроцитах субкомпонентов С3 компонента комплемента часто свидетельствует об аутоиммунной реакции, обусловленной холодовыми антителами [19]. В нашем случае были выявлены как изолированно СЗ, так и холодовые агглютинины и гемолизины, а также комбинация IgG/C3, которая указывает на наличие одновременно тепловой и холодной аутоиммунных реакций, что, конечно же, усугубляет аутоиммунный процесс. АИГА, обусловленная холодовыми антиэритроцитарными антителами, у больных неходжкинскими лимфомами протекает особенно злокачественно и хуже поддается лечению [13, 16, 18]. К тому же, холодовые агглютинины (которые преимущественно относятся к IgM [21]) встречались только у пациентов группы II. Нами ни в одной из групп исследования не были выявлены тепловые агглютинины класса IgM. Также, в группе II, в отличие от остальных групп наблюдения, не выявлены тепловые агглютинины IgG, что может свидетельствовать об отсутствии тепловой аутоиммунной монореакции, а лишь в комбинации с холодной.

В отличие от группы II, у пациентов групп I и III не встречались холодовые агглютинины и IgG/C3, но выявлялись тепловые агглютинины IgG. В группе I не встречались кислотные холодовые гемолизины, в группе III они были выявлены в два раза меньшем количестве, чем в группе II. Выявление в III группе IgG тепловых агглютининов в три раза меньшем количестве, чем у первичных пациентов (группа I), может свидетельствовать о снижении тяжести аутоиммунного синдрома под воздействием ритуксима.

Характерной особенностью пациентов группы I было отсутствие СЗ и холодовых антител любой категории, и наличие только тепловых антител – как гемолизин, так и агглютининов. Этот факт и

присутствие в этой группе пациентов с выявленными антителами на I стадии заболевания (табл. 1) могут указывать на то, что онкологический и аутоиммунный процессы у данных больных не достигли глубокой степени прогрессии. У пациентов группы III выявлялись тепловые и холодовые гемолизины и СЗ, однако, в гораздо меньшем количестве, чем в группах II и I. Таким образом, применение химиотерапии без ритуксима, в отличие от режима с применением ритуксима, не только не способствовало ликвидации аутоиммунной антиэритроцитарной реакции, но и усугубляло развитие основного заболевания.

Лабораторные признаки гемолиза. У пациентов всех групп наблюдения выявлены следующие лабораторные признаки гемолиза: повышение уровней свободного гемоглобина и непрямого фракции билирубина (НБ), а также снижение уровня гаптоглобина, которые оценивались по факту их наличия или отсутствия. Повышенный уровень fHb и сниженный Нр являются маркерами внутрисосудистого гемолиза, а повышенный уровень НБ – внесосудистого. Однако, в некоторых случаях может наблюдаться снижение Нр и при внесосудистом иммунном разрушении эритроцитов, что обусловлено «вырыванием» измененных и деформированных эритроцитов из ретикулоэндотелиального зазора, попаданием их в кровотоки и дальнейшим разрушением клеток уже в кровеносном русле [5]. Гаптоглобин – весьма чувствительный показатель, который длительное время остается сниженным, даже после выздоровления и нормализации уровня гемоглобина. Следует учитывать, что Нр также может снижаться в условиях, отличимых от гемолиза, например, при нарушении функции печени, недоедании, врожденной гипогаптоглобинемии. В то же время, являясь белком острой фазы, Нр повышается у курильщиков, при нефротическом синдроме и при воспалительных заболеваниях [5]. Эти особенности нужно принимать во внимание при анализе гемолитического состояния пациентов.

Среди 12 пациентов группы I антитела выявлены только у двух лиц. У одного пациента с тепловыми агглютинами IgG был обнаружен повышенный

уровень fHb. У другого пациента (с тепловыми кислотными гемолизинами) ни одного из выше перечисленных лабораторных признаков гемолиза не наблюдалось. У обоих пациентов признаков анемии не обнаружено (т.е. уровень гемоглобина находился в норме). Среди 10 пациентов без антител только у одного была обнаружена анемия легкой степени.

Из 14 пациентов группы II у 6, что составляет почти 50%, выявлены аутоиммунные антиэритроцитарные антитела и/или остаточные субкомпоненты комплемента. У 5 из них присутствовали те или иные лабораторные признаки гемолиза. Все три признака – повышенный НБ и fHb, пониженный Нр – обнаружены у одного пациента, следовательно, имеет место как вне-, так и внутрисосудистый гемолиз. Но уровень гемоглобина у данного лица находился в пределах нормы, а из антител выявлены только тепловые кислотные гемолизины. У этого пациента диагностирована III стадия заболевания.

Только повышение НБ, а также анемия легкой степени выявлены у двоих пациентов, что указывает на внесосудистый гемолиз. У первого из них обнаружен комплекс IgG/C3 (пациент с III стадией заболевания), у второго – субкомпонент C3d (пациент с II стадией).

Повышение уровня fHb (маркер внутрисосудистого гемолиза) зафиксировано у одного пациента на II стадии, с анемией легкой степени и с IgG/C3.

Еще у одного пациента группы II из лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза обнаружен повышенный уровень fHb. Однако, уровень Нр также был повышен. Поскольку Нр является белком острой фазы и повышается при различных воспалительных состояниях, возможно, у данного пациента имело место сопутствующее воспалительное заболевание, о котором нам на момент исследования не было известно. У пациента диагностирована III стадия заболевания и обнаружены холододовые и тепловые кислотные гемолизины, гемоглобин находился в норме.

Из всей группы больных В-НХЛ, находившихся на полихимиотерапии, у которых обнаружены антиэритроцитарные аутоантитела, лишь у одного пациента не выявлено лабораторных признаков вне- или внутрисосудистого гемолиза, однако был снижен уровень гемоглобина (анемия тяжелой степени). Пациент находился на III стадии и имел IgG/C3.

Среди 14 пациентов II группы сочетание анемического синдрома с лабораторными признаками иммунного гемолиза выявлено у 4 (36%) больных: у 3-х с легкой степенью анемии, у 1-го – средней. Изолированный анемический синдром без лабораторных признаков иммунного гемолиза встречался у 5 наблюдаемых (29%), у остальных не выявлено

каких-либо признаков анемии или гемолиза. Таким образом, при обнаружении анемии у лиц с В-НХЛ необходимо дальнейшее дообследование пациента на наличие иммунного гемолиза: биохимических маркеров вне- и внутрисосудистого гемолиза, аутоиммунных антител всех серологических подтипов – тепловых и холододовых агглютининов, тепловых и холододовых кислотных гемолизинов. Выявление иммунного характера анемии позволит врачу-клиницисту подобрать наиболее патогенетически обусловленную адекватную терапию.

В группе наблюдения III ни у одного пациента с антиэритроцитарными антителами не выявлен комплекс из всех трех вышеперечисленных лабораторных признаков гемолиза. У одного из них (с C3d) их не было вовсе, у другого, с тепловыми кислотными гемолизинами, наблюдалось повышение fHb и понижение уровня Нр. Еще у одного пациента из этой группы, с холододовыми кислотными гемолизинами, обнаружено повышение уровня fHb, а у пациента с тепловыми IgG агглютинами – снижение Нр. Анемия легкой степени без признаков иммунного гемолиза была выявлена у 4 из 31 наблюдаемого (12,9%), иммунный характер анемии наблюдался только у одного пациента.

В общем, среди 6 пациентов с антителами из группы II у 4 был снижен уровень гемоглобина (ниже 110 г/л) и диагностирована анемия: у 3 пациентов легкой степени, у 1 – тяжелой. Из этих 4 пациентов двое имели комбинацию IgG/C3, один – холододовые агглютинины и C3d, и еще один – только C3d (табл. 1). Среди 4 пациентов с антителами группы III лишь у одного (обнаружен C3d) была анемия легкой степени тяжести, и именно у него не выявлены признаки вне- или внутрисосудистого гемолиза. В I группе наблюдения ни у одного пациента с аутоиммунными антиэритроцитарными антителами не зафиксировано снижение гемоглобина ниже 110 г/л. Возможно, причина заключается в том, что это – первичные пациенты, обратившиеся за помощью на раннем этапе развития заболевания, у которых процесс еще не осложнился гемолитическим компонентом.

Поскольку обнаружение только субкомпонентов компонента комплемента C3 в прямом тесте Кумбса может свидетельствовать о присутствовавших ранее холододовых агглютинах, но не обнаруженных в данный момент по каким-либо причинам [19], есть основания полагать, что холододовая аутоиммунная реакция, имеющая более агрессивное течение по сравнению с тепловой, свойственна больным В-НХЛ, принимающим полихимиотерапию без ритуксима. Агрессивность течения аутоиммунного процесса в данном случае подтверждается также тем, что подавляющее большинство

пациентов с антителами имеют лабораторные признаки вне- или внутрисосудистого гемолиза и анемии. Кроме того, те или иные признаки аутоиммунного гемолитического процесса обнаружены практически у половины всех обследованных больных группы. У двоих пациентов – внутрисосудистый гемолиз, еще у двоих – внесосудистый, у одного – комбинированный вариант, у одного пациента признаков гемолиза не обнаружено.

У пациентов I и III групп исследования обнаружены признаки только внесосудистого гемолиза.

Выводы

1. Введение в терапию ритуксима снижало частоту возникновения аутоиммунных гемолитических осложнений.
2. Возникновение анемического синдрома у больных В-НХЛ в большинстве случаев было обусловлено прогрессированием аутоиммунного гемолитического процесса. У таких больных следует производить поиск биохимических маркеров вне- и внутрисосудистого гемолиза, всех серологических подтипов аутоиммунных антител – тепловых и холодowych агглютининов, тепловых и холодowych кислотных гемолизиннов.
3. Холодовые агглютинины, вызывающие наиболее злокачественную АИГА, в нашем исследовании встречались только у пациентов, принимающих полихимиотерапию без использования ритуксима.
4. Из всех групп наблюдения в группе пациентов, получавших химиотерапию без ритуксима, наблюдалось больше всего лиц с аутоиммунными антиэритроцитарными антителами и с III стадии

ей течения заболевания. В группе пациентов без терапии и в группе принимавших ритуксим большинство находилось на I стадии. Таким образом, применение ритуксима препятствовало прогрессированию заболевания.

5. В группе пациентов, принимавших полихимиотерапию с ритуксимом и в группе первичных пациентов, не принимавших ранее специфической терапии, обнаружены признаки только внесосудистого гемолиза. У пациентов, принимавших химиотерапию с ритуксимом, обнаружены признаки вне- и внутрисосудистого гемолиза.
6. При обнаружении аутоиммунных антиэритроцитарных антител у пациентов с В-НХЛ необходимо дальнейшее тщательное обследование с целью уточнения активности гемолитического процесса для проведения коррекции терапии.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем мы планируем исследование активности и типа гемолитического процесса у пациентов с В-НХЛ на фоне различных режимов терапии (включая схему R-B). При наличии тепловых агглютининов класса IgG мы будем идентифицировать их подкласс (IgG1, IgG3) и плотность на эритроцитах; в случае выявления холодowych агглютининов – определять температурный оптимум их действия и титр. Такая скрупулезная лабораторная диагностика антиэритроцитарных антител позволит оценить риск гемолитических осложнений и проводить прицельную, патогенетически обоснованную терапию, направленную на своевременную коррекцию лечения и профилактику гемолитических осложнений при В-НХЛ.

References

1. Anoshina MY, Goryainova NV, Tretyak NM, Basova OV. Funktsional'nii stan gemoglobinu u hvorih na gostru miyeloidnu leikemiyu. In: Tretyak NM editor. *Proceedings of the Malignant diseases of the blood and lymphoid tissue system: achievements and prospects*. 2013 Oct 10-11; Kyiv. Kyiv UA: TOV "Zirka"; 2013. p. 22-3. [Ukrainian].
2. *Patent 99298 Ukraine*. Sposib viznachennya monofaznih avtoimunnih kislotnih teplovih ta holodovih gemolizininiv mikrometodom / Pavliuk RP, Timoshenko UV, Mironenko GA, Lavrovs'ka LN. (UA); zayavnik i vlasnik patentu State institution "Institute of haematology and transfusiology NAMS Ukraine", patentovlasnyk. opubl 25.05.2015. Byul № 7. [Ukrainian].
3. Anderson LA, Gadalla S, Morton LM, Landgren O, Pfeiffer R, Warren JL, et al. Population-based study of autoimmune conditions and the risk of specific lymphoid malignancies. *Int J Cancer* [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Jul 07]; 125: 398-405. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2692814>. DOI: 10.1002/ijc.24287.
4. Balla G, Lakatos L, Balla J. Effects of free hemoglobin in human pathologies. *ECNE*. 2017 Apr 06; 5 (5): 181-3.
5. Barcellini W, Fattizzo B. Clinical applications of hemolytic markers in the differential diagnosis and management of hemolytic anemia. *Disease Markers* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Jul 06]; 2015: 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/635670>.
6. Borthacur G, O'Brien S, Wierda WG, Thomas DA, Cortes JE, Giles FG, et al. Immune anaemias in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab – incidence and predictors. *Br J Haematol*. 2007 Mar 2; 136: 800-5. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06513.x.
7. Brig RS Sarkar, Col J Philip, Surg Cdr RS Mallhi, Neelesh J. Drug-induced immune hemolytic anemia (Direct Antiglobulin Test positive). *MJAFI*. 2012 Aug 4; 69: 190-2. DOI: 10.1016/j.mjafi.2012.04.017.
8. Dati F, Lammers M, Adam A, Sondag D, Stienen L. Referenzwerte für 18 Plasmaproteine am Behring-Nephelometer-System. *Lab Med*. 1989; 13: 87-90. DOI: <https://doi.org/10.1515/labm.1989.13.3.87>.
9. Garraty G. Drug-induced immune hemolytic anemia. *Hematology*. 2009 Jan 1; 2009 (1): 73-9. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.73.

10. Haddad H, Mohammad F, Dai Q. Bendamustine-induced immune hemolytic anemia in a chronic lymphocytic leukemia patient: A case report and review of the literature. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2014 Jan 11; 7 (4): 162-4. DOI: 10.1016/j.hemonc.2014.04.001.
11. Johnson ST, Fueger JT, Gottschall JL. One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia – a new paradigm. *Transfusion.* 2007 Mar 2; 47 (4): 697-702. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01173.x.
12. Khosroshahi BN, Jafari M, Vazini H, Ahmadi A, Shams K, Kholoujini M. Cold autoimmune hemolytic anemia due to high-grade non Hodgkin's B-cell lymphoma with weak response to rituximab and chemotherapy regimens. *IJHOSCR.* 2015 Jul 1; 9 (3): 157-60. PMID: 26261701.
13. Longinotti M, Fozza C. Use of Rituximab in autoimmune hemolytic anemia associated with non-Hodgkin lymphomas. *Advances in Hematology* [Internet]. 2011 Feb [cited 2017 Jul 07]; 2011: 1-4. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/960137>.
14. Rifkind JM, Mohanty JG, Nagabadu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Front Physiol.* 2015 Jan 14; 5 (500): 1-7. DOI: 10.3389/fphys.2014.00500.
15. Roumenina L, Radanova M, Atanasov BP, Popov KT, Kaveri SV, Lacroix-Desmazes S, et al. Heme interacts with C1q and inhibits the classical complement pathway. *JBC.* 2011 Mar 1; 286 (18): 16459-69. DOI: 10.1074/jbc.M110.206136.
16. Sallah S, Sigounas G, Vos P, Wan JY, Nguyen NP. Autoimmune hemolytic anemia in patients with non-Hodgkin's lymphoma: Characteristics and significance. *Annals of Oncology.* 2000 Dec; 11: 1571-7. PMID: 11205465. <https://doi.org/10.1023/A:1008319532359>.
17. Smedby KE, Vajdic CM, Falster M, Engels EA, Martinez-Maza O, Turner J, et al. Autoimmune disorders and risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes: a pooler analysis within the InterLymph Consortium. *Blood.* 2008 Jan 25; 111 (8): 4029-38. DOI: <https://doi.org/10.14740/jh303w>.
18. Song J, Dormosh M, Ayres J, Swami V. A case of diffuse large B cell Lymphoma presenting as cold agglutinin disease. *The internet Journal of Hematology* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jul 07]; 9 (1): 1-5. Available from: <http://ispub.com/IJHE/9/1/144>.
19. Sudulagunta SR, Kumbhat M, Sodalagunta MB, Nataraju AS, Bangalore Raja SK, Thejaswi KC, et al. Warm autoimmune hemolytic anemia: clinical profile and management. *J Hematol.* 2017 Nov 04; 6 (1): 12-20. <https://doi.org/10.14740/jh303w>.
20. Tietz NW, Pruden EL, McPherson RA, Fuhrman SA. *Clinical guide to laboratory tests.* 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1983. 695 p.
21. Yamashita T, Ishida M, Moro H, Yumoto H, Uchibayashi S, Yoshii M, et al. Primary bone marrow diffuse large B-cell lymphoma accompanying cold agglutinin disease: A case report with review of the literature. *Oncology letters.* 2013 Nov 21; 7: 79-81. DOI: 10.3892/ol.2013.1695.

УДК 616.155.194+616-006.44

АУТОІМУННИЙ ГЕМОЛІЗ У ПАЦІЄНТІВ З В-КЛІТИННИМИ НЕГОДЖКІНСЬКИМИ ЛІМФОМАМИ

Тимошенко У. В., Мироненко Г. А.,
Сівкович С. О., Павлюк Р. П.

Резюме. Нами здійснене дослідження частоти імунних гемолітичних ускладнень у пацієнтів з В-клітинними неходжкінськими лімфомами. Антиеритроцитарні аутоімунні антитіла виявлені у 42,9% пацієнтів, що приймали поліхіміотерапію без ритуксиму. З усієї кількості пацієнтів групи IgG / С3 виявлені у 28,6%, холодові аглютиніни – у 7,1%, кислотні гемолізینی – у 21,4%, С3d і / або С3с – у 14,3%. У групі пацієнтів, які приймали ритуксим, антитіла зустрічалися у 12,9%: IgG – у 3,2%, кислотні гемолізینی – у 6,4%, С3d і / або С3с – у 3,2% (у багатьох пацієнтів виявлено декілька серологічних типів). У групі пацієнтів, які не приймали жодної специфічної терапії, антитіла діагностовані у 16,7% (IgG – 8,3%, кислотні гемолізینی також у 8,3%). Таким чином, у групі пацієнтів, що приймали терапію без ритуксиму, у порівнянні з пацієнтами на ритуксими або такими, що не лікувалися, спостерігалися ширший спектр антиеритроцитарних антитіл, компонентів комплементу, наявність холодкових аглютининів, відсутність теплових IgG аглютининів, тобто виявлена холодова аутоімунна реакція. У переважної більшості пацієнтів з антитілами, які отримували поліхіміотерапію без ритуксиму, були лабораторні ознаки поза- або внутрішньосудинного гемолізу і зниження рівня гемоглобіну крові; ознаки аутоімунного гемолітичного процесу виявлені у майже половини всіх обстежених. У пацієнтів, які не лікувалися і тих, які приймали ритуксим, виявлені ознаки лише позасудинного гемолізу.

Ключові слова: антиеритроцитарні аутоімунні антитіла, гаптоглобін, вільний гемоглобін, непрямий білірубін.

UDC 616.155.194+616-006.44

**AUTOIMMUNE HEMOLYSIS IN THE PATIENTS WITH
B-CELL NON-HODGKIN LYMPHOMAS**

*Tymoshenko U. V., Myronenko G. A.,
Sivkovych S. O., Pavlyuk R. P.*

Abstract. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) can complicate B-cell non-Hodgkin's lymphomas. It can develop as a consequence of the oncological process and may be a complication of drug therapy. Hemolysis is able to inhibit the C1q component of the complement and affect the effectiveness of rituxim therapy.

The purpose of the study was to determine the frequency of autoimmune anti-erythrocyte antibodies and laboratory signs of hemolysis (levels of free hemoglobin, haptoglobin and indirect bilirubin) in patients with B-NHL, depending on the stage of the disease and the regimen of therapy.

Materials and methods. 57 patients with B-NHL were divided into 3 groups. The group I included those who did not receive specific therapy, group II – who received CHOP, CHOEP, COP or FC, group III – R-CHOP, R-CHOEP, R-COP, R-FC. Anti-erythrocyte autoimmune antibodies, levels of free hemoglobin (fHb), haptoglobin (Hp), indirect bilirubin were tested in patients' venous blood. Elevated level of fHb and reduced of Hp are markers of intravascular hemolysis, and elevated levels of indirect bilirubin is marker of extravascular one.

Results and discussion. Antibodies were detected in 42.9% of patients of group II. IgG / C3 were detected in 28,6% of ones, cold agglutinin – 7,1%, acidic haemolysins – 21.4%, C3d and / or C3c – 14.3%. Antibodies were found in 12.9% of the patients of group III: IgG – 3,2%, acid haemolysins – 6,4%, C3d and / or C3c – 3,2% (many patients showed several serological types). In I group antibodies were detected in 16,7% (IgG – 8,3%, acid haemolysins also in 8,3%). Laboratory signs of intra- and extravascular hemolysis and decreased hemoglobin levels were found in the vast majority of patients of group II. Patients of group I and group III had signs of extravascular hemolysis. The majority of patients with autoimmune anti-erythrocyte antibodies and with stage III of the disease were in the group II. The majority of patients with stage I were in groups I and III.

Conclusions. Rituxim therapy reduced the frequency of autoimmune hemolytic complications. No signs of extravascular hemolysis were found in patients taking rituxim. Rituxim prevented the progression of the disease.

Keywords: anti-erythrocyte autoimmune antibodies, haptoglobin, free hemoglobin, indirect bilirubin.

Стаття надійшла 25.03.2018 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування