

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOHEMATOLOGY

**Эффективность высокодозной
консолидации и аутоТКМ
в первой ремиссии острого
миелоидного лейкоза**

**Новые подходы к терапии
классических Rh-негативных
миелопролиферативных заболеваний**

**Роль многоцветной проточной
цитофлуориметрии
в диагностике гемобластозов**



Журнал «Онкогематология» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С 2006 года журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

С 2015 года электронная версия журнала представлена в ведущих российских и мировых электронных библиотеках, в том числе EBSCO.

В апреле 2017 г. принято решение о включении журнала в базу данных Scopus.

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

<http://oncohematology.abvpress.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Самочатова Елена Владимировна, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный научный сотрудник отдела депрессий кроветворения, миелоидных лейкозов, редких и наследственных болезней ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зейналова Первин Айдыновна, д.м.н., заведующая отделом гематологии и трансплантации костного мозга НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Афанасьев Борис Владимирович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, директор Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Путешкин Вадим Вадимович, д.м.н., профессор, заместитель главного врача по гематологии ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий отделом кооперированных исследований в гематологии/онкологии подростков и взрослых ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Румянцев Юлия Васильевна, д.м.н., заведующая отделом исследования лимфопролиферативных заболеваний ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ПОМОЩНИК ОТВЕТСТВЕННОГО СЕКРЕТАРЯ

Петрова Галина Дмитриевна, к.м.н., научный сотрудник отделения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

1
ТОМ 13
'18

О С Н О В А Н В 2005 Г.

Адрес редакции:
115478, Москва,
Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор **Е.П. Врублевская**
Корректор **М.В. Макарова**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Руководитель проекта
А.Г. Прилепская, +7 (965) 319-10-53,
alla@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций
ПИ № ФС77-36928 от 21 июля 2009 г.

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Онкогематология»
обязательна.

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Онкогематология. 2018. Том 13.
№ 1. 1–120
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 3000 экз.

<http://oncohematology.abvpress.ru>

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алейникова Ольга Витальевна, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава Республики Беларусь, врач-гематолог высшей квалификационной категории (Минск, Республика Беларусь)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, академик РАЕН, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. Н.Ф. Владимирского», главный гематолог Московской области (Москва, Россия)

Дубровин Михаил Михайлович, д.м.н., профессор, отдел ядерной медицины Детского исследовательского госпиталя св. Иуды (Мемфис, США)

Карачунский Александр Исаакович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

Криволапов Юрий Александрович, д.м.н., профессор, член панели патологов Европейской сети исследования лимфом, член Европейской рабочей группы исследования костного мозга, заведующий патологоанатомическим отделением клинической молекулярной морфологии Клиники им. Э.Э. Эйхвальда ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Менделеева Лариса Павловна, д.м.н., заместитель генерального директора по науке и инновациям — директор НИИ гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Минков М.Л., д.м.н., доцент, заведующий Клиникой педиатрии и подростковой медицины с отделением неонатологии больницы Rudolfstiftung (Вена, Австрия)

Мякова Наталья Валерьевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Никитин Евгений Александрович, д.м.н., руководитель дневного стационара Городского гематологического центра ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

Паровичникова Елена Николаевна, д.м.н., руководитель отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Пономарев Владимир Борисович, д.м.н., отдел радиологии Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (Нью-Йорк, США)

Рукавицын Олег Анатольевич, д.м.н., профессор, начальник Гематологического центра ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко» Минобороны России, главный гематолог госпиталя (Москва, Россия)

Снеговой Антон Владимирович, д.м.н., заведующий отделением амбулаторной химиотерапии (дневной стационар) НИИ клинической онкологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Усс Анатолий Леонидович, д.м.н., профессор, главный гематолог Минздрава Республики Беларусь, член Комитета по трансплантологии Совета Европы и Европейской группы по трансплантации костного мозга, руководитель Республиканского центра гематологии и трансплантации костного мозга (Минск, Республика Беларусь)

Фечина Лариса Геннадиевна, заслуженный врач РФ, заместитель главного врача по онкологии и гематологии ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», руководитель Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Крыжановский Олег Игоревич, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний медицинского онкологического центра «Alta Bates» (Калифорния, США)

Лукина Елена Алексеевна, д.м.н., профессор, руководитель научно-клинического отделения редких заболеваний, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии лейкозов и патологии эритронов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Поддубная Ирина Владимировна, д.м.н., профессор, академик РАН, заведующая кафедрой онкологии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Россиев Виктор Анатольевич, к.м.н., врач высшей категории, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. М.И. Калинина» (Самара, Россия)

Румянцев Александр Григорьевич, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, главный внештатный детский специалист-гематолог Минздрава России, член правления Союза педиатров (Москва, Россия)

Румянцев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, проректор по стратегическому развитию, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Минобрнауки России (Москва, Россия)

Талалаев Александр Гаврилович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России на базе ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница», главный детский патологоанатом г. Москвы (Москва, Россия)

The journal "Oncohematology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

In 2006, journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Since 2015, the journal's electronic version has been available in the leading Russian and international electronic libraries, including EBSCO.

In April 2017, the decision was made to include the journal in the Scopus database.

ONCOHEMATOLOGY

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

<http://oncohematology.abvpress.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Samochatova Elena V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Chief Researcher of Hematopoiesis depressions, myeloid leukemia, rare and hereditary diseases department in Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES OF EDITOR-IN-CHIEF

Zeynalova Pervin Aydynovna, MD, Head of the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation at the N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center at the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Afanasiev Boris V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Director of Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head of the Department of Hematology, Transfusion and Transplantation at Acad. I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Ptushkin Vadim V., MD, PhD, Professor, Deputy Chief Physician for hematology of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; Head of Department of Cooperated Research in Adolescents / Adults Hematology / Oncology Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE SECRETARY

Rumyantseva Yulia V., MD, PhD, Head of Department of Lymphoproliferative Diseases Studies in Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia, Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ASSISTANT OF EXECUTIVE SECRETARY

Petrova Galina D., MD, PhD, Research Fellow in Department of Intensive Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2005

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor **E.P. Vrublevskaya**
Proofreader **M.V. Makarova**
Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **O.V. Goncharuk**

Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Project Manager
A.G. Prilepskaya, +7 (965) 319-10-53,
alla@abvpress.ru

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (ППМ. №ФЦ77-36928 dated 21 July 2009).

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Onkogematologiya".

The editorial board is not responsible for advertising content.

The authors' point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Onkogematologiya. 2018.
Volume 13. No. 1. 1–120
© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue index: 42167
Printed at the Mediicolor LLC
3,000 copies

<http://oncohematology.abvpress.ru>

1 Vol. 13
'18

EDITORIAL BOARD

Aleynikova Olga V., Associate Member of the National Academy of Science of the Republic of Belarus, Professor, Director of Republican Research and Medical Center for Oncology, Hematology and Immunology, Physician of the Highest Qualification Grade (Minsk, Republic of Belarus)

Golenkov Anatoly K., MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Natural Sciences, Head of Department of Clinical Hematology and Immune Therapy in N.F. Vladimirovsky Moscow Region Research Clinical Institute, Chief Hematologist of Moscow Region (Moscow, Russia)

Dobrovinn Mikhail M., MD, PhD, Nuclear Medicine Division, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA)

Karachunsky Alexander I., MD, PhD, Professor, Deputy General Director – Director of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine of Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia, Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Krivolapov Yuri A., MD, PhD, Professor, Member of Pathologists Panel of European Lymphomas Research Group, Member of European Bone Marrow Research Group, Head of Anatomico-Pathological Department of Clinical Molecular Morphology of E.E. Eichwald Clinics, I.I. Mechnikov North-West State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Mendeleeva Larisa P., MD, PhD, Deputy General Director for Science and Innovation – Director of the Research Institute of Hematology and Transplantation of National Research Center for Hematology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Minkov M.L., MD, PhD, Vienna Hospital Association Rudolfstiftung Hospital, Clinic of Pediatrics and Adolescent Medicine with Department for Neonatology (Vienna, Austria)

Myakova Natalya V., MD, PhD, Professor, Head of Oncohematology Department of Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Nikitin Evgeny A., MD, PhD, Head of the Day Hospital in Hematology Center of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department (Moscow, Russia)

Parovichnikova Elena N., MD, PhD, Head of Department of Chemotherapy of Hematological Malignancy, Hematopoiesis Depression and Bone Marrow Transplantation in National Research Center for Hematology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ponomarev Vladimir B., MD, PhD, Department of Radiology of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, USA)

Rukavitsyn Oleg A., MD, PhD, Professor, Head of Hematology Center of N.N. Burdenko General Military Clinical Hospital of Ministry of Defense of Russia, Chief Hematologist of the Hospital (Moscow, Russia)

Snegovoy Anton Vladimirovich, MD, Head of the Department of Outpatient Chemotherapy (day patient facility) at the N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center at the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Uss Anatoly L., MD, PhD, Professor, Chief Hematologist of Ministry of Health of the Republic of Belarus, Member of Transplantology Committee of the Council of Europe and European Bone Marrow Transplantation Group, Head of Republican Center for Hematology and Bone Marrow Transplantation (Minsk, Republic of Belarus)

Fechina Larisa G., Honored Doctor of the Russian Federation, Deputy Chief Physician for Oncology and Hematology of Regional Children's Clinical Hospital No. 1, Head of Center of Children's Oncology and Hematology (Yekaterinburg, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Krijanovski Oleg I., MD, PhD, Director of Malignant Hematology Program "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, California, USA)

Lukina Elena A., MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department of Rare Diseases, Leading Researcher of the Department of Leukemia Chemotherapy and Erythron Pathology in National Research Center for Hematology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Poddubnaya Irina V., MD, PhD, Academician of Russian Academy of Sciences, Professor, Head of Oncology Department of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of Ministry of Health of Russia on the basis of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Rossiev Viktor A., MD, PhD, Highest Grade Doctor, Head of Hematology Department in M.I. Kalinin Samara Regional Clinical Hospital (Samara, Russia)

Rumyantsev Alexander G., MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, General Director of Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia, Chief Pediatric Hematologist of Ministry of Health of Russia, Board Member of the Union of Pediatricians of Russia (Moscow, Russia)

Roumiantsev Sergey A., MD, PhD, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Vice-Rector for Strategic Development, Head of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; Head of Translational and Regenerative Medicine Department of Moscow Institute of Physics and Technology (State University) of Ministry of Education and Science of Russia (Moscow, Russia)

Talalaev Alexander G., MD, PhD, Professor, Head of Pathology Department in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia based in Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Chief Children's Pathologist of Moscow (Moscow, Russia)

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

- И.А. Самородова, С.Н. Бондаренко, В.Н. Овечкина, А.В. Климович,
Э.И. Подольцева, Н.В. Медведева, А.С. Низамутдинова, Е.В. Карягина,
Б.И. Смирнов, И.С. Моисеев, Л.С. Зубаровская, Б.В. Афанасьев*
**Эффективность высокодозной консолидации и аутологичной трансплантации
костного мозга в первой ремиссии острого миелоидного лейкоза** 8
- Я.К. Мангасарова, А.У. Магомедова, А.М. Ковригина, И.Э. Костина,
Е.С. Нестерова, Л.Г. Горенкова, А.Е. Мисюрина, О.В. Марголин, С.К. Кравченко*
**Экстрамедиастинальное поражение у больных
первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой** 21
- А.С. Поляков, Я.А. Носков, В.В. Тыренко, А.С. Лапинова, А.В. Ковалев*
**Новые подходы к терапии классических Rh-негативных миелопролиферативных
новообразований: опыт раннего применения цепэгинтерферона альфа-2b** 29
- В.Т. Сахин, Е.Р. Маджанова, Е.В. Крюков, С.П. Казаков, О.А. Рукавицын*
**Анемия хронических заболеваний: особенности патогенеза
и возможности терапевтической коррекции
(обзор литературы и результаты собственных исследований)** 45

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

- Е.Г. Хамаганова, Е.Н. Паровичникова, Л.А. Кузьмина,
С.М. Куликов, Е.П. Кузьминова, Р.С. Чапова, В.Г. Савченко*
**Влияние несовместимости по гену *HLA-DPB1* на результаты трансплантации
аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора** 54

ДИАГНОСТИКА ГЕМОБЛАСТОЗОВ

- Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, А.В. Кохно, Е.Н. Паровичникова*
**Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике
миелодиспластических синдромов** 63
- И.А. Новикова, Т.Ю. Вержбицкая, Л.В. Мовчан, Г.А. Цаур, М.В. Белевцев, А.М. Попов*
**Стандарт российско-белорусской кооперативной группы
по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей** 73
- Т.И. Лобанова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова*
**Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов
с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной
проточной цитофлуориметрии (обзор литературы)** 83
- Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Ю.О. Давыдова,
Н.М. Капранов, Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, Т.Н. Моисеева, А.М. Ковригина,
В.Н. Двирник, У.Л. Джулакян, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко*
**Особенности экспрессии антигенов, участвующих
в формировании иммунологического синапса, при хроническом лимфолейкозе** 103

ПРЕСС-РЕЛИЗ 115**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ** 119

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

- I.A. Samorodova, S.N. Bondarenko, V.N. Ovechkina, A.V. Klimovich, E.I. Podolceva, N.V. Medvedeva, A.S. Nizamutdinova, E.V. Karyagina, B.I. Smirnov, I.S. Moiseev, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasyev*
The efficacy of high-dose consolidation and autologous bone marrow transplantation in first remission of acute myeloid leukemia 8
- Ya.K. Mangasarova, A.U. Magomedova, A.M. Kovrigina, I.E. Kostina, E.S. Nesterova, L.G. Gorenkova, A.E. Misyurina, O.V. Margolin, S.K. Kravchenko*
Extramediastinal lesion in patients with primary mediastinal B-cell lymphoma 21
- A.S. Polyakov, Y.A. Noskov, V.V. Tyrenko, A.S. Lapshova, A.V. Kovalev*
New approaches to therapy of classical Ph-negative myeloproliferative diseases: the experience of early therapy with cepeginterferon alpha-2b 29
- V.T. Sakhin, E.R. Madzhanova, E.V. Kryukov, S.P. Kazakov, O.A. Rukavitsin*
Anemia of chronic disease: features of pathogenesis and possible therapeutic correction (literature review and results of own research) 45

HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

- E.G. Khamaganova, E.N. Parovichnikova, L.A. Kuzmina, S.M. Kulikov, E.P. Kuzminova, R.S. Chapova, V.G. Savchenko*
Impact of HLA-DPBI incompatibility on the results of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation from HLA-A-B-C-DRBI-DQBI-compatible unrelated donor 54

DIAGNOSIS OF HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

- Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, A.V. Kokhno, E.N. Parovichnikova*
Multicolor flow cytometry as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes 63
- I.A. Novikova, T.Yu. Verzhbitskaya, L.V. Movchan, G.A. Tsauro, M.V. Belevtsev, A.M. Popov*
Russian-belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics 73
- T.I. Lobanova, E.N. Parovichnikova, I.V. Galtseva*
Minimal residual disease assesment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry. Literature review. 83
- D.S. Badmazhapova, I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, N.G. Chernova, N.G. Gabeeva, T.N. Moiseeva, A.M. Kovrigina, V.N. Dvirnyk, U.L. Dzhalakyan, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko*
Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia. 103

PRESS RELEASE 115

INFORMATION FOR AUTHORS 119

Эффективность высокодозной консолидации и аутологичной трансплантации костного мозга в первой ремиссии острого миелоидного лейкоза

И.А. Самородова^{1,2}, С.Н. Бондаренко¹, В.Н. Овечкина¹, А.В. Климович², Э.И. Подольцева², Н.В. Медведева², А.С. Низамутдинова³, Е.В. Карягина⁴, Б.И. Смирнов⁵, И.С. Моисеев¹, Л.С. Зубаровская¹, Б.В. Афанасьев¹

¹НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова Минздрава России;

Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8;

²СПбГБУЗ «Городская клиническая больница № 31»; Россия, 197110 Санкт-Петербург, пр-т Динамо, 3;

³СПбГБУЗ «Александровская больница»; Россия, 193312 Санкт-Петербург, пр-т Солидарности, 4;

⁴СПбГБУЗ Городская больница № 15; Россия, 198205 Санкт-Петербург, ул. Авангардная, 4;

⁵Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина); Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

Контакты: Самородова Ирина Анатольевна irdoc@mail.ru

Введение. Вопрос выбора наиболее адекватной стратегии лечения острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) в случаях, когда по каким-либо причинам невозможно выполнить аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), до сих пор остается открытым.

Цель исследования — оценка долгосрочной выживаемости у пациентов с ОМЛ, получивших в качестве консолидации химиотерапию (ХТ) или аутологичную ТГСК (аутоТГСК) в 1-й ремиссии заболевания.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 135 пациентов в возрасте от 18 до 67 лет с диагнозом ОМЛ (кроме М3 по классификации FAB). Из них 100 пациентов получали только программную ХТ, 35 больным в качестве консолидации проведена аутологичная трансплантация костного мозга. Пациенты, достигшие ремиссии после завершения индукционных курсов ХТ, в качестве консолидации получали 1 из 3 вариантов лечения: 1) ХТ стандартной интенсивности (сХТ); 2) высокодозную ХТ (ВДХТ); 3) аутоТГСК после 1–2 курсов высокодозной ХТ. К неблагоприятным факторам прогноза были отнесены: возраст >40 лет, гиперлейкоцитоз >50,0 × 10⁹/л, а также неблагоприятный цитогенетический и молекулярно-биологический риск.

Результаты. В соответствии с количеством факторов неблагоприятного прогноза в дебюте заболевания безрецидивная выживаемость (БРВ) составила 47 % при их отсутствии, 45 % — при наличии 1 фактора, при наличии 2 факторов — 14 % ($p = 0,000$) вне зависимости от варианта консолидационной терапии (сХТ, ВДХТ, аутоТГСК). Исходный высокий уровень лейкоцитов при проведении только ХТ (сХТ и ВДХТ) негативно влияет на общую выживаемость (ОВ) (38 % против 22 %) и увеличивает частоту рецидивов (52 % против 69 %). При исходном уровне лейкоцитов >50,0 × 10⁹/л 5-летняя ОВ при проведении аутоТГСК и ВДХТ составила 60 %. Выполнение аутоТГСК при недостижении ремиссии после 1-го индукционного курса ХТ ассоциировано с лучшей 2-летней ОВ (62 % против 35 %, $p = 0,05$), бессобытийной выживаемостью (БСВ) (50 % против 22 %, $p = 0,05$) и БРВ (50 % против 37 %, $p = 0,05$) по сравнению с ВДХТ и сХТ. В группе благоприятного цитогенетического риска при проведении аутоТГСК 5-летняя БРВ составила 80 %, при проведении только ХТ — 67 %, что не отразилось на 5-летней ОВ — она составила 80 % вне зависимости от варианта консолидационной терапии.

Заключение. АутоТГСК — предпочтительный вариант консолидации у пациентов группы благоприятного риска и у лиц, не достигших ремиссии после 1-го курса ХТ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, химиотерапия, аутологичная трансплантация костного мозга

Для цитирования: Самородова И.А., Бондаренко С.Н., Овечкина В.Н. и др. Эффективность высокодозной консолидации и аутологичной трансплантации костного мозга в первой ремиссии острого миелоидного лейкоза. Онкогематология 2018;13(1)8–20.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-8-20

The efficacy of high-dose consolidation and autologous bone marrow transplantation in first remission of acute myeloid leukemia

I.A. Samorodova^{1,2}, S.N. Bondarenko¹, V.N. Ovechkina¹, A.V. Klimovich², E.I. Podolceva², N.V. Medvedeva², A.S. Nizamutdinova³, E.V. Karyagina⁴, B.I. Smirnov⁵, I.S. Moiseev¹, L.S. Zubarovskaya¹, B.V. Afanasyev¹

¹R.M. Gorbacheva Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6/8 L'va Tolstogo St., St. Petersburg 197022, Russia;

²City Clinical Hospital № 31; 3, prospect Dinamo, St. Petersburg 197110, Russia;

³Aleksandrovskaya Hospital; 4, prospect Solidarnosti, St. Petersburg 193312, Russia;

⁴City Clinical Hospital № 15; 4, Avangardnaya St., St. Petersburg 198205, Russia;

⁵Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI"; 5, Professora Popova St. Petersburg 197376, Russia

Introduction. The question of the most adequate treatment strategy of AML in cases when it is impossible to perform allogeneic HSCT because of any reason still remains open.

The aim of this study was to assess the long-term survival of patients with AML who received chemotherapy (CT) or autologous HSCT as consolidation in the first remission of the disease. It was included 135 patients aged 18 to 67 years, with a verified diagnosis of AML (except FAB M3) in the study. Of these, 100 patients received only CT, 35 patients received consolidation with autologous bone marrow transplantation. Patients who achieved remission after completion of induction CT courses received one of three treatment options as consolidation: 1) chemotherapy of standard-intensity (sCT); 2) high-dose chemotherapy (HDCT); 3) autologous HSCT (autoHSCT) conducted after 1–2 courses of high-dose CT. Adverse prognostic factors were identified as: age over 40 years, hyperleucocytosis more than $50,0 \times 10^9/L$ and unfavorable cytogenetic and molecular-biological risk group.

Materials and methods. Depending on the number of prognostic factors at the onset of disease relapse-free survival (RFS) was 47 % in their absence, 45 % in the presence of 1 factor, in the presence of 2 factors – 14 % ($p = 0,000$), regardless of the variant of consolidation therapy (sCT, HDCT, autoHSCT). A high level of white blood cells adversely affects OS (38 % vs. 22 %) and increases the frequency of relapse (52 % vs. 69 %) when performing only CT (sCT and HDCT). At initial white blood cells level more than $50,0 \times 10^9/L$ the 5-year OS was 60 % when performing both autoHSCT and HDCT. Performance of autoHSCT at failure to achieve remission after the 1st induction course CT is associated with the best 2-year OS (62 % vs. 35 %, $p = 0,05$), EFS (50 % vs. 22 %, $p = 0,05$) and RFS (50 % vs. 37 %, $p = 0,05$) in comparison with HDCT and sCT. In favorable cytogenetic risk group 5-year RFS was 80 % when performing autoHSCT and 67 % when performing HDCT; the 5-year OS was 80 % regardless of consolidation therapy option.

Conclusion. AutoHSCT is the preferred consolidation option in favorable risk group patients, and after failure to achieve remission after the 1st CT course.

Key words: acute myeloid leukemia, chemotherapy, autologous hematopoietic stem cell transplantation

For citation: Samorodova I.A., Bondarenko S.N., Ovechkina V.N. et al. The efficacy of high-dose consolidation and autologous bone marrow transplantation in first remission of acute myeloid leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):8–20.

Введение

В настоящее время при лечении острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) наиболее предпочтительным методом консолидации, оказывающим излечивающий эффект, является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК). Проведенная в 1-й ремиссии ОМЛ аллоТГСК имеет неоспоримое преимущество перед протоколом лечения, ограниченным только химиотерапией (ХТ), как в отношении 5-летней общей выживаемости (ОВ) (67 % против 46 %), так и в 5-летней бессобытийной выживаемости (БСВ) (65 % против 30 %), в первую очередь за счет меньшей частоты рецидивов в группе аллоТГСК (24 % против 57 %) [1]. Тем не менее аллоТГСК до сих пор остается методом лечения, при котором снижение ОВ во многом обусловлено развитием ряда тяжелых осложнений, что приводит к более высокому уровню смертности в ремиссии (25 % против 4 %) [2]. Основным фактором, определяющим терапевтическую тактику и результаты лечения ОМЛ у взрослых, является принадлежность пациента к группе цитогенетического риска (ЦГР) [3]. Так, например, у лиц группы благоприятного риска долгосрочная ОВ после проведения программной ХТ сравнима с аллоТГСК. Таким образом, вопрос о необходимости выполнения аллоТГСК в 1-й ремиссии ОМЛ этим пациентам, а также больным стандартной группы риска в настоящее время остается открытым. В многочисленных исследованиях показано преимущество аллоТГСК у паци-

ентов группы неблагоприятного риска в 1-й ремиссии ОМЛ (ОВ – 40 против 30 %, риск рецидива – 39 против 77 %) [2, 4, 5]. Однако использование этого метода лимитировано такими факторами, как отсутствие HLA-идентичного донора – лишь в 20 % случаев имеется совместимый родственник донор, длительностью поиска неродственного донора, при этом для 30 % пациентов не удается подобрать совместимого по генам HLA-системы донора.

Для пациентов, особенно при наличии факторов неблагоприятного прогноза (неблагоприятная цитогенетическая группа, возраст >40 лет, высокий уровень лейкоцитов в момент постановки диагноза), которым в силу различных причин не выполнена аллоТГСК, альтернативным способом консолидации может стать аутологичная ТГСК (аутоТГСК). Ее применение не сопряжено с трудностями подбора донора и такими тяжелыми посттрансплантационными осложнениями, ухудшающими ОВ, как при аллоТГСК, однако эффективность аутоТГСК значительно ей уступает. В связи с этим роль и место аутоТГСК при лечении ОМЛ у взрослых в настоящее время требуют уточнения. В соответствии с рекомендациями ЕВМТ (2015) пациентам в первой полной ремиссии ОМЛ благоприятной прогностической группы показано проведение консолидации с помощью аутоТГСК или аллоТГСК от родственного донора. У лиц стандартной и неблагоприятной групп риска ОМЛ аутоТГСК является клинической опцией, решение вопроса о применении которой

возможно только после анализа соотношения риск—польза [6, 7]. По данным ЕВМТ (2016), при проведении аутоТГСК у пациентов с ОМЛ групп благоприятного и стандартного риска ОВ и БРВ сравнимы с неродственной аллоТГСК (78 % и 59 % — ОВ и БРВ в группе благоприятного риска; 66 % и 51 % — в группе стандартного риска соответственно) [8]. В исследованиях групп EORTC/GIMEMA и HOVON-SAAK показана корреляция ОВ и БСВ с возрастом: если у лиц <36–40 лет ОВ при аллоТГСК превышает таковую при аутоТГСК и ХТ (61 % против 49 %), то у больных >40 лет ОВ сравнима (44 % против 42 %); в основном это объясняется увеличением смертности, связанной с лечением, у пациентов старшего возраста (25 % при аллоТГСК против 4 % при аутоТГСК) [2, 5].

Цель исследования — оценка долгосрочной выживаемости у лиц с диагнозом ОМЛ, получивших в качестве консолидации ХТ или аутоТГСК в 1-й ремиссии заболевания.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 135 пациентов в возрасте от 18 до 67 лет, медиана 45 лет, с верифицированным диагнозом ОМЛ (кроме М3 по классификации FAB), лечившихся в гематологических отделениях городских клинических больниц № 31, 15 и 17, в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой, ПСПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова в 2005–2014 гг. Из них 100 пациентов получали только программную ХТ, 35 больным назначена в качестве консолидации аутоТГСК.

Диагноз ОМЛ устанавливали на основании данных морфологического (>20 % бластов), цитохимического, цитофлюорометрического, цитогенетического, молекулярно-генетического исследований костного мозга (КМ), полученного методом аспирационной биопсии из грудины или заднего гребня подвздошной кости.

Формулировка диагноза ОМЛ осуществлялась на основании FAB-классификации и классификации Всемирной организации здравоохранения (2008). По морфологическому варианту ОМЛ пациентов распределили следующим образом: М0 — у 3 % ($n = 5$); М1 — у 20 % ($n = 28$); М2 — у 33 % ($n = 45$); М4 — у 26 % ($n = 35$); М5 — у 12 % ($n = 16$); М6 — у 3 % ($n = 4$); М7 — у 1 % ($n = 2$); М3 — исключены из исследования.

В исследовании участвовали 84 % ($n = 113$) пациентов с первичным ОМЛ, 3 % ($n = 4$) — с вторичным ОМЛ, связанным с предшествующей ХТ, и 13 % ($n = 18$) — с ОМЛ с предшествующими миелодиспластическим синдромом (МДС) и хроническим миеломоноцитарным лейкозом (ХММЛ).

Распределение по группам риска проведено в соответствии с классификацией групп риска ОМЛ (Cheril L. Willman, 2002). К группе благоприятного ЦГР отнесены 16 % ($n = 21$) пациентов, 64 % ($n = 87$) — к группе промежуточного (стандартного) риска, 20 % ($n = 27$) — к группе неблагоприятного прогноза.

По неблагоприятным факторам прогноза пациенты были распределены следующим образом: возраст >40 лет (51 %; $n = 69$), гиперлейкоцитоз $>50,0 \times 10^9/\text{л}$ (22 %; $n = 30$), группа неблагоприятного цитогенетического и молекулярно-биологического риска (20 %; $n = 27$).

В качестве индукции ремиссии все участники получили 1–2 курса ХТ по схеме «7+3»: цитарабин $100 \text{ мг}/\text{м}^2$ в виде 1-часовой инфузии 2 раза в сутки или $200 \text{ мг}/\text{м}^2$ в виде 24-часовой непрерывной инфузии в течение 7 дней; даунорубин $60 \text{ мг}/\text{м}^2$ однократно в сутки в виде короткой 15-минутной инфузии, пациентам >55 лет с целью уменьшения кардиотоксичности назначали идарубин $12 \text{ мг}/\text{м}^2$ в виде короткой 15-минутной инфузии в течение первых 3 дней терапии.

На 21-й день от начала 1-го курса ХТ была выполнена контрольная аспирационная биопсия КМ с морфологическим, цитогенетическим и молекулярно-генетическим исследованием для верификации достижения ремиссии заболевания. При отсутствии восстановления гематологических показателей (количество нейтрофилов в периферической крови $>1,5 \times 10^9/\text{л}$ при числе тромбоцитов $>100,0 \times 10^9/\text{л}$) повторное исследование КМ выполняли через неделю и/или при восстановлении показателей периферической крови.

Достижение полной клинико-гематологической ремиссии верифицировалось при выполнении следующих условий: в пунктате КМ обнаруживается ≤ 5 % бластов при нормальном соотношении всех ростков гемопоэза, при количестве нейтрофилов в периферической крови $>1,5 \times 10^9/\text{л}$, количестве тромбоцитов $>100,0 \times 10^9/\text{л}$, при отсутствии экстрамедуллярных очагов лейкоэмического роста. Указанные показатели должны сохраняться в течение >1 мес.

В дальнейшем пациенты, достигшие ремиссии после завершения индукционных курсов ХТ, в качестве консолидации получали один из трех вариантов лечения:

- ХТ стандартной интенсивности (сХТ) — 2–3 курса ХТ с дозировкой цитарабина до $1,5 \text{ г}/\text{м}^2$ в сутки («7+3», «MiDAC», «MiDAC+Ida», «MiDAC+Mito»);
- высокодозную химиотерапию (ВДХТ) — 2–3 курса ХТ с дозировкой цитарабина от 2 до $6 \text{ г}/\text{м}^2$ в сутки в 1-й, 3-й, 5-й дни терапии +/- антрациклины (HDAC, HAM);
- аутоТГСК после 1–2 курсов ВДХТ. У большинства пациентов (80 %; $n = 28$) источником трансплантата были периферические стволовые клетки крови (ПСКК), в 20 % случаев — КМ. Миелоаблативный режим кондиционирования — циклофосфан с бусульфаном — использовали у 83 % больных ($n = 29$), у остальных 17 % ($n = 6$) — немиелоаблативный режим кондиционирования — мелфалан. АутоТГСК выполняли в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ПСПб ГМУ им. акад. И.П. Павлова и в городской клинической больнице № 31. Интервал от момента верификации диаг-

ноза до проведения аутоТГСК составил от 3,6 до 18 мес, медиана — 7,8 мес.

Поддерживающее лечение в группе программной ХТ получали 44 % больных ($n = 44$). Большинству из них ($n = 34$) назначали терапию по схеме «5+5»: цитарабин 50 мг/м² 2 раза в сутки подкожно в течение 5 дней и 6-меркаптопурин 75 мг/м²/сут в течение 5 дней. Суммарно таких курсов проводилось 6, часть пациентов ($n = 9$) получали поддерживающую терапию ротационными курсами: цитарабин в комбинациях с циклофосфамидом, даунорубицином (до суммарной кумулятивной дозы антрациклинов 550 мг/м²) и 6-меркаптопурин в течение 3 лет. Поддерживающую терапию не назначали лицам с выполненной аутоТГСК.

В связи с тем, что был проведен ретроспективный анализ данных, группа получивших аутоТГСК является селектированной, т.е. все эти пациенты достигли ремиссии, более того, в 1-й ремиссии дожили до момента проведения аутоТГСК. Поэтому исследование было разделено на 2 этапа:

- анализ выживаемости получивших только ХТ с целью оценить индукционную терапию и сравнить эффективность сХТ и ВДХТ;
- сравнительный анализ эффективности аутоТГСК и ХТ (сХТ и ВДХТ), куда были включены только пациенты, дожившие в ремиссии заболевания до времени медианы выполнения аутоТГСК (так называемый *land-mark*) — 7,8 мес от момента постановки диагноза.

Эффективность терапии оценивали по следующим критериям:

- ОВ рассчитывали от даты постановки диагноза до смерти от любой причины или до даты последней явки больного;
- БРВ рассчитывали от даты констатации полной ремиссии до даты рецидива или последней явки больного;
- БСВ рассчитывали от даты начала лечения до любого «отрицательного» события или до даты последней явки больного. Под «отрицательным» событием понимали прогрессирование, отсутствие полной ремиссии после окончания 2 курсов индукционной терапии, осложнения лечения, вызвавшие его прекращение, рецидив, смерть от любой причины, а также появление второй опухоли или любое другое позднее осложнение лечения, угрожающее жизни больного.

В многофакторный анализ, проводимый для общей когорты пациентов, были включены пол, возраст, уровень лейкоцитов, тромбоцитов и гемоглобина на момент верификации диагноза, группы ЦГР, наличие нейтролейкемии, достижение ремиссии после 1-го курса индукционной ХТ, варианты консолидационной терапии, поддерживающая терапия.

Для анализа полученных данных использовали методы параметрической и непараметрической статисти-

стики. Оценку схожести групп проводили по методу таблиц сопряженности, используя кси-квадрат. Анализ ОВ, БСВ и БРВ проведен по методу Каплана—Майера с использованием тестов Log-Rank и Breslow для оценки достоверности различий. При оценке результатов тестирования статистически достоверными считали различия при значениях $p < 0,05$. Многофакторный анализ выполнен по методу пошаговой логистической регрессии и регрессии Кокса. Обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета статистической программы SPSS, version 21, StatSoft, Inc.

Результаты

В исследовании участвовали 135 пациентов. Медиана наблюдения составила 45 мес (3–92 мес). Отсутствие ремиссии после 1-го курса индукционной терапии констатировано у 39 % ($n = 53$) больных. У 4 % ($n = 4$) участников не удалось достичь ремиссии после 2 курсов ХТ и использования ее резервных схем, а также с учетом смертности в 1-й индукции — 8 % ($n = 8$), во 2-й индукции — 7 % ($n = 7$) из дальнейшего анализа эти пациенты были исключены. Стоит отметить, что на фоне 2-го индукционного курса умерли только пациенты, у которых не была достигнута ремиссия после первого курса ХТ. Суммарная смертность в индукции составила 15 %.

Консолидационную терапию проводили 116 пациентам: 29 % ($n = 39$) — сХТ, 31 % ($n = 42$) — ВДХТ, 26 % ($n = 35$) — аутоТГСК.

В группе получивших только ХТ до времени медианы аутоТГСК дожили 66 пациентов (66 %), из них 7 — в рецидиве заболевания, в связи с чем они были исключены из анализа эффективности терапии от *land-mark*.

Таким образом, в группы сравнения эффективности аутоТГСК и ХТ вошли 95 участников: 35 получивших аутоТГСК (37 %) и 60 получивших ХТ и доживших в ремиссии заболевания до *land-mark*, из них 22 пациента (23 %) получили в качестве консолидации ремиссии сХТ, 38 (40 %) — ВДХТ. Группы сравнения сопоставимы по числу пациентов, исходному уровню лейкоцитов, группам ЦГР, частоте достижения ремиссии после 1-го индукционного курса. Возраст участников в группе аутоТГСК закономерно ниже в связи с необходимостью выполнения интенсивной программы режима кондиционирования перед аутоТГСК, которая не может быть выполнена у лиц старшей возрастной группы с сопутствующим коморбидным фоном.

Клинические характеристики пациентов приведены в табл. 1.

ОВ всех участников исследования составила 37 %, БРВ — 30 % (рис. 1). Продолжительность ремиссии до рецидива составила от 3 до 49 мес, медиана в общей группе — 24 мес, в группе аутоТГСК — 15,2 мес.

Среди всех получавших в качестве консолидации только ХТ (сХТ и ВДХТ) ($n = 81$) рецидив заболевания развился у 47 % ($n = 38$) пациентов, из них в 5 %

Таблица 1. Сравнительные характеристики пациентов

Table 1. Characteristics of patients

Показатель Parameter		Всего пациен- тов, n (%) Total patients, n (%)	Пациенты, получив- шие только ХТ, n (%) Patients received only CT, n (%)		Пациенты на момент land-mark/ аутоТГСК, n (%) Patients at the time of land-mark/ autoHSCT, n (%)		
			сХТ sCT	ВДХТ HDCT	сХТ sCT	ВДХТ HDCT	Ауто- ТГСК AutoHSCT
Число пациентов Number of patients		n = 135	n = 39	n = 42	n = 21	n = 38	n = 35
Пол Gender	Мужчины male	56 (41)	12 (30)	19 (45)	7 (33)	15 (40)	16 (46)
	Женщины female	79 (59)	27 (70)	23 (55)	14 (67)	23 (60)	19 (54)
Возраст Age	17–67 лет 17–67 years	Медиана 41 год Median 41 year	Медиана 47 лет Median 47 year	Медиана 41 лет Median 41 year	Медиана 44 года Median 44 year	Медиана 43 года Median 43 year	Медиана 28 лет Median 28 year
	<40 лет <40 years	66 (49)	13 (31)	21 (50)	9 (43)	17 (45)	27 (77)
	>41 года >41 years	69 (51)	26 (69)	21 (50)	12 (57)	21 (55)	8 (23)
Диагноз Diagnosis	<i>De novo</i>	113 (4)	35 (90)	37 (88)	20 (96)	33 (87)	31 (88)
	Вторичный (связанный с ХТ) Secondary (associated with CT)	4 (3)	0	1 (2)	0	1 (3)	2 (6)
	ОМЛ с предшествующими МДС и ХММЛ AML with previous MDS and CMML	18 (13)	4 (10)	4 (9)	1 (4)	4 (10)	2 (6)
Лейкоциты × 10 ⁹ /л (0,5–817) Leukocytes × 10 ⁹ /L (0.5 – 817)	<50	105 (78)	31 (80)	35 (83)	20 (96)	32 (84)	25 (71)
	>50	30 (22)	8 (20)	7 (16)	1 (4)	6 (16)	10 (29)
Нейролейкемия (оценивали у 78 % пациентов) Neuroleukemia (assessed in 78 % of patients)		16 (12)	1 (2)	4 (9)	0	3 (8)	7 (20)
Группы ЦГР Cytogenetic risk groups	Благоприятная Favorable	21 (15)	5 (12)	10 (24)	4 (19)	10 (26)	5 (14)
	Стандартная Standard	87 (65)	25 (65)	29 (69)	13 (62)	25 (66)	25 (72)
	Неблагоприятная Unfavorable	27 (20)	9 (23)	3 (7)	4 (19)	3 (8)	5 (14)
Кол-во факторов плохого прогноза Number of poor prognosis factors	0	41 (30)	8 (20)	17 (40)	5 (24)	4 (37)	15 (43)
	1	63 (47)	19 (49)	19 (45)	15 (72)	18 (47)	17 (49)
	2	30 (22)	12 (31)	6 (15)	1 (4)	6 (16)	3 (8)
Достижение ремиссии после 1-го курса ХТ Achieving remission after the 1 st CT course	Да Yes	82 (61)	27 (70)	26 (62)	14 (67)	24 (63)	27 (77)
	Нет No	53 (39)	12 (30)	16 (38)	7 (33)	14 (37)	8 (23)
Рецидивы Relapses	Всего Total	60 (44)	19 (48)	19 (45)	11 (52)	16 (42)	21 (60)
	До 7,8 мес Before 7.8 month	12 (9)	8 (20)	3 (7)	—	—	—

Примечание: ХТ — химиотерапия; ТГСК — трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; сХТ — химиотерапия стандартной интенсивности; ВДХТ — высокодозная химиотерапия; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; МДС — миелодиспластический синдром; ХММЛ — хронический миеломоноцитарный лейкоз; ЦГР — цитогенетический риск.

Note: CT — chemotherapy; HSCT — hematopoietic stem cells transplantation; sCT — chemotherapy of standard intensity; HDCT — high-dose chemotherapy; AML — acute myeloid leukemia; MDS — myelodysplastic syndrome; CMML — chronic myelomonocytic leukemia.

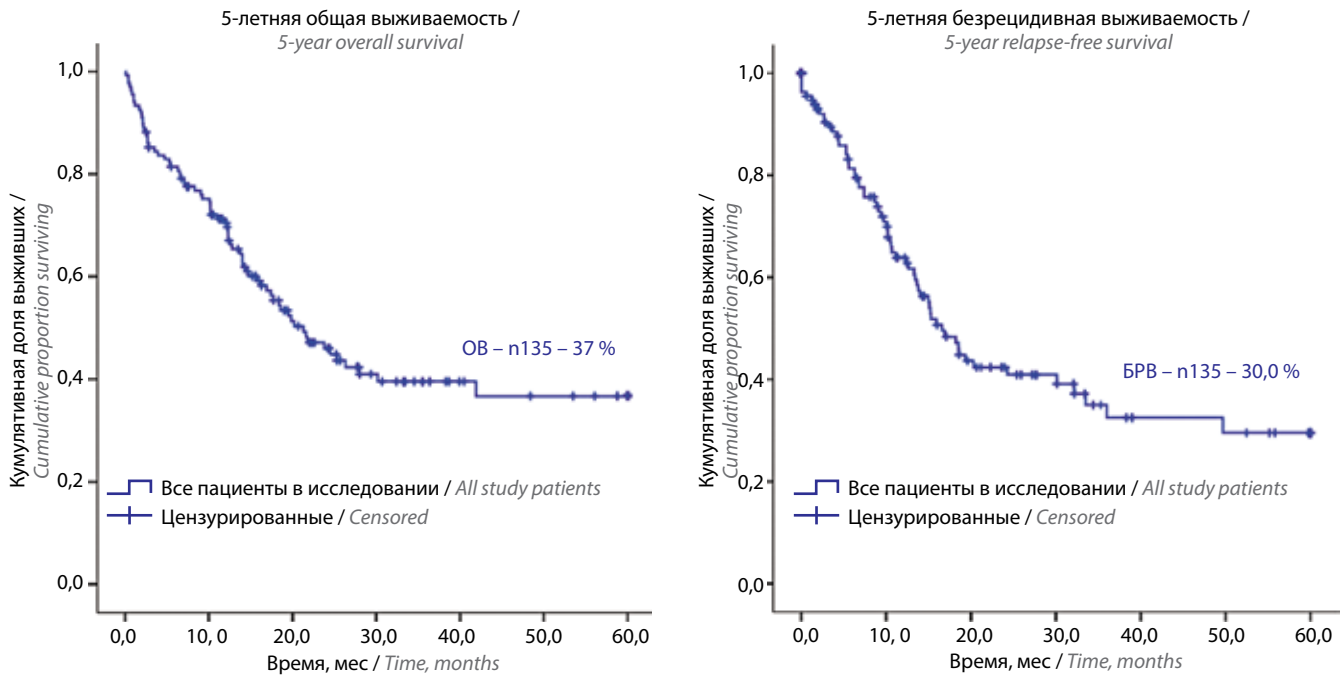


Рис. 1. Общая и безрецидивная выживаемость всех пациентов в исследовании
Fig. 1. Overall and relapse-free survival of all study patients

случаев ($n = 4$) – с поражением центральной нервной системы (ЦНС) (1 – изолированный, 3 – костномозговой + ЦНС).

При проведении консолидации сХТ рецидив документирован у 48 % больных ($n = 19$), в том числе у 3 пациентов с поражением ЦНС (1 – изолированный ЦНС, 2 – комбинированный). В группе ВДХТ количество рецидивов значимо не отличалось – 45 % ($n = 19$) пациентов, из них у 1 больного возник комбинированный рецидив: костномозговой с поражением ЦНС. Результаты сравнения эффективности сХТ и ВДХТ представлены в табл. 2.

В группе аутоТГСК количество рецидивов составило 60 % ($n = 21$), из них в 1 случае развился изолированный рецидив ЦНС.

Летальность на фоне проведения консолидационной ХТ составила 12 % ($n = 10$); причинами смерти в равных соотношениях послужили инфекционные, геморрагические и кардиологические осложнения. Большинство смертей в консолидации отмечено при проведении сХТ – 8 % ($n = 7$); ВДХТ – 4 % ($n = 3$); аутоТГСК – 0 %.

Проведение ВДХТ обуславливает лучшую 5-летнюю ОБ (52,5 % против 30,2 %, $p = 0,00$) и 5-летнюю БРВ (37,7 % против 32,2 %, $p = 0,1$) в сравнении с сХТ в группе получивших в качестве консолидации только ХТ (рис. 2).

По результатам однофакторного анализа в общей когорте пациентов 5-летняя БРВ оказалась выше в группе получавших поддерживающую терапию – 54,5 % против 45,8 % ($p = 0,028$).

При недостижении ремиссии после первого индукционного курса ХТ 5-летняя ОБ и БСВ статисти-

чески были достоверно ниже – 54,5 % против 30,2 % ($p = 0,000$) и 43,2 % против 22,2 % ($p = 0,000$) соответственно независимо от интенсивности консолидационной терапии. При этом при сравнении эффективности сХТ, ВДХТ и аутоТГСК от land-mark по данным однофакторного анализа выполнение аутоТГСК при недостижении ремиссии после 1-го индукционного курса ХТ ассоциировано с лучшей 2-летней ОБ (62 % против 35 %, $p = 0,05$), БСВ (50 % против 22 %, $p = 0,05$) и БРВ (50 % против 37 %, $p = 0,05$) по сравнению с ВДХТ и сХТ.

Возраст является независимым прогностическим фактором: ОБ у лиц до 40 лет составила 53,2 % против 36,8 % у лиц >40 лет ($p = 0,003$); БСВ – 39,4 % против 30,0 % ($p = 0,002$).

В группе благоприятного ЦГР при проведении аутоТГСК 5-летняя БРВ составила 80 %, при назначении только ХТ – 67 %. Это не отразилось на 5-летней ОБ – она составила 80 % вне зависимости от варианта консолидационной терапии. В группе стандартного риска проведение ВДХТ определяет лучшую 5-летнюю ОБ в сравнении с сХТ и аутоТГСК (68 % против 45 %, $p = 0,05$); 5-летняя БСВ составила 35 % при всех вариантах консолидации. В группе высокого ЦГР статистически достоверных различий в 5-летней ОБ и БСВ между проведением сХТ, ВДХТ и аутоТГСК не получено.

Исходный высокий уровень лейкоцитов при проведении только ХТ (сХТ и ВДХТ) негативно влияет на 5-летнюю ОБ (38 % против 22 %) и увеличивает частоту рецидивов (52 % против 69 %).

При исходном уровне лейкоцитов $>50,0 \times 10^9/\text{л}$ 5-летняя ОБ при проведении аутоТГСК и ВДХТ

Таблица 2. Сравнение результатов химиотерапии стандартной интенсивности и высокодозной химиотерапии у пациентов, получивших в качестве консолидационной терапии только химиотерапию

Table 2. Comparison of treatment results with sCT and HDCT in patients who received only CT as a consolidation therapy

Показатель Parameter		5-летняя ОВ, % 5-years OS, %	5-летняя БРВ, % 5-years RFS, %
Все пациенты Total patients	сХТ sCT	30,2*	32,2
	ВДХТ HDCT	52,5*	37,7
Возраст Age	До 40 лет <40 years	сХТ sCT	34,3
		ВДХТ HDCT	53,0
	Старше 40 лет ≥40 years	сХТ sCT	30,4*
		ВДХТ HDCT	53,9*
Диагноз Diagnosis	<i>De novo</i>	сХТ sCT	33,7*
		ВДХТ HDCT	47,4*
	Вторичный и с предшествующими МДС и ХММЛ Secondary and with previous MDS and CMML	сХТ sCT	0*
		ВДХТ HDCT	80,0*
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л Leukocytes × 10 ⁹ /L	<50	сХТ sCT	34,1*
		ВДХТ HDCT	55,2*
	>50	сХТ sCT	18,8
		ВДХТ HDCT	53,6
Группы по цито- и молекулярно- генетическому риску Cytogenetic and molecular genetic risk groups	Благоприятная Favorable	сХТ sCT	80,0
		ВДХТ HDCT	71,1
	Стандартная Standard	сХТ sCT	33,6*
		ВДХТ HDCT	56,6*
	Неблагоприятная Unfavorable	сХТ sCT	0
		ВДХТ HDCT	0
Кол-во факторов плохого прогноза Number of poor prognosis factors	0	сХТ sCT	40,0*
		ВДХТ HDCT	62,9*
	1	сХТ sCT	43,1
		ВДХТ HDCT	53,0

Окончание таблицы 2

End of table 2

Показатель Parameter			5-летняя ОВ, % 5-years OS, %	5-летняя БРВ, % 5-years RFS, %
Кол-во факторов плохого прогноза Number of poor prognosis factors	2 и более 2 and more	cXT sCT	8,0*	0*
		ВДХТ HDCT	0*	0*
Достижение ремиссии Remission achieving	после 1-го курса ХТ After 1 st CT course	cXT sCT	34,3*	25,9*
		ВДХТ HDCT	67,5*	44,1*
	после 2-го курса ХТ After 2 nd CT course	cXT sCT	25,9*	30,0
		ВДХТ HDCT	28,7*	22,9

Примечание: БРВ – безрецидивная выживаемость; ВДХТ – высокодозная химиотерапия; cXT – химиотерапия стандартной интенсивности; ОВ – общая выживаемость; ХТ – химиотерапия. *Отмечены статистически достоверные различия ($p < 0,005$).
Note: RFS – relapse-free survival; HDCT – high-dose chemotherapy; sCT – chemotherapy of standard intensity; OS – overall survival; CT – chemotherapy. *Statistically significant differences ($p < 0.005$).

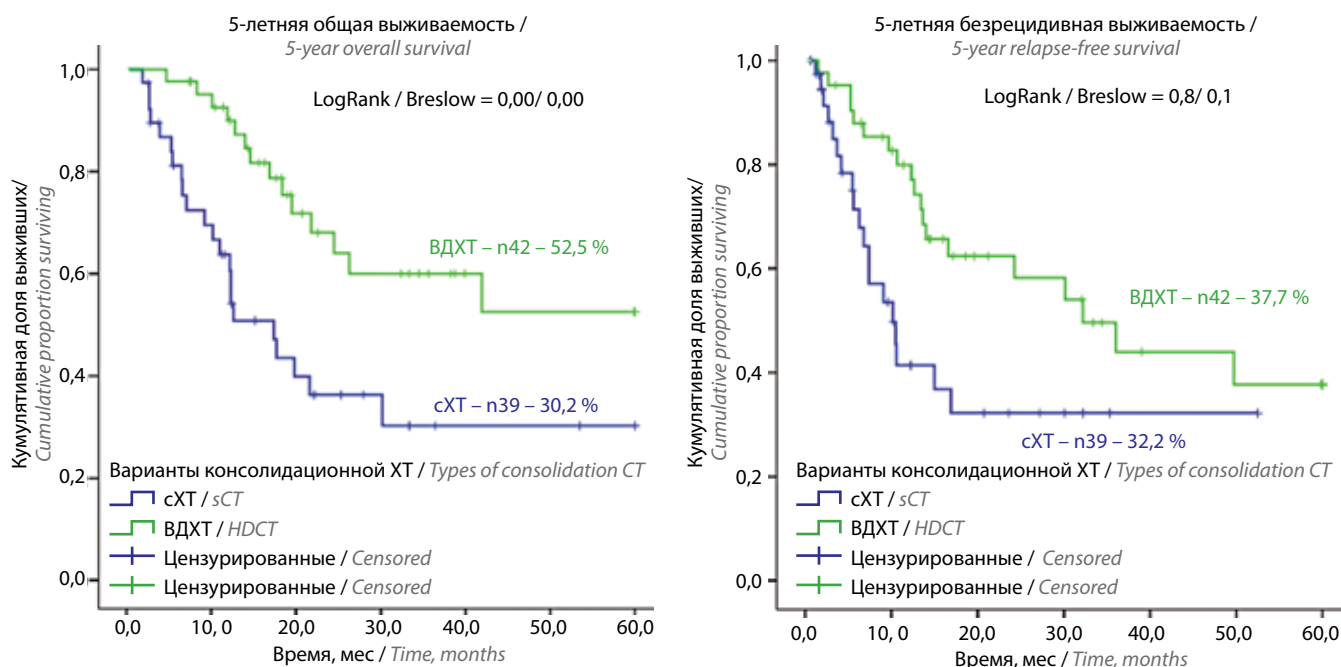


Рис. 2. Общая и безрецидивная выживаемость пациентов, получивших в качестве консолидационной терапии только химиотерапию (стандартной интенсивности и высокодозную)

Fig. 2. Overall and relapse-free survival of patients who received only CT (sCT and HDCT) as consolidation therapy

составила 60 %. Стоит отметить, что при исходном уровне лейкоцитов $>50,0 \times 10^9/\text{л}$ до момента land-mark при проведении cXT дожил только 1 (12 %) пациент. Медиана БСВ при проведении аутоТГСК и ВДХТ составила 12 мес от land-mark, относительно БРВ статистически достоверных различий не получено, однако при проведении только ХТ к 25-му месяцу рецидив возник у всех пациентов, при проведении аутоТГСК 5-летняя БРВ составила 40 %. В то же время при

исходном уровне лейкоцитов $<50,0 \times 10^9/\text{л}$ проведение ВДХТ ассоциировано с лучшей 5-летней ОВ (55 % против 40 %, $p = 0,008$) и БСВ (37 % против 31 %, $p = 0,01$) и 2-летней БРВ (63 % против 35 %, $p = 0,016$) в сравнении как с cXT, так и с аутоТГСК.

При анализе ОВ, БСВ и БРВ в зависимости от исходного уровня гемоглобина, тромбоцитов и уровня blasts в КМ на момент постановки диагноза статистически достоверных различий не получено.

В соответствии с количеством факторов неблагоприятного прогноза (возраст, уровень лейкоцитов, молекулярно-цитогенетическая группа риска) в дебюте заболевания БРВ составила 47 % при их отсутствии, 45 % при наличии 1 фактора, а при наличии 2 факторов – 14 % ($p = 0,000$) вне зависимости от варианта консолидационной терапии (сХТ, ВДХТ, аутоТГСК).

При сравнении эффективности аутоТГСК, ВДХТ и сХТ от land-mark достоверных различий между всеми вариантами консолидации не наблюдалось как в отношении 5-летней ОВ (45 % против 59 % против 44 %; $p = 0,10$), так и 5-летней БРВ (29 % против 40 % против 41 %; $p = 0,11$) (рис. 3).

Более подробно результаты сравнения эффективности аутоТГСК, ВДХТ и сХТ от land-mark представлены в табл. 3.

Стоит отметить, что в зависимости от сроков проведения аутоТГСК относительно достижения ремиссии были получены статистически достоверные различия при анализе 5-летней ОВ: 54 % при выполнении аутоТГСК в срок до 6 мес от момента достижения ремиссии ($n = 21$) и 37 % при проведении аутоТГСК позже 6 мес после достижения ремиссии ($n = 14$; $p = 0,03$). При этом статистически достоверных различий по частоте рецидивов не получено.

При многофакторном анализе было показано, что продолжительность интервала от момента установления диагноза до начала цитостатической терапии не влияет на 5-летнюю ОВ и БСВ, но увеличивает вероятность развития рецидива ($p = 0,006$), в то же время при увеличении продолжительности ремиссии (>7 мес) значительно сокращается вероятность развития рецидива ($p = 0,000$). У мужчин в возрасте до 40 лет вероятность развития рецидива выше ($p = 0,011$) в сравнении с остальной популяцией. В результате многофакторного анализа также выявлено достоверное увеличение 5-летней ОВ при проведении поддерживающей терапии в общей когорте пациентов ($p = 0,013$), а также улучшение 5-летней ОВ при назначении высокодозной консолидации и аутоТГСК ($p = 0,004$) по сравнению со стандартными дозами консолидации у лиц в 1-й ремиссии ОМЛ.

Обсуждение

Вопрос наиболее адекватной стратегии лечения ОМЛ в случаях, когда по каким-либо причинам невозможно выполнить аллоТГСК, до сих пор вызывает дискуссии. Аутологичная ТГСК при ОМЛ в большинстве случаев рассматривается как клиническая опция. За последние годы уменьшилась не связанная с рецидивом летальность при выполнении аутоТГСК. Наиболее вероятно, что это произошло благодаря успехам сопроводительной терапии [6, 9]. В нашем исследовании летальных исходов, непосредственно связанных с выполнением аутоТГСК, не отмечено.

Частота развития рецидива после аутоТГСК остается высокой и, к сожалению, за последние годы зна-

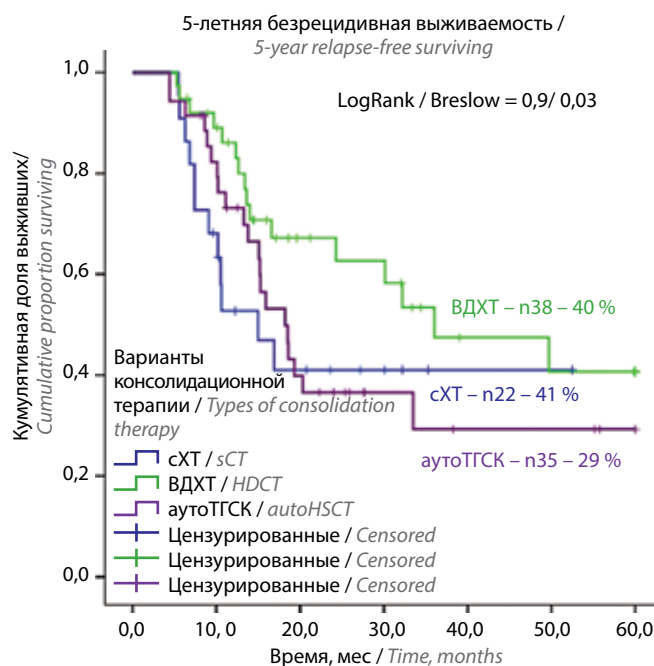


Рис. 3. Безрецидивная выживаемость от land-mark при консолидации стандартными дозами цитарабина, высокими дозами цитарабина и аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток
Fig. 3. Relapse-free survival from land-mark in patients received consolidation with standard cytarabine doses, high cytarabine doses and autoHSCT

чимых улучшений в этом отношении не достигнуто. По данным различных авторов, 3–5-летняя БРВ после аутоТГСК составляет от 28 % до 53 % [10]. По нашим данным, 5-летняя БРВ в группах благоприятного и стандартного риска составила 80 и 40 % соответственно. В ходе многоцентрового исследования выявлена зависимость частоты рецидивов не только от возраста (>45 лет) и позднего достижения ремиссии (>40 дней), но и от источника трансплантата (частота рецидивов при использовании ПСКК составила 51 %, при использовании КМ – 43 %), а также от сроков проведения аутоТГСК от момента достижения ремиссии [11, 12]. В нашем исследовании выявлена лучшая 5-летняя ОВ в группе получивших аутоТГСК в срок до 6 мес от момента достижения ремиссии (она составила 54 %), в то время как при выполнении аутоТГСК позже 6 мес 5-летняя ОВ сравнялась с результатами ХТ и составила 37 %. Для пациентов группы высокого риска, которым не может быть выполнена аллоТГСК, в нашем исследовании не выявлено преимущество аутоТГСК, что соответствует данным ЕВМТ (2015), а также российским клиническим рекомендациям (2014) [7, 13, 14].

В исследовании М. Sekeres и соавт. (2009) показано ухудшение ОВ у молодых пациентов при откладывании начала специфической терапии более чем на 5 дней [15]. По данным Bertoli и соавт. (2013), не выявлено влияния продолжительности интервала от момента постановки диагноза до начала специфической терапии ни на ОВ, ни на раннюю смертность, ни на ответ на проводимую терапию [16]. По нашим данным, интервал до начала специфической терапии также

Таблица 3. Сравнение результатов лечения химиотерапии стандартной интенсивности, высокодозной химиотерапии и аутологичной трансплантации гемопоэтических клеток от land-mark

Table 3. Comparison of treatment results with sCT, HDCT and autoHSCT from land-mark

Показатель Parameter		5-летняя ОВ, % 5-years OS, %	5-летняя БРВ, % 5-years RFS, %
Все пациенты Total patients		сХТ sCT	44,7*
		ВДХТ HDCT	59,7 *
		аутоТГСК autoHSCT	29,3
Возраст Age	До 40 лет <40 years	сХТ sCT	33,3
		ВДХТ HDCT	69,1
		аутоТГСК autoHSCT	54,1
	Старше 40 лет ≥40 years	сХТ sCT	56,3
		ВДХТ HDCT	53,9
		аутоТГСК autoHSCT	18,8
Диагноз Diagnosis	De novo	сХТ sCT	46,9
		ВДХТ HDCT	55,1
		аутоТГСК autoHSCT	45,7
	Вторичный и с предшествующим МДС и ХММЛ Secondary and with previous MDS and CMML	сХТ sCT	0*
		ВДХТ HDCT	80,0*
		аутоТГСК autoHSCT	33,3*
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л Leukocytes × 10 ⁹ /L	<50	сХТ sCT	44,0*
		ВДХТ HDCT	61,7*
		аутоТГСК autoHSCT	40,2*
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л Leukocytes × 10 ⁹ /L	>50	сХТ sCT	-
		ВДХТ HDCT	62,5
		аутоТГСК autoHSCT	57,9
Группы по цито- и молекулярно- генетическому рisku Cytogenetic and molecular genetic risk groups	Благоприятная Favorable	сХТ sCT	100,0
		ВДХТ HDCT	71,1
		аутоТГСК autoHSCT	80,0
	Стандартная Standard	сХТ sCT	45,4*
		ВДХТ HDCT	68,2*
		аутоТГСК autoHSCT	44,6*
	Неблагоприятная Unfavorable	сХТ sCT	0
		ВДХТ HDCT	0
		аутоТГСК autoHSCT	25,0

Окончание таблицы 3

End of table 3

Показатель Parameter			5-летняя ОВ, % 5-years OS, %	5-летняя БРВ, % 5-years RFS, %
Кол-во факторов плохого прогноза Number of poor prognosis factors	0	сХТ sCT	40,0*	20,0*
		ВДХТ HDCT	79,5*	34,0*
		аутоТГСК autoHSCT	54,2*	40,7*
	1	сХТ sCT	47,9	51,4
		ВДХТ HDCT	57,0	63,5
		аутоТГСК autoHSCT	24,5	0
	2 и более 2 and more	сХТ sCT	0	0
		ВДХТ HDCT	0	0
		аутоТГСК autoHSCT	33,3	33,3
Достижение ремиссии Remission achieving	После 1-го курса ХТ After 1 st CT course	сХТ sCT	50,0*	43,6*
		ВДХТ HDCT	73,7*	45,9*
		аутоТГСК autoHSCT	41,0*	21,2*
	После 2-го курса ХТ After 2 nd CT course	сХТ sCT	38,1	42,9
		ВДХТ HDCT	34,7	26,2
		аутоТГСК autoHSCT	60,0	50,0

Примечание: БРВ — безрецидивная выживаемость; ВДХТ — высокодозная химиотерапия; сХТ — химиотерапия стандартной интенсивности; ОВ — общая выживаемость; ХТ — химиотерапия. *Отмечены статистически достоверные различия ($p < 0,005$).

Note: RFS — relapse-free survival; HDCT — high-dose chemotherapy; sCT — chemotherapy of standard intensity; OS — overall survival; CT — chemotherapy. *Statistically significant differences ($p < 0.005$).

не влияет на 5-летнюю ОВ, однако увеличивает вероятность развития рецидива. По этому вопросу необходимы дополнительные исследования.

По данным немецкой группы по лечению ОМЛ под руководством Т. Бюхнера (2003), проведение поддерживающей терапии после высокодозной консолидации увеличивало 5-летнюю БРВ, в частности в группе неблагоприятного прогноза [17]. В российском исследовании ОМЛ-06.06 показано статистически достоверное снижение частоты рецидивов в группе пациентов, получивших поддерживающую терапию после завершения высокодозной консолидации [18]. Согласно нашим данным также отмечено положительное влияние поддерживающей терапии на 5-летнюю ОВ при многофакторном анализе.

В ходе данного исследования показано преимущество высокодозной консолидации, в том числе с использованием аутоТГСК, перед стандартными дозами цитарабина. Несмотря на небольшую группу наблюдения, это соответствует результатам других, более

крупных исследований. Так, по данным исследовательской группы GALGB, применение высокодозной консолидации (3 г/м² цитарабина) у пациентов благоприятной и промежуточной прогностических групп способствовало достоверному увеличению 5-летней БРВ до 78 % и 40 % соответственно по сравнению со стандартными (100 мг/м² и 400 мг/м² цитарабина) дозами в консолидации [19].

Закключение

В заключение необходимо отметить, что наше исследование было ретроспективным и нерандомизированным, в связи с чем выводы неоднозначны. Тем не менее есть основания полагать, что частота рецидивов у пациентов благоприятной группы риска, получивших в качестве консолидационной терапии аутоТГСК, меньше. При недостижении ремиссии после 1-го курса ХТ проведение аутоТГСК также является предпочтительным вариантом консолидации. По всей видимости, высокий риск развития рецидивов требует

оценки минимальной резидуальной болезни перед заготовкой трансплантата (периферические стволовые клетки крови, КМ). Также необходимо решить вопрос о проведении эпигеномной терапии после аутоТГСК. Пациенты старшей возрастной группы (не только >60 лет, но и >40 лет) с гиперлейкоцитозом в дебюте и неблагоприятными молекулярно-генетическими

изменениями имеют худший прогноз вне зависимости от вида консолидации. Необходимо проведение дальнейших исследований с целью определения предпочтительного варианта консолидационной и поддерживающей терапии при невозможности выполнения аллоТГСК, стандартной для этой группы пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бондаренко С.Н., Моисеев И.С., Самородова И.А. и др. Сравнение эффективности химиотерапии и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе в первой ремиссии у взрослых. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 2015; том XXII, № 3, с. 66–72. [Bondarenko S.N., Moiseev I.S., Samorodova I.A. et al. Comparison of chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cells transplantation efficacy in first remission of acute myeloid leukemia in adults. Uchenye zapiski SPbGMU im. Akad. I. P. Pavlova = The Scientific Notes of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University 2015, XXII(3);66–72 (In Russ.)]. DOI: 10.24884/1607-4181-2015-22-3-66-80.
2. Cornelissen J.J., van Putten W.L.J., Verdonck L.F. et al. Results of a HOVON/SAKK donor versus no-donor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middle-aged adults: benefits for whom? Blood 2007;109:3658–66. DOI: 10.1182/blood-2006-06-025627. PMID: 17213292.
3. Афанасьев Б.В., Зубаровская Л.С., Семенова Е.В. и др. Опыт аллогенной неродственной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток в клинике трансплантации костного мозга СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Терапевтический архив 2007; 79(7):36–43. [Afanasyev B.V., Zubarovskaya L.S., Semenova E.V. et al. The experience of allogeneic unrelated hematopoietic stem cells transplantation in the bone marrow transplantation clinic of Pavlov First St. Petersburg State Medical University. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive 2007;79(7):36–43 (In Russ.)].
4. Cornelissen J.J., Gratwohl A., Schlenk R.F. et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated_risk adapted approach. Nat Rev Clin Oncol 2012;9(10):579–90. DOI: 10.1038/nrclinonc. 2012.150. PMID: 22949046.
5. Suciu S., Mandelli F., de Witte T. et al. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia (AML) in first complete remission (CR1): an intention-to-treat analysis of the EORTC/GIMEMAAML-10 trial. Blood 2003;102(4):1232–40. DOI: 10.1182/blood-2002-12-3714. PMID: 12714526.
6. Mohty M. The EBMT Handbook 2012, Ch. 19, pp. 317–27.
7. Sureda A., Bader P., Cesaro S. et al. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe. Bone Marrow Transplantation 2015;50(8):1037–56. DOI: 10.1038/bmt.2015.6. PMID: 25798672.
8. Мелкова К.Н., Петрова Г.Д. Материалы 42-го конгресса Европейского общества по трансплантации костного мозга (апрель 2016 г., Валенсия). Клиническая онкогематология 2016;9(4):485–93. [Melkova K.N., Petrova G.D. Materials of the 42nd Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (April, 2016; Valencia). Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2016;9(4):485–93 (In Russ.)].
9. Cornelissen J.J., Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first remission. Blood 2016;127(1):62–70. DOI: 10.1182/blood-2015-07-604546. PMID: 26660427.
10. Breems D.A., Lowenberg B. Autologous stem cell transplantation in the treatment of adults with acute myeloid leukaemia. British Journal of Haematology 2005;130:825–33. DOI:10.1111/j.1365-2141.2005.05628.x. PMID: 16156852.
11. Valardo R., Frassoni F. The EBMT Handbook, 2008, pp. 357–70.
12. Материалы конференции Европейского общества по трансплантации костного мозга (ЕВМТ), 2008. Клиническая онкогематология 2008;1(2):183–5. [Proceedings of the European Bone Marrow Transplantation Conference (EBMT), 2008. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology 2008;1(2):183–5 (In Russ.)].
13. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению ОМЛ взрослых. Гематология и трансфузиология 2014;59(S2):2–29. [Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasiev B.V. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of AML in adults. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 2014;59(S2):2–29 (In Russ.)].
14. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и др. Клинические рекомендации российских экспертов по лечению больных острыми миелоидными лейкозами в возрасте моложе 60 лет. Терапевтический архив 2014;86(7):4–13. [Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasiev B.V. et al. Russian experts' clinical guidelines for acute myeloid leukemia treatment in patients less than 60 years of age. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive 2014;86(7):4–13 (In Russ.)].
15. Sekeres M., Elson P., Kalaycio M.E. et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. Blood 2009;113(1):28–36. DOI: 10.1182/blood-2008-05-157065. PMID: 18827183.
16. Bertoli S., Bérard E., Huguet F. et al. Time from diagnosis to intensive chemotherapy initiation does not adversely impact the outcome of patients with acute myeloid leukemia. Blood 2013;121(14):2618–26. DOI: 10.1182/blood-2012-09-454553. PMID: 23365464.
17. Buchner T., Hiddemann W., Berdel W.E. et al. 6-Thioguanine, cytarabine, and daunorubicin (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM)

for induction, TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by reduced monthly TAD or TAD-HAM-TAD and one course of intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia(AML): a randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4496–504. DOI: 10.1200/JCO.2003.02.133. PMID: 14673036.

19. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Клясова Г.А. и др. Клинический протокол ОМЛ-01.10 по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. В сб.: Программное лечение заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко М.: Практика, 2012. С. 153–206. [Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V., Klyasova G.A. et al. Clinical protocol AML-01.10 on the treatment of acute myeloid

leukemia in adults. In: Program treatment of blood diseases. V.G. Savchenko (ed.). Moscow: Praktika, 2012. P. 153–206 (In Russ.)].

20. Bloomfield C.D., Lawrence D., Byrd J.C. et al. Frequency of Prolonged Remission Duration after High-Dose Cytarabine Intensification in Acute Myeloid Leukemia Varies by Cytogenetic Subtype. *Cancer Research* 1998;58(18):4173–79. PMID: 9751631.

ORCID авторов

И.А. Самородова: <https://orcid.org/0000-0001-9321-9084>

ORCID of authors

I.A. Samorodova: <https://orcid.org/0000-0001-9321-9084>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Экстрамедиастинальное поражение у больных первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой

Я.К. Мангасарова, А.У. Магомедова, А.М. Ковригина, И.Э. Костина, Е.С. Нестерова, Л.Г. Горенкова, А.Е. Мисюрин, О.В. Марголин, С.К. Кравченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Яна Константиновна Мангасарова v.k.jana@mail.ru

Введение. Внемедиастинальные опухолевые очаги при первичной медиастинальной (тимической) В-крупноклеточной лимфоме (ПМВКЛ) и вовлечение костного мозга (КМ) в дебюте заболевания являются исключением из правил, и информации в отечественной и международной литературе практически нет.

Цель исследования — охарактеризовать больных ПМВКЛ с наличием отдаленных экстрамедиастинальных очагов.

Материалы и методы. С 2007 по 2017 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России диагноз ПМВКЛ согласно критериям Всемирной организации здравоохранения был установлен 157 пациентам, экстрамедиастинальное вовлечение констатировано у 16 (10,2 %) больных, из них 3 пациентки находились на разных сроках беременности. Медиана возраста пациентов составила 27 (23–69) лет. Больные получили разные виды терапии: *m-NHL-BFM-90*, *R-DA-EPOCH* и *VACOP-B*.

Результаты. Один экстрамедиастиальный отдаленный очаг верифицирован у 11 (68,7 %) из 16 больных, множественные — у 5 (31,3 %) из 11. Наиболее часто констатировали вовлечение поджелудочной железы — 6 (37,5 %) случаев, почек — 5 (31,2 %), яичников — 3 (18,7 %), печени — 3 (18,7 %), КМ — 3 (18,7 %) и молочной железы — 2 (12 %) случая. Выявлено по 1 случаю поражения желудка, костей, мягких тканей, селезенки, а также образование малого таза и надпочечников. В 15 из 16 случаев отдаленные экстрамедиастинальные очаги поражения сочетались с вовлечением передневерхнего средостения и только у 1 больной из 16 констатировали изолированное поражение мягких тканей грудной клетки без вовлечения структур средостения. При статистическом анализе данных, рассчитанных с использованием метода Каплана—Майера, 5-летняя общая выживаемость в группе пациентов с классической ПМВКЛ, леченных по схеме *R-DA-EPOCH*, *m-NHL-BFM-90*, и в когорте больных с наличием экстрамедиастинальных очагов была сопоставима и составила 93 %.

В результате проведенного анализа в 10,2 % (16 из 157) случаев констатировалось наличие отдаленных экстрамедиастинальных очагов. Во всех случаях отмечено вовлечение органов и тканей, но не лимфатических узлов. В 18,7 % (3 из 16) наблюдений выявлено поражение КМ, подтвержденное молекулярными и гистологическими исследованиями.

Заключение. Вовлечение передневерхнего средостения, наличие отдаленных изолированных внемедиастинальных очагов при поражении КМ не являются критериями исключения диагноза ПМВКЛ, однако требует проведения дифференциальной диагностики с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с включением стандартных методов и молекулярного исследования. Является ли изолированное внемедиастинальное вовлечение при ПМВКЛ фактором неблагоприятного прогноза, говорить сложно из-за небольшого количества наблюдений.

Ключевые слова: первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная крупноклеточная лимфома, отдаленные экстрамедиастинальные очаги, поражение костного мозга

Для цитирования: Мангасарова Я.К., Магомедова А.У., Ковригина А.М. и др. Экстрамедиастинальное поражение у больных первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой. Онкогематология 2018;13(1):21–8.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-21-28

Extramediastinal lesion in patients with primary mediastinal B-cell lymphoma

Ya. K. Mangasarova, A. U. Magomedova, A. M. Kovrigina, I. E. Kostina, E. S. Nesterova, L. G. Gorenkova, A. E. Misyurina, O. V. Margolin, S. K. Kravchenko

National Research Center for Hematology, 4 Noviy Zykovskiy proezd, 125167 Moscow, Russia

Background. Extramediastinal and bone marrow involvement in PMBCL patients in the onset of the disease is an exception to the rules and complete information, except for the word “rare”, in Russian and international literature is not available.

Objective: to characterize PMBCL patients with extramediastinal involvement.

Materials and methods. From 2007 to 2017 diagnosis of PMBCL was established in 157 patients according to WHO criteria with extramediastinal involvement in 16 (10.2 %) patients, 3 of them were at different stages of pregnancy. The median age was 27 years (23–69). Patients received different therapy protocols: *m-NHL-BFM-90*, *R-DA-EPOCH* and *VACOP-B*.

Results. One extramediastinal lesion was verified in 11/16 (68.7 %) patients, multiple — in 5/11 (31.3 %). The most common localizations were: pancreas — 6 (37.5 %), kidneys — 5 (31.2 %), ovaries — 3 (18.7 %), liver — 3 (18.7 %), bone marrow — 3 (18.7 %) and breast — 2 (12 %) cases. Involvement of stomach, bones, soft tissues, spleen, pelvis, adrenal gland was revealed in one case each. In 15/16 cases,

extramediastinal lesions were combined with antero-superior mediastinum involvement and only in 1 cases an isolated lesion of the soft thorax tissues without involvement of mediastinal structures was revealed. Five-year overall survival in the group of patients with classical PMBCL who received R-DA-EPOCH, m-NHL-BFM-90 and cohort of patients with extramediastinal lesions was comparable and was 93 %. As a result of the analysis, in 10.2 % (16/157) of cases extramediastinal involvement was revealed. In all cases, there is involvement of organs and tissues, but not the lymph nodes. In 18.7 % (3/16) of cases there was bone marrow involvement, confirmed by molecular and histological studies.

Conclusion. Involvement of the antero-superior mediastinum and the presence of extramediastinal lesion, bone marrow involvement is not excluding criterion for PMBCL, but requires differential diagnosis with DBCL, including standard and molecular methods. Is isolated extramediastinal involvement in PMBCL a poor prognostic factor, is uncertain because of the small number of observations.

Key words: primary mediastinal (thymic) B-cell large-cell lymphoma, distant extramediastinal lesion, bone marrow involvement

For citation: Mangasarova Ya.K., Magomedova A.U., Kovrigina A.M. et al. Extramediastinal lesion in patients with primary mediastinal B-cell lymphoma. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):21–8.

Введение

В 1980 г. А.К. Lichtenstein и соавт. представили подробную морфологическую и клиническую характеристику пациентов с первичной лимфомой средостения. Первые описания этого варианта в литературе характеризуются как диффузная гистиоцитарная лимфома с обширными участками склероза и характерной клинической картиной [1]. В дальнейшем первичная медиастинальная (тимическая) В-крупноклеточная лимфома (ПМВКЛ) в классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выделена в отдельную нозологическую форму и составляет примерно 2–3 % всех неходжкинских лимфом. Возрастная медиана заболеваемости составляет 35 лет, при этом женщины болеют значительно чаще мужчин (соотношение 2:1) [2]. ПМВКЛ развивается из В-клеток вилочковой железы и имеет характерное клиническое течение, обусловленное особенностями распространения заболевания в пределах грудной клетки с вовлечением тимуса и распространением на окружающие органы и ткани. Выделение ПМВКЛ как самостоятельного варианта диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ) основана в первую очередь на клинических данных, однако дальнейшие молекулярные исследования полностью подтвердили правомерность этого выделения. Опухолевые клетки при ПМВКЛ характеризуются уникальным профилем экспрессии генов, отличным от ДВКЛ, и имеют большое сходство с молекулярным портретом клеток Березовского–Рид–Штернберга [3–5].

Одним из ключевых механизмов в патогенезе ПМВКЛ является амплификация гена *JAK2* (9p24). После агрегации происходят активация *JAK2* и изменения роста и дифференцировки опухолевых клеток. При ПМВКЛ выявляется повышенная экспрессия генов *PDL1* и *PDL2*, что приводит к подавлению Т-клеточного ответа и росту опухолевого клона в тимусе. Повышенная экспрессия *STAT1* (IL-13 сигнальный путь) и *TRAF1* в опухолевых клетках ПМВКЛ приводят к активации NF-κB и выживаемости Ig-негативных опухолевых клеток. В 70 % случаев в опухолевых клетках ПМВКЛ выявляется гиперэкспрессия *MAL* (2q13). Механизм

повышенной экспрессии *MAL*-белка остается до конца не изученным. Известно, что данный ген кодирует протеолипиды, участвующие в стабилизации мембран и передаче сигнала. В норме экспрессия данного протеина ассоциируется с поздней внутритимической стадией дифференцировки Т-клеток в корковой части вилочковой железы [6, 7].

В ходе цитогенетического исследования при ПМВКЛ и ДВКЛ выявляются различные хромосомные нарушения. Так, для ПМВКЛ характерны отчетливые генетические признаки приобретения генетического материала в областях хромосом 2 (регион 2p15), 9 (регион 9p24), и 12 (регион 12q24) – 30, 50 и 30 % случаев соответственно. При ДВКЛ определяются нарушения 3q27 (*BCL6*) в 40 % случаев, t(14;18)(q32;q21) – в 20–30 % [8–12].

Морфологическая картина ПМВКЛ характеризуется диффузной лимфоидной инфильтрацией клетками среднего и крупного размера. Частый признак – стромальный склероз с формированием альвеолоподобного рисунка строения. Опухолевые клетки ПМВКЛ по уровню дифференцировки являются посттерминальными IgM-негативными. Для ПМВКЛ, кроме экспрессии основных В-клеточных антигенов (CD19, CD20, CD22, CD79a), характерно отсутствие антигенов CD10, CD21, поверхностных иммуноглобулинов, а также слабая экспрессия молекул МНС I и II классов. Опухолевые клетки экспрессируют активационный антиген CD23. В отличие от лимфомы Ходжкина, при которой практически все опухолевые клетки CD30 позитивны, экспрессия CD30 при ПМВКЛ слабая, неравномерная и сочетается с экспрессией CD23 [13].

Для ПМВКЛ характерны агрессивный локальный рост опухоли в пределах грудной полости, инфильтрация прилежащих структур и органов, что уже на начальных этапах болезни вызывает в большинстве случаев развитие синдрома сдавления верхней полой вены и дыхательной недостаточности. В ситуации, когда констатируются немедиастинальные очаги у пациентов с ПМВКЛ, возникает вопрос: является ли экстрамедиастинальное вовлечение проявлением ПМВКЛ или это вариант генерализованной ДВКЛ?

J. Yuan и соавт. опубликовали в 2015 г. работу, посвященную молекулярному анализу ДВКЛ, имеющей молекулярные подписи ПМБКЛ. При исследовании значительного объема ретроспективного биопсийного материала пациентов с ДВКЛ и на основании GEP (Gene expression profiling) исследования у 24 лиц диагноз был пересмотрен в пользу ПМБКЛ (в части случаев отмечались внемедиастинальные отдаленные очаги). При этом в 6 наблюдениях клинически не было верифицировано вовлечения средостения. Авторы делают вывод, что для ПМБКЛ может быть характерно экстрамедиастинальное вовлечение, в том числе без включения внутригрудных структур. Возможно, данный феномен связан с эктопическими очагами тимуса или с нарушением миграции опухолевых В-клеток [14].

Внемедиастинальные опухолевые очаги и вовлечение костного мозга (КМ) в дебюте заболевания — исключение из правил и информация в отечественной и международной литературе практически отсутствует [15, 16].

Цель исследования — охарактеризовать больных ПМБКЛ с наличием отдаленных экстрамедиастинальных очагов.

Материалы и методы

С 2007 по 2017 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России диагноз ПМБКЛ согласно критериям ВОЗ был установлен 157 пациентам, экстрамедиастинальное вовлечение констатировано у 16 (10,2 %) лиц, из них 3 пациентки находились на разных сроках беременности. Медиана возраста — 27 (23–69) лет. Больные получили разные виды терапии: m-NHL-BFM-90, R-DA-EPOCH и VACOP-B.

У всех участников до начала лечения оценили распространенность опухолевого процесса согласно протоколу обследования при лимфопролиферативных заболеваниях: были проведены компьютерная томография головного мозга, органов грудной и брюшной полостей, билатеральная трепанобиопсия КМ и лабораторные исследования. Дополнительные методы обследования

использовали по показаниям. Беременным пациенткам выполняли магнитно-резонансную томографию (МРТ) и/или ультразвуковое исследование (УЗИ).

Дифференциальный диагноз ПМБКЛ и ДВКЛ проведен на основании гистологической картины, результатов иммуногистохимического исследования на парафиновых срезах и молекулярных данных. Молекулярное исследование с целью детекции уровня экспрессии генов *JAK2*, *TRAF1*, *MAL*, *PDL1*, *PDL2* выполнено с использованием метода полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для проведения амплификации синтезированы оригинальные пары праймеров с местами посадки в разных экзонах генов *JAK2*, *MAL*, *PDL1*, *PDL2*, *TRAF1*.

Результаты

Отдаленные экстрамедиастинальные очаги констатированы у 16 больных, среди которых было большинство женщин. Медиана возраста — 27 (23–69) лет. Один экстрамедиастинальный отдаленный очаг верифицирован у 11 (68,7 %) из 16 больных, множественные — у 5 (31,3 %) из 11. Наиболее часто констатировали вовлечение: поджелудочной железы — 6 (37,5 %), почек — 5 (31,2 %), яичников — 3 (18,7 %), печени — 3 (18,7 %), КМ — 3 (18,7 %) и молочной железы — 2 (12 %). Выявлено по 1 случаю поражения желудка, костей, мягких тканей, селезенки, а также образование малого таза (исходящее из матки или яичника) и надпочечников (рис. 1–4). В 15 из 16 случаев отдаленные экстрамедиастинальные очаги поражения сочетались с вовлечением передневерхнего средостения и только у одной из 16 больных констатировано изолированное поражение мягких тканей грудной клетки без вовлечения структур средостения (в данном случае диагноз подтвержден молекулярным методом исследования). Данные представлены в табл. 1.

Молекулярный анализ методом ПЦР проведен 8 из 16 больных. Во всех исследуемых образцах определялась гиперэкспрессия 2 и более генов *JAK2*, *TRAF1*, *MAL*, *PDL1*, *PDL2*, что позволило подтвердить,



Рис. 1. Опухоль передневерхнего средостения (а) и вовлечение селезенки (б), печени (в) пациента с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой (компьютерная томография)

Fig. 1. Tumor of anterior-superior mediastinum (a) and spleen involvement (б), liver involvement (в) of PMBCL patient (computed tomography)

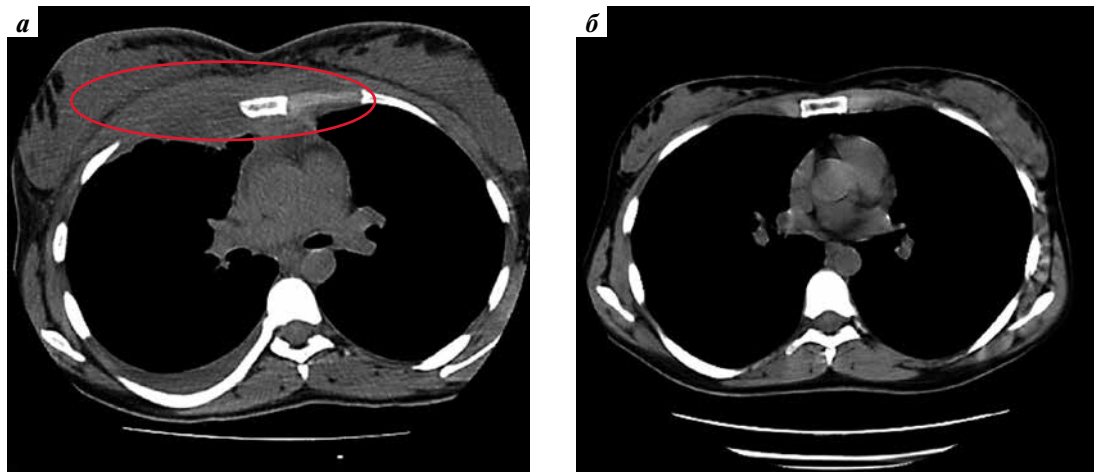


Рис. 2. Вовлечение мягких тканей до (а) и после (б) лечения пациентки с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой при отсутствии вовлечения передневерхнего средостения (компьютерная томография)

Fig. 2. Involvement of soft tissues before (a) and after (b) treatment of PMBCL patient without involvement of the antero-superior mediastinum (computed tomography)

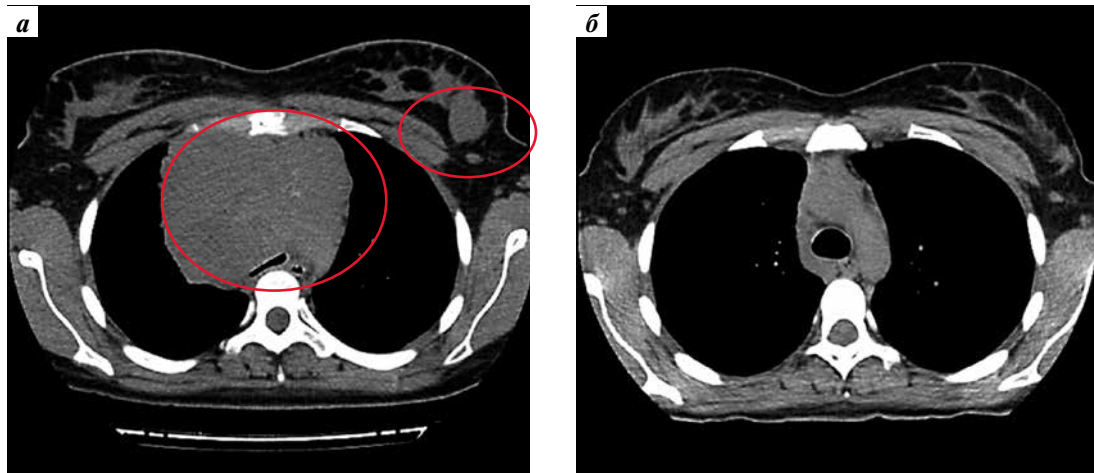


Рис. 3. Опухоль передневерхнего средостения и изолированное вовлечение молочной железы пациентки с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой в дебюте заболевания (а) и после проведения полихимиотерапии (б) (компьютерная томография)

Fig. 3. Anterior-superior mediastinal tumor and isolated involvement of the mammary gland of PMBCL patient at the onset of disease (a) and after multiagent chemotherapy (b) (computed tomography)

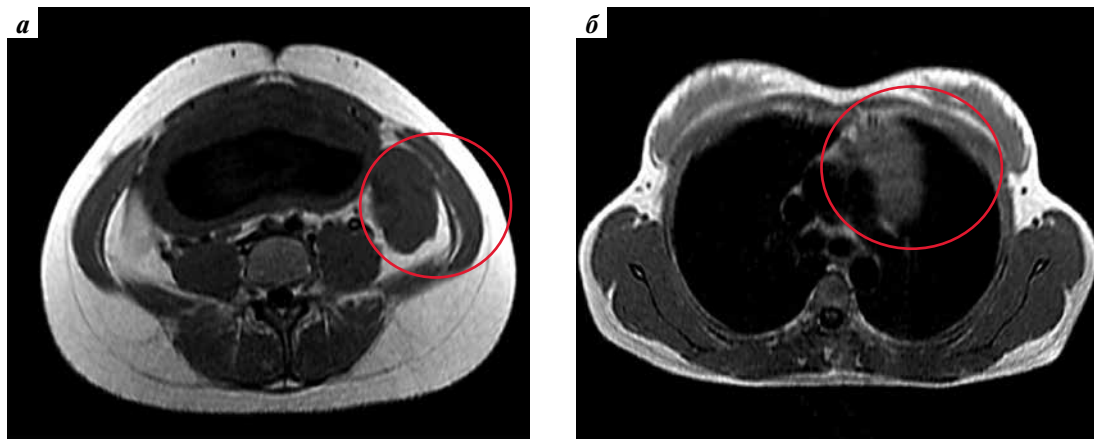


Рис. 4. Опухоль яичника (а) и средостения (б) пациентки с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой до начала лечения на 21-й нед беременности (магнитно-резонансная томография)

Fig. 4. Ovarian tumor (a) and mediastinum tumor (b) of PMBCL patient before treatment at the gestational age of 21 weeks (magnetic resonance imaging)

Таблица 1. Характеристика и результаты лечения пациентов с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой с наличием отдаленных экстрамедиастинальных очагов ($n = 16$)

Table 1. Patients characteristics and therapy results in PMBCL patients with extramediastinal involvement ($n = 16$)

Показатель Parameter	Значение Value
Соотношение мужчины:женщины Ratio males: females	4:12
Возраст, лет Age, years	23–69
Медиана Median	27
Экстрамедиастиальный очаг, n : Extramediastinal lesion, n :	
1	11
≥ 1	5
Вовлечение костного мозга, n Bone marrow involvement, n	3
Поражение лимфатических узлов ниже диафрагмы, n The lymph nodes involvement below the diaphragm, n	0
Вовлечение органов и тканей ниже диафрагмы, n Organ and tissues involvement below the diaphragm, n	15
Опухоль средостения ≥ 6 см, n Mediastinal tumor ≥ 6 cm, n	15
Экстрамедиастиальный очаг ≥ 6 см, n Extramediastinal lesion ≥ 6 cm, n	6
Остаточное образование после ПХТ, n : Residual tumor after MCT, n :	
в области средостения mediastinum	15
экстрамедиастиальное extramediastinal	0
ЛДГ, n : LDH, n :	
N	3
$\uparrow N$	13
Терапия, n : Therapy, n :	
m-NHL-BFM-90	4
ПР/прогрессия/живы CR/progression/alive	4/1/3
R-DA-EPOCH	11
ПР/прогрессия/живы CR/progression/alive	10/1/10
VACOP-B	1
ПР/прогрессия/живы CR/progression/alive	1/0/1

Примечание: ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ПР — полная ремиссия, ПХТ — полихимиотерапия, N — нормальный уровень.

Note: LDH — lactate dehydrogenase, CR — complete remission, MCT — multiagent chemotherapy, N — normal level.

а в некоторых случаях и пересмотреть диагноз в пользу ПМВКЛ (табл. 2).

Терапию по схеме m-NHL-BFM-90 выполнили 4 (25 %) из 16 больных, в 1 случае из 4 наступила смерть от прогрессирования заболевания, у 3 из 4 больных достигнута полная ремиссия (ПР).

Протокол R-DA-EPOCH выполнили у 11 (68,7 %) из 16 пациентов, из них 2 пациентки находились на разных сроках беременности. ПР после 1 линии терапии констатировали у 6 из 11 больных, частичную ремиссию — у 4 из 11 пациентов, им была продолжена полихимиотерапия (Dexa-BEAM, 2 из 4 — DNAP + аутотрансплантация стволовых кроветворных клеток) и достигнута ПР. В данной группе в 1 из 11 случаев в результате прогрессирования заболевания наступила смерть.

Одной (6,3 %) больной в связи с беременностью провели полихимиотерапию по схеме VACOP-B, а после родов продолжили лечение по схеме Dexa-BEAM и достигли ПР.

Медиана наблюдения за больными составила 25 мес.

Таким образом, прогрессирование заболевания констатировали в 2 из 16 случаев: с поражением молочной железы после выполнения курса полихимиотерапии по схеме m-NHL-BFM-90 и КМ после выполнения протокола R-DA-EPOCH.

При статистическом анализе данных, рассчитанных с использованием метода Каплана–Майера 5-летняя общая выживаемость в группе пациентов с классической ПМВКЛ, леченных по схемам R-DA-EPOCH, m-NHL-BFM-90, и в когорте больных с наличием экстрамедиастинальных очагов была сопоставима и составила 93 %. Возможно, статистических различий не получено из-за небольшого числа больных. Все неблагоприятные события (прогрессия/рецидив заболевания) в обеих группах были ранними и возникали в течение года после завершения лечения.

Важно, что если у пациента в дебюте заболевания исходные размеры опухоли средостения превышали 6 см, то всегда после завершения лечения визуализировалось остаточное образование. Если отдаленные экстрамедиастиальные очаги локализовались ниже диафрагмы и размеры их превышали 6 см, остаточное образование после завершения лечения не выявляли.

Обсуждение

Появление позитронно-эмиссионной и компьютерной томографии, расширение иммуногистохимической панели и внедрение в клиническую практику молекулярных методов исследования позволяют углубить представление о классическом проявлении ПМВКЛ. У таких пациентов возможно вовлечение не только структур передневерхнего средостения и КМ, но наличие отдаленных экстрамедиастинальных очагов. Включение структур вне передневерхнего средостения требует дифференции, в первую очередь от ДВКЛ, с применением стандартных

Таблица 2. Молекулярные данные пациентов с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой с экстрамедиастинальным вовлечением**Table 2.** Molecular data of PMBCL patients with extramediastinal involvement

Пациент Patient	Гиперэкспрессия генов (полимеразная цепная реакция) Genes hyperexpression (polymerase chain reaction)	Отдаленные экстрамедиастинальные очаги Extramediastinal lesion
1	<i>TRAF1, PDL2, MAL, JAK2</i>	Опухоль средостения + молочная железа Mediastinal tumor + breast
2	<i>JAK2, TRAF1, PDL1/2</i>	Пара- и ретростеральные мягкие ткани и клетчаточные пространства (в том числе аксиллярных областей и передней грудной стенки) Para- and retrosternal soft tissues (including axillary regions and anterior thoracic wall)
3	<i>PDL1, JAK2</i>	Опухоль средостения + изолированные очаги в обоих легких, печень, поджелудочная железа, почки Mediastinal tumor + isolated lesion in both lungs, liver, pancreas, kidney
4	<i>JAK2, TRAF1, MAL</i>	Опухоль средостения + костный мозг Mediastinal tumor + bone marrow
5	<i>JAK2, TRAF1</i>	Опухоль средостения + левая доля печени, костный мозг Mediastinal tumor + liver left lobe, bone marrow
6	<i>TRAF1, MAL</i>	Опухоль средостения + костный мозг Mediastinal tumor + bone marrow
7	<i>TRAF1, PDL1/2</i>	Опухоль средостения + левая почка Mediastinal tumor + left kidney
8	<i>TRAF1, JAK2, PDL2</i>	Опухоль средостения + левый яичник Mediastinal tumor + left ovary

методов, а в некоторых случаях диагностики — и молекулярного анализа [7, 8].

Наиболее часто, в 68,7 % случаев, у больных верифицировали 1 экстрамедиастинальный очаг. При этом всегда при отдаленном изолированном экстрамедиастинальном поражении ниже диафрагмы вовлекались органы (поджелудочная железа, печень, почки и т. д.), а не лимфатические узлы. В 15 из 16 наблюдений отмечены сочетанное вовлечение передневерхнего средостения и отдаленные экстрамедиастинальные изолированные очаги, и только в 1 случае вовлечение мягких тканей, подкожно-жировой клетчатки, периферических лимфатических узлов не сопровождалось наличием массивной опухоли в передневерхнем средостении. Было проведено молекулярное исследование, в результате которого установлен диагноз ПМБКЛ.

Вовлечение КМ, по нашим наблюдениям, констатировано в 3 из 157 случаев. Помимо гистологического подтверждения поражения КМ, в 2 наблюдениях удалось выполнить молекулярное исследование и выявить гиперэкспрессию генов *JAK2, MAL, PDL1, PDL2, TRAF1*.

Заключение

Таким образом, вовлечение передневерхнего средостения с наличием отдаленных изолированных внемедиастинальных очагов при поражении КМ не является критерием исключения диагноза ПМБКЛ. В подобных случаях необходима дифференциальная диагностика с ДБКЛ с использованием стандартных методов и молекулярного исследования. Является ли изолированное внемедиастинальное вовлечение при ПМБКЛ фактором неблагоприятного прогноза, говорить сложно из-за небольшого количества наблюдений.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Lichtenstein A.K., Levine A., Taylor C.R. et al. Primary mediastinal lymphoma in adults. *Am J Med* 1980;68(4):509–14. DOI: 10.1016/0002-343(80)90294-6. PMID: 6892753.
2. Cazals-Hatem D., Lepage E., Brice P. et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ("Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte") study. *Am J Surg Pathol* 1996;20(7):877–88. DOI: 10.1097/00000478-199607000-00012. PMID: 8669537.
3. Rosenwald A., Wright G., Leroy K. et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003;198(6):851–862. DOI: 10.1084/jem.20031074. PMID: 12975453.
4. Zhang B., Wang Z., Li T. et al. NF-kappa-B2 mutation targets TRAF1 to induce lymphomagenesis. *Blood* 2007;110(2):743–51. DOI: 10.1182/blood-2006-11-058446. PMID: 17405906.
5. Meier C., Hoeller S., Bourgaud C. et al. Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. *Mod Pathol* 2009;22(3):476–87. DOI: 10.1038/modpathol.2008.207. PMID: 19136931.
6. Steidl C., Gascoyne R.D. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2011;118(10):2659–69. DOI: 10.1182/blood-2011-05-326538. PMID: 21700770.
7. Joos S., Granzow M., Holtgreve-Grez H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer* 2003;103(4):489–95. DOI: 10.1002/ijc.10845. PMID: 12478664.
8. Мангасарова Я.К., Мисюрин А.В., Магомедова А.У. и др. Молекулярная диагностика первичной медиастинальной В-клеточной лимфомы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с первичным вовлечением лимфатических узлов средостения. *Клиническая онкогематология* 2011;4:142–5. [Mangasarova Ya.K., Misyurin A.V., Magomedova A.U. et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B-cell lymphoma and diffuse B-large-cell lymphoma with primary involvement of mediastinum lymph nodes. *Klinicheskaya onkologematologiya* = *Clinical oncohematology* 2011;4:142–5 (In Russ.)].
9. Twa D.D., Chan F.C., Ben-Neriah S. et al. Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2014;123(13):2062–5. DOI: 10.1182/blood-2013-10-535443. PMID: 24497532.
10. Bentz M., Barth T.F., Bruderlein S. et al. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Gen Chromos Cancer* 2001;30(4):393–401. PMID: 11241792.
11. Huang J., Sanger G., Greiner T. et al. The t(14;18) defines a unique subset of large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002;99(7):285–90. DOI: 10.1182/blood.V99.7.2285. PMID: 11895757.
12. Barans S., Connor S., Evans P. et al. Rearrangement of the BCL-6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Hematol* 2002;117(2):322–32. DOI: 10.1046/j.1365.2141.2002.03435.x. PMID: 11972514.
13. Ковригина А.М., Пробатова Н.А. Лимфома Ходжкина и крупноклеточные лимфомы. М.: МИА, 2007. С. 108–124. [Kovrigina A.M., Probatova N.A. Hodgkin's lymphoma and large-cell lymphomas. М.: MIA, 2007. P. 108–124 (In Russ.)].
14. Yuan J., Wright G., Rosenwald A. et al. Identification of primary mediastinal large b-cell lymphoma at nonmediastinal sites by gene expression profiling. *Am J Surg Pathol* 2015;39(10):1322–30. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000473. PMID: 26135560.
15. Bishop P.C., Wilson W.H., Pearson D. et al. CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1999;17(8):2479–85. DOI: 10.1200/jco.1999.17.8.2479. PMID: 10561312.
16. Магомедова А.У., Фастова Е.А., Ковригина А.М. и др. Поражение костного мозга при первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфоме. *Терапевтический архив* 2017;89(7):65–8. [Magomedova A.U., Fastova E.A., Kovrigina A.M. et al. Bone marrow involvement in primary mediastinal B-large-cell lymphoma. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic archive* 2017;89(7):65–8 (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh201789765–68. PMID: 28766543.

Вклад авторов

Я.К. Мангасарова, А.У. Магомедова: концепция и дизайн, предоставление материалов для исследования, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка рукописи;

А.М. Ковригина, И.Э. Костина, Е.С. Нестерова, Л.Г. Горенкова, А.Е. Мисюрина, О.В. Марголин, С.К. Кравченко: предоставление материалов для исследования.

Authors' contributions

Ya.K. Mangasarova, A.U. Magomedova: concept and design, provision of materials for research, analysis and interpretation of obtained data, preparation of the article;

A.M. Kovrigina, I.E. Kostina, E.S. Nesterova, L.G. Gorenkova, A.E. Misyurina, O.V. Margolin, S.K. Kravchenko: provision of materials for research.

ORCID авторов

Я.К. Мангасарова: <https://orcid.org/0000-0003-1936-5934>

А.У. Магомедова: <https://orcid.org/0000-0003-4263-8275>

А.М. Ковригина: <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>

И.Э. Костина: <https://orcid.org/0000-0003-4683-4118>

Е.С. Нестерова: <https://orcid.org/0000-0002-6035-9547>

Л.Г. Горенкова: <https://orcid.org/0000-0002-3967-9183>

А.Е. Мисюрина: <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>

С.К. Кравченко: <https://orcid.org/0000-0001-9086-8521>

ORCID of authors

Ya. K. Mangasarova: <https://orcid.org/0000-0003-1936-5934>

A. U. Magomedova: <https://orcid.org/0000-0003-4263-8275>

A. M. Kovrigina: <https://orcid.org/0000-0002-1082-8659>

I. E. Kostina: <https://orcid.org/0000-0003-4683-4118>

E. S. Nesterova: <https://orcid.org/0000-0002-6035-9547>

L. G. Gorenkova: <https://orcid.org/0000-0002-3967-9183>

A. E. Misyurina: <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>

S. K. Kravchenko: <https://orcid.org/0000-0001-9086-8521>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Новые подходы к терапии классических Rh-негативных миелопролиферативных новообразований: опыт раннего применения цепагинтерферона альфа-2b

А.С. Поляков, Я.А. Носков, В.В. Тыренко, А.С. Лапшова, А.В. Ковалев

Кафедра факультетской терапии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России; Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6а

Контакты: Поляков Алексей Сергеевич doctorpolyakov@gmail.com

Введение. Даже спустя 100 лет после первых попыток внедрения в практику химиотерапевтических подходов (1918 г.) и несмотря на окончательно сформировавшиеся представления о миелопролиферативных заболеваниях как о группе злокачественных новообразований, в отношении большинства пациентов с Rh-негативными миелопролиферативными новообразованиями (МПН) допускается, по сути, симптоматический подход к терапии — воздействие на показатели периферической крови и неспецифическая тромбопрофилактика. Ограничения классической циторедукции и современной таргетной терапии, а также убежденность большинства специалистов в невозможности адекватного сдерживания прогрессирования заболевания остаются основными факторами, удерживающими врачей от раннего назначения патогенетической терапии.

Цель исследования — изучение эффективности и безопасности цепагинтерферона альфа-2b (цеПЭГ-ИФН α-2b) в ранней (не риск-адаптированной) терапии классических Rh-негативных МПН при инициальном назначении и при переходе с терапии другими пегилированными интерферонами.

Материалы и методы. Пациентам (n = 27) с истинной полицитемией или эссенциальной тромбоцитемией без учета риска назначен цеПЭГ-ИФН α-2b: инициально или после 6 либо 12 мес терапии другими пегилированными интерферонами в дозе 200 мкг в неделю со снижением до 100 мкг в неделю при развитии гематологической токсичности II степени. Оценивали гематологический и молекулярный ответ. Время наблюдения — от 20 до 46 мес.

Результаты. Во всех группах достигнут сопоставимый по глубине и динамике гематологический ответ со стойкой нормализацией показателей, а также молекулярный ответ в виде устойчивого снижения уровня аллельной нагрузки JAK2V617F. Влияние на результаты фактора переключения на терапию цеПЭГ-ИФН α-2b отсутствовало. ЦеПЭГ-ИФН α-2b показал меньшую дозозимитирующую токсичность по нейтропении и лучшую фармакоэкономическую целесообразность.

Обсуждение. Новые данные о механизмах антипролиферативного действия препаратов интерферона α позволяют говорить о фармакологических преимуществах цеПЭГ-ИФН α-2b по фармакокинетическим показателям; отмечены наличие одного позиционного изомера, чистота лекарственной субстанции, удобство самостоятельного применения.

Заключение. Раннее назначение эффективной патогенетической терапии является самостоятельной превентивной мерой в профилактике развития осложнений МПН. Внедрение цеПЭГ-ИФН α-2b может способствовать совершенствованию помощи пациентам с МПН.

Ключевые слова: миелопролиферативные новообразования, истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, миелофиброз, пегилированный интерферон α, цепагинтерферон альфа-2b

Для цитирования: Поляков А.С., Носков Я.А., Тыренко В.В. и др. Новые подходы к терапии классических Rh-негативных миелопролиферативных новообразований: опыт раннего применения цепагинтерферона альфа-2b. Онкогематология 2018;13(1):29–44.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-29-44

New approaches to therapy of classical Ph-negative myeloproliferative diseases: the experience of early therapy with cepeginterferon alpha-2b

A.S. Polyakov, Y.A. Noskov, V.V. Tyrenko, A.S. Lapshova, A.V. Kovalev

S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of the Russian Federation; Department of Faculty Therapy; 6a Akademika Lebedeva St., Saint Petersburg 194044, Russia

Background. Even 100 years after the first attempts to introduce the chemotherapeutic approaches (in 1918) and despite the completely formed notions of myeloproliferative diseases as a group of malignant neoplasms, in the majority of patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), a symptomatic, in fact, therapy approach — the impact on peripheral blood indices and nonspecific thromboprophylaxis — is allowed. The limitations of classical cytoreduction and current targeted therapy, as well as the conviction of most specialists in the impossibility of adequately containment of disease progression, continue to be the main factors that keep physicians from the early start of pathogenetic therapy.

Objective: to study the efficacy and safety of cepeginterferon alpha-2b (cePEG-IFN alpha-2b) in early (non-risk-adjusted) therapy of classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in initial use and after therapy with other pegylated interferons (PEG-IFN).

Materials and methods. Twenty seven patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia, without considering risk, received cePEG-IFN alpha-2b: initially, or after 6 or 12 months of other pegylated interferon therapy, in a dosage of 200 µg per week, with a decrease to 100 µg per week if 2 degree hematological toxicity developed. Hematological and molecular responses were assessed. Follow-up — from 20 to 46 months.

Results. In all groups, a hematologic response comparable in depth and dynamics, as well as a molecular response as a steady decrease in the JAK2V617F allelic load, was achieved. There was no effect on the results of change to therapy with cePEG-IFN alpha-2b. CePEG-IFN alpha-2b showed less dose-limiting toxicity for neutropenia and better pharmacoeconomic feasibility.

Discussion. New data about mechanisms of antiproliferative effects of interferon alfa preparations are given. The pharmacological advantages of cePEG-IFN alpha-2b are discussed: superiority in pharmacokinetic parameters, the presence of one position isomer purity of the drug substance, the convenience of self-application.

Conclusion. Early administration of an effective pathogenic therapy is an independent preventive measure to prevent the MPN progression and complications development. The use of cePEG-IFN alpha-2b may help to improve the care of MPN patients.

Key words: myeloproliferative neoplasms, MPN, polycythemia vera, essential thrombocythemia, myelofibrosis, pegylated interferon alpha, cepeginterferon alpha-2b

For citation: Polyakov A.S., Noskov Y.A., Tyrenko V.V. et al. New approaches to therapy of classical Ph-negative myeloproliferative diseases: the experience of early therapy with cepeginterferon alpha-2b. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):29–44.

Введение

Еще в 1951 г. Уильям Дамешек объединил в особую группу ряд заболеваний со сходными морфологическими изменениями в костном мозге и склонностью к прогрессированию в миелофиброз (МФ). К хроническим миелопролиферативным заболеваниям (МПЗ) он отнес истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ), первичный МФ, хронический миелолейкоз и острый эритролейкоз [1]. Наиболее значимое событие в борьбе с МПЗ последовало ровно через 50 лет, в 2001 г., когда разработка антирозинкиназной терапии позволила на несколько порядков снизить значимость наиболее прогностически неблагоприятной формы МПЗ — хронического миелоидного лейкоза [2].

В настоящее время наибольшей среди МПЗ значимостью по распространенности, частоте и тяжести осложнений, склонности к прогрессированию и трансформации в острый миелоидный лейкоз, а также ограниченным возможностям специфической терапии обладает группа так называемых классических Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН), или неоплазий, включающая 3 нозологии: ИП, ЭТ и первичный МФ [3, 4].

Идентификация ряда соматических мутаций при МПН (в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR* и др.) позволила доказать клональную природу этих заболеваний [5–14] и объяснить наличие свойственных и другим злокачественным новообразованиям черт: неконтролируемую пролиферацию, нестабильность генома, клональную экспансию и эволюцию, резистентность к терапии, склонность к своеобразному «метастазированию» с развитием очагов экстрамедуллярного кроветворения в селезенке, печени, легких и в других органах [15, 16], повышенный риск тромбгеморрагических осложнений и развития других опухолей [17]. Позже были описаны дополнительные эпигенетические или болезньюмодифицирующие мутации [7], появление новых

хромосомных aberrаций при прогрессировании заболевания [13], а также прогностическое значение уровня аллельной нагрузки мутации V617F в гене *JAK2* в отношении прогрессирования в МФ [4, 18, 19]. Основную роль в прогрессировании МФ и клональной эволюции заболевания играют выделение различных цитокинов, поддержание хронического воспаления и оксидативный стресс [20–32]. При экзотном секвенировании показана зависимость трансформации в острый миелоидный лейкоз от динамики накопления соматических и эпигенетических мутаций [33]. Увеличение числа генетических и фенотипических изменений в миелоидных клетках и микроокружении объясняет непрерывную эволюцию заболевания. Полученные за последние 2 десятилетия данные позволили сформулировать концепцию биологического континуума от ранних стадий заболевания (ИП, ЭТ, дофибротическая стадия первичного МФ) к продвинутым формам: вторичному МФ, фибротической стадии первичного МФ и острому миелоидному лейкозу) [4, 34–36].

Уже 100 лет минуло с момента первых попыток «циторедуктивного» лечения ИП рентгеновским облучением в 1917 г. и ацетилфенилгидразином в 1918 г. [37]. За эти годы определенную эффективность при различных МПН показали: арсенит калия (1933), радиоактивный фосфор (³²P) (1942), ацетат свинца (1942), пирит (1950), триэтиленгликольдиметакрилат меламина (1952), пиреметамин (1954), бусульфид (1958), 6-меркаптопурин (1962), пипоброман (1962), хлорамбуцил (1965), дапсон (1966), гидроксимочевина (1967) и многие другие миелотоксичные агенты [37, 38].

Упоминание в начале статьи У. Дамешака не случайно. Сформировавшееся в 1951 г. принципиально новое понимание природы МПН уже давно должно было кардинально изменить наши представления о подходах к терапии. Но, несмотря на понимание злокачественной природы МПН, а также расширение возможностей диагностического и прогностического

инструментария, подходы к терапии Ph-негативных МПН остаются практически неизменными. Врачебное сообщество, международные согласительные документы (LeukemiaNet, NCCN), национальные руководства, даже лидеры мнений в данной области и на современном этапе находят оправданным, по сути, симптоматический подход к терапии — назначение лечения только по конкретным показаниям [39–42].

Созерцательный подход к ведению пациентов без существенных отклонений показателей периферической крови отчасти объясняется ограниченным набором доступных терапевтических опций. До сих пор наиболее используемыми циторедуктивными агентами остаются гидроксимочевина, меркаптопурин, цитарабин, бусульфан, анагрелид и даже ^{32}P [39, 43]. Возложенные на внедрение таргетных ингибиторов JAK1/JAK2- и JAK2/FLT3-киназ надежды (по аналогии с успехами терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелолейкозе) не оправдались, и в настоящее время рукусолитиниб и перспективные препараты занимают лишь узкую терапевтическую нишу и недостаточно распространены [3, 44, 45].

Убежденность большинства специалистов в невозможности адекватного сдерживания прогрессирования заболевания продолжает оставаться основным фактором, определяющим незыблемость общепринятых показаний к инициации терапии: клинически значимые отклонения показателей крови, обуславливающие симптоматику и высокий риск тромбогеморрагических осложнений, а также запоздалая вторичная профилактика сосудистых катастроф [39, 42]. При этом невмешательство и стороннее наблюдение за неуклонно прогрессирующим и эволюционирующим заболеванием, временный или даже в ряде случаев отрицательный эффект гемоэкспузий или афереза (перераспределение депонированных клеток, стимулирование пролиферации, дисбаланс гемостаза, вторичный железодефицит), низкая эффективность неспецифической тромбопрофилактики, собственно, и замыкают патологический круг, способствуя развитию жизнеугрожающих и инвалидизирующих осложнений задолго до определения общепринятых показаний к инициации специфической терапии [3, 46, 47].

По нашему мнению, на современном этапе накоплено уже достаточное количество данных для обоснования возможно более раннего назначения специфической терапии при злокачественных по своей сути МПН [3, 48–50]. Для принятия этого тезиса необходимо наличие терапевтического агента, мишенью которого был бы преимущественно злокачественный клон, а целью терапии — предотвращение прогрессирования и клональной эволюции заболевания задолго до того, как оно приобретет гетерогенный характер и произойдут неизбежные изменения в костномозговом окружении [3, 51]. Такая терапия должна способствовать эффективному предотвращению осложнений, приводящих к нарушению функций органов и систем орга-

низма и инвалидизации, а также служить превентивной мерой в развитии ассоциированных с наличием хронического воспаления состояний, таких как ускоренный атеросклероз, вторичная артериальная гипертензия, сердечные и мозговые сосудистые катастрофы, инфекции, аутоиммунные заболевания, новые опухоли и т. д. [52–54].

Препараты рекомбинантного интерферона альфа (ИФН- α) были опробованы и показали высокую эффективность при МПН еще в конце 1980-х гг. [55]. При этом их широкому внедрению препятствовали неудобство применения и худшая переносимость пациентами, эмпирический подход к терапии, обусловленный недостаточным пониманием механизмов противоопухолевого и иммуномодулирующего воздействия, и, следовательно, рассмотрение интерферонотерапии только с позиций одного из направлений классической циторедукции. Кроме того, сдерживающими факторами популяризации интерферонотерапии оказались: относительная дороговизна биологических препаратов в сравнении с синтетическими лекарственными субстанциями, а также неопределенная для производителей рентабельность разработки, совершенствования и регистрационных исследований препаратов для лечения редких заболеваний, определяющая необходимость назначения гематологами лечения off-label, т. е. препаратами, разработанными и разрешенными для применения при совершенно иных показаниях (вирусные инфекции). Все эти факторы привели к формированию суррогатных принципов интерферонотерапии МПН, таких как терапия «только для молодых пациентов» или даже терапия «не для всех».

Накопленный несколькими поколениями гематологов кафедры факультетской терапии Военно-медицинской академии опыт применения препаратов рекомбинантного ИФН- α при разнообразной онкогематологической патологии и в различных возрастных группах, в том числе уникальный опыт применения высоких доз ИФН (до 36–39 млн МЕ в неделю) при МПН, иногда с достижением многолетних гематологических ремиссий, а также опыт ранней инициации терапии (до развития выраженных гематологических изменений и анамнеза осложнений), предопределил наш интерес к возможности внедрения в гематологическую практику новых лекарственных форм.

Создание в 1990-х гг. методики пегилирования, т. е. внедрения белковых лекарственных субстанций в «клубок» полиэтиленгликоля (ПЭГ), не осталось без внимания производителей рекомбинантного ИФН и уже к началу 2000-х гг. привело к выходу на рынок (только в качестве противовирусных агентов) 2 препаратов пегилированного ИФН (ПЭГ-ИФН) альфа — ПЭГ-ИФН α -2a и ПЭГ-ИФН α -2b. Эффективность и безопасность этих препаратов при МПН изучена только в нескольких локальных исследованиях. Согласно их результатам пегилированные формы обладали рядом преимуществ: удобством применения (от 1 подкожной

инъекции в 5–10 дней), лучшей субъективной переносимостью пациентами, быстрым достижением гематологического ответа [56–62]. Именно при изучении эффективности ПЭГ-ИФН впервые была показана возможность редукции опухолевого клона и достижения молекулярной ремиссии заболевания (по признаку снижения уровня аллельной нагрузки мутации JAK2V617F) [58–62].

Принципиальным отличием наших собственных исследований новых форм ИФН, стартовавших еще в 2013 г., стало расширение показаний к началу специфической терапии. У большинства пациентов терапию назначали сразу по факту подтверждения диагноза МПН (преимущественно ИП и ЭТ) вне зависимости от выраженности клинико-лабораторных изменений и стратификации риска. Такой подход оказался оправданным: ни у одного из пациентов с ответом на терапию не зафиксировано тромбгеморрагических осложнений, включая лиц с отягощенным тромбоэмболическим анамнезом уже к моменту диагностики (инфаркт миокарда, нарушения мозгового кровообращения, тромбоэмболия ветвей легочной артерии, периферические артериальные, периферические и висцеральные венозные тромбозы и др.), а динамика достижения гематологического и молекулярного ответа, а также профиль безопасности терапии в целом соответствовали мировому опыту применения при развернутых стадиях МПН. Кроме того, нами было показано преимущество ПЭГ-ИФН по скорости достижения гематологического ответа в сравнении с получавшими терапию обычными рекомбинантными ИФН α -2a и α -2b [3, 48, 49].

Появление в 2013 г. на фармацевтическом рынке нового оригинального препарата ПЭГ-ИФН — цепэг-интерферона α -2b (цепПЭГ-ИФН α -2b) российского производства и первый опыт его применения у ограниченного числа пациентов клиники (в 2014 г.), показавший сравнимую переносимость и эффективность при переходе с других форм ПЭГ-ИФН, стало стимулом к продолжению исследований [3, 50].

Цели исследования: 1) изучение эффективности и безопасности цепПЭГ-ИФН α -2b в ранней (не рискадаптивной) терапии классических Ph-негативных МПН; 2) оценка эффективности и безопасности цепПЭГ-ИФН α -2b при переходе с других видов интерферонотерапии.

Материалы и методы

Характеристика пациентов и групп исследования

Исследование выполнено на базе гематологического отделения клиники факультетской терапии им. С.П. Боткина ВМА им. С.М. Кирова в рамках одобренной локальным этическим комитетом инициативной научно-исследовательской работы с ноября 2015 г. по октябрь 2017 г. Подписываемое пациентами информированное добровольное согласие содержало полную информацию о целях и прогнозируемых осложнениях проводимой терапии.

Были включены 27 пациентов обоих полов с критерияльно обоснованным (ВОЗ, 2016) диагнозом ИП или ЭТ, вне зависимости от наличия мутации V617F в гене JAK2, а также факта и вида проводимой ранее симптоматической или патогенетической терапии (табл. 1).

При статистической обработке были учтены данные 25 пациентов, так как 2 из них прекратили терапию в течение 1 мес по причине негематологической токсичности (см. результаты).

Для достижения 2-й цели работы при обработке результатов пациенты были подразделены на группы в зависимости от наличия и сроков предшествующей интерферонотерапии (табл. 2).

Проводимое лечение

ЦепПЭГ-ИФН α -2b во всех группах назначали в унифицированной начальной дозе 200 мкг 1 раз в неделю подкожно. При переходе с другого ПЭГ-ИФН (2-я и 3-я группы) отмывание не проводили, цепПЭГ-ИФН α -2b вводили через 1 нед после последней инъекции отмененного препарата.

В дальнейшем титрование дозировки проводили индивидуально, по результатам оценки показателей гемограмм (1-й месяц терапии — еженедельно, далее — ежемесячно). Показанием к снижению еженедельной дозы препарата считалась гематологическая токсичность II степени по шкале NCI CTC (лейкоциты $<3 \times 10^9/\text{л}$, тромбоциты $<75 \times 10^9/\text{л}$, гемоглобин $<100 \text{ г/л}$). В этом случае дозу препарата снижали до $\approx 100 \text{ мкг}$ (1/2 шприца 200 мкг) 1 раз в неделю, а при повторном развитии токсичности — до $\approx 66,7 \text{ мкг}$ (1/3 шприца 200 мкг). Временная отмена терапии не предусматривалась.

Продолжалась назначенная ранее по имеющимся показаниям антиагрегантная (ацетилсалициловая кислота или клопидогрел) и антикоагулянтная (варфарин или ривароксабан) терапия. Всем пациентам без предшествующей антитромботической терапии был назначен препарат ацетилсалициловой кислоты в дозе 100 мг/сут.

Коррекция другой плановой терапии по поводу конкурирующей и сопутствующей патологии не проводилась.

Оценка эффективности проводимой терапии

Ответ на проводимую терапию оценивали по результатам оценки в динамике показателей гемограмм (еженедельно в течение 1-го месяца, далее — через 2 мес после начала терапии, в дальнейшем — каждые 3 мес) и уровня аллельной нагрузки мутации JAK2V617F (перед началом терапии, затем каждые 3 мес). В качестве критериев гематологического ответа была установлена нормализация уровня лейкоцитов ($<10 \times 10^9/\text{л}$), тромбоцитов ($<400 \times 10^9/\text{л}$), а также уровня эритроцитов ($<5,5 \times 10^{12}/\text{л}$) при отсутствии гемоэксфузионной терапии. В качестве критерия молекулярного ответа расценивалась устойчивая тенденция к снижению уровня аллельной нагрузки JAK2V617F.

Таблица 1. Общая характеристика пациентов

Table 1. Patient characteristics

Пол (число) Gender (number)	Возраст Age	Медиана Median	Среднее Mean
Мужчины (n = 16) Male	27–78	59	56,2
Женщины (n = 11) Female	27–80	60	57,2
Характеристики по нозологическим формам <i>Characteristics by nosology</i>			
Нозологические формы Nosology	Истинная полицитемия Polycythemia vera (n = 12)	Эссенциальная тромбоцитемия Essential thrombocythemia (n = 15)	
Тромбогеморрагические осложнения в анамнезе History of thrombohemorrhagic complications	3	2	
Предшествующая терапия: Prior therapy:	11	7	
антиагреганты antiplatelet agents	9	13	
антикоагулянты anticoagulants	2	1	
гемоэксфузии/аферез hemofusion/apheresis	6	1	
гидроксимочевина hydroxyurea	3	3	
анагредид anagrelide	—	1	
пегилированный интерферон pegylated interferon	9	7	
Получали исследуемую терапию менее 3 мес Received experimental therapy less than 3 months	1	1	

Таблица 2. Характеристика групп

Table 2. Characteristics of groups

Терапия Therapy	1-я группа (n = 9) 1 st group	2-я группа (n = 8) 2 nd group	3-я группа (n = 8) 3 rd group
Время начала терапии цеПЭГ-ИФН α-2b The time of start therapy with cePEG-IFN alpha-2b	Инициально Initially	С 6-го по 11-й месяц From 6 th to 11 th months	С 12-го месяца и далее From 12 th month and after
Предшествующая терапия ПЭГ-ИФН Prior therapy with PEG-IFN	Не проводилась No	0–11 мес 0–11 months	От 12-го месяца More 12 months

Характеристика групп пациентов по оцениваемым параметрам на момент начала исследования представлена в табл. 3.

Оценка безопасности проводимой терапии

Регистрировали и оценивали все симптомы и нежелательные явления. Критерием непереносимости терапии было установлено развитие любой токсичности III–IV-й степени по шкале NCI CTC.

Фармакоэкономический анализ

Экономическую целесообразность оценивали по методике модельного фармакоэкономического анализа в сравнении с зарегистрированными в Российской Федерации импортными препаратами ПЭГ-ИФН. Были оценены стоимость терапии в неделю в максимальной начальной эквивалентной (200 мкг для ПЭГ-ИФН α-2b и 180 мкг для ПЭГ-ИФН α-2a) дозе и стоимость терапии в год исходя из расчетной средней дозы

Таблица 3. Характеристика групп на момент включения

Table 3. Characteristic of groups at the time of enrollment

Показатель Parameter	Все пациенты (n = 25) All patients	1-я группа (n = 9) 1 st group	2-я группа (n = 8) 2 nd group	3-я группа (n = 8) 3 rd group	p*
Эритроциты, ×10 ¹² /л Erythrocytes					
Медиана Median	5,34	5,27	4,905	5,38	0,523
Н. квартиль L. quartile	4,67	4,22	4,63	5,20	
В. квартиль U. quartile	5,5	5,99	5,47	5,49	
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л Leukocytes					
Медиана Median	7,70	9,00	5,50	8,35	0,1875*
Н. квартиль L. quartile	5,30	5,30	2,60	7,40	
В. квартиль U. quartile	10,60	11,03	7,50	10,60	
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л Platelets					
Медиана Median	545,00	673,00	499,00	500,00	0,2813*
Н. квартиль L. quartile	343,00	343,00	144,00	428,00	
В. квартиль U. quartile	677,00	747,00	607,00	615,00	
Аллельная нагрузка JAK2, % JAK2 allele burden					
Медиана Median	42,00	42,00	30,15	43,93	0,5499*
Н. квартиль L. quartile	12,88	0,00	10,12	37,30	
В. квартиль U. quartile	59,97	64,20	45,17	54,20	

*Значение p — сравнение показателей в 3 группах терапии, критерий Краскелла—Уоллиса.

*p value — comparison between three treatment groups, Kruskal—Wallis test.

препарата за первые 12 мес терапии (для оценки потребности в препаратах сравнения были использованы собственные ретроспективные данные). Стоимость препарата оценивали исходя из данных Государственного реестра предельных отпускных цен [63].

Результаты

Оценка гематологического ответа и гематологическая токсичность

Динамика уровня эритроцитов. Согласно результатам наблюдения, у всех пациентов с ИП была достигнута стойкая нормализация уровней гемоглобина, эритроцитов и гематокрита в периферической крови.

При этом за весь период терапии у больных и с ИП и с ЭТ не было зарегистрировано анемии даже I степени. Во всех группах (менее выражено от 1-й к 3-й) при наличии эритроцитоза наблюдалось постепенное снижение уровня эритроцитов и гемоглобина с последующей стабилизацией в нормальном диапазоне значений (рис. 1).

При сравнении медиан исходного уровня эритроцитов со значениями через 6, 12 и 24 мес терапии в общей популяции и по группам значимые различия получены в общей популяции, а также в 1-й и 3-й группах, что свидетельствовало не только о достоверном снижении уровня эритроцитов во всех контрольных

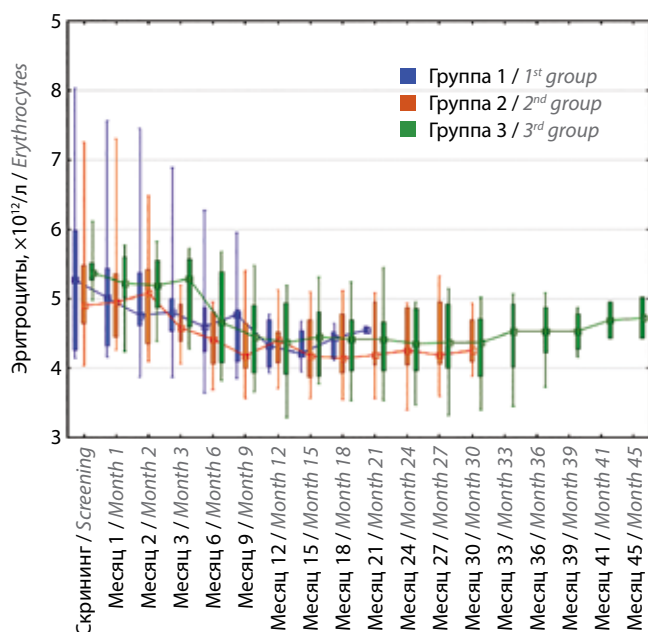


Рис. 1. Динамика уровня эритроцитов по группам
Fig. 1. Erythrocytes dynamics by groups

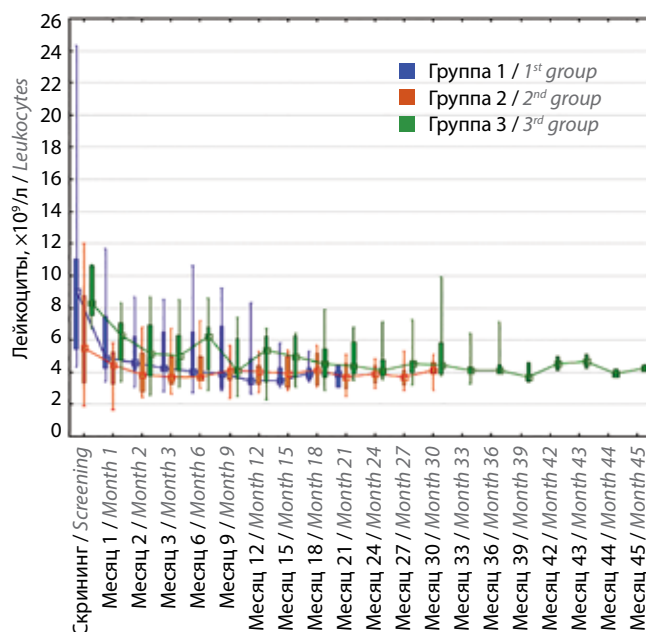


Рис. 2. Динамика уровня лейкоцитов по группам
Fig. 2. Leukocytes dynamics by groups

Таблица 4. Динамика эритроцитов: значение p в контрольных точках*
Table 4. Erythrocytes dynamics: p value at control points*

Выборка Sample	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months
Все пациенты All patients	0,0004	0,0002	0,0013
Группа 1 1 st group	0,0234	0,0312	—
Группа 2 2 nd group	0,1094	0,1094	0,1094
Группа 3 3 rd group	0,0234	0,0078	0,0078

*Значение p — непараметрический парный тест Вилкоксона.
* p value — nonparametric paired Wilcoxon test.

Таблица 5. Динамика лейкоцитов: значение p в контрольных точках*
Table 5. Leukocytes dynamics: p value at control points*

Выборка Sample	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months
Все пациенты All patients	0,0002	0	0,0008
1-я группа 1 st group	0,0156	0,0156	—
2-я группа 2 2 nd group	0,08	0,1094	0,1094
3-я группа 3 3 rd group	0,0078	0,0078	0,0078

*Значение p — непараметрический парный тест Вилкоксона.
* p value — nonparametric paired Wilcoxon test.

точках, но и об отсутствии влияния на динамику показателя фактора переключения на терапию цеПЭГ-ИФН α -2b в процессе лечения (табл. 4).

Динамика уровня лейкоцитов во всех группах в целом оказалась сопоставимой (рис. 2).

Как и в отношении эритроцитов, статистически значимыми оказались различия в общей популяции, в 1-й и 2-й группах (табл. 5).

Помимо быстрого купирования лейкоцитоза (при наличии), снижение уровня лейкоцитов — наиболее частое проявление гематологической токсичности ПЭГ-ИФН. Снижение начальной дозы препаратов вследствие развития лейкопении потребовалось 12 пациентам (44 % из всей выборки), 6 из них — по поводу применения других ПЭГ-ИФН до назначения цеПЭГ-ИФН α -2b, 6 — уже в период исследуемой терапии (4 пациента 1-й группы, 2 пациента 2-й группы).

Следует отметить, что снижение дозы цеПЭГ-ИФН α -2b вследствие нейтропении требовалось в среднем (медиана) только через 9 (2–18) мес, тогда как дозопонирующая токсичность других ПЭГ-ИФН регистрировалась уже через 2 (2–12) мес терапии. Косвенным подтверждением меньшей токсичности цеПЭГ-ИФН α -2b в отношении гранулопоза может быть то, что доля пациентов без лейкоцитоза ($<10 \times 10^9/\text{л}$ в 1-й группе к 6-му и 12-му месяцам терапии увеличилась только с 66,67 до 77,78 %, тогда как во 2-й группе (исходно 75,0 %) и 3-й (исходно 62,5 %) достигла 100 %.

Динамика уровня тромбоцитов ожидаемо оказалась самым показательным эффектом проводимой терапии во всех группах пациентов, что в первую очередь было связано с преобладанием больных ЭТ (рис. 3).

При этом ни у одного из 3 (10,5 %) пациентов (1 — цеПЭГ-ИФН α -2b, 2 — другие ПЭГ-ИФН) с тром-

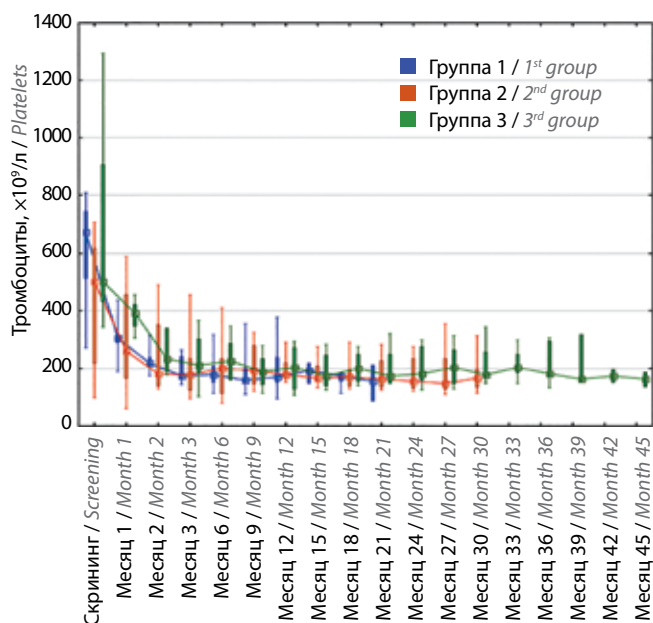


Рис. 3. Динамика уровня тромбоцитов по группам

Fig. 3. Platelets dynamics by groups

Таблица 6. Динамика тромбоцитов: значение p в контрольных точках*Table 6. Platelets dynamics: p value at control points*

Выборка Sample	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months
Все пациенты All patients	0	0	0,0002
1-я группа 1 st group	0,0078	0,0156	—
2-я группа 2 nd group	0,0078	0,0391	0,0391
3-я группа 3 rd group	0,0078	0,0078	0,0078

Значение p — непараметрический парный тест Вилкоксона. p value — nonparametric paired Wilcoxon test.

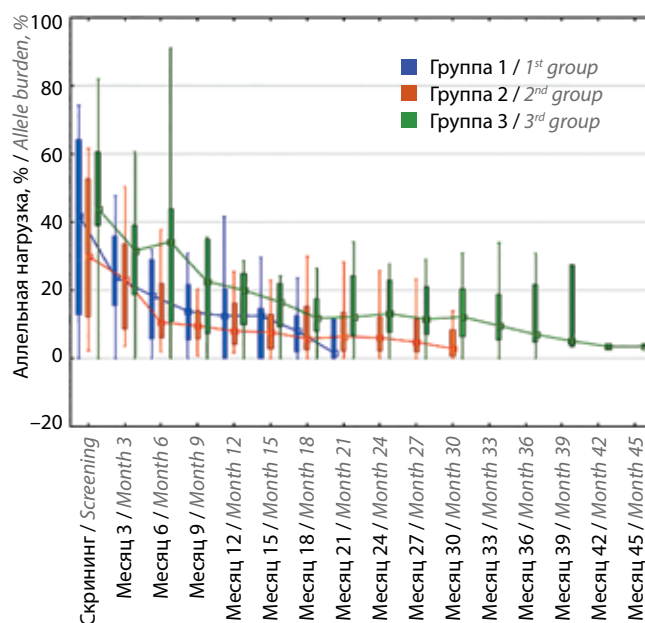
боцитопенией I степени снижение дозы не было обусловлено одновременно зарегистрированной лейкопенией II степени. Статистически значимые различия наблюдались в общей популяции и при анализе во всех группах. Значения p представлены в табл. 6.

Оценка молекулярного ответа

Уровень аллельной нагрузки *JAK2* во всех группах на фоне проводимой терапии демонстрировал устойчивое снижение (рис. 4).

Однако достоверное снижение медиан исходного уровня аллельной нагрузки со значениями через 6, 12 и 24 мес терапии было показано только для 2-й и 3-й групп, а также для всей популяции (табл. 7).

Отсутствие достоверного снижения уровня *JAK2V617F* в 1-й группе, вероятно, было обусловлено наименьшим

Рис. 4. Динамика уровня аллельной нагрузки *JAK2* по группамFig. 4. *JAK2* allele burden dynamics by groupsТаблица 7. Динамика уровня *JAK2V617F*: значение p в контрольных точках*Table 7. *JAK2V617F* level dynamics: p value at control points*

Выборка Sample	6 мес 6 months	12 мес 12 months	24 мес 24 months
Все пациенты All patients	0,0003	0,0001	0,0007
1-я группа 1 st group	0,0591	0,0591	—
2-я группа 2 nd group	0,0078	0,0078	0,0078
3-я группа 3 rd group	0,0759	0,0225	0,0225

Значение p — непараметрический парный тест Вилкоксона. p value — nonparametric paired Wilcoxon test.

сроком наблюдения, а также наличием в ней сразу 2 пациентов, отрицательных по данной мутации. При этом в других группах смена терапии достоверно не повлияла на динамику снижения аллельной нагрузки.

Негематологическая токсичность

В целом проявления негематологической токсичности были сопоставимы с описанными в наших предыдущих работах [3, 48–50].

Частота прогнозируемого гриппоподобного синдрома (порядка 80 %) в течение 1 мес после инициации терапии всеми ПЭГ-ИФН достоверно не различалась. Двое пациентов из 1-й группы отказались от дальнейшего участия уже после 2-й инъекции препарата именно по причине плохой переносимости этого нежелательного явления. При этом необходимо отметить,

что при переходе на цеПЭГ-ИФН α -2b (2-я и 3-я группы) оно развилось только у 2 (12,5 %) пациентов: у 1 (из 2-й группы) — только после 1-й инъекции, у 2-го (из 3-й группы) — после 1-й и 2-й инъекций и далее не возникало.

В отличие от других ПЭГ-ИФН при применении цеПЭГ-ИФН α -2b местно раздражающего действия не было отмечено ни в одном из случаев, а аллергическая реакция в виде преходящего ограниченного дерматита в области введения (живот) развилась только у 1 пациента 3-й группы (4 % среди всех получавших исследуемый препарат). Системных аллергических реакций не выявлено.

Обоснование экономической целесообразности

Немаловажным фактором выбора современной фармакотерапии является стоимость лечения. Длительное время наличие ограниченной возможности обеспечения гематологических больных препаратами рекомбинантных ИФН через медицинские учреждения или аптечную сеть вынуждало специалистов проводить своеобразный отбор пациентов по возрастным и социальным особенностям.

В 2018 г. стоимость еженедельной терапии в начальной эквивалентной дозе составляет: цеПЭГ-ИФН α -2b — 4400 руб., ПЭГ-ИФН α -2b — 4510 руб., ПЭГ-ИФН α -2a — 7508 руб. (включая НДС) [63]. При курсе терапии 1 раз в неделю в течение 48 нед при усредненной дозировке стоимость прямых медицинских затрат в первые 12 мес терапии в 2018 г. составляет: цеПЭГ-ИФН α -2b — 211 200 руб., ПЭГ-ИФН α -2b — 216 480 руб., ПЭГ-ИФН α -2a — 360 384 руб. Таким образом, при сравнимой эффективности и безопасности стоимость цеПЭГ-ИФН α -2b оказывается на 2 % ниже ПЭГ-ИФН α -2b и на 41 % ниже ПЭГ-ИФН α -2a.

Обсуждение

В конце 2013 г. — начале 2014 г., спустя всего несколько месяцев с момента регистрации и вывода на рынок новой формы ПЭГ-ИФН- α — цеПЭГ-ИФН α -2b, нам удалось апробировать его на нескольких пациентах с ИП и ЭТ в качестве альтернативы импортным лекарственным препаратам. Удовлетворительная переносимость и быстрая положительная динамика по тромбоцитам у этих пациентов послужили стимулом к его дальнейшему изучению.

В сравнении с ранее применявшимися нами препаратами ПЭГ-ИФН цеПЭГ-ИФН α -2b обладал рядом особенностей.

1. Уникальная структура молекулы. В состав молекулы цеПЭГ-ИФН α -2b входит ПЭГ с молекулярной массой 20 кДа, имеющий устойчивую пептидную связь с молекулой ИФН, что обуславливает более длительную циркуляцию в крови цеПЭГ-ИФН α -2b по сравнению с ПЭГ-ИФН α -2b, имеющим в составе молекулы ПЭГ с массой 12 кДа и нестабильную пептидную связь

ПЭГ с молекулой ИФН- α . Исследования фармакокинетики показали, что достижение пика концентрации цеПЭГ-ИФН α -2b в плазме ($C_{\max}$) сдвигается во времени и эффективная концентрация ИФН поддерживается в крови дольше по сравнению с ПЭГ-ИФН α -2b. Период полувыведения цеПЭГ-ИФН α -2b составляет $57,8 \pm 8,4$ ч, что больше, чем период полувыведения ПЭГ-ИФН α -2b — 30,7 (27–33) ч. Кроме того, наличие устойчивой пептидной связи между молекулой ПЭГ и ИФН определяет стабильность цеПЭГ-ИФН α -2b в водных растворах и отсутствие необходимости разведения перед инъекцией, в то время как ПЭГ-ИФН α -2b выпускается в виде лиофилизата для приготовления раствора непосредственно перед введением. Благодаря этому в нашем исследовании даже у пациентов преклонного возраста не возникало проблем с приверженностью терапии. Первое введение препарата выполнял медицинский персонал. Вторая инъекция проводилась самим пациентом в присутствии инструктирующего врача, а 3-я и последующие — самостоятельно.

2. Наличие 1 позиционного изомера. цеПЭГ-ИФН α -2b содержит 1 позиционный изомер, тогда как ПЭГ-ИФН α -2b представляет собой смесь из 13 изомеров, ПЭГ-ИФН α -2a — смесь из 6 изомеров. При этом известно, что каждый из изомеров в составе препарата имеет различную удельную противовирусную активность (важно, что все регистрационные клинические исследования ПЭГ-ИФН проводили только у испытуемых с вирусными гепатитами), и потенциально и различную противоопухолевую активность, а также переносимость и иммуногенность. Иначе говоря, цеПЭГ-ИФН α -2b благодаря отсутствию гетерогенности биологических свойств множества изомеров, вероятно, обладает более прогнозируемыми фармакологическими свойствами.

3. Чистота лекарственной субстанции цеПЭГ-ИФН α -2 составляет 95–97 %. В процессе синтеза молекулы цеПЭГ-ИФН α -2b пегилирование ИФН- α происходит по аминокислоте N-концевого метионина, и в препарате отсутствуют молекулы белка, содержащие T-концевой метионин, что соответствует международным требованиям.

4. Потенциально более низкая стоимость терапии препаратом отечественного производства.

Результаты проведенного исследования полностью оправдали наши ожидания в плане эффективности и переносимости цеПЭГ-ИФН α -2b у пациентов с МПН, как минимум сопоставимые с другими препаратами ПЭГ-ИФН [3, 48–50, 56–62]. При этом была подтверждена возможность не только достижения гематологического и молекулярного ответа на терапию при инициальном назначении, но и сохранения положительных тенденций при смене терапии другими ПЭГ-ИФН на цеПЭГ-ИФН α -2b.

Конечно, терапия ИФН не лишена недостатков и, по мнению многих специалистов, нередко приводит к прекращению лечения из-за плохой переносимости

[58, 64–66], хотя разнообразие и тяжесть неблагоприятных явлений при этом сопоставимы с таковыми и при других подходах к лечению [67–71], характеристики которых достаточно подробно рассмотрены в наших предыдущих работах [3, 48, 49].

Несмотря на более чем 30-летнюю историю применения препаратов ИФН- α , до сих пор не сформировано единое понимание всех молекулярно-генетических механизмов, вовлеченных в реализацию эффектов различных видов ИФН на клетку. И именно это остается основным аргументом для рассмотрения данной группы препаратов лишь как одного из направлений классической циторедуктивной терапии [42]. При этом отмечается, что даже такой результат, как молекулярный ответ на терапию в виде снижения аллельной нагрузки JAK2V617F, может быть временно достигнут и при применении руксолитиниба, и при применении классической циторедукции, например бусульфана. Все это обуславливает необходимость дальнейшего изучения как патогенетических особенностей МПН, так и различных видов болезнь-специфичной терапии [42].

Известно значение эффекторного пути JAK-STAT в передаче сигнала от поверхностных интерфероновых рецепторов к генам [72], однако данных, объясняющих различия в реализации сигнала от ИФН I и III типа, а также активацию различных генов при передаче сигнала от рецепторов ИФН- α и ИФН- γ , пока нет. Предполагаются наличие различных дополнительных путей проведения сигнала и их взаимодействие, однако на данный момент эти механизмы не изучены. Также требует дальнейшего изучения роль генов огромного семейства IFS (interferon-stimulated genes) [73].

В связи с отсутствием на данный момент единой теоретической модели молекулярно-генетического воздействия ИФН на клетку особый интерес представляют практические исследования, освещающие некоторые эффекты ИФН- α на отдельные клеточные популяции. Так, недавно была уточнена роль ИФН- α в регуляции мегакариопоэза и тромбоцитопоэза [74]. *In vitro*, а также *in vivo* (на модели с использованием химерных мышей) было показано, что ИФН α -2b, не уменьшая количество мегакариоцитов *in vitro*, значительно снижает количество тромбоцитов. Это объясняется подавлением поздних этапов дифференцировки мегакариоцитов, а не увеличением потребления или депонирования тромбоцитов. В одном из исследований разъяснены молекулярные механизмы, объясняющие замедление созревания мегакариоцитов: ИФН α -2b подавляет экспрессию гена *GATA-1*, а также угнетает образование белков p45NF-E2 и MafG [74]. Считается, что ген *GATA-1* принимает непосредственное участие в дифференцировке мегакариоцитов [74, 75], а белки p45NF-E2 и MafG связаны с формированием гранул и процессом отшнуровывания тромбоцитов [76, 77]. Описанные механизмы согласуются с результатами наблюдений за динамикой уровня

тромбоцитов при применении ИФН- α у пациентов с МПН [48–50, 56, 60, 62, 78–80].

A. Duke и соавт. в исследовании на нокаутных мышцах определили роль гена *Stat1* в регуляции эритропоэза. Было показано, что утрата гена *Stat1* приводит к потенцированию активированного мутацией JAK2V617F эритропоэза, а также вызывает перераспределение эритропоэза из костного мозга в селезенку [81]. N. Au-Yeung и соавт. показали, что рецепторы к ИФН- α активируют тирозинкиназы JAK1 и TYK2, которые, в свою очередь, фосфорилируют транскрипционные факторы *Stat1* и *Stat2* [82]. Был выявлен и другой механизм угнетения эритропоэза ИФН- α : подавление размножения миелоидных и эритроидных предшественников в костном мозге при фосфорилировании адаптивного белка Crk [83]. Эти исследования частично объясняют влияние ИФН на эритропоэз, когда его подавление является одной из целей терапии (например, при ИП) [48–50, 56, 60, 78, 79, 84].

Регуляторный фактор ИФН 8 (IRF8) и кодируемый им белок Icsbp играют ключевую роль в регуляции гранулопоэза. Уровень экспрессии Icsbp в гемопоэтических стволовых клетках коррелирует с активностью грануло- и монопоэза [85]. Гены-мишени Icsbp кодируют белки, вовлеченные в эффекторные функции гранулоцитов и моноцитов, такие как Toll-рецепторы, белки лизосом гранулоцитов и белки главного комплекса гистосовместимости 1-го класса [85–89]. При исследовании на нокаутных мышцах было показано, что потеря гена IRF8 приводит к экспансии клеток-предшественников грануломонопоэза, нарушает дифференцировку и способность к активации гранулоцитов и моноцитов, а также способность моноцитов к дифференцировке в антигенпрезентирующие клетки [88, 90–92]. В другой модели была показана способность Icsbp прерывать гранулоцитопоэз при реализации реакций врожденного иммунитета [93].

Приведенные новые данные лишь частично приближают нас к пониманию механизмов антимиело-пролиферативной активности препаратов ИФН- α и их способности индуцировать гематологическую ремиссию. Большинство работ, появившиеся после внедрения в терапию ПЭГ-ИФН, продемонстрировали их значительно большую активность в достижении клинико-лабораторного и молекулярного ответа. При этом следует отметить, что в эпоху терапии быстрорастворимыми рекомбинантными ИФН, т. е. фактически до открытия роли мутации в гене *JAK2* и внедрения методик ее качественного (после 2006–2008 гг.) и количественного (после 2012 г.) определения, самого понятия молекулярного ответа не существовало. При введении ПЭГ-ИФН равномерное высвобождение ИФН из комплекса с сополимером позволяет в течение нескольких (4–10) дней поддерживать терапевтическую концентрацию в периферической крови, что обуславливает увеличение эффективности терапии и снижение числа и выраженности неблагоприятных явлений.

В последние годы одним из общепринятых прогностических показателей, а также стандартов контроля эффективности терапии ИФН стал считаться уровень аллельной нагрузки JAKV617F. Так, при ИП уровень аллельной нагрузки JAKV617F, превышающий 50 % [94] или 75 % [95] коррелирует с 3,56-кратным повышением риска гемодинамически значимых тромбозов или тромбоэмболических кардиоваскулярных событий, а прогрессия по уровню JAKV617F демонстрирует взаимосвязь не только с выраженностью гематологических отклонений и спленомегалии, но и со степенью МФ [94, 96]. При ЭТ превышение только 25 % порога аллельной нагрузки уже сопряжено с нарастанием клинических признаков нарушений микроциркуляции и с 3-кратным увеличением риска артериальных тромбозов [97]. При этом в большинстве работ были подтверждены активность ПЭГ-ИФН в отношении контроля уровня аллельной нагрузки JAK2, а также наличие потенциальной возможности достижения молекулярного ответа, по сути достижения минимальной остаточной болезни у пациентов с МПН [48–50, 61, 62, 64–66, 78, 98].

Длительная терапия ИФН-α сопряжена не только с возможностью достижения гематологической и даже молекулярной ремиссии заболевания, но и вследствие незначительной в сравнении с другими циторедуктивными агентами миелотоксичности — со способностью снижения выраженности морфологических изменений в костном мозге и восстановлению относительно нормального гемопоэза, иногда сохраняющегося даже спустя несколько лет после прекращения лечения [62]. Положительная клиничко-лабораторная динамика ассоциирована с уменьшением степени МФ, снижением количества и морфологических изменений мегакариоцитов, регрессом спленомегалии [62, 99–102]. ИФН-α изменяет течение заболевания, обладая способностью подавления цитокиновых реакций, лежащих в основе механизмов прогрессирования [103]. Некоторые работы демонстрируют отсутствие появления новых мутаций на фоне терапии ИФН-α, т. е. остановку или, по крайней мере, задержку клональной эволюции МПН [62]. Данные эффекты реализуются за счет способности ИФН-α активировать естественные механизмы репарации ДНК и хромосом. Так, уже упоминавшийся регуляторный белок IRF8 активирует белки, участвующие в репарации ДНК — Fanconi C и F [104]. В другом исследовании было показано, что острый миелоидный лейкоз у нокаутных по гену *Icsbp* мышей развивался значительно чаще, чем у мышей с диким геномом [93]. Продemonстрирована также способность ИФН-α к активации белков, принимающих участие в процессе репарации ДНК, таких как ХРА, ХРВ, ХРС, ХРЕ, ХРД, ХРФ и ХРГ [105]. Эти процессы эволюционно обоснованы с позиций обеспечения защиты собственного генома от повреждений при наличии чужеродного генетического материала внутри клетки, инфицированной вирусом. Так, показано, что вирусное повре-

ждение ДНК способно запускать иммунный ответ, опосредованный интерферонами I типа [84].

Объяснение механизмов задержки клональной эволюции заболевания и участия в регуляции процессов репарации генетического материала может стать наиболее важным доказательством преимуществ интерферонотерапии перед терапией гидроксимочевой и другими синтетическими циторедуктивными агентами. Ведь до сих пор мы можем оперировать только результатами популяционных наблюдений, например доказательствами превосходства терапии ИФН над терапией гидроксимочевой в 5-летней беспрогрессивной выживаемости [106]. Однако благодаря уникальным свойствам современных препаратов ПЭГ-ИФН количество получающих их пациентов с МПН во всем мире неуклонно растет, даже несмотря на отсутствие зарегистрированных показаний к применению. Накопление новых данных, прежде всего в плане увеличения длительности наблюдений, несомненно, будет способствовать появлению новых выводов об эффективности и безопасности этого направления терапии.

Как бы то ни было, на современном этапе препараты на основе ИФН-α остаются единственной фармакологической группой, способной изменить естественное течение заболевания и способствовать восстановлению нормального поликлонального кроветворения у пациентов с МПН. Это справедливо не только для ИП и ЭТ, клиничко-лабораторная картина которых на начальных этапах заболевания складывается преимущественно из неконтролируемой пролиферации различных звеньев миелопоэза, но и с учетом потенциальной возможности уменьшения степени костномозгового фиброза и частичного восстановления кроветворения в отношении даже фибротической стадии первичного МФ.

Приведенные факты мы считаем достаточным основанием для смены устоявшейся парадигмы длительного наблюдения за пациентами с МПН в ожидании возникновения общепринятых показаний к началу терапии в пользу возможно более ранней инициации специфического лечения для всех групп пациентов. Важной особенностью дизайна инициированного нами исследования было назначение терапии всем пациентам с подтвержденным диагнозом, вне зависимости от выраженности гематологических изменений, наличия симптомов и риска. Возможно, именно поэтому и при оценке результатов этого исследования, и при обобщении результатов нашего предыдущего опыта (всего обобщено более 50 случаев терапии ПЭГ-ИФН и более 40 — высокими дозами рекомбинантного ИФН при медиане возраста 62,5 года с соответствующим коморбидным фоном) у пациентов, достигших устойчивого гематологического и/или молекулярного ответа в период терапии ИФН, даже в условиях отмены обычно назначаемой неспецифической антитромботической профилактики не было зафиксировано повышенного риска тромбогеморрагических осложнений.

Заключение

Исходя из современного уровня знаний о патогенезе и течении классических Ph-негативных МПН, только раннее, не ориентированное на выраженность клинико-лабораторных изменений и стратификацию риска назначение эффективной патогенетической терапии может способствовать улучшению результатов лечения большинства пациентов с МПН, будучи при этом самостоятельной превентивной мерой профилактики прогрессирования и развития осложнений.

Сегодня лекарственные средства на основе ИФН-α остаются единственной потенциально доступной пациентам группой препаратов, которые могут изменить естественное течение заболевания и способствовать восстановлению нормального поликлонального кроветворения на всех этапах МПН. Как опубликованные другими авторами работы, так и наш собственный опыт

применения различных препаратов ИФН-α определяют необходимость внедрения в клиническую практику новых форм препаратов и разработки новых режимов их применения, прежде всего с позиций улучшения профиля безопасности терапии и удобства применения. Внедрение в практику нового отечественного препарата цеПЭГ-ИФН α-2b, обладающего рядом потенциальных преимуществ перед другими ПЭГ-ИФН, таких как превосходство по фармакокинетическим показателям, наличие 1 позиционного изомера, чистота лекарственной субстанции, более низкая стоимость, показавшего в нашем локальном исследовании как минимум сопоставимые с другими ПЭГ-ИФН эффективность и переносимость и при инициализации терапии, и при переходе с других видов интерферонотерапии, может стать новой вехой в совершенствовании помощи пациентам с МПЗ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6(4):372–5.
2. Goldman J.M. Chronic myeloid leukemia: reversing the chronic phase. *J Clin Oncol* 2010;28(3):363–5. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.5587. PMID: 20008612.
3. Поляков А.С., Тыренко В.В., Носков Я.А. Клинико-лабораторные особенности различных видов интерферонотерапии классических Ph-негативных миелопролиферативных неоплазий. *Гены и клетки* 2016;11(3):153–61. [Polyakov A.S., Tyrenko V.V., Noskov Y.A. Clinical and laboratory features of different types of interferon therapy classic Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Geny i kletki* = Genes and cells 2016;11(3): 153–61 (In Russ.)].
4. Larsen T.S., Pallisgaard N., Møller M.B., Hasselbalch H.C. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis – impact on disease phenotype. *Eur J Haematol* 2007;79(6):508–15. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00960.x. PMID: 17961178.
5. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365(9464):1054–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9. PMID: 15781101.
6. Campbell P.J., Green A.R. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2006;355(23):2452–66. DOI: 10.1056/NEJMr063728. PMID: 17151367.
7. Cazzola M., Kralovics R. From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(24):3714–9. DOI: 10.1182/blood-2014-03-530865. PMID: 24786775.
8. James C., Ugo V., Le Couédic J.P. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144–8. DOI: 10.1038/nature03546. PMID: 15793561.
9. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347. PMID: 24325356.
10. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779–90. DOI: 10.1056/NEJMoa051113. PMID: 15858187.
11. Levine R.L., Pardanan A., Tefferi A., Gilliland D.G. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer* 2007;7(9):673–83. DOI: 10.1038/nrc2210. PMID: 17721432.
12. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387–97. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.023. PMID: 15837627.
13. Lundberg P., Karow A., Nienhold R. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(14):2220–8. DOI: 10.1182/blood-2013-11-537167. PMID: 24478400.
14. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542. PMID: 24325359.
15. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
16. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70. PMID: 10647931.
17. Frederiksen H., Farkas D.K., Christiansen C.F. et al. Chronic myeloproliferative neoplasms and subsequent cancer risk: a Danish population-based cohort study. *Blood* 2011;118(25):6515–20. DOI: 10.1182/blood-2011-04-348755. PMID: 22039256.
18. Singdong R., Siriboonpipittana T., Chareonsirisuthigul T. et al. Characterization and Prognosis Significance of JAK2 (V617F), MPL, and CALR Mutations in Philadelphia-Negative Myeloproliferative Neoplasms. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(10):4647–53. DOI: 10.22034/APJCP.2016.17.10.4647. PMID: 27892678.
19. Passamonti F., Rumi E., Pietra D. et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*

- 2010;24(9):1574–9. DOI: 10.1038/leu.2010.148. PMID: 20631743.
20. Björn M.E., Hasselbalch H.C. The role of reactive oxygen species in myelofibrosis and related neoplasms. *Mediators Inflamm* 2015;2015:648090. DOI: 10.1155/2015/648090. PMID: 26538833.
21. Hasselbalch H.C., Björn M.E. MPNs as inflammatory diseases: the evidence, consequences, and perspectives. *Mediators Inflamm* 2015;2015:102476. DOI: 10.1155/2015/102476. PMID: 26604428.
22. Hasselbalch H.C., Thomassen M., Riley C.H. et al. Whole blood transcriptional profiling reveals deregulation of oxidative and antioxidative defence genes in myelofibrosis and related neoplasms. Potential implications of downregulation of Nrf2 for genomic instability and disease progression. *PLoS One* 2014;9(11):e112786. DOI: 10.1371/journal.pone.0112786. PMID: 25397683.
23. Hasselbalch H.C. A role of NF-E2 in chronic inflammation and clonal evolution in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Leuk Res* 2014;38(2):263–6. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.07.002. PMID: 23932394.
25. Hasselbalch H.C. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development. *Leuk Res* 2013;37(2):214–20. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.10.020. PMID: 23174192.
26. Hasselbalch H.C. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer. *Blood* 2012;119(14):3219–25. DOI: 10.1182/blood-2011-11-394775. PMID: 22318201.
27. Hasselbalch H.C. The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(2):133–45. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.01.004. PMID: 23415024.
28. Hermouet S., Vilaine M. The JAK2 46/1 haplotype: a marker of inappropriate myelomonocytic response to cytokine stimulation, leading to increased risk of inflammation, myeloid neoplasm, and impaired defense against infection? *Haematologica* 2011;96(11):1575–9. DOI: 10.3324/haematol.2011.055392. PMID: 22058280.
29. Kristinsson S.Y., Landgren O., Samuelsson J. et al. Autoimmunity and the risk of myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2010;95(7):1216–20. DOI: 10.3324/haematol.2009.020412. PMID: 20053870.
30. Marty C., Lacout C., Droin N. et al. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 2013;27(11):2187–95. DOI: 10.1038/leu.2013.102. PMID: 23558526.
31. Skov V., Larsen T.S., Thomassen M. et al. Molecular profiling of peripheral blood cells from patients with polycythemia vera and related neoplasms: identification of deregulated genes of significance for inflammation and immune surveillance. *Leuk Res* 2012;36(11):1387–92. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.07.009. PMID: 22877729.
32. Skov V., Larsen T.S., Thomassen M. et al. Whole-blood transcriptional profiling of interferon-inducible genes identifies highly upregulated IFI27 in primary myelofibrosis. *Eur J Haematol* 2011;87(1):54–60. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2011.01618.x. PMID: 21447007.
33. Skov V., Thomassen M., Riley C.H. et al. Gene expression profiling with principal component analysis depicts the biological continuum from essential thrombocythemia over polycythemia vera to myelofibrosis. *Exp Hematol* 2012;40(9):771–80. DOI: 10.1016/j.exphem.2012.05.011. PMID: 22659388.
34. Feenstra J.M., Rumi E., Pietra D. et al. Whole exome sequencing reveals clonal evolution of myeloproliferative neoplasms to acute myeloid leukemia. *ASH abstr. Blood* 2015;126(23):1626.
35. Barosi G., Rosti V., Bonetti E. et al. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. *PLoS One* 2012;7(4):e35631. DOI: 10.1371/journal.pone.0035631. PMID: 22536419.
36. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol* 2014;27(2):129–40. DOI: 10.1016/j.beha.2014.07.004. PMID: 25189724.
37. Hasselbalch H.C. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: the advanced phase of an untreated disseminated hematological cancer. *Leuk Res* 2009;33(1):11–8. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.06.002. PMID: 18632152.
38. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia* 2008;22(1):3–13. DOI: 10.1038/sj.leu.2404946. PMID: 17882283.
39. Berlin N.I. Prologue: polycythemia vera. The closing of the Wasserman-Polycythemia Vera Study Group era. *Semin Hematol* 1997;34(1):1–5. PMID: 9025156.
40. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелолипролиферативные новообразования. М.: Литтерра, 2016. 190 с. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Myeloproliferative neoplasms. Moscow: Litterra, 2016, 190 p. (In Russ.)].
41. Barosi G., Tefferi A., Besses G. et al. Clinical end points for drug treatment trials in BCR-ABL1-negative classic myeloproliferative neoplasms: consensus statements from European LeukemiaNET (ELN) and International Working Group – Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT). *Leukemia* 2015;29(1):6–20. DOI: 10.1038/leu.2014.250. PMID: 25151955.
42. Carlson R.W. The NCCN 22nd Annual Conference: Discussing Treatment Disparities, the Doctor – Patient Relationship, the Latest NCCN Guidelines Updates, and More. *J Natl Compr Canc Netw* 2017;15(5S):653–4. PMID: 28515239.
43. Tefferi A., Vannucchi A., Barbui T. Polycythemia vera treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J* 2018;8(1):3. DOI: 10.1038/s41408-017-0042-7. PMID: 29321547.
44. Mascarenhas J., Mesa R., Prchal J., Hoffman R. Optimal therapy for polycythemia vera and essential thrombocythemia can only be determined by the completion of randomized clinical trials. *Haematologica* 2014;99(6):945–9. DOI: 10.3324/haematol.2014.106013. PMID: 24881037.
45. Wolfe L. Ruxolitinib in Myelofibrosis and Polycythemia Vera. *J Adv Pract Oncol* 2016;7(4):436–44. PMID: 29226001.
46. Mesa R.A., Vannucchi A.M., Mead A. et al. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol* 2017;4(5):225–36. DOI: 10.1016/S2352-3026(17)30027-3. PMID: 28336242.
47. Поляков А.С., Тыренко В.В., Носков Я.А. Нарушения гемостаза при миелолипролиферативных новообразованиях. Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов 2017;15(2):46–47. [Polyakov A.S., Tyrenko V.V., Noskov Y.A. Hemostasis disorders in myeloproliferative neoplasms. Tromby, krvotochivost i bolezni sudov = Thrombi, bleeding and vascular disorders 2017;15(2):46–7. (In Russ.)].
48. Barbui T., De Stefano V. Management of venous thromboembolism in myeloproliferative neoplasms. *Curr Opin Hematol* 2017;24(2):108–14. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000312. PMID: 27875375.

49. Тыренко В.В., Поляков А.С., Носков Я.А., Ковалев А.В. Совершенствование противоопухолевой иммунотерапии миелопролиферативных неоплазий у спортсменов-ветеранов старшего возраста. Ученые записки университета имени П.Ф. Лесгафта 2016;6(136):158–62. [Tyrenko V.V., Polyakov A.S., Noskov Y.A., Kovalev A.V. Improving the antitumor immunotherapy of myeloproliferative neoplasms among veteran athletes. Uchenye zapiski universiteta imeni P.F. Lesgafta = Scientific notes of the P.F. Lesgaft University 2016;6(136):158–62 (In Russ.)].
50. Носков Я.А. Клинико-лабораторные особенности течения миелопролиферативных неоплазий на фоне различных видов интерферонотерапии: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2016. 136 с. [Noskov Y.A. Clinical and laboratory features of myeloproliferative disorders during different types of interferon therapy. Dissertation. St. Petersburg, 2016. (In Russ.)].
51. Поляков А.С., Носков Я.А., Петрова О.Р., Голубцов О.Ю. Перспективная интерферонотерапия Ph-негативных миелопролиферативных новообразований: цеpegинтерферон α -2b (Альгерон®). Боткинские чтения. Санкт-Петербург, 2017. С. 213–215. [Polyakov A.S., Noskov Y.A., Petrova O.R., Golubtsov O.Yu. Perspective interferon therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms: cepeginterferon α -2b (Algeron®). Botkinskie chteniya (conference), 2017, St. Petersburg. P. 213–215 (In Russ.)].
52. Le Bousse-Kerdilès M.C. Primary myelofibrosis and the “bad seeds in bad soil” concept. Fibrogenesis Tissue Repair 2012;5(Suppl 1):S20. DOI: 10.1186/1755-1536-5-S1-S20. PMID: 23259918.
53. Christensen A.S., Møller J.B., Hasselbalch H.C. Chronic kidney disease in patients with the Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Leuk Res 2014;38(4):490–5. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.01.014. PMID: 24630365.
54. Farmer S., Horváth-Puhó E., Vestergaard H. et al. Chronic myeloproliferative neoplasms and risk of osteoporotic fractures; a nationwide population-based cohort study. Br J Haematol 2013;163(5):603–10. DOI: 10.1111/bjh.12581. PMID: 24111669.
55. Hasselbalch H.C. Perspectives on the impact of JAK-inhibitor therapy upon inflammation-mediated comorbidities in myelofibrosis and related neoplasms. Expert Rev Hematol 2014;7(2):203–16. DOI: 10.1586/17474086.2013.876356. PMID: 24524202.
56. Silver R.T. A new treatment for polycythemia vera: recombinant interferon α . Blood 1990;76(4):664–5. PMID: 2383649.
57. Gisslinger H., Zagrijtschuk O., Buxhofer-Ausch V. et al. Ropeginterferon α -2b, a novel IFN α -2b, induces high response rates with low toxicity in patients with polycythemia vera. Blood 2015;126(15):1762–70. DOI: 10.1182/blood-2015-04-637280. PMID: 26261238.
58. Gowin K., Thapaliy P., Samuelson J. et al. Experience with pegylated interferon α -2a in advanced myeloproliferative neoplasms in an international cohort of 118 patients. Haematologica 2012;97(10):1570–3. DOI: 10.3324/haematol.2011.061390. PMID: 22419578.
59. Kiladjian J.J., Cassinat B., Chevret S. et al. Pegylated interferon- α -2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. Blood 2008;112(8):3065–72. DOI: 10.1182/blood-2008-03-143537. PMID: 18650451.
60. Quintás-Cardama A., Abdel-Wahab O., Manshouri T. et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α -2a. Blood 2013;122(6):893–901. DOI: 10.1182/blood-2012-07-442012. PMID: 23782935.
61. Quintás-Cardama A., Kantarjian H., Manshouri T. et al. Pegylated interferon α -2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. J Clin Oncol 2009;27(32):5418–24. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.6075. PMID: 19826111.
62. Stauffer Larsen T., Iversen K.F., Hansen E. et al. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon α . Leuk Res 2013;37(9):1041–5. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.06.012. PMID: 23827351.
63. Utke Rank C., Weis Bjerrum O., Larsen T.S. et al. Minimal residual disease after long-term interferon- α 2 treatment: a report on hematological, molecular and histomorphological response patterns in 10 patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Leuk Lymphoma 2015, Jun 18:1–7. [Epub ahead of print]. DOI: 10.3109/10428194.2015.1049171. PMID: 25956046.
64. Государственный реестр предельных отпускных цен производителей на лекарственные препараты, включенные в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (по состоянию на 01.02.2018). Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/pricelims.aspx>. [The state register of the maximum selling prices for medications included in the list of vital and essential medicines(as of 01.02.2018). Available from: <https://grls.rosminzdrav.ru/pricelims.aspx>. (In Russ.)].
65. Hasselbalch H.C. A new era for IFN- α in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Expert Rev Hematol 2011;4(6):637–55. DOI: 10.1586/EHM.11.63. PMID: 22077528.
66. Kiladjian J.J., Giraudier S., Cassinat B. Interferon- α for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. Leukemia 2016;30(4):776–81. DOI: 10.1038/leu.2015.326. PMID: 26601783.
67. Silver R.T., Kiladjian J.J., Hasselbalch H.C. Interferon and the treatment of polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. Expert Rev Hematol 2013;6(1):49–58. DOI: 10.1586/ehm.12.69. PMID: 23373780.
68. Birgegard G. Advances and challenges in the management of essential thrombocythemia. Ther Adv Hematol 2015;6(3):142–56. DOI: 10.1177/2040620715580068. PMID: 26137205.
69. Latagliata R., Spadea A., Cedrone M. et al. Symptomatic mucocutaneous toxicity of hydroxyurea in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: the Mister Hyde face of a safe drug. Cancer 2012;118(2):404–9. DOI: 10.1002/cncr.26194. PMID: 21692060.
70. Massa M., Campanelli R., Fois G. et al. Reduced frequency of CD4⁺CD25⁺+CD127^{low/-} FOXP3⁺ regulatory T-cells in patients with primary myelofibrosis. ASH abstract. Blood 2015;126(23):2809.
71. Parampalli Jaynaranayana S., Stübgen T., Cornez I. et al. JAK1/2 inhibition impairs T cell function in vitro and in patients with myeloproliferative neoplasms. Br J Haematol 2015;169(6):824–33. DOI: 10.1111/bjh.13373. PMID: 25824483.
72. Spivak J.L., Hasselbalch H. Hydroxycarbamide: a user's guide for chronic myeloproliferative disorders. Expert Rev Anticancer Ther 2011;11(3):403–14. DOI: 10.1586/era.11.10. PMID: 21417854.
73. Bailey A.D., Gray L.T., Pavelitz T. et al. The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. DNA Repair(Amst) 2012;11(5):488–501. DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.02.004. PMID: 22483866.

74. Yamane A., Nakamura T., Suzuki H. et al. Interferon- α 2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood* 2008;112(3):542–50. DOI: 10.1182/blood-2007-12-125906. PMID: 18523149.
75. Shivdasani R.A., Fujiwara Y., McDevitt M.A., Orkin S.H. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J* 1997;16(13):3965–74. DOI: 10.1093/emboj/16.13.3965. PMID: 9233806.
76. Muntean A.G., Pang L., Poncz M. et al. Cyclin D–Cdk4 is regulated by GATA-1 and required for megakaryocyte growth and polyploidization. *Blood* 2007;109(12):5199–207. DOI: 10.1182/blood-2006-11-059378. PMID: 17317855.
77. Igarashi K., Kataoka K., Itoh K. et al. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 1994;367(6463):568–72. DOI: 10.1038/367568a0. PMID: 8107826.
78. Shivdasani R.A., Rosenblatt M.F., Zucker-Franklin D. et al. Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* 1995;81(5):695–704. PMID: 7774011.
79. Hasselbalch H.C., Kiladjan J.J., Silver R.T. Interferon α in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *J Clin Oncol* 2011;29(18):e564–5. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.6238. PMID: 21576637.
80. Them N.C., Bagienski K., Berg T. et al. Molecular responses and chromosomal aberrations in patients with polycythemia vera treated with peg-proline-interferon α -2b. *Am J Hematol* 2015;90(4):288–94. DOI: 10.1002/ajh.23928. PMID: 25545244.
81. Verger E., Cassinat B., Dosquet C. et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* 2015;126(24):2585–92. DOI: 10.1182/blood-2015-07-659060. PMID: 26486786.
82. Duek A., Lundberg P., Shimizu T. et al. Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2–V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood* 2014;123(25):3943–50. DOI: 10.1182/blood-2013-07-514208. PMID: 24820309.
83. Au-Yeung N., Mandhana R., Horvath C.M. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. *JAKSTAT* 2013;2(3):e23931. DOI: 10.4161/jkst.23931. PMID: 24069549.
84. Platanias L.C., Uddin S., Bruno E. et al. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp Hematol* 1999;27(8):1315–21. PMID: 10428508.
85. Härtlova A., Erttmann S.F., Raffi F.A. et al. DNA damage primes the type I interferon system via the cytosolic DNA sensor STING to promote anti-microbial innate immunity. *Immunity* 2015;42(2):332–43. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.01.012. PMID: 25692705.
86. Scheller M., Foerster J., Heyworth C.M. et al. Altered development and cytokine responses of myeloid progenitors in the absence of transcription factor, interferon consensus sequence binding protein. *Blood* 1999;94(11):3764–71. PMID: 10572090.
87. Eklund E.A., Kakar R. Recruitment of CBP by PU. 1, IRF1 and ICSBP is necessary for gp91phox and p67phox expression. *Immunol* 1999;163(11):6095–105. PMID: 10570299.
88. Eklund E.A., Jalava A., Kakar R. PU.1, interferon regulatory factor 1, and interferon consensus sequence binding protein cooperate to increase gp91phox expression. *J Biol* 1998;273(22):13957–65. PMID: 9593745.
89. Kurotaki D., Osato N., Nishiyama A. et al. Essential role of the IRF8–KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 2013;121(10):1839–49. DOI: 10.1182/blood-2012-06-437863. PMID: 23319570.
90. Rehli M., Poltorak A., Schwarzfischer L. et al. PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* 2000;275(13):9773–81. PMID: 10734131.
91. Huang W., Saberwal G., Horvath E. et al. Leukemia associated, constitutively active mutants of SHP2 protein tyrosine phosphatase inhibit NF1-transcriptional activation by the interferon consensus sequence binding protein. *Mol Cell Biol* 2006;26(17):6311–32. DOI: 10.1128/MCB.00036-06. PMID: 16914719.
92. Kakar R., Kautz B., Eklund E.A. JAK2 is necessary and sufficient for interferon-induced transcription of the gene encoding gp91PHOX. *J Leukoc Biol* 2005;77(1):120–7. DOI: 10.1189/jlb.0704429. PMID: 15496449.
93. Konieczna I., Horvath E., Wang H. et al. Constitutive activation of SHP2 cooperates with ICSBP-deficiency to accelerate progression to acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2008;118(3):853–67. DOI: 10.1172/JCI133742. PMID: 18246201.
94. Hu L., Huang W., Hjort E.E. et al. The Interferon Consensus Sequence Binding Protein(Icsbp/Irf8) Is Required for Termination of Emergency Granulopoiesis. *J Biol Chem* 2016;291(8):4107–20. DOI: 10.1074/jbc.M115.681361. PMID: 26683374.
95. Carobbio A., Finazzi G., Antonioli E. et al. JAK2V617F allele burden and thrombosis: a direct comparison in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp Hematol* 2009;37(9):1016–21. DOI: 10.1016/j.exphem.2009.06.006. PMID: 19559071.
96. Vannucchi A.M., Antonioli E., Guglielmelli P. et al. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2 (V617F) allele burden. *Leukemia* 2007;21(9):1952–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2404854. PMID: 17625606.
97. Silver R.T., Vandris K., Wang Y.L. et al. JAK2(V617F) allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. *Leuk Res* 2011;35(2):177–82. DOI: 10.1016/j.leukres.2010.06.017. PMID: 20650526.
98. Antonioli E., Guglielmelli P., Poli G. et al. Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. *Haematologica* 2008;93(1):41–8. DOI: 10.3324/haematol.11653. PMID: 18166784.
99. Kiladjan J.J., Mesa R.A., Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;117(18):4706–15. DOI: 10.1182/blood-2010-08-258772. PMID: 21389325.
100. Hasselbalch H.C., Larsen T.S., Riley C.H. et al. Interferon- α in the treatment of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. Status and perspectives. *Curr Drug Targets* 2011;12(3):392–419. PMID: 21143149.
101. Hasselbalch H.C., Silver R.T. Interferon in polycythemia vera and related neoplasms. Can it become the treatment of choice without a randomized trial? *Expert Rev Hematol* 2015;8(4):439–45. DOI: 10.1586/17474086.2015.1045409. PMID: 25996953.
102. Pizzi M., Silver R.T., Barel A., Orazi A. Recombinant interferon- α in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Mod Pathol* 2015;28(10):1315–23. DOI: 10.1038/modpathol.2015.93. PMID: 26271725.
103. Silver R.T., Vandris K., Goldman J.J. Recombinant interferon- α may retard

- progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report. *Blood* 2011;117(24):6669–72. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320069. PMID: 21518929.
104. Silver R.T. Long-term effects of the treatment of polycythemia vera with recombinant interferon- α . *Cancer* 2006;107(3):451–8. DOI: 10.1002/cncr.22026. PMID: 16804923.
105. Saberwal G., Horvath E., Hu L. et al. The interferon consensus sequence binding protein (ICSBP/IRF8) activates transcription of the FANCF gene during myeloid differentiation. *J Biol Chem* 2009;284(48):33242–54. DOI: 10.1074/jbc.M109.010231. PMID: 19801548.
106. Bailey A.D., Gray L.T., Pavelitz T. et al. The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. *DNA Repair (Amst)* 2012;11(5):488–501. DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.02.004. PMID: 22483866.
107. Huang B.T., Zeng Q.C., Zhao W.H. et al. Interferon α -2b gains high sustained response therapy for advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera with JAK2V617F positive mutation. *Leuk Res* 2014;38(10):1177–83. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.06.019. PMID: 25069759.

Вклад авторов

А.С. Поляков: концепция, интерпретация данных, дизайн и написание статьи, сбор данных;
 Я.А. Носков: концепция, интерпретация данных, проведение статистического анализа, дизайн и написание статьи, сбор данных;
 В.В. Тыренко: концепция, окончательное одобрение рукописи;
 А.С. Лапшова: проведение статистического анализа, участие в написании статьи;
 А.В. Ковалев: проведение статистического анализа, участие в написании статьи

Authors' contributions

A.S. Polyakov: concept, interpretation of data, design and article writing, data collection;
 Y.A. Noskov: concept, interpretation of data, statistical analysis, design and article writing, data collection;
 V.V. Tyrenko: concept, final approval of the article;
 A.S. Lapshova: statistical analysis, article writing;
 A.V. Kovalev: statistical analysis, article writing

ORCID авторов

А.С. Поляков: <https://orcid.org/0000-0001-9238-8476>

ORCID of authors

A.S. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0001-9238-8476>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 15.02.2018. **Принята к публикации:** 15.03.2018

Article received: 15.02.2018. **Accepted for publication:** 15.03.2018

Анемия хронических заболеваний: особенности патогенеза и возможности терапевтической коррекции (обзор литературы и результаты собственных исследований)

В.Т. Сахин¹, Е.Р. Маджанова¹, Е.В. Крюков², С.П. Казаков², О.А. Рукавицын²

¹ФГКУ «1586 Военный клинический госпиталь» Минобороны России;

Россия, 142110 Московская область, Подольск, ул. Маштакова, 4;

²ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени Н.Н. Бурденко» Минобороны России; Россия, 105229 Москва, Госпитальная площадь, 3

Контакты: Валерий Тимофеевич Сахин SahinVT@yandex.ru

В обзоре приведены данные, касающиеся новых важных аспектов патогенеза и лечения анемии хронических заболеваний. Продемонстрирован сложный многокомпонентный генез этой анемии, в основе которого лежат нарушения обмена железа, повреждение пролиферации и дифференцировки клеток эритропоэза, уменьшение синтеза и биологической активности эритропоэтина. Показано значение гемотрансфузий, препаратов железа и эритропоэз-стимулирующих агентов в лечении пациентов с анемией хронических заболеваний. Установлено, что данные по безопасности этих методик достаточно противоречивы, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении с целью разработки единых принципов диагностики и лечения этой анемии. Представлены собственные результаты сравнительного анализа концентрации интерлейкина (ИЛ) 6, 10, фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) у пациентов со злокачественными новообразованиями с анемией и без таковой, а также корреляционного анализа для оценки их влияния на число эритроцитов и концентрацию гемоглобина. Исследованы данные 63 пациентов со II–IV стадиями заболевания. У пациентов с анемией в сравнении с контрольной группой более высокие уровни ИЛ-6 (41,5 (3,8–31,1) и 7,1 (0,00–9,40), пг/мл), ФНО-α (58,6 (36,1–81,1) и 8,25 (1,3–13,6) пг/мл) и ИЛ-10 (18,3 (4,5–14,4) и 0,9 (0,3–5,5) пг/мл соответственно), $p < 0,05$. Для ИЛ-6 выявлена корреляция с эритроцитами ($r = -0,55$), гемоглобином ($r = -0,52$); для ФНО-α – корреляция с эритроцитами ($r = -0,74$), гемоглобином ($r = -0,69$); для ИЛ-10 – корреляция с гемоглобином ($r = -0,74$) и эритроцитами ($r = -0,6$). Полученные результаты подтверждают важное значение этих цитокинов в генезе анемии у больных со злокачественными новообразованиями.

Ключевые слова: анемия хронических заболеваний, гепцидин, провоспалительные цитокины

Для цитирования: Сахин В.Т., Маджанова Е.Р., Крюков Е.В. и др. Анемия хронических заболеваний: особенности патогенеза и возможности терапевтической коррекции (обзор литературы и результаты собственных исследований). Онкогематология 2018;13(1):45–53.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-45-53

Anemia of chronic disease: features of pathogenesis and possible therapeutic correction (literature review and results of own research)

V.T. Sakhin¹, E.R. Madzhanova¹, E.V. Kryukov², S.P. Kazakov², O.A. Rukavitsin²

¹1586 Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of the Russian Federation;

4 Mashtakova St., Podolsk, Moscow region 142110, Russia;

²Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko, Ministry of Defense of the Russian Federation; 3 Gospitalnaya square, Moscow 105229, Russia

The review contains data on new important aspects of the pathogenesis and treatment of anemia of chronic diseases. The complex multicomponent genesis of this anemia is shown, which is based on the disturbances in iron metabolism, damage of proliferation and differentiation of erythropoiesis cells, a decrease in the synthesis and biological activity of erythropoietin. The value of blood transfusions, iron preparations and erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of patients with anemia of chronic diseases is shown. It is established that the safety data of these methods are quite contradictory, further studies are needed in this direction with the aim of developing uniform principles for the diagnosis and treatment of this anemia. Comparative analysis results of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) concentration in patients with malignant neoplasms with anemia and without it are presented, as well as correlation analysis for evaluation their influence on the number of erythrocytes and hemoglobin concentration. Sixty three patients with stage II–IV disease were examined. In patients with anemia, compared with the control group, higher levels of IL-6 (41.5 (3.8–31.1) and 7.1 (0.00–9.40) pg/ml), TNF-α (58.6 (36.1–81.1) and 8.25 (1.3–13.6) pg/ml) and IL-10 (18.3 (4.5–14.4) and 0.9 (0.3–5.5) pg/ml) were revealed ($p < 0.05$). For IL-6, there was a correlation with erythrocytes ($r = -0.55$), hemoglobin ($r = -0.52$); for TNF-α, a correlation with erythrocytes ($r = -0.74$), hemoglobin ($r = -0.69$) was revealed; for IL-10, there was a correlation with hemoglobin ($r = -0.74$) and erythrocytes ($r = -0.6$). The results confirm the importance of these cytokines in the genesis of anemia in cancer patients.

Key words: anemia of chronic diseases, hepcidin, pro-inflammatory cytokines

For citation: Sakhin V. T., Madzhanova E. R., Kryukov E. V. et al. Anemia of chronic disease: features of pathogenesis and possible therapeutic correction (literature review and results of own research). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):45–53.

Введение

Анемия хронических заболеваний (АХЗ), также называемая анемией хронического воспаления, — наиболее распространенный вид анемии у госпитализированных пациентов [1] и 2-я по распространенности после железодефицитной анемии (ЖДА) [2–4]. АХЗ развивается у пациентов, у которых их текущая болезнь вызывает активный иммунный или воспалительный ответ, что приводит к уменьшению поглощения железа на разных участках, но не у пациентов, у которых их болезнь или ее лечение напрямую вызывает анемию, как это наблюдается при некоторых злокачественных новообразованиях и при лечении цитотоксическими препаратами [5]. В разных работах приводится различная частота возникновения этого серьезного осложнения (от 30 до 90 %), однако можно предположить, что этот показатель может достигать 100 %, если заболевание и сопутствующее ему лечение будут продолжаться достаточно долго. Также частота АХЗ увеличивается с возрастом, затрагивая до 77 % пожилых людей [3, 5]. Об АХЗ можно думать при наличии у пациента длительно текущего инфекционно-воспалительного, опухолевого или аутоиммунного процесса. Все приведенные выше факты свидетельствуют о сложном и мультифакторном патогенезе этой анемии, в основе которого лежат нарушение синтеза эритропоэтина и чувствительности к нему клеток-предшественников эритропоэза, гиперпродукция факторов, угнетающих эритропоэз (фактор некроза опухоли — ФНО, интерлейкины — ИЛ), нарушения в метаболизме железа [6, 7]. Анемия существенноотяжеляет течение патологических процессов, с которыми сочетается [8, 9], а также способствует снижению работоспособности, функциональной активности, когнитивной функции [10] и выживаемости [11]. От эффективного лечения анемии зависят быстрота нормализации состояния больного, а также успех в лечении других заболеваний.

Основные моменты патогенеза АХЗ. Обмен железа. Железо является важнейшим компонентом митохондриальной дыхательной цепи. Оно абсолютно необходимо для функционирования организма, так как играет центральную роль в связывании и транспорте кислорода. В то же время свободное железо образует опасные гидроксильные радикалы, приводящие к гибели клеток. В свободном виде железо практически не встречается, связываясь на конкретном этапе циркулирования в организме с определенным белком. Наибольшую роль в обмене железа играют ферритин, трансферрин и трансферриновый рецептор. Ферритин

необходим для накопления и хранения запасов железа. В физиологических условиях (но далеко не всегда у больных АХЗ!) количество ферритина соотносится с количеством железа в организме (чем больше ферритина, тем больше железа). Трансферрин служит для транспортировки железа в ткани, испытывающие в нем потребность, синтезируется в клетках печени в соответствии с количеством железа в организме (чем меньше железа, тем больше синтезируется трансферрина). Трансферрин переносит железо как попавшее в организм с пищей, так и высвобожденное из депо (макрофагов). Для транспортировки железа в клетку из его комплекса с трансферрином необходим трансферриновый рецептор, связывающий трансферрин. После этого связывания комплекс трансферрин–трансферриновый рецептор погружается в клетку, где при низком рН из него высвобождается железо. Белки же (трансферрин и трансферриновый рецептор) не разрушаются, а входят в процесс рециркуляции. Синтезируемый печенью гормон гепцидин — основной циркулирующий в крови регулятор всасывания железа и распределения его в тканях [6]. В последнее время все больше внимания уделяется исследованию дефицита железа у больных с АХЗ. Установлено, что уровень растворимого рецептора к трансферрину значимо выше в группе онкологических пациентов и это повышение имеет большее значение в сравнении с увеличением уровня С-реактивного белка, гепцидина, ферритина и трансферринового рецептора в этой группе больных [12]. Гепцидин контролирует основные пути поступления железа в плазму, вызывая деградацию белка ферропортина, транспортера железа в энтероцитах, утилизацию железа макрофагами и стимуляцию высвобождения железа, хранящегося в гепатоцитах. Его концентрация отрицательно коррелирует с доступностью железа для клеток организма (чем больше экспрессия гепцидина, тем железо менее доступно) [6]. Гепцидин регулирует содержание железа в плазме, но верно и наоборот — экспрессия гепцидина регулируется количеством железа в организме, а вернее — потребностью в нем. Уровень гепцидина также регулируется гормоном эритроферроном, членом суперсемейства ФНО-α, синтезируемым созревающими эритроблантами. Он ингибирует продукцию гепцидина при повышенной потребности в железе для синтеза гемоглобина [13].

Повышенный уровень гепцидина приводит к недостатку железа для синтеза гемоглобина у пациентов с различными типами анемий. Необходимо отметить, что с физиологической точки зрения увеличение уровня гепцидина следует расценивать как защитный

механизм, так как уменьшается концентрация железа, металла необходимого для роста патогенных бактерий и раковых клеток.

Исключительная важность взаимодействия в комплексе гепцидин–ферропортин стала причиной выделения нового патофизиологического феномена, который был назван «ось гепцидин–ферропортин». Это стало поводом к выделению целой группы заболеваний, связанных с осью гепцидин–ферропортин. Насколько оправдано такое выделение, покажет время [12, 14, 15].

Нарушение пролиферации и дифференцировки клеток эритропоэза — следующий (за нарушениями обмена железа) важнейший фактор развития АХЗ. Микробная инвазия, злокачественные новообразования и аутоиммунные расстройства активируют CD3-Т-лимфоциты и макрофаги, которые секретируют цитокины — интерферон гамма (ИФН- γ) из Т-клеток, ФНО- α , ИЛ-1 и ИЛ-6 из моноцитов [7, 16]. ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-1 обладают проапоптотическими эффектами в отношении клеток-предшественников эритропоэза — эритроидных бурст- и колониеобразующих единиц. Кроме того, эти же цитокины вызывают снижение экспрессии рецептора к эритропоэтину, а также нарушают синтез эритропоэтина, тем самым ингибируя его активность. Эти процессы, происходящие на фоне ограниченной доступности железа для эритропоэза, приводят к ингибции пролиферации эритроидных предшественников. Предполагается, что ИЛ-6 является наиболее важным цитокином, опосредующим патогенез АХЗ [17]. ИЛ-6 — мощный ингибитор ФНО- α и индуктор транскрипции ферритина, способствующий удержанию и хранению железа в пределах ретикуло-эндотелиальных клеток. ИЛ-6 также ингибирует эритропоэз через другие пути, не участвующие в ингибировании абсорбции и усвоения железа [18]. Он подавляет экспрессию гена *SLC4a1* в поздних эритроидных предшественниках и тем самым уменьшает синтез гемоглобина [7]. Кроме того, ИЛ-6, так же как ИЛ-22 и активин В, увеличивает экспрессию гепцидина [19].

Белки острой фазы воспаления могут эффективно связывать трансферрин и ингибировать опосредованный трансферрином захват железа эритроидными предшественниками. Таким образом, блокируется их пролиферация и дифференцировка. Антипролиферативный эффект в отношении эритропоэза описан и для ферритина; механизм эффекта не вполне ясен, но это может быть связано с доступностью железа эритроидным предшественникам. Кроме того, у больных с АХЗ может развиваться дефицит кобаламина и фолиевой кислоты, что приводит к нарушению пролиферации эритроидных предшественников. И наконец, сочетание анемии у онкологических больных с радио- и химиотерапевтическим воздействием может усиливать анемию посредством прямого токсического действия на костный мозг.

Уменьшение синтеза и биологической активности эритропоэтина — 3-й фактор развития АХЗ. Как пра-

вило, уровень эндогенного эритропоэтина неадекватен степени анемии у больных АХЗ. К тому же биологический ответ на гипоксию у больных АХЗ искажен. Это лишь косвенно связано с изменениями в гомеостазе железа. Основной причиной является способность цитокинов, бактериальных полисахаридов, ИФН- γ [20] индуцировать образование оксида азота и свободных радикалов кислорода, которые уменьшают экспрессию эритропоэтина [21]. Образующиеся активные формы кислорода ингибируют факторы транскрипции, индуцирующие эритропоэтин, а также повреждают клетки, продуцирующие эритропоэтин. Этот механизм, приводящий к уменьшению синтеза эритропоэтина, подтвержден в экспериментальных исследованиях (в опытах на животных). Ответ эритроидных предшественников на эритропоэтин коррелирует с количеством циркулирующих цитокинов. Так, в присутствии высоких концентраций ИФН- γ и ФНО- α требуется повышенное количество эритропоэтина для образования эритроидных колоний [3, 22, 23].

Диагностика анемии хронических заболеваний

Обычно АХЗ — нормохромная и нормоцитарная, легкой или средней степени тяжести. Уровень гемоглобина редко опускается ниже 70 г/л. В случае уменьшения показателя гемоглобина <70 г/л необходим тщательный поиск других причин потери или разрушения эритроцитов.

Основой диагностики является наличие у пациента длительно текущего хронического заболевания. Обычно природа его — опухолевая, инфекционно-воспалительная или аутоиммунная. Если это заболевание отсутствует, диагноз АХЗ маловероятен.

Достаточно часто приходится проводить дифференциальную диагностику АХЗ и ЖДА, основой которой является оценка обмена железа. Оценить запасы железа в организме можно, ориентируясь на уровень сывороточного ферритина. У больных ЖДА уровень ферритина обычно крайне низкий, у больных АХЗ он может быть нормальным или даже повышенным. Повышенный уровень ферритина отражает запасы железа в клетках ретикуло-эндотелиальной системы и может быть следствием воспаления, поскольку ферритин относится к белкам острой фазы. Концентрация сывороточного железа и насыщение трансферрина могут быть снижены как при ЖДА, так и при АХЗ, и не играют большой роли в дифференциальной диагностике.

Напротив, концентрация трансферрина, нормальная или низкая у больных АХЗ, обычно значительно повышена у больных ЖДА. Также уровень растворимого рецептора трансферрина (усеченного фрагмента мембранного рецептора) повышен, когда доступность железа для гемопоэза снижена [12].

В таблице обобщены различия в показателях обмена железа при АХЗ, ЖДА и при сочетании этих нарушений.

Различия в показателях обмена железа у пациентов с анемией хронических заболеваний, железodefицитной анемией и с сочетанием этих нарушений
Differences in iron metabolism in patients with anemia of chronic diseases, iron deficiency anemia and a combination of two anemias

Показатель Parameter	АХЗ ACD	ЖДА IDA	АХЗ + ЖДА ACD + IDA
Уровень железа Iron level	Пониженный Reduced	Пониженный Reduced	Пониженный Reduced
Уровень трансферрина Transferrin level	Пониженный или нормальный Reduced or normal	Повышенный Increased	Пониженный Reduced
Насыщение трансферрина Transferrin saturation	Уменьшено Reduced	Уменьшено Reduced	Уменьшено Reduced
Уровень ферритина Ferritin level	Нормальный или повышенный Normal or increased	Пониженный Reduced	Пониженный или нормальный Reduced or normal
Уровень растворимого рецептора трансферрина Soluble transferrin receptor level	Нормальный Normal	Повышенный Increased	Нормальный или повышенный Normal or increased
Отношение рецептора трансферрина к логарифму ферритина The ratio of transferrin receptor to the logarithm of ferritin	Низкое (<1) Low (<1)	Высокое (>2) High (>2)	Высокое (>2) High (>2)
Уровень цитокинов Cytokines level	Повышенный Increased	Нормальный Normal	Повышенный Increased

Примечание: АХЗ — анемия хронических заболеваний, ЖДА — железodefицитная анемия.

Note: ACD — anemia of chronic diseases, IDA — iron deficiency anemia.

Когда диагноз АХЗ установлен или предполагается с высокой степенью вероятности, ключевым вопросом является определение типа дефицита железа: является ли он абсолютным (истинным) или функциональным. Принципиальная разница между ними состоит в том, что при абсолютном дефиците железа его назначение приводит к быстрому потреблению эритроидными клетками-предшественниками и активирует эритропоэз, компенсируя тем самым анемию. В то же время у пациентов с функциональным дефицитом железа такое назначение будет бесполезным, несмотря на то что имеются признаки нехватки железа. Ранее считалось, что это принципиально разные состояния, но в дальнейшем пришло понимание того, что эти 2 дефицита часто сочетаются (наличие функционального не исключает наличия истинного, и наоборот). Важнейшую роль играет тщательный сбор анамнеза. АХЗ с абсолютным дефицитом железа обнаруживается у больных с потерей крови, из-за гастроинтестинальных и урологических опухолей, маточных кровотечений, воспалительных заболеваний кишечника и гастроинтестинальных инфекций. Признаки кровопотери могут быть выявлены уже при подробном расспросе больного или его родственников. Назначенное с целью верифицировать хроническую кровопотерю обследование может помочь в этом.

Лабораторными признаками АХЗ с абсолютным дефицитом железа являются (в порядке значимости): высокий уровень растворимого рецептора к трансферрину, сниженное насыщение трансферрина, увеличе-

ние количества трансферрина, сниженные количества железа и ферритина сыворотки крови.

О нехватке железа для работы эритрона также свидетельствует уменьшение количества гипохромных эритроцитов и ретикулоцитов, снижение среднего содержания гемоглобина в эритроците и среднего объема эритроцитов. Очень важным признаком истинного дефицита железа является снижение количества железосодержащих гранул в эритроидных клетках-предшественниках костного мозга при специальной окраске (по Перлсу). При обычной же окраске часто наблюдается неровность контуров клеток-предшественников эритропоэза, что может быть связано с дефектами цитоплазматической мембраны.

Весьма вероятно, что в недалеком будущем в установлении диагноза АХЗ с истинным дефицитом железа важную роль будет играть уровень гепцидина. При высоком уровне можно будет предполагать, что имеется нехватка железа и эритропоэз работает в условиях его дефицита. В том же ключе интенсивно изучается роль другого белка, также активно участвующего в эритропоэзе и регуляции обмена железа, — эритроферрона. Установление диагноза затрудняется сопутствующими кровотечениями, почечной недостаточностью и эффектами медикаментов.

Лечение анемии хронических заболеваний. Основой терапевтического подхода к лечению АХЗ является лечение основного заболевания. Когда это невозможно, необходимо компенсировать анемию иначе. Можно говорить о 3 основных направлениях:

- переливание компонентов крови;
- назначение препаратов железа;
- применение стимуляторов эритропоэза.

Переливание компонентов крови остается важным краткосрочным терапевтическим вмешательством, дающим быстрый эффект, и абсолютно показано пациентам с жизнеугрожающей анемией (гемоглобин <65 г/л), ассоциирующейся с декомпенсацией сердечной деятельности. Оно также может применяться у больных АХЗ с выраженной анемией (гемоглобин <80 г/л) или при АХЗ, осложненной кровотечением. Однако длительные трансфузии ассоциируются с увеличением летальности главным образом вследствие перегрузки железом, а также развития осложнений иммунологического типа [24]. Также нельзя гарантировать абсолютную защиту от возможного заражения одной из гемотрансмиссивных инфекций.

Также существует точка зрения, что гемотрансфузии полезны, поскольку имеет место их иммуномодулирующий эффект. Так, например, известно, что переливание крови увеличивает выживаемость больных АХЗ, осложненной инфарктом миокарда.

Естественным является предположение, что более упорная анемия отражает более выраженное основное заболевание. Так, больные, получающие большое количество гемокомпонентов, объективно имеют худший прогноз, и трансфузии крови могут не вносить особого вклада в негативный клинический исход. Основываясь на данных, которые доступны сейчас, крайне сложно определить влияние трансфузий на результат лечения у больных АХЗ, а также на течение основного заболевания [25].

Назначение препаратов железа. Еще недавно считалось, что лечение только железом при отсутствии железодефицита не приносит пользы больным АХЗ. Действительно, пероральные препараты железа иногда плохо всасываются из-за ухудшения функционирования ЖКТ у больных АХЗ. Это особенно резко выражено у больных с воспалительными заболеваниями кишечника. Также лечение препаратами железа может быть не очень эффективным при АХЗ в связи с развитием функционального, а не абсолютного дефицита железа.

Высказывается и мнение о вреде терапии препаратами железа. Установлено, что железо необходимо для роста некоторых патогенных микроорганизмов и опухолевых клеток. Подтверждено тормозящее влияние железа на иммунную систему посредством подавления ИФН- γ опосредованных путей [24, 26]. Кроме того, железо способствует образованию гидроксильных радикалов, вызывающих деструкцию тканей и эндотелия.

Однако реальная клиническая значимость этих в основном теоретических положений неизвестна. Неизвестно, о каком количестве железа в какой клинической ситуации можно говорить в свете его влияния на опухолевый рост и инфекцию, а также на образование клинически значимого уровня гидроксильных радикалов.

Внутривенное железо должно назначаться больным, у которых отсутствует ответ на эритропоэстимулирующие агенты (ЭСА) и у которых подозревается дефицит железа. Характерно, что железо быстрее утилизируется клетками эритрона, чем микроорганизмами, при хронических воспалительных заболеваниях; уровень гемоглобина растет без роста числа инфекционных осложнений [27, 28].

Установлено, что парентеральная терапия железом гораздо эффективнее, чем пероральная, у больных раком, получающих химиотерапию. Скорее всего, это верно для абсолютного большинства пациентов с АХЗ. Накопленные в последние годы сведения позволяют ввести понятие гепцидинового барьера, т. е. определить состояния внутри большой группы АХЗ с повышенным уровнем гепцидина (в совокупности с другими факторами) и, как следствие, не всасыванием железа из ЖКТ. Однако попытки преодоления этого барьера продолжаются, в частности появились препараты железа, где металл интегрирован в липосомы. Есть сведения о том, что такие препараты способны преодолевать гепцидиновый барьер [29, 30].

Обобщая комплекс вопросов о лечении препаратами железа больных АХЗ, можно заключить, что они скорее полезны, даже если признаки дефицита железа неочевидны. Вред же их не определен конкретно, а существующие данные не позволяют определить противопоказания к попытке ферротерапии у пациентов этой группы за исключением тех, у которых есть признаки перегрузки железом. При этом нет смысла использовать пероральное железо (возможно, за исключением липосомального). Необходимо применять парентеральные препараты, эффективность которых зачастую весьма высока. Современные железосодержащие комплексы удобны тем, что можно ввести требуемую дозу металла за 1–2 инфузии и долгое время контролировать анемию.

Человеческие рекомбинантные эритропоэтины (ЭСА). Эритропоэтин стимулирует пролиферацию эритроидных предшественников, эритроцитарных бурстобразующих единиц, посредством его действия на костный морфогенетический белок [31, 32] и сигнальный путь JAK-STAT5. В гепатоцитах костный морфогенетический белок связывается с гемоувелином, который действует как его сигнальный компонент и индуцирует экспрессию гепцидина с последующим уменьшением поглощения железа [32]. Индукция сигнального пути JAK-STAT способствует уменьшению провоспалительных эффектов гепцидина за счет ингибирования продукции ИЛ-6 моноцитами [33].

Механизм действия ЭСА включает уменьшение антипролиферативного эффекта провоспалительных цитокинов, а также стимуляцию поглощения железа и синтеза гема в эритроидных предшественниках. ЭСА следует использовать в сочетании с железом, а целевым уровнем гемоглобина следует считать 11–12 г/дл. Предыдущие исследования показали, что достижение

более высокого уровня гемоглобина связано с более плохим результатом лечения и значительным увеличением числа тромбозов и эмболий. Особенно часто это наблюдается у пациентов со злокачественными новообразованиями. Однако эффективность лечения ЭСА необходимо оценивать индивидуально у каждого пациента. Следует учитывать возможность развития артериальной гипертензии, судорожного синдрома/гипертонической энцефалопатии, тромбоэмболических осложнений, дефицита железа и гриппоподобного синдрома [34].

В настоящее время наиболее изучена эффективность эритропоэтина альфа и дарбэпоэтина альфа для коррекции анемии у пациентов со злокачественными новообразованиями. В 2007 и 2010 гг. изданы совместные рекомендации Американского общества гематологов/Американского общества клинической онкологии по их применению у взрослых пациентов с этой патологией. Рекомендуемая стартовая доза для эритропоэтина альфа — 150 МЕ/кг 3 раза в неделю с возможностью увеличения дозы до 300 МЕ/кг 3 раза в неделю в последующие 4 нед у неответивших пациентов. Классическим является режим 10 000 МЕ 3 раза в неделю. Это позволяет мониторировать ответ на лечение, вовремя отменив терапию (опасность тромбогенности!) или усилив ее. Однако более предпочтителен режим 12 000 МЕ 3 раза в неделю, так как общая недельная доза ближе к целевой — 40 000 МЕ. Возможен альтернативный режим введения — 1 раз в неделю в дозе 40 000 МЕ для взрослых пациентов с возможным увеличением до 60 000 МЕ. Продолжение терапии эритропоэтином альфа при отсутствии ответа через 6–8 нед, вероятно, не является целесообразным. Неответившие пациенты должны исследоваться с целью выявления возможной прогрессии опухоли, дефицита железа и других возможных причин анемии.

Дарбэпоэтин альфа вводится в дозе 150 мкг 1 раз в неделю или 500 мкг 1 раз в 3 нед. Скорость ответной реакции на терапию ЭСА у пациентов с АХЗ широко варьирует, однако имеется четкий дозозависимый эффект. Более предпочтительным является подкожное введение ЭСА, что обусловлено его фармакокинетикой. Продолжительность лечения имеет особое значение. Не стоит ожидать значимого клинического эффекта раньше, чем через 4 нед от начала лечения, обычно же — через 6 нед. При анемии, связанной с заболеваниями почек, используют меньшие дозы [35, 36].

В последнее время активно изучается взаимосвязь между вероятностью развития летального исхода и фактом применения ЭСА. В 2 крупных исследованиях показано что применение ЭСА может быть связано с увеличением риска летального исхода, но результаты не были статистически достоверны. Также опубликованы данные исследований, в которых не выявлено отрицательное влияние применения ЭСА на исход заболевания [37–39]. Решение о назначении ЭСА принимает только лечащий врач.

Следует учитывать, что функция эритропоэтина не исчерпывается регуляцией эритропоэза. Например, он участвует в важных метаболических процессах, происходящих в кардиомиоцитах, клетках головного мозга. Клинически важно, что зачастую качество жизни пациента с анемией, получающего ЭСА, может улучшаться и без повышения уровня гемоглобина.

Результаты исследования уровней ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α и их взаимосвязи с показателями гемограммы у пациентов с солидными опухолями

В связи с представленными данными о сложном патогенезе АХЗ, включающем в том числе влияние провоспалительных цитокинов, выполнен сравнительный анализ концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α у пациентов со злокачественными новообразованиями с анемией и без нее, а также корреляционный анализ для оценки их влияния на число эритроцитов и концентрацию гемоглобина. Для реализации поставленных задач нами обследованы 63 пациента со II–IV стадиями заболевания, из них 41 пациент с анемией (34 мужчины, 7 женщин, средний возраст $67,1 \pm 9,9$ года), 22 — без таковой (17 мужчин, 5 женщин, средний возраст $60,2 \pm 14,9$ года). Из 63 пациентов у 46 злокачественное новообразование диагностировано впервые, у 11 — верифицирован рецидив онкологического заболевания после комбинированного лечения (хирургическое лечение и полихимиотерапия), у 6 — рецидив онкологического заболевания после проведенного хирургического лечения.

Всем пациентам определяли в периферической крови концентрации эритроцитов, гемоглобина, гематокрита, тромбоцитов и эритроцитарные индексы (MCV — средний объем эритроцита, MCH — среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците). Исследование уровней ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-α выполнялось методом иммуноферментного анализа на полуавтоматическом анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology Inc., США). Для исследуемых показателей рассчитывали среднее (M) и межквартильный интервал (LQ–UQ). Достоверность различий между изучаемыми выборками определяли с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при статистической значимости (p) в рассматриваемых выборках $<0,05$. Для оценки взаимосвязи между 2 переменными использовали корреляционный анализ с вычислением коэффициента корреляции Спирмена (r). Статистически значимым отличием коэффициента r от 0 признавали уровень $p < 0,05$. Статистическая обработка выполнялась в программе StatSoft Statistica 10.

Пациенты с анемией в сравнении с пациентами без анемии имели статистически значимо более низкий уровень MCH: соответственно $26,9$ ($24,8–29$) и $29,4$ ($27,1–31,6$) пг; MCHC — $318,8$ ($302,5–331$) и $338,8$ ($327,5–350$) г/л. Также для пациентов с анемией в сравнении с контрольной группой выявлены более высокие

уровни ИЛ-6: 41,5 (3,8–31,1) и 7,1 (0,00–9,40) пг/мл, ФНО- α – 58,6 (36,1–81,1) и 8,25 (1,3–13,6) пг/мл; ИЛ-10 – 18,3 (4,5–14,4) и 0,9 (0,3–5,5) пг/мл; $p < 0,05$. Для ИЛ-6 показаны отрицательные корреляционные связи умеренной силы с уровнями эритроцитов ($r = -0,55$), гемоглобина ($r = -0,52$). Для ФНО- α выявлена сильная отрицательная корреляционная связь с уровнем эритроцитов ($r = -0,74$), отрицательная корреляционная связь умеренной силы с гемоглобином ($r = -0,69$); для ИЛ-10 – обратная корреляция с уровнем гемоглобина ($r = -0,74$) и умеренная обратная корреляция с уровнем эритроцитов ($r = -0,6$).

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что высокие концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО- α характерны для пациентов со злокачественными новообразованиями и анемией. Высокие концентрации этих цитокинов приводят к уменьшению уровня эритроцитов и гемоглобина. Механизм, посредством которого исследуемые цитокины приводят к развитию анемии, требует дальнейшего уточнения, но с учетом представленных данных зарубежных исследований наиболее вероятно, что они влияют на секрецию регуляторов обмена железа, гепсидина

и эритроферрона и оказывают ингибирующий эффект на эритропоэз.

Заключение

АХЗ имеет сложный многокомпонентный генез, в основе которого лежат нарушения обмена железа, повреждение пролиферации и дифференцировки клеток эритропоэза, уменьшение синтеза и биологической активности эритропоэтина. Все больше внимания уделяется изучению влияния гепсидина и эритроферрона на обмен железа. Изучение этих регуляторов в дальнейшем позволит разработать новые способы терапевтической коррекции АХЗ. Важное значение имеет влияние провоспалительных цитокинов на развитие этой анемии, что также подтверждено и в нашем исследовании. В настоящее время достаточно много исследований по изучению эффективности гемотрансфузий, препаратов железа и ЭСА с целью коррекции АХЗ. Данные исследований по эффективности и безопасности этих методик достаточно противоречивы, необходимы дальнейшие исследования в этом направлении с целью разработки единых принципов диагностики и лечения этой анемии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Poggiali E., Migone De Amicis M., Motta I. Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases. *Eur J Inter Med* 2014;25(1):12–7. DOI: 10.1016/j.ejim.2013.07.011. PMID: 23988263.
- Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Reviews* 2002;16(2):87–96. PMID: 12127952.
- Weiss G., Goodnough L. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005;352(10):1011–23. DOI: 10.1056/NEJMr041809. PMID: 15758012.
- Means R. T. Jr. Recent developments in the anemia of chronic disease. *Curr Hematol Rep* 2003;2(2):116–21. PMID: 12901142.
- Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790(7):682–93. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.08.006. PMID: 18786614.
- Ganz T., Nemeth E. Hepsidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(9):1434–43. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014. PMID: 22306005.
- McCranor B., Kim M., Cruz N. et al. Interleukin-6 directly impairs the erythroid development of human TF-1 erythroleukemic cells. *Blood Cells Mol Dis* 2014;52(2–3):126–33. DOI: 10.1016/j.bcmd.2013.09.004. PMID: 24119518.
- Вуд М.Э., Банн П.А. Секреты гематологии и онкологии. М.: Бином, 1997. 560 с. [Wood M.E., Bunn P.A. Hematology/Oncology secrets. Moscow: Binom, 1997. 560 p. (In Russ.)].
- Анемии. Под. ред. О.А. Рукавицына. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. 256 с. [Anemias. Ed.: O.A. Rukavitsin, 2nd edition. Moscow: GEOTAR-Media, 2016, 256 p. (In Russ.)].
- Steinmetz T., Totzke U., Schweigert M. et al. A prospective observational study of anaemia management in cancer patients – results from the German Cancer Anaemia Registry. *Eur J Cancer Care* 2011;20(4):493–502. DOI: 10.1111/j.1365-2354.2010.01230.x. PMID: 21029222.
- Waters J., O'Brien M.E., Ashley S. Management of anemia in patients receiving chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002;20(2):601–3. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.2.601. PMID: 11786593.
- Park S., Jung C., Kim K. et al. Iron deficient erythropoiesis might play key role in development of anemia in cancer patients. *Oncotarget* 2015;6(40):42803–12. DOI: 10.18632/oncotarget.5658. PMID: 26517509.
- Arezes J., Nemeth E. Hepsidin and iron disorders: new biology and clinical approaches. *Int J Lab Hematol* 2015;37(Suppl. 1):92–8. DOI: 10.1111/ijlh.12358. PMID: 25976966.
- Nicolas G., Bennoun M., Porteu A. et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(7):4596–601. DOI: 10.1073/pnas.072632499. PMID: 11930010.
- Andrews N. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 2004;113(9):1251–3. DOI: 10.1172/JCI21441. PMID: 15124013.
- Moldawer L., Marano M., Wei H. et al. Cachectin/tumor necrosis factor- α alters red blood cell kinetics and induces anemia *in vivo*. *FASEB J* 1989;3(5):1637–43. PMID: 2784116.
- Галушко Е.А. Клиническое значение определения гепсидина при анемии у больных ревматоидным артритом. *Клиническая медицина* 2014;92(6):21–7. [Galushko E.A. The clinical significance of hepcidin detection in patients with anemia and rheumatoid arthritis. *Klinicheskaya meditsina* = Clinical medicine 2014;92(6):21–7. (In Russ.)].
- Raj D. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. *Semin Arthritis Rheum* 2009;38(5):382–8.

- DOI: 10.1016/j.semarthrit.2008.01.006. PMID: 18336871.
19. Wrighting D., Andrews N. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood* 2006;108(9):3204–9. DOI: 10.1182/blood-2006-06-027631. PMID: 16835372.
 20. De Lurdes Agostinho Cabrita A., Pinho A., Malho A. et al. Risk factors for high erythropoiesis stimulating agent resistance index in pre-dialysis chronic kidney disease patients, stages 4 and 5. *Int Urol Nephrol* 2011;43(3):835–40. DOI: 10.1007/s11255-010-9805-9. PMID 20640598.
 21. Nazemian F., Karimi G., Moatamedi M. et al. Effect of silymarin administration on TNFalpha serum concentration in peritoneal dialysis patients. *Phytother Res* 2010;24(11):1654–7. DOI: 10.1002/ptr.3175. PMID: 21031623.
 22. Ludwig H., Fritz E., Leitgeb C. et al. Prediction of response to erythropoietin treatment in chronic anemia of cancer. *Blood* 1994;84(4):056–63. PMID: 7741835.
 23. Schilling R. Anemia of chronic disease: a misnomer? *Ann Intern Med* 1991;115(7):572–3. PMID: 1883128.
 24. Kennedy R., Ovsyannikova I., Haralambieva I. et al. Genome-wide SNP associations with rubella-specific cytokine responses in measles-mumps-rubella vaccine recipients. *Immunogenetics* 2014;66(7–8):493–9. DOI: 10.1007/s00251-014-0776-3. PMID: 24811271.
 25. Wilson A., Reyes E., Ofinan J. Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004;116(Suppl. 7A): 44–9. DOI: 10.1016/j.amjmed.2003.12.011. PMID: 15050885.
 26. Nairz M., Haschka D., Demetz E. et al. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol* 2014;(5):152. DOI: 10.3389/fphar.2014.00152. PMID: 25076907.
 27. Steinmetz T., Tschenechne B., Harlin O. et al. Clinical experience with ferric carboxymaltose in treatment of cancer- and chemotherapy-associated anemia. *Ann Oncol* 2013;24(2):475–82. DOI: 10.1093/annonc/mds338. PMID: 23071262.
 28. Maury C., Liljestrom M., Laiho K. et al. Tumor necrosis factor alpha, its soluble receptor I, and –308 gene promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis with or without amyloidosis: implications for the pathogenesis of nephropathy and anemia of chronic disease in reactive amyloidosis. *Arthritis Rheum* 2003;48(11):3068–70. DOI: 10.1002/art.11294. PMID: 14613268.
 29. Brissot P., Ropert M., Lee L., Loreal O. Non transferring bound iron: key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(3):403–10. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.07.014. PMID: 21855608.
 30. Tarantino G., Brilli E., Giordano G., Torelli A. Innovative oral iron supplement (sucrosomial iron) is able to downregulate hepcidin release during inflammation: in vitro study. *Blood* 2015;(126):4563–5.
 31. Gangat N., Wolanskyj A. Anemia of chronic disease. *Semin Hematol* 2013;50(3):232–238. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2013.06.006. PMID: 23953340.
 32. Miyazono K., Kamiya Y., Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *The Journal of Biochemistry* 2010;147(1): 35–51. DOI: 10.1093/jb/mvp148. PMID: 19762341.
 33. Han X., Zhou D., Xu C. et al. Effect of erythropoietin on proinflammatory factors of human monocytes and its mechanisms (in Chinese). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2011; 19(3):738–43. PMID: 21729562.
 34. Herfs R., Fleitmann L., Kocsis I. Treatment of iron deficiency with or without anaemia with intravenous ferric carboxymaltose in gynaecological practices – a non-interventional study. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2014;74(1):81–8. DOI: 10.1055/s-0033-1360223. PMID: 24741123.
 35. Rizzo J., Brouwers M., Hurley P. et al. ASH/ASCO clinical practice guideline update on the use epoetin and darbepoetin in adult patients with cancer. *J Oncol Pract* 2010;6(6):317–20. DOI: 10.1200/JOP.2010.000132. PMID: 21358963.
 36. Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(Suppl. 7): 36–40. PMID: 11590255.
 37. Bohlius J., Schmidlin K., Brillant C. et al. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: A meta-analysis of randomized trials. *Lancet* 2009;373(9674):1532–42. DOI: 10.1016/S0140-6736(09) 60502-X. PMID: 19410717.
 38. Glaspy J., Crawford J., Vansteenkiste J. et al. Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *Br J Cancer* 2010;102(2):301–15. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605498. PMID: 20051958.
 39. Tsuboi M., Ezaki K., Tobinai K. et al. Weekly administration of epoetin beta for chemotherapy-induced anemia in cancer patients: Results of multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Jpn J Clin Oncol* 2009;39(3): 163–8. DOI: 10.1093/jjco/hyn151. PMID: 19164318.
 40. Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2011; 19(3):738–43. PMID: 21729562.

Вклад авторов

В.Т. Сахин, Е.Р. Маджанова, Е.В. Крюков, С.П. Казаков, О.А. Рукавицын: концепция и дизайн;
В.Т. Сахин, Е.Р. Маджанова, С.П. Казаков: сбор и анализ данных;
В.Т. Сахин, Е.Р. Маджанова, Е.В. Крюков, О.А. Рукавицын: подготовка рукописи;
О.А. Рукавицын: окончательное одобрение рукописи.

Authors' contributions

V.T. Sakhin, E.R. Madzhanova, E.V. Kryukov, S.P. Kazakov, O.A. Rukavitsin: concept and design;
V.T. Sakhin, E.R. Madzhanova, S.P. Kazakov: data collection, data analysis;
V.T. Sakhin, E.R. Madzhanova, E.V. Kryukov, O.A. Rukavitsin: article writing;
O.A. Rukavitsin: final approval of the article.

ORCID авторов

В.Т. Сахин: <https://orcid.org/0000-0001-5445-6028>
О.А. Рукавицын: <https://orcid.org/0000-0002-1309-7265>

ORCID of authors

V.T. Sakhin: <https://orcid.org/0000-0001-5445-6028>
O.A. Rukavitsin: <https://orcid.org/0000-0002-1309-7265>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Влияние несовместимости по гену *HLA-DPB1* на результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора

Е.Г. Хамаганова, Е.Н. Паровичникова, Л.А. Кузьмина, С.М. Куликов,
Е.П. Кузьминова, Р.С. Чапова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Екатерина Георгиевна Хамаганова ekhamat@mail.ru

Введение. Совместимость донора и реципиента по *HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*-генам является «золотым стандартом» при подборе неродственного донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллотГСК), так как несовпадение повышает частоту реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и ухудшает выживаемость, однако значение расхождения по аллелям гена *HLA-DPB1* остается неопределенным.

Цель исследования — оценка влияния расхождения по аллелям гена *HLA-DPB1* на исход аллотГСК от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 49 больных с различными гемобластомами, которым в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ МЗ РФ было выполнено 52 аллотГСК от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора. Высокоразрешающее типирование гена *HLA-DPB1* проводили методом полимеразной цепной реакции с секвенс-специфическими праймерами у пар донор — реципиент, которые совпали по вариантам генов *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1* при типировании с высоким разрешением. Общая выживаемость (ОВ), бессобытийная выживаемость (БСВ), выживаемость без острой РТПХ (ОРТПХ) рассчитаны по методу Каплана—Майера. Для оценки статистической значимости различий выживаемости использовали лог-ранг-тест. Многофакторный анализ проведен с применением регрессионной модели Кокса.

Результаты. Трехлетняя ОВ после аллотГСК составила 68 %, 3-летняя БСВ — 51 %, 3-летняя выживаемость без ОРТПХ — 62 %. Несовпадение донора и больного по *DPB1*-аллелям не оказывало статистически значимого влияния на ОВ, БСВ и повышение вероятности развития ОРТПХ после аллотГСК; однако у больных с аллотГСК от донора с непермиссивным несовпадением по *DPB1*-аллелям наблюдалась тенденция к повышению БСВ. Факторами риска развития ОРТПХ после аллотГСК от неродственного *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого донора были трансплантация стволовых клеток периферической крови, продвинутая стадия основного заболевания и мужской пол реципиента.

Заключение. Факторы риска развития ОРТПХ после аллотГСК от неродственного *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого донора — трансплантация стволовых клеток периферической крови; продвинутая стадия основного заболевания, мужской пол реципиента. Для более точной оценки влияния несоответствия донора и больного по *DPB1*-аллелям на исход аллотГСК необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, неродственный донор, реакция «трансплантат против хозяина», ген *HLA-DPB1*, совместимость

Для цитирования: Хамаганова Е.Г., Паровичникова Е.Н., Кузьмина Л.А. и др. Влияние несовместимости по гену *HLA-DPB1* на результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора. Онкогематология 2018;13(1):54–62.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-54-62

Impact of *HLA-DPB1* incompatibility on the results of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation from *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-compatible unrelated donor

E.G. Khamaganova, E.N. Parovichnikova, L.A. Kuzmina, S.M. Kulikov, E.P. Kuzminova, R.S. Chapova, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology; 4 Novyi Zykovskiy proezd, 125167 Moscow, Russia

Introduction. An accepted fact in allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) from unrelated donors is that matching for HLA genes is critical to ensure the best outcomes for patients. The current gold standard is an unrelated donor matched for 10/10 HLA alleles (*HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1*). In the HLA-mismatched setting graft-versus-host disease (GVHD) is increased, and overall survival becomes significantly worse. The importance of *HLA-DPB1* mismatching is more controversial.

The aim of our study was to evaluate the impact of *HLA-DPB1* mismatches on outcome of patients who underwent 10/10 HLA matched unrelated HSCT.

Materials and methods. 49 patients treated with allo-HSCT in transplant center of National Research Center for Hematology from 10/10 HLA-matched unrelated donors were included in the study. High-resolution typing for HLA-DPB1 was done by PCR with sequence specific primers (SSP) using Olerup typing kits. HLA-DPB1 permissive/nonpermissive mismatches were examined according to TCE groups. Overall survival, event-free survival and survival without acute graft-versus-host disease were calculated by Kaplan–Meier method, and compared with log-rank test. Proportional hazard Cox models were used for multivariate analysis.

Results. The 3-year overall survival after allo-HSCT was 68 %, event-free survival – 51 %, acute GVHD-free survival – 62 %. No significant impacts of HLA-DPB1 disparities on overall, event-free survival and probability of acute graft-versus-host disease were observed. Patients with nonpermissive HLA-DPB1-incompatible donors had a tendency to increased event-free survival. The factors significantly increasing risk of acute GVHD were peripheral blood grafts, advanced-stage disease and male gender of recipients.

Conclusion. The factors associated with acute GVHD are peripheral blood grafts, advanced-stage disease and male sex of recipients. For more precise evaluation of impact of HLA-DPB1-incompatibility on results of allo-HSCT further investigations are needed.

Key words: allo-HSCT, unrelated donor, GVHD, HLA-DPB1, compatibility

For citation: Khamaganova E.G., Parovichnikova E.N., Kuzmina L.A. et al. Impact of HLA-DPB1 incompatibility on the results of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation from HLA-A-B-C-DRB1-DQB1-compatible unrelated donor. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):54–62.

Введение

У большинства больных, нуждающихся в трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллотГСК), отсутствует HLA-идентичный родственный донор, поэтому возникает необходимость в поиске неродственного донора [1]. Совпадение донора и реципиента по аллелям генов *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1* повышает показатели выживаемости после аллотГСК, однако влияние расхождения по аллелям гена *HLA-DPB1* остается неопределенным [2–4]. Слабое неравновесное сцепление локуса *HLA-DP* с другими генами *HLA*-системы ведет к тому, что несовпадение по аллелям *HLA-DPB1* наблюдается примерно в 80 % неродственных аллотГСК [3–5]. Классификация *HLA-DPB1*-аллелей по группам Т-клеточных эпитопов (ТСЕ) [6] позволяет идентифицировать пермиссивные (допустимые) комбинации донор – реципиент, ассоциирующиеся с низким клиническим риском, и непермиссивные (недопустимые) комбинации с высоким клиническим риском. *HLA-DPB1*-аллели делятся на 3 группы ТСЕ в зависимости от того, распознаются ли они всеми Т-клонами – группа ТСЕ1 (с сильной иммуногенностью): *DPB1**09:01, 10:01, 17:01; некоторыми клонами – группа ТСЕ2 (со средней иммуногенностью): *DPB1**03:01, 14:01, 45:01, 86:01, 104:01; или не распознаются – группа ТСЕ3 (со слабой иммуногенностью): *DPB1**01:01, 02:01, 02:02, 04:01, 04:02, 05:01, 06:01, 11:01, 13:01, 15:01, 16:01, 19:01, 20:01, 23:01, 46:01. Пермиссивные и непермиссивные несовпадения пары донор – реципиент классифицируют в зависимости от принадлежности аллелей *DPB1* к одной и той же или разным группам [6–8]. Имеется корреляция так называемой функциональной дистанции между ТСЕ-группами и комбинацией аминокислотных замен в пептидсвязывающем сайте молекул *HLA-DP* [5, 9]. Web-инструмент, позволяющий идентифицировать комбинации *HLA-DPB1*-аллелей пары донор – реципиент при поиске неродственного донора, доступен на сайте <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html> [10].

Непермиссивные расхождения донора и реципиента по *HLA-DPB1*-аллелям коррелируют с развитием тяжелой формы острой реакции «трансплантат против хозяина» (ОРТПХ) и повышением летальности после аллотГСК [3, 8, 11]. Однако совпадение по *DPB1*-аллелям повышает частоту рецидива [3], а непермиссивные комбинации, напротив, снижают риск его развития после аллотГСК [11]. Однако не все исследователи выявили влияние расхождений по *HLA-DPB1* на выживаемость после аллотГСК и развитие острой и хронической РТПХ, хотя отмечено, что 2 несовпадения по *HLA-DPB1* ухудшают прогноз у больных после аллотГСК [4].

Цель исследования – оценить влияние расхождения по аллелям гена *HLA-DPB1* на исход аллотГСК от совместимого по 10 из 10 генов (10/10) *HLA (A-B-C-DRB1-DQB1)* неродственного донора.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 49 больных (18 мужчин – 37 % и 31 женщина – 63 %), которым в отделении трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ МЗ РФ с октября 2012 г. по сентябрь 2016 г. выполнено 52 аллотГСК от неродственных доноров, совместимых по 10 из 10 генов *HLA (A-B-C-DRB1-DQB1)* на уровне высокого разрешения. Медиана возраста пациентов составила 34 года (диапазон 19–55 лет). Медиана возраста доноров – 32 года (диапазон 22–56 лет). Диагнозы: острый миелоидный лейкоз – 27 (55 %) пациентов, острый лимфобластный лейкоз – 17 (35 %), хронический миелолейкоз – 1 (2 %) пациент, хронический миеломоноцитарный лейкоз – 1 (2 %), хронический лимфолейкоз – 1 (2 %), лимфома – 2 (4 %) пациента. В соответствии со статусом заболевания на момент аллотГСК всех участников разделили на 2 группы. Первая группа – больные на ранней стадии заболевания, куда вошли пациенты с острыми лейкозами в 1-ю ремиссию и больные хроническим миелолейкозом в 1-ю хроническую фазу. Вторую группу составили лица в продвинутой стадии заболевания – остальные пациенты.

Характеристика больных и их доноров по группам ТСЕ и другим факторам, влияние которых на развитие оРТПХ анализировалось, приведена в табл. 1.

Высокоразрешающее типирование гена *HLA-DPB1* проводили методом PCR-SSP (полимеразная цепная реакция с сиквенс-специфическими праймерами) с использованием набора Olegur SSP (Швеция) у пар донор – реципиент, которые совпали по вариантам

генов *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1* при типировании с высоким разрешением. Каждая пара была классифицирована как *HLA-DPB1*-совместимая, с пермиссивным несовпадением по *HLA-DPB1*, с непермиссивным несовпадением согласно обновленному в соответствии с публикацией Р. Crivello и соавт., 2015 [5] алгоритму (version 2.0), доступному на сайте www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html [10].

Таблица 1. Характеристика больных и их доноров по группам Т-клеточных эпитопов и другим факторам, потенциально влияющим на развитие острой реакции «трансплантат против хозяина»

Table 1. Characteristics of patients and their donors by TCE groups and other factors potentially affecting the development of aGVHD

Характеристика Characteristics		Статус больного, n (%) Patient status, n (%)	
		Ранняя стадия заболевания Early disease stage (n = 25)	Продвинутая стадия заболевания Advanced disease stage (n = 27)
Статус пары донор – реципиент по группам ТСЕ Status of donor-recipient pair by TCE groups	Совпадение Compatible	3 (5,8)	7
	Пермиссивное несовпадение Permissive mismatch	14 (26,9)	10 (19,2)
	Непермиссивное несовпадение, из них: Non-permissive mismatch, of which:	8 (15,4)	10 (19,2)
	в направлении GvH* in GvH direction* в направлении HvG** in HvG direction**	4 (7,7) 4 (7,7)	5 (9,6) 5 (9,6)
Источник ГСК HSC source	СКК PBSC	14 (26,9)	19 (36,5)
	КМ BM	11 (21,2)	8 (15,4)
Режим кондиционирования Conditioning regimen	Миелоаблативный Myeloablative	6 (11,5)	4 (7,7)
	Немиелоаблативный Non-myeloablative	19 (36,5)	23 (44,2)
Комбинация донор – реципиент по полу The donor-recipient combination by gender	Совпадают Compatible	9 (17,4)	13 (25,0)
	М (донор)/Ж (реципиент) M (donor)/F (recipient)	10 (19,2)	6 (11,5)
	Ж (донор)/М (реципиент) F (donor)/M (recipient)	1 (1,9)	3 (5,8)
	Неизвестно Unknown	5 (9,6)	5 (9,6)
оРТПХ aGVHD	II–IV степени II–IV degrees	6 (11,5)	13 (25,0)
	III–IV степени III–IV degrees	2 (3,8)	8 (15,4)

Примечание: ГСК – гемопоэтические стволовые клетки, КМ – костный мозг, СКК – стволовые клетки крови, оРТПХ – острая реакция «трансплантат против хозяина», ТСЕ – Т-клеточные эпитопы. *GvH (graft-versus-host) – несовпадение в направлении «трансплантат против хозяина». **HvG (host-versus-graft) – несовпадение в направлении «хозяин против трансплантата».

Note: aGVHD – acute graft-versus-host disease; HSC – hematopoietic stem cells; PBSC – peripheral blood stem cells; BM – bone marrow. *GvH (graft-versus-host) – mismatch in the graft-versus-host direction. **HvG (host-versus-graft) – mismatch in the host-versus-graft direction.

Конечные точки исследования: общая выживаемость (ОВ) — время от момента аллотГСК до смерти от любых причин; бессобытийная выживаемость (БСВ) — время от момента аллотГСК до развития рецидива (как молекулярного, так и гематологического), отторжения трансплантата, или смерти от любых причин, а также оРТПХ II–IV степени. Степени оРТПХ определялись в соответствии с критериями Н. Glucksberg и соавт. (1974) [12]. Точка цензурирования — дата последней информации о пациенте. ОВ, БСВ, выживаемость без оРТПХ рассчитаны по методу Каплана–Майера. Для оценки статистической значимости различий выживаемости использовали log-ранг-тест. Многофакторный анализ проведен с использованием регрессионной модели Кокса. Пороговый уровень статистической значимости — 0,05. Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью статистического пакета SAS 9.3.

Результаты

Распределение пар доноры — реципиенты по ТСЕ-группам (см. табл. 1) в целом соответствовало приводимым в литературных источниках данным [3–4]. По аллелям гена *HLA-DPB1* совпало 10 (19,2 %) пар донор — реципиент, 24 пары (46,1 %) имели пермиссивное расхождение, 18 пар (34,6 %) — непермиссивное расхождение (у 17,5 % пар имелось несовпадение в направлении «трансплантат против хозяина» и у 17,5 % пар — в направлении «хозяин против трансплантата»).

Трехлетняя ОВ после аллотГСК всех участников исследования составила 68 %, 3-летняя БСВ — 51 %, 3-летняя выживаемость без острой РТПХ — 62 %.

В табл. 2 представлены результаты однофакторного событийного анализа для ОВ, БСВ и вероятности развития РТПХ.

Следует отметить, что только в 4 (7,7 %) случаях аллотГСК была выполнена реципиентам-мужчинам от доноров-женщин, в остальных 48 (92,3 %) случаях гендерная комбинация донор — реципиент была иной (см. табл. 1), поэтому из гендерных параметров анализировалось влияние на результаты аллотГСК только пола реципиента.

Не выявлено статистически достоверных различий между ОВ у пациентов, совпадающих с донором по аллелям гена *HLA-DPB1* (3-летняя ОВ составила 65 %), имеющих пермиссивное расхождение с донором по аллелям гена *HLA-DPB1* (3-летняя ОВ — 65 %) и имеющих непермиссивное расхождение с донором (3-летняя ОВ — 79 %). Оценка БСВ в группе больных, у которых имелось непермиссивное расхождение с донором по ТСЕ-группам гена *HLA-DPB1* (3-летняя БСВ — 75 %), была несколько выше, чем в группе пациентов, совпавших с донором по *HLA-DPB1* (3-летняя БСВ — 37,5 %) или имевших допустимое *HLA-DPB1*-несовпадение (3-летняя БСВ — 40 %), $p = 0,13$ (рис. 1).

Число несовпадений по ТСЕ-группам не оказывало видимого влияния на показатели ОВ, БСВ и вероятность развития оРТПХ.

Острая РТПХ статистически достоверно чаще развивалась у пациентов, источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) у которых являлись стволовые клетки крови (СКК), полученные после стимуляции гранулоцитарными колониестимулирующими факторами, по сравнению с участниками, у которых источником ГСК был костный мозг (КМ), $p = 0,0054$ (рис. 2).

Помимо источника ГСК на вероятность развития оРТПХ в посттрансплантационном периоде влияла стадия заболевания пациента на момент проведения аллотГСК. Острая РТПХ II–IV степени статистически достоверно ($p = 0,04$) чаще наблюдалась у пациентов с развернутой стадией заболевания, чем у лиц с ранней стадией (рис. 3).

Тенденция к повышению частоты оРТПХ II–IV степени наблюдалась у реципиентов-мужчин по сравнению с реципиентами-женщинами ($p = 0,06$). Также тенденцию к более частому развитию оРТПХ имели больные, которым предтрансплантационное кондиционирование проводили в немиелоаблативных режимах по сравнению с пациентами с миелоаблацией ($p = 0,06$).

Поскольку наиболее значимое влияние на вероятность развития оРТПХ в посттрансплантационном периоде оказывала периферическая кровь как источник ГСК, было проведено более подробное исследование пациентов, источником ГСК у которых являлись СКК. У этих больных не установлено статистически значимого влияния на вероятность развития оРТПХ несовпадения по группам ТСЕ *HLA-DPB1*-аллелей и числа несовпадений. Стадия заболевания (ранняя против продвинутой) и режим кондиционирования перед аллотГСК (миелоаблативный режим против режима пониженной интенсивности) также не оказывали статистически значимого влияния на вероятность развития оРТПХ. Однако у реципиентов-мужчин риск

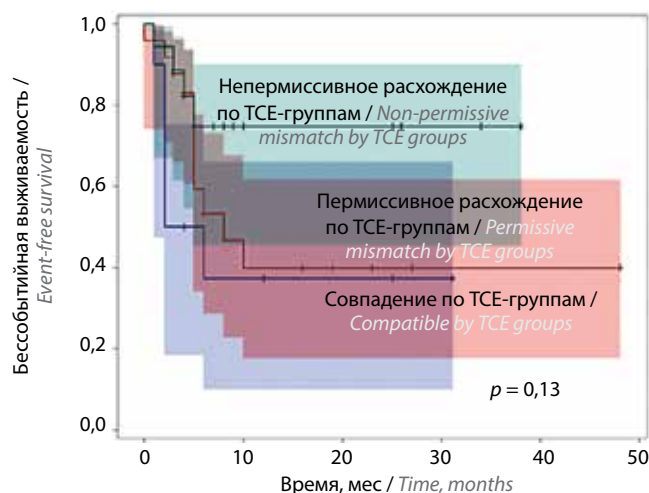


Рис. 1. Бессобытийная выживаемость в зависимости от совпадения пар донор — реципиент по ТСЕ-группе: совместимые/с пермиссивным несовпадением/с непермиссивным несовпадением
Fig. 1. EFS by donor-recipient pairs matching by TCE group: compatible/permissive mismatch/non-permissive mismatch

Таблица 2. Факторы, влияющие на исход аллогенной трансплантации костного мозга

Table 2. Factors affecting the allo-HSCT outcome

Фактор и его значения Factors	3-летняя ОВ 3-years OS		3-летняя БСВ 3-years EFS		Вероятность развития оРТПХ II–IV степени к 3-му году 3-year probability of II–IV gr. acute GVHD development	
	%	p	%	p	%	p
Совместимость донора и реципиента по группам ТСЕ: Compatibility of donor and recipient by TCE groups:						
Совместимые Compatible	65	0,76	38	0,13	60	0,34
С пермиссивным несовпадением Permissive mismatch	65		40		35	
С непермиссивным несовпадением Non-permissive mismatch	79		75		30	
Число несовпадений донора и реципиента по группам ТСЕ: The number of donor-recipient mismatches by TCE groups:						
0 несовпадений 0 mismatches	65	0,77	38	0,44	60	0,62
1 пермиссивное 1 permissive	56		39		33	
1 непермиссивное 1 non-permissive	83		73		—	
2 пермиссивных 2 permissive	83		—		—	
1 пермиссивное + 1 непермиссивное 1 permissive + 1 non-permissive	83		—		—	
2 пермиссивных 2 permissive	57		57		25	
1 пермиссивное + 1 непермиссивное 1 permissive + 1 non-permissive	—		—		35	
Пол реципиента: Recipient genders:						
мужской M	68	0,61	49	0,53	53	0,06
женский F	68		52		30	
Статус по основному заболеванию: Disease status:						
Ранняя стадия заболевания Early disease stage	66	0,84	40	0,14	24	0,04
Продвинутая стадия заболевания Advanced disease stage	70		62		48	
Источник ГСК: HSC source:						
КМ BM	83	0,34	60	0,41	11	0,005
СКК PBSC	61		48		53	
Режим кондиционирования: Conditioning regimen:						
Миелоаблативный Myeloablative	100	0,14	80	0,33	13	0,06
Немиелоаблативный non-myeloablative	64		46		45	

Примечание: БСВ — бессобытийная выживаемость, ГСК — гемопоэтические стволовые клетки, КМ — костный мозг, ОВ — общая выживаемость, оРТПХ — острая реакция «трансплантат против хозяина», СКК — стволовые клетки крови, ТСЕ — Т-клеточные эпитопы

Note: GVHD — graft-versus-host disease; OS — overall survival; EFS — event-free survival; HSC — hematopoietic stem cells; PBSC — peripheral blood stem cells; BM — bone marrow.

Таблица 3. Вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» II–IV степени по результатам многофакторного анализа

Table 3. The probability II–IV gr. acute GVHD by multivariate analysis

Фактор Factor	Отношение рисков Hazard ratio (RR)	<i>p</i>
Продвинутая стадия заболевания Advanced disease stage	2,7	0,046
Реципиенты-женщины Recipients – female	0,4	0,052

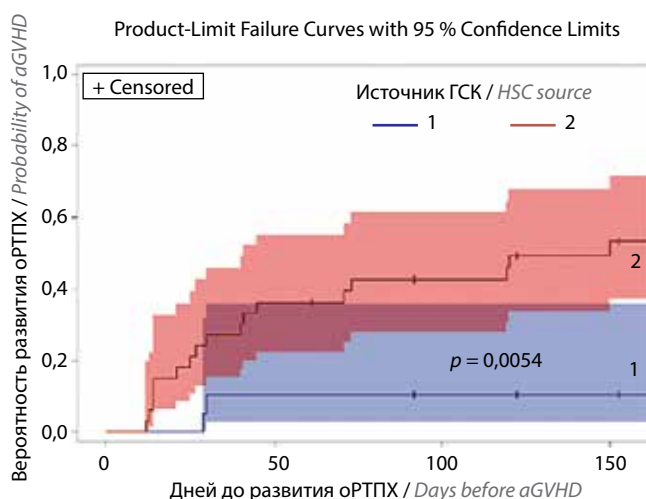


Рис. 2. Вероятность развития острой реакции «трансплантат против хозяина» II–IV степени в зависимости от источника гемопоэтических стволовых клеток (1 – костный мозг, 2 – стволовые клетки крови)

Fig. 2. The probability of 2–4 gr. aGVHD by HSC source (1 – BM, 2 – PBSC)

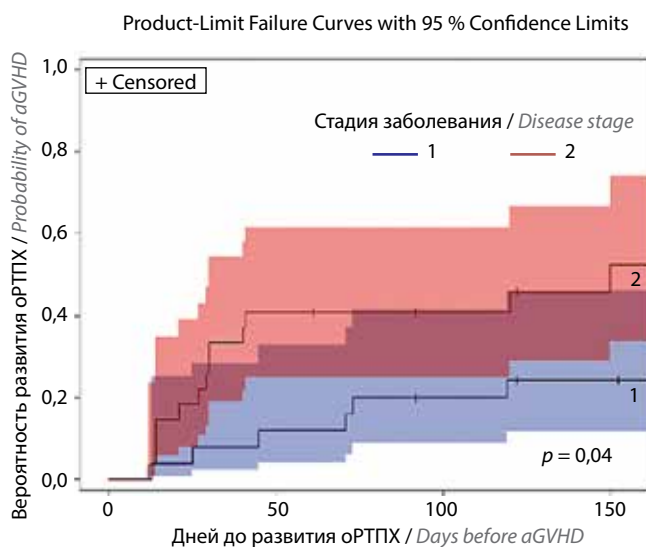


Рис. 3. Вероятность развития реакции «трансплантат против хозяина» II–IV степени в зависимости от стадии заболевания (1 – ранняя стадия, 2 – продвинутая стадия)

Fig. 3. The probability of 2–4 gr. GVHD by disease stage (1 – early stage; 2 – advanced stage)

развития оРТПХ был несколько выше, чем у реципиентов-женщин ($p = 0,105$).

Исследование больных, которым аллотГСК была выполнена в ранней стадии, показало, что несовпадение по группам ТСЕ, число несовпадений, режим кондиционирования и пол больного не оказывали заметного влияния на вероятность развития оРТПХ. У лиц, которым аллотГСК была выполнена в продвинутой стадии заболевания, несовпадение по *HLA-DPB1*-аллелям, число несовпадений и режим кондиционирования не имели статистически значимого влияния на риск развития оРТПХ, но у реципиентов-мужчин по сравнению с реципиентами-женщинами вероятность развития оРТПХ была статистически достоверно выше ($p = 0,004$).

Для учета возможного взаимодействия между факторами прогноза риска развития РТПХ и отбора среди них наиболее значимых и независимых был проведен многофакторный регрессионный событийный анализ. В анализ в качестве исходного был включен следующий набор признаков: совместимость донора и реципиента по ТСЕ-группам, пол реципиента, статус основного заболевания, источник ГСК, режим кондиционирования. В табл. 3 приведены отобранные в результате факторы. Подтверждено значение признака «статус по основному заболеванию» как независимого фактора прогноза оРТПХ.

Продвинутая стадия заболевания была существенным неблагоприятным фактором, повышающим риск возникновения оРТПХ II–IV степени в посттрансплантационном периоде почти в 3 раза (отношение рисков (ОР) 2,7). У реципиентов-женщин имела тенденция к снижению вероятности развития оРТПХ II–IV степени по сравнению с реципиентами-мужчинами (ОР 0,4)

Обсуждение

Совместимость донора и реципиента по высокому разрешению по *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*-генам в настоящее время является «золотым стандартом» при подборе неродственного донора для аллотГСК, так как несовпадение повышает частоту РТПХ и ухудшает выживаемость [13]. В отношении гена *HLA-DPB1* – 6-го классического HLA-локуса – сохраняется неопределенность, и этот ген не принимают во внимание при рутинном типировании при селекции неродственного донора [2, 3]. Несовместимость по *HLA-DP* может быть специфической мишенью эффекта «трансплантат против лейкоза», так как молекула *HLA-DP* способна подобно другим молекулам *HLA* стимулировать аллореактивность. Так, у больных после аллотГСК с несовместимостью по *DPB1*-гену возможно появление *DPB1*-специфических Т-клеток [14]. При этом иммуногенность *HLA-DP*-молекул чревата развитием РТПХ, поэтому предпринимаются попытки разграничить «приемлемые» и «неприемлемые» несовместимости по *DPB1*-аллелям. Одной из подобных попыток

является классификация *DPB1*-аллелей по ТСЕ-группам. Однако до сих пор нет однозначного ответа на вопрос, позволяет ли эта классификация действительно предсказывать несовпадения по *DPB1*-аллелям, которых следует избегать, так как результаты исследований противоречивы [2–5, 11].

В нашем исследовании несовпадение донора и больного по *HLA-DPB1*-аллелям не приводило к существенному ухудшению ОВ, БСВ и повышению вероятности развития оРТПХ. Напротив, у пациентов, которым аллогенная трансплантация КМ была выполнена от донора с так называемым непермиссивным несовпадением, отмечена тенденция к повышению БСВ, а больные, совпадающие с донором по *DPB1*-аллелям, имели худшие показатели выживаемости. Снижение риска развития рецидива при аллотГСК от *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого неродственного донора с непермиссивным расхождением по *HLA-DPB1* в направлении ТПХ отмечено в работе К. Fleischhauer и соавт., 2014 [11]. Вероятно, что у некоторых больных непермиссивное несовпадение может стимулировать эффект «трансплантат против лейкоза», что и реализовалось в улучшении показателей БСВ у наших больных. К сожалению, незначительное число наблюдений в нашем исследовании не позволяет надежно оценить и взвесить эффекты непермиссивных расхождений, которые требуют дальнейшего изучения.

Значимым фактором риска развития оРТПХ после аллотГСК от неродственного 10/10 совместимого донора являлся источник ГСК, а именно трансплантация СКК. В настоящее время СКК, полученные после стимуляции гранулоцитарными колониестимулирующими факторами, — наиболее часто используемый

источник ГСК, однако трансплантация СКК в отличие от трансплантации КМ значительно увеличивает риск развития как оРТПХ [15], так и хронической [16]. Также трансплантация СКК по сравнению с трансплантацией КМ ухудшает выживаемость без РТПХ / рецидива (новый композитный показатель, учитывающий критически значимые для больного события после аллотГСК) [17–18].

Факторами риска развития оРТПХ являлись также продвинутая стадия основного заболевания к моменту аллотГСК и мужской пол больного. Известно, что на Y-хромосоме кодируется ряд минорных антигенов гистосовместимости, поэтому у реципиентов-мужчин при трансплантации ГСК от доноров-женщин отмечается повышение частоты РТПХ, хотя уменьшается частота рецидива гемобластоза [19–20].

Заключение

Основные факторы риска развития оРТПХ после аллотГСК от неродственного *HLA-A-B-C-DRB1-DQB1*-совместимого донора — трансплантация стволовых клеток периферической крови, продвинутая стадия основного заболевания к моменту аллотГСК и мужской пол реципиента. Несовпадение донора и больного по *DPB1*-аллелям в соответствии с ТСЕ-классификацией не оказывает статистически значимого влияния на ОВ и БСВ и повышение вероятности развития оРТПХ после аллотГСК, однако у больных с аллотГСК от донора с непермиссивным несовпадением по *DPB1*-аллелям наблюдается некоторая тенденция к повышению БСВ. Дальнейшие исследования помогут дать более точную оценку влияния несоответствия донора и больного по *DPB1*-аллелям на исход аллотГСК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Программное лечение заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко М.: Практика, 2012. 1056 с. [Program treatment of blood system diseases. Ed.: Savchenko V.G. 2012, Moscow: Praktika. 1056 p. (In Russ.)].
2. Shaw B.E., Mayor N.P., Russell N.H. et al. Diverging effects of HLA-DPB1 matching status on outcome following unrelated donor transplantation depending on disease stage and the degree of matching for other HLA alleles. *Leukemia* 2010;24(1):58–65. DOI: 10.1038/leu.2009.239. PMID: 19924143.
3. Pidala J., Lee S.J., Ahn K.W., et al. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2014;124(16):2596–606. DOI: 10.1182/blood-2014-05-576041. PMID: 25161269.
4. Gagne K., Loiseau P., Dubo V. et al. Is there any impact of HLA-DPB1 disparity in 10/10 HLA-matched unrelated hematopoietic SCT? Results of a French multicentric retrospective study. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(2):232–6. DOI: 10.1038/bmt.2014.253. PMID: 25365066.
5. Crivello P., Zito L., Sizzano F. et al. The impact of amino acid variability on alloreactivity defines a functional distance predictive of permissive HLA-DPB1 mismatches in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(2):233–41. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.10.017. PMID: 25445022.
6. Zino E., Vago L., Di Terlizzi S. et al. Frequency and targeted detection of HLA-DPB1 T cell epitope disparities relevant in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(9):1031–40. DOI: 10.1016/j.bbmt.2007.05.010. PMID: 17697965.
7. Crocchiolo R., Zino E., Vago L. et al. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009;114(7):1437–44. DOI: 10.1182/blood-2009-01-200378. PMID: 17697965.
8. Fleischhauer K., Shaw B.E., Gooley T. et al. Effect of T-cell-epitope matching at HLA-DPB1 in recipients of unrelated-donor haematopoietic-cell transplantation: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2012;13(4):366–74. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70004-9. PMID: 22340965.
9. Crivello P., Heinold A., Rebmann V. et al. Functional distance between recipient and donor HLA-DPB1 determines

- nonpermissive mismatches in unrelated HCT. *Blood* 2016;128(1):120–9. DOI: 10.1182/blood-2015-12-686238. PMID: 27162243.
10. Shaw B.E., Robinson J., Fleischhauer K. et al. Translating the HLA-DPB1 T-cell epitope-matching algorithm into clinical practice. *Bone Marrow Transplant* 2013;48(12):1510–2. DOI: 10.1038/bmt.2013.91. PMID: 23811815.
 11. Fleischhauer K., Fernandez-Viña M.A., Wang T. et al. Risk associations between HLA-DPB1 T-cell epitope matching and outcome of unrelated hematopoietic cell transplantation are independent of HLA-DPA1. *Bone Marrow Transplant* 2014;49(9):1176–83. DOI: 10.1038/bmt.2014.122. PMID: 24955785.
 12. Glucksberg H., Storb R., Fefer A. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18(4):295–304. PMID: 4153799.
 13. Lee S.J., Klein J., Haagenson M. et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 2007;110:4576–83. DOI: 10.1182/blood-2007-06-097386. PMID: 17785583.
 14. Rutten C.E., van Luxemburg-Heijs S.A., Halkes C.J. et al. Patient HLA-DP-specific CD4+ T cells from HLA-DPB1-mismatched donor lymphocyte infusion can induce graft-versus-leukemia reactivity in the presence or absence of graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(1):40–8. DOI:10.1016/j.bbmt.2012.07.020. PMID: 22871556.
 15. Eapen M., Logan B.R., Confer D.L. et al. Peripheral Blood Grafts from Unrelated Donors Are Associated with Increased Acute and Chronic Graft-versus-Host Disease without Improved Survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(12):1461–8. DOI:10.1016/j.bbmt.2007.08.006. PMID: 18022576.
 16. Anasetti C., Logan B.R., Lee S.J. et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med* 2012;367(16):1487–96. DOI: 10.1056/NEJMoa1203517. PMID: 23075175.
 17. Holtan S.G., DeFor T.E., Lazaryan A. et al. Composite end point of graft-versus-host disease-free, relapse-free survival after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2015;125(8):1333–8. DOI: 10.1182/blood-2014-10-609032. PMID: 25593335.
 18. Inamoto Y., Kimura F., Kanda J. et al. Comparison of graft-versus-host disease-free, relapse-free survival according to a variety of graft sources: antithymocyte globulin and single cord blood provide favorable outcomes in some subgroups. *Haematologica* 2016;101(12):1592–602. DOI: 10.3324/haematol.2016.149427. PMID: 27662017.
 19. Spierings E., Kim Y.H., Hendriks M. et al. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;19(8):1244–53. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.06.001. PMID: 23756210.
 20. Popli R., Sahaf B., Nakasone H. et al. Clinical impact of H-Y alloimmunity. *Immunol Res* 2014;58(0):249–58. DOI: 10.1007/s12026-014-8514-3. PMID: 24781195.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам отделения интенсивной высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, принимавшим участие в ведении больных, включенных в исследование.

Acknowledgment. The authors are grateful to staff of Intensive Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation Department of the National Research Center for Hematology of Ministry of Health of Russia, which took part in the management of the patients included in the study.

Вклад авторов

Е.Г. Хамаганова: концепция, дизайн и написание статьи, сбор данных;
 Е.Н. Паровичникова: интерпретация данных, участие в написании статьи;
 Л.А. Кузьмина: ведение больных, предоставление материалов, интерпретация результатов;
 С.М. Куликов: проведение статистического анализа, участие в написании статьи;
 Е.П. Кузьмина: выполнение генотипирования, сбор данных;
 Р.С. Чапова: выполнение генотипирования;
 В.Г. Савченко: концепция, окончательное одобрение рукописи.

Authors' contributions

E.G. Khamaganova: concept, design and article writing, data collection;
 E.N. Parovichnikova: interpretation of data, article writing;
 L.A. Kuzmina: management of patients, provision of materials, interpretation of results;
 S.M. Kulikov: statistical analysis, article writing;
 E.P. Kuzminova: performance of genotyping, data collection;
 R.S. Chapova: performance of genotyping;
 V.G. Savchenko: concept, final approval of the article.

ORCID авторов

Е.Г. Хамаганова: <https://orcid.org/0000-0002-0110-3314>
 Е.Н. Паровичникова: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
 Л.А. Кузьмина: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>
 С.М. Куликов: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>
 Е.П. Кузьмина: <https://orcid.org/0000-0001-9473-4774>

Р.С. Чапова: <https://orcid.org/0000-0002-6749-8099>

В.Г. Савченко: <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

ORCID of authors

E.G. Khamaganova: <https://orcid.org/0000-0002-0110-3314>

E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

L.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0001-6201-6276>

C.M. Kulikov: <https://orcid.org/0000-0002-6288-7570>

E.P. Kuzminova: <https://orcid.org/0000-0001-9473-4774>

R.S. Chapova: <https://orcid.org/0000-0002-6749-8099>

V.G. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 04.11.2017. **Принята к публикации:** 14.03.2018

Article received: 04.11.2017. **Accepted for publication:** 14.03.2018

Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике миелодиспластических синдромов

Ю.О. Давыдова, И.В. Гальцева, А.В. Кохно, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Юлия Олеговна Давыдова juliya89mur@yandex.ru

Миелодиспластические синдромы (МДС) — гетерогенная группа клональных заболеваний системы кроветворения, характеризующихся цитопениями, признаками дисмиелопоэза, высокой частотой аномалий кариотипа и риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. Диагностика МДС требует комплексного подхода, но даже при выполнении цитологического, цитохимического, цитогенетического, молекулярно-генетического и гистологического исследований не всегда удается подтвердить диагноз. Многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ) — высокотехнологичный метод, часто применяемый в диагностике различных гематологических заболеваний. В течение последних лет активно проводится стандартизация МПЦ для оценки дисплазии во всех ростках кроветворения при МДС. Многими исследовательскими группами были продемонстрированы высокие показатели чувствительности и специфичности этого метода, что свидетельствует о необходимости интеграции МПЦ в диагностические протоколы МДС.

Ключевые слова: миелодиспластические синдромы, проточная цитофлуориметрия, иммунофенотипирование, лабораторная диагностика

Для цитирования: Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Кохно А.В., Паровичникова Е.Н. Роль многоцветной проточной цитофлуориметрии в диагностике миелодиспластических синдромов. Онкогематология 2018;13(1)63–72.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-63-72

Multicolor flow cytometry as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes

Yu.O. Davydova, I.V. Galtseva, A.V. Kokhno, E.N. Parovichnikova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyi Zыkovskiy proezd, 125167 Moscow, Russia

Myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous group of clonal hematological neoplasms characterized by cytopenias, signs of dysplasia and high risk of transformation in acute myeloid leukemia. Diagnostics of MDS requires a comprehensive approach, but even when performing cytological, cytogenetic, molecular and histological studies, it is not always possible to establish a diagnosis. Multicolor flow cytometry (MFC) is a high-tech method, increasingly used in the diagnosis of various hematologic diseases. Over the last years, MFC is standardized for assessing of dysplasia in all cell compartments of the bone marrow. Many research groups have demonstrated high sensitivity and specificity of this diagnostic approach, which indicates the necessity of integration of flow cytometric study into diagnostic protocols of MDS.

Key words: myelodysplastic syndromes, flow cytometry, immunophenotyping, diagnostic tools

For citation: Davydova Yu.O., Galtseva I.V., Kokhno A.V., Parovichnikova E.N. Multicolor flow cytometry as a diagnostic tool in myelodysplastic syndromes. Onkogematologiya = Oncohematology 2018;13(1)63–72.

Введение

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных заболеваний системы крови, характеризующихся цитопениями, признаками дисмиелопоэза, высокой частотой аномалий кариотипа и риском трансформации в острые миелоидные лейкозы. Существуют рекомендации Европейского общества LeukemiaNet по выбору стандартных диагностических процедур и терапевтических подходов для взрослых больных с первичным МДС. Ведущими симптомами являются цитопении, к которым относятся анемия (при уровне гемоглобина <100 г/л), нейтропения (когда абсолютное число нейтрофилов $<1,5 \times 10^9$ /л) и тромбоцитопения (при ко-

личестве тромбоцитов $<100 \times 10^9$ /л). Базовые методы диагностики этих заболеваний — цитологическое, цитохимическое, гистологическое и цитогенетическое исследования костного мозга (КМ) [1].

К цитологическому критерию МДС относится дисплазия в более чем 10 % клеток одной или нескольких линий гемопоэза (эритрокариоциты, нейтрофилы и/или мегакариоциты). Однако признаки дисплазии встречаются и при многих других заболеваниях (например, хронических миелопролиферативных заболеваниях — МПЗ), при реактивных состояниях и вирусных инфекциях (гепатиты В и С, вирус Эпштейна–Барр, парвовирус В19), а также при лечении химиотерапевтическими препаратами. Дизэритропоэз возникает

при мегалобластных анемиях, аутоиммунных, а также некоторых наследственных заболеваниях, например врожденной дизэритропоэтической анемии [2, 3].

Цитогенетическое исследование КМ проводится в обязательном порядке и имеет диагностический, прогностический и терапевтический аспекты. Однако цитогенетические аномалии встречаются только у 40–50 % пациентов с МДС. К наиболее частым аберрациям относят *del* (5q), моносомию 7 или *del* (7q), трисомию 8 и *del* (20q). Потеря Y-хромосомы также обнаруживается нередко, однако эта аномалия часто является возрастным феноменом и не всегда указывает на наличие клонального заболевания [4, 5].

Гистологическое исследование трепанобиоптата позволяет оценить клеточность КМ, состояние стромы, наличие фиброза, морфологические признаки дисплазии, количество и локализацию клеток с бластной морфологией (при иммуногистохимическом исследовании). Гиперклеточность КМ с дефицитом зрелых форм клеток в крови свидетельствует о неэффективности гемопоэза при МДС, но встречается также при реактивных состояниях, МПЗ и анемическом синдроме. Сложными в диагностическом плане являются МДС с гипоплазией КМ, которая характеризуется клеточностью, составляющей <20 % кроветворной ткани в лакунах трепанобиоптата КМ. В этом случае необходимо проводить дифференциальную диагностику с апластической анемией, гипопластическим вариантом острого миелоидного лейкоза [6].

Таким образом, диагностика МДС требует комплексного подхода, и даже при выполнении цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований может потребоваться дополнительный диагностический критерий, особенно при отсутствии цитогенетических аномалий и/или когда выявляется гипоплазия КМ [7]. Дифференциальная диагностика МДС с другими заболеваниями, протекающими с миелодисплазией, требует полного и тщательного обследования пациента, динамического наблюдения и повторных обследований [8, 9]. Многоцветная проточная цитофлуориметрия (МПЦ) клеток КМ введена в 2007 г. как дополнительный критерий при диагностике МДС [10].

В марте 2008 г. в Амстердаме состоялся первый международный семинар по стандартизации МПЦ в диагностике МДС. В нем принимали участие представители 18 университетов из Европы, работающих в рамках Европейского общества LeukemiaNet, а также эксперты из США и Японии [11]. В ходе последующих семинаров были пересмотрены и дополнены диагностические цитометрические критерии МДС [12–14].

Необходимо отметить, что не существует универсального цитометрического критерия, который бы позволял определить наличие МДС. Необходимо оценивать множество параметров в основных компартментах КМ: зрелом миелоидном (нейтрофилы, моноциты), эритроидном ростках и компартменте

ранних миелоидных и В-клеточных предшественников. Эти цитометрические стратегии базируются на интерпретации экспрессии поверхностных маркеров кластеров дифференцировки (CD). К ним относят повышенную или сниженную по отношению к референсным значениям интенсивность экспрессии антигенов, асинхронную экспрессию антигенов и экспрессию лимфоидных маркеров на миелобластных клетках. Немаловажное значение имеет подсчет доли клеток, составляющих определенные клеточные компартменты (особенно для миелоидных и В-клеточных предшественников) [15].

Скрининговая мини-панель для цитометрической диагностики миелодиспластического синдрома

В скрининговых целях согласно рекомендациям LeukemiaNet может быть использована панель, состоящая из минимального количества моноклональных антител (МКА) и позволяющая оценить 4 параметра. Данная шкала называется Ogata score, это первая разработанная система диагностики МДС методом МПЦ [16]. К параметрам Ogata score относятся:

- 1) доля CD34⁺ миелоидных клеток-предшественниц от всех CD45⁺ клеток КМ (в норме до 2 %);
- 2) доля CD34⁺ В-клеточных предшественников от всех CD34⁺ клеток (в норме не менее 5 %);
- 3) отношение экспрессии CD45 на лимфоцитах к CD34⁺ миелоидным предшественникам;
- 4) отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на нейтрофилах к лимфоцитам (рис. 1).

При отклонениях в 2 и более параметрах предполагается наличие МДС. Описанная шкала была использована в проспективном исследовании, где изучали 134 образца КМ пациентов с МДС низкого риска и 106 контрольных образцов КМ в 2 центрах — в Японии и Италии. Диагностическая чувствительность составила 65 % и 89 %, а специфичность — 98 % и 90 % для когорт пациентов из Японии и Италии соответственно.

Для клинического применения чувствительность этой шкалы недостаточна, и есть несколько аспектов, которые следует учитывать. Во-первых, в результате разведения периферической кровью образца КМ может быть недооценено количество миелоидных предшественников, кроме того, у некоторых пациентов с МДС на миелобластах антиген CD34 не экспрессируется, что является иммунофенотипической аберрацией. Количество CD34⁺ В-клеточных предшественников варьирует в зависимости от возраста и может снижаться при реактивных состояниях. Необходимо также учитывать, что референсные интервалы для экспрессии CD45 на миелобластах и показателя SSC могут немного отличаться в зависимости от используемых флуорохромов и настроек приборов [17]. Для того чтобы результаты МПЦ были применимы в клинических целях, необходимо использовать расширенную панель МКА, которая бы позволяла исследовать

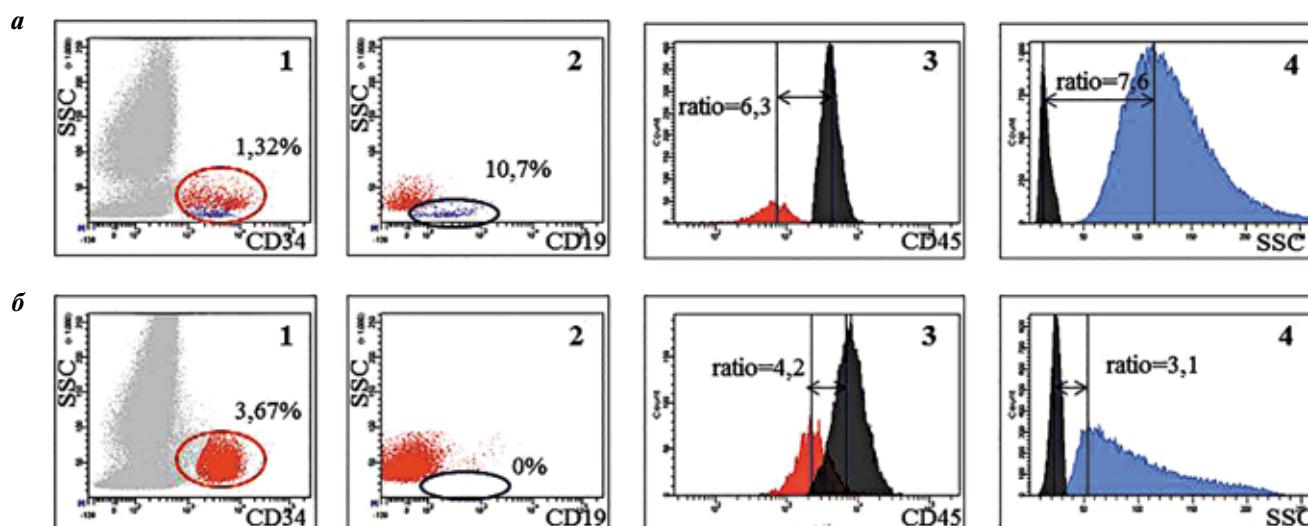


Рис. 1. Пример определения цитометрических параметров по шкале Ogata score в костном мозге здорового донора (а) и примеры аномалий у лиц с миелодиспластическим синдромом (б): 1 — доля $CD34^+$ миелоидных клеток-предшественниц от всех $CD45^+$ клеток (выделено красным); 2 — доля $CD34^+$ В-клеточных предшественников (выделено синим) от всех $CD34^+$ клеток; 3 — отношение экспрессии $CD45$ на лимфоцитах (выделено черным) к $CD34^+$ миелобластам; 4 — отношение параметра бокового светорассеяния (SSC) на нейтрофилах (выделено голубым) к лимфоцитам (фото авторов)

Fig. 1. An example of cytometric parameters by Ogata score scale in the bone marrow of a healthy donor (a) and examples of anomalies in MDS patients (b): 1 — the proportion of $CD34^+$ myeloid progenitor cells from all $CD45^+$ cells (red); 2 — the proportion of $CD34^+$ B-cell progenitors (blue) from all $CD34^+$ cells; 3 — the ratio of $CD45$ expression on lymphocytes (black) to $CD34^+$ myeloblasts; 4 — the ratio of the lateral light scattering parameter (SSC) on neutrophils (in blue) to lymphocytes (photo submitted by the authors)

параметры, рекомендованные LeukemiaNet, представленные в табл. 1 [12, 13].

Далее нами будут рассмотрены иммунофенотипические аномалии, наиболее часто встречающиеся в различных клеточных компартментах.

Цитометрический анализ незрелых миелоидных предшественников

Подсчет количества незрелых миелоидных предшественников крайне важен, поскольку является основной частью всех прогностических шкал. Обычно отмечается хорошая корреляция между количеством бластных клеток, подсчитанных цитологическим методом, и МПЦ. Иногда можно выявить заниженное количество незрелых предшественников в ходе цитометрического анализа вследствие разведения КМ периферической кровью, и наоборот [18].

Для точного подсчета количества миелоидных клеток-предшественниц недостаточно использования только маркера $CD45$, так как в регионе $CD45^{\dim}SSC^{\text{low}}$ расположены также В-клеточные предшественники, монобласты, базофилы, эритробласты, плазмцитидные дендритные предшественники, а также гипогранулярные нейтрофилы при МДС. Это требует введения в анализ дополнительных МКА к антигенам $CD34$, $CD117$, $CD19$, $CD123$ и $HLA-DR$ [13].

Важно не только подсчет миелоидных предшественников, но и изучение их иммунофенотипа. Часто при МДС снижается или отсутствует экспрессия $CD34$, $CD117$, $CD45$, $CD38$ и/или $HLA-DR$, хотя экспрессия $CD34$ и $CD117$ на аномальных клетках может быть также повышена, также возможна гомогенность распре-

деления этих антигенов [13]. В некоторых исследованиях отмечаются аномальное отсутствие $CD13$ и/или $CD33$, асинхронная экспрессия «зрелых» маркеров $CD11b$ и $CD15$ на ранних $CD34^+$ клетках [12, 19]. Также обнаруживается экспрессия лимфоидных маркеров на миелоидных предшественниках, однако частота их встречаемости варьирует в широких пределах: $CD5$ определяется только в 1,6–7 % случаев МДС, $CD7$ — в 3,5–30 %, $CD2$ — в 14 %, $CD56$ — в 35 %. При оценке аномальной экспрессии лимфоидных антигенов следует учитывать, что $CD2$, $CD7$ и $CD56$ присутствуют и на нормальных $CD34^+$ предшественниках, но таких клеток немного [17, 20–24].

Цитометрический анализ гранулоцитарного роста

Цитологические признаки дисплазии гранулоцитарного роста выявляют у 60 % пациентов с МДС. К наиболее значимым морфологическим изменениям относят гипогрануляцию нейтрофилов, нарушение сегментации их ядер и повышение доли ранних форм гранулоцитов. Для идентификации нейтрофилов методом МПЦ в основном применяют сочетание маркера $CD45$ и параметра SSC , однако рекомендуется проводить еще и анализ антигенов $CD64$ и $CD33$ для более четкого разграничения гипогранулярных гранулоцитов и моноцитов [25].

Метод МПЦ позволяет определить гранулярность нейтрофилов по соотношению параметра бокового светорассеяния SSC нейтрофилов к SSC лимфоцитов, получая индекс гранулярности. Когда по данным цитологического исследования количество гипогранулярных нейтрофилов составляет менее 10 % (что является

Таблица 1. Параметры, рекомендованные для цитометрического исследования миелодиспластического синдрома

Table 1. Cytometric parameters recommended for MDS

Компартмент костного мозга Bone marrow compartment	Параметры Parameters
CD34 ⁺ миелоидные клетки-предшественники CD34 ⁺ myeloid progenitor cells	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells Экспрессия CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD38 Expression of CD45, CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD38 Асинхронная экспрессия CD11b, CD15 Asynchronous expression of CD11b, CD15 Нелинейная экспрессия CD5, CD7, CD19, CD56 Nonlinear expression of CD5, CD7, CD19, CD56
CD34 ⁺ В-клеточные предшественники CD34 ⁺ B-cell progenitors	Доля от всех CD34 ⁺ клеток (с использованием CD19 и/или CD10) The proportion of all CD34 ⁺ cells (using CD19 and/or CD10)
Нейтрофилы Neutrophils	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells Соотношение SSC нейтрофилов к SSC лимфоцитов The ratio of SSC neutrophils to SSC lymphocytes «Паттерны созревания» CD13 и CD11b; CD16 и CD11b; CD13 и CD16; CD15 и CD10 “Maturation patterns” of CD13 and CD11b; CD16 and CD11b; CD13 and CD16; CD15 and CD10
Моноциты Monocytes	Доля от CD45 ⁺ клеток Proportion of CD45 ⁺ cells «Паттерны созревания» HLA-DR и CD11b; CD36 и CD14 “Maturation patterns” of HLA-DR and CD11b; CD36 and CD14 Экспрессии CD13 и CD33 CD13 and CD33 expression Экспрессия CD56 CD56 expression
Эритрокариоциты Erythrocyocytes	Доля от ядросодержащих клеток КМ The proportion of nucleated BM cells «Паттерны созревания» CD71 и CD235a “Maturation patterns” of CD71 and CD235a Экспрессия CD71 CD71 expression Экспрессия CD36 CD36 expression Доля CD117-позитивных предшественников Proportion of CD117-positive progenitors

критерием диагностики МДС согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения), данные МПЦ могут быть более информативными. Определение индекса гранулярности имеет высокую специфичность, а его снижение наиболее часто происходит именно при МДС [25].

К другим признакам дисплазии гранулоцитарного роста относят изменение так называемых паттернов созревания (соотношение экспрессии 2 антигенов, которое меняется в зависимости от стадии созревания клетки). Наиболее часто при анализе гранулоцитов уделяют внимание 2 паттернам: CD16 и CD11b, CD13 и CD16 [15]. Впервые изменение паттерна CD16 и CD11b в КМ у пациентов с МДС по сравнению с группой здоровых доноров было описано в исследовании В.Н. Davis и соавт. в 1997 г. У лиц с МДС отмечалось повышение доли гранулоцитов с низкой экспрессией CD16 и/или CD11b [26]. Другим значимым паттерном является соотношение CD13 и CD16. По мере созревания нейтрофилов появляется и нарастает экспрессия CD16,

в то время как экспрессия CD13 сначала снижается, а затем от стадии метамиелоцитов до сегментоядерных нейтрофилов вновь повышается. У пациентов с МДС количество клеток, иммунофенотипически соответствующих миелоцитам и метамиелоцитам, повышено, а число зрелых CD13⁺CD16⁺ нейтрофилов снижено (рис. 2). Ошибки при интерпретации данных о паттернах могут возникать в случае включения в гейт нейтрофилов эозинофилов, которые не экспрессируют CD16; нейтрофилы, претерпевающие апоптоз, также теряют CD16. Доказано, что у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией экспрессия CD16 на зрелых нейтрофилах отсутствует, так как этот антиген имеет гликозилфосфатидилинозитольный якорь; кроме того, у некоторых людей имеется генетический полиморфизм антигена CD16, что может ложно интерпретироваться как аномальное отсутствие данного маркера [15].

Еще один признак МДС — повышенная экспрессия антигена CD56 на нейтрофилах. При МДС данная аномалия встречается в 20–30 % случаев, при МПЗ — менее

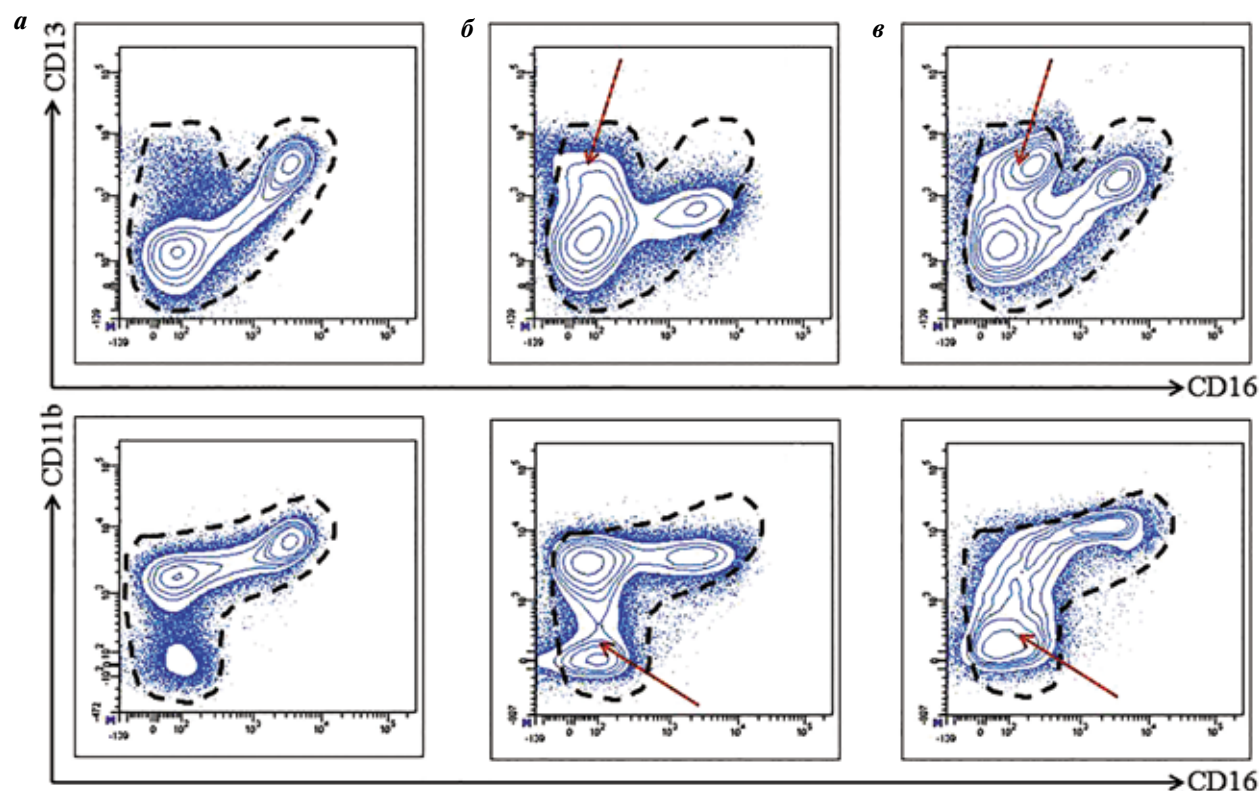


Рис. 2. Паттерны созревания нейтрофилов CD13 и CD16; CD11b и CD16 при анализе костного мозга здорового донора (а) и лиц с миелодиспластическим синдромом (б и в). Стрелками указано повышение доли незрелых гранулоцитов по сравнению с донором (фото авторов)

Fig. 2. Patterns of neutrophils maturation CD13 and CD16; CD11b and CD16 in the bone marrow of a healthy donor (a) and MDS patients (б and в). The arrows indicate an increase in the proportion of immature granulocytes in comparison with donor (photo submitted by the authors)

чем в 20 %, но при идиопатическом миелофиброзе — до 37 % [27, 28]. Однако описано повышение экспрессии данного маркера на нейтрофилах при активации, а также на 10–25 % незрелых гранулоцитов при регенерации КМ [29]. Низкая экспрессия CD56 отмечается у пациентов после химиотерапии и трансплантации аллогенных стволовых клеток, и доля гранулоцитов, экспрессирующих CD56, составляет <10 % [28]. Таким образом, экспрессия молекулы адгезии CD56 на нейтрофилах может быть как признаком аномалии в данном компартменте, так и следствием воздействия полихимиотерапии или других причин.

Одним из цитометрических признаков дисгранулоцитопоза служит снижение экспрессии антигена CD10 (в норме экспрессируется на самых зрелых нейтрофилах). Частота встречаемости этого признака широко варьирует в разных исследованиях — от 11 % до 74 % в зависимости от применяемого референсного значения [30–32]. Сниженная экспрессия CD10 ассоциирована с повышенной восприимчивостью к инфекциям, так как этот белок играет важную роль в хемотаксисе и координации провоспалительных реакций. Снижение CD10 на нейтрофилах отмечено при аутоиммунной нейтропении [33], а также у пациентов с ВИЧ-инфекцией и расценивается как признак реактивного дисгранулоцитопоза [34].

Более редкими аномалиями при МДС являются изменения в экспрессии антигенов CD33 и CD64,

появление HLA-DR, CD36 и CD14 на нейтрофилах. При МДС описывают в основном снижение экспрессии CD33 и CD64 на гранулоцитах, однако следует относиться к этим признакам с осторожностью, так как их экспрессия вариабельна и связана с генетическим полиморфизмом. Экспрессия CD36 повышается на нейтрофилах при апоптозе, а HLA-DR начинает экспрессироваться после применения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [14, 15]. Экспрессия CD14 гранулоцитами выявлена у пациентов с 5q-синдромом [35].

Цитометрический анализ моноцитов

Цитологическая оценка дисплазии в моноцитах при верификации МДС не проводится. Однако при дифференциальной диагностике МДС с моноцитозом <1×10⁹/л и хроническим миеломоноцитарным лейкозом (вариант МДС/МПЗ) следует обращать внимание на цитологические особенности моноцитов.

Идентификация моноцитов при МПЗ нередко производится только на основе анализа экспрессии маркера CD45 и параметра SSC. Однако, как было упомянуто ранее, при МДС могут встречаться нейтрофилы со сниженной гранулярностью, в этом случае их популяция «пересекается» с популяцией моноцитов, что диктует необходимость применения дополнительных маркеров, таких как CD33, CD45, CD14, CD36 [14].

В ходе цитометрического анализа моноцитов необходимо оценить их долю от всех $CD45^+$ клеток, паттерны HLA-DR и CD11b, CD36 и CD14, экспрессию антигенов CD13, CD33 и CD56. При МДС может встречаться как относительная моноцитопения (в 40 % случаев), так и моноцитоз (в 12 % случаев). Параметр SSC моноцитов, так же как и гранулоцитов, у пациентов с МДС может быть снижен. В большинстве случаев отмечается аномальное созревание моноцитов, выражающееся в аномальной экспрессии CD14, CD36, CD11b и HLA-DR (рис. 3). В 92 % случаев МПЦ позволяет обнаружить признаки дисмоноцитопоза [25]. При оценке экспрессии CD14 на моноцитах нужно помнить, что данный белок связан с мембраной через гликозилфосфатидилинозитольный якорь, поэтому у пациентов с ПНГ экспрессия данного маркера снижена или может отсутствовать.

При МДС часто отмечают повышенную экспрессию CD56 на моноцитах, которая встречается также у лиц с МПЗ и/или МДС/МПЗ, в частности с хроническим миеломоноцитарным лейкозом. Кроме того, экспрессия CD56 на моноцитах может быть обусловлена инфекционными процессами и регенерацией КМ после химиотерапии, трансплантации аллогенных стволовых клеток крови [14].

Цитометрический анализ эритрокариоцитов

Морфологические признаки дизэритропоэза являются наиболее яркими и часто встречающимися. Они присутствуют при всех вариантах МДС и остаются единственными морфологическими признаками у пациентов с рефрактерной анемией (РА) и РА с кольцевыми сидеробластами. Однако цитометрическая оценка дизэритропоэза — непростая задача, так как проблематично точно выделить популяцию эритроидных предшественников, а маркеры, по которым можно оценить их аномальность, немногочисленны. Вследствие этого с 2007 по 2012 г. оценка компартамента эритрокариоцитов имела лишь рекомендательный характер [13, 14], в 2014 г. были обозначены обязательные критерии цитометрического анализа эритрокариоцитов [12], но только в 2017 г. опубликованы первые практические результаты введения анализа эритрокариоцитов в интегрированную оценку МДС методом МПЦ [36].

Первым важным моментом становится определение эритрокариоцитов методом МПЦ. Эритроидная популяция выделяется по слабой/негативной экспрессии CD45 и низким параметрам прямого и бокового светорассеяния. Однако в этот регион также попадают нелизированные эритроциты и клеточный дебрис.

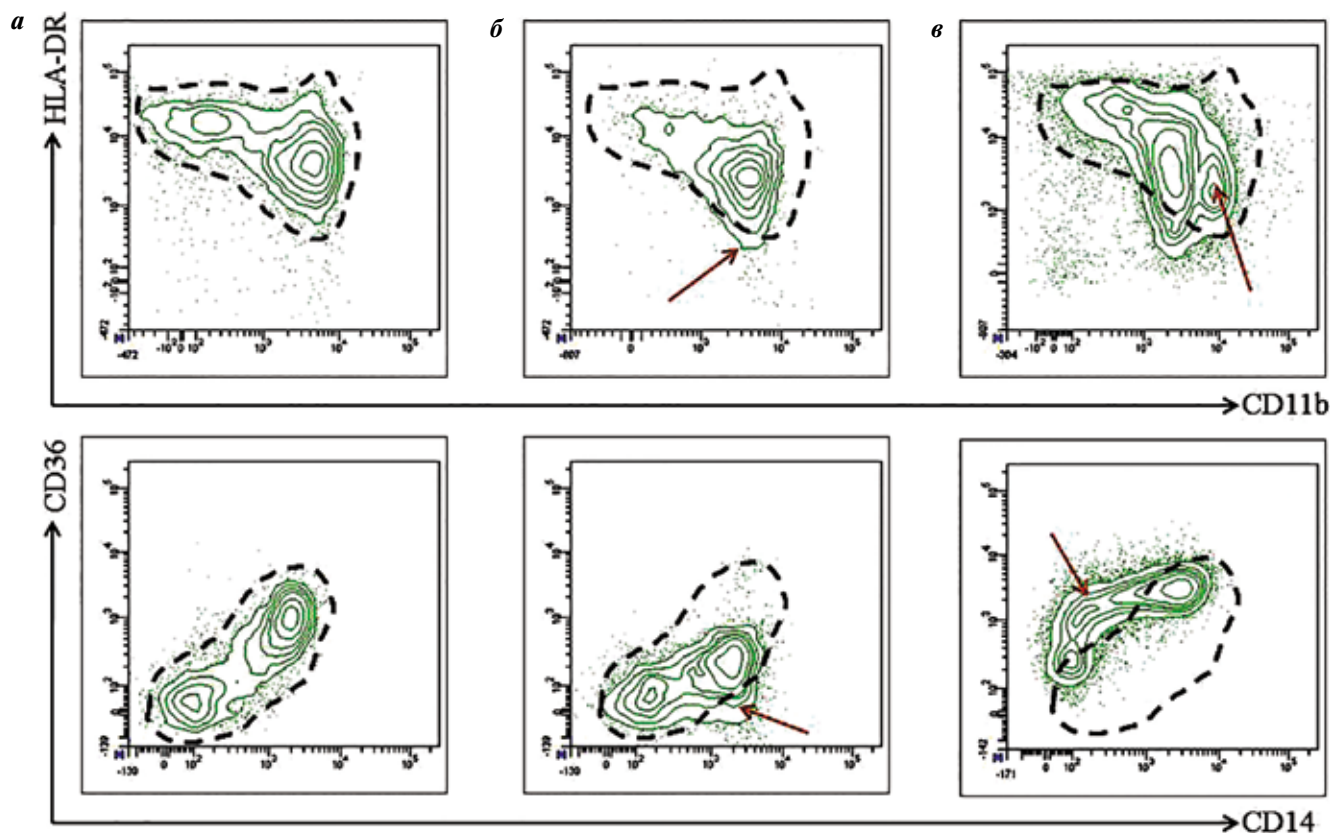


Рис. 3. Паттерны созревания моноцитов HLA-DR и CD11b; CD36 и CD14 при анализе костного мозга здорового донора (а) и лиц с миелодиспластическим синдромом (б и в). Стрелками указаны аномалии в форме паттернов (фото авторов)

Fig. 3. Patterns of monocytes maturation HLA-DR and CD11b; CD36 and CD14 in the bone marrow of a healthy donor (a) and MDS patients (б and в). Arrows indicate anomalies in patterns form (photo submitted by the authors)

Используя антигены CD36, CD71, можно выделить эритрокариоциты более точно. В ходе нормального их созревания происходит постепенное снижение экспрессии CD45, повышение экспрессии CD235a. CD71 — один из самых ранних маркеров, который экспрессируется в течение всего периода эритроцитопоэза, он остается на ретикулоцитах после энуклеации и перестает экспрессироваться только после деградации РНК. Таким образом, основываясь на экспрессии CD71, можно исключить из анализа все зрелые эритроциты [37]. Возможно введение в панель МКА нуклеотропных красителей, например CyTRAK orange, DRAQ5, DRAQ7, которые позволяют отделить ядросодержащие предшественники от зрелых эритроцитов даже без проведения лизиса [37]. С другой стороны, в ходе ряда исследований показано, что проведение лизиса позволяет получить более точные количественные характеристики плотности экспрессии антигенов [38].

Согласно данным Европейского общества LeukemiaNet цитометрическими признаками аномального эритрокариоцитопоэза могут быть: повышение доли CD117⁺ эритроидных предшественников, аномальная гетерогенная или сниженная экспрессии CD36 и CD71 и aberrантный паттерн CD71 и CD235a [12]. Анализ этой группы показателей способствует наилучшей дифференциальной диагностике МДС и неклональных цитопений [39].

Цитометрические оценочные системы в диагностике миелодиспластического синдрома

Для диагностики МДС методом МПЦ необходимо исследовать многочисленные характеристики всех основных клеточных компартментов КМ. Эти параметры изучали в нескольких центрах, и на основе ретроспективного анализа были разработаны цитометрические оценочные шкалы, обладающие диагностической и прогностической значимостью. В 2003 г. Р. Wells и соавт. из США предложили шкалу, где на основе числа цитометрических aberrаций в компартменте нейтрофилов и моноцитов, а также количества миелобластов подсчитывали конечный балл (табл. 2). Суммарный балл от 0 до 1 классифицировался как минимальный, от 2 до 3 — как средний, >4 — как высокий. В данном исследовании приняли участие 115 лиц с МДС и 104 пациента контрольной группы без МДС и МПЗ. Никто из больных контрольной группы не набрал >2 баллов, однако у 55 % пациентов с МДС было получено 3 и более баллов [40].

Оценка по шкале Wells коррелировала с вариантом МДС по ВОЗ. У лиц с РА и РА с кольцевыми сидеробластами средний балл составил 3, с РА с мультилинейной дисплазией — 4, с РА с избытком бластов — 6 [25]. Цитометрические баллы коррелировали с оценками по шкалам IPSS (International Prognostic Scoring System), WPSS (WHO-adjusted Prognostic Scoring System) и зависимостью от трансфузий. Медиана выживаемо-

Таблица 2. Цитометрическая шкала Wells

Table 2. Cytometric Wells Scale

Балл Score	Описание Description
Основной балл <i>The main score</i>	
0	Отсутствие цитометрических aberrаций Absence of cytometric aberrations
1	Одна aberrация или в гранулоцитах, или в моноцитах One aberration in either granulocytes or monocytes
2	Одна aberrация и в гранулоцитах, и в моноцитах либо... One aberration in both granulocytes and monocytes either... Две или три aberrации или в гранулоцитах, или в моноцитах Two or three aberrations, either in granulocytes or in monocytes
3	Четыре и более aberrаций или в гранулоцитах, или в моноцитах Four or more aberrations, either in granulocytes or monocytes
4	Две или три aberrации и в гранулоцитах, и в моноцитах Two or three aberrations in both granulocytes and monocytes
Дополнительный балл <i>Additional score</i>	
+1	Сниженное миелоидно-лимфоидное соотношение (<1) The decreased myeloid-lymphoid ratio (<1) Нормальное содержание миелобластов (<5 %) с цитометрическими aberrациями The normal content of myeloblasts (<5 %) with cytometric aberrations
+2	Повышенное содержание аномальных миелобластов (5–10 %) Increased content of abnormal myeloblasts (5–10 %)
+3	Повышенное содержание аномальных миелобластов (11–20 %) Increased content of abnormal myeloblasts (11–20 %)
+4	Повышенное содержание аномальных миелобластов (>20 %) Increased content of abnormal myeloblasts (>20 %)

сти у пациентов с минимальным баллом по шкале Wells (0–1) не была достигнута, со средним баллом (2–3) составила 19 мес, с высоким баллом (4–9) — 6 мес [41].

В 2011 г. А. van de Loosdrecht и Т. Westers была предложена объединенная диагностическая шкала с учетом баллов по скрининговой шкале Ogata и количества aberrаций в компартментах нейтрофилов и моноцитов [17]. Эта шкала не включала аномалии в эритроидных клетках, а заключение по ней устанавливается в виде буквенного эквивалента. Оценка «А» означает, что по результатам анализа дисмиелопоэза методом проточной цитометрии признаков МДС не выявлено; «В» — что при цитометрическом исследовании

выявляются признаки, которые часто обнаруживаются при МДС, и «С» — результаты цитометрического исследования соответствуют МДС (табл. 3).

Эту шкалу применяли в исследовании (его результаты были опубликованы в 2016 г.) с участием 101 пациента с МДС и 51 пациента контрольной группы без диагноза МДС или МПЗ. Из когорты участников с МДС 15 % получили оценку «А», 24 % — «В» и 61 % — «С». Оценку «А», которая соответствовала отсутствию цитометрических аномалий, имели в основном лица с МДС с изолированными дисэритропоэзом и/или дисмегакариопоэзом. При этом цитогенетические aberrации, типичные для МДС, выявлены только у 23 % пациентов, другие цитогенетические аномалии — у 21 % и нормальный кариотип — у 56 %. Таким образом, цитометрические аномалии при МДС встречались чаще, чем цитогенетические. В контрольной группе оценку «А» получили 65 % пациентов, «В» — 29 % и «С» — только 6 % [4].

В 2017 г. была разработана и апробирована интегрированная диагностическая шкала, которая включала аномалии в компартменте эритрокариобластов (табл. 4). Введение в шкалу анализа аномалий эритроидного ряда позволило повысить чувствительность метода с 69 до 80 %, а специфичность незначительно снизилась — с 98 до 95 % [36].

Заключение

Диагностика МДС требует комплексного подхода, основанного на проведении цитологического, цитохимического, цитогенетического и гистологического исследований КМ. Во многих публикациях показано, что метод МПЦ может улучшить диагностику МДС, особенно в трудных случаях, когда результатов, полученных другими методами, недостаточно, однако пока что этот способ является лишь вспомогательным.

Не существует универсального цитометрического признака, который бы позволил уверенно определить

Таблица 3. Объединенная шкала диагностики миелодиспластического синдрома методом многоцветной проточной цитофлуориметрии без учета аномалий в компартменте эритрокариоцитов

Table 3. The combined scale of MDS diagnosis by MFC without taking into account anomalies in the erythrocytes compartment

Шкала Ogata Ogata scale	<2				≥2			
Цитометрические aberrации в миелоидных предшественниках Cytometric aberrations in myeloid progenitors	—	—	+	+	—	—	+	+
Цитометрические aberrации: в гранулоцитах (сниженный индекс гранулярности или 2 и более других aberrаций) in granulocytes (reduced granulation index or two or more other aberrations) в моноцитах (экспрессия CD56 или 2 и более другие aberrации) in monocytes (CD56 expression or two or more other aberrations)	—	+	—	+	—	+	—	+
Оценка Assessment	A	A/B	A/B	C	A/B	B/C	B/C	C

Таблица 4. Интегрированная шкала диагностики миелодиспластического синдрома методом многоцветной проточной цитофлуориметрии с учетом аномалий в компартменте эритрокариоцитов

Table 4. The integrated scale of MDS diagnosis by MFC taking into account anomalies in the erythrocytes compartment

Шкала Ogata Ogata scale	<2								≥2							
Цитометрические aberrации в миелоидных предшественниках Cytometric aberrations in myeloid progenitors	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+
Цитометрические aberrации: в гранулоцитах (≥2 aberrаций) in granulocytes (≥2 aberrations) в моноцитах (экспрессия CD56 или ≥2 aberrаций) in monocytes (expression of CD56 or ≥2 aberrations)	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+
Цитометрические aberrации (≥2) в эритрокариоцитах Cytometric aberrations (≥2) in erythrocytes	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+
Оценка Assessment	A	B	B	C	B	C	C	C	A/B	C	C	C	C	C	C	C

наличие МДС, и для полноценного исследования требуется провести оценку многочисленных параметров (экспрессию антигенов, их соотношения, нормальность паттернов созревания). Европейским обществом LeukemiaNet в течение нескольких лет проводится работа по стандартизации МПЦ в диагностике МДС.

В настоящее время определены оптимальные антигены и параметры, которые необходимо анализировать в основных клеточных компартментах КМ: ранних предшественниках, нейтрофилах, моноцитах и эритрокариобластах. Перспективным направлени-

ем дальнейшей работы является уменьшение вероятности возможных ошибок, связанных с отличиями в процессах пробоподготовки, выбора комбинаций МКА и стратегий гейтирования. Немаловажен поиск способов дальнейшего повышения чувствительности и специфичности метода МПЦ в диагностике МДС. Совершенствование цитометрических подходов позволит интегрировать метод МПЦ в диагностические протоколы МДС и тем самым улучшить первичную диагностику данного гематологического заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Кохно А.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению миелодиспластических синдромов взрослых (2015 г.). Гематология и трансфузиология 2016;61(1S(4)):1–32. [Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Kokhno A.V. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of adult myelodysplastic syndromes (2015). *Gematologiya i transfuziologiya* = *Hematology and Transfusiology* 2016;61(1S(4)):1–32 (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-1.
2. Tefferi A., Vardiman J.W. Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* 2009;361(19):1872–85. DOI: 10.1056/NEJMra0902908. PMID: 19890130.
3. Двирник В.Н., Кохно А.В., Паровичникова Е.Н. Вторичный дисмиелопоэз у больных миелодиспластическими синдромами. Терапевтический архив 2014;86(7):97–103. [Dvirnyk V.N., Kokhno A.V., Parovichnikova E.N. Secondary dysmyelopoiesis in patients with myelodysplastic syndromes. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic archive* 2014;86(7):97–103 (In Russ.)]. PMID: 25314785.
4. Cremers E.M.P., Westers T.M., Alhan C. et al. Multiparameter flow cytometry is instrumental to distinguish myelodysplastic syndromes from non-neoplastic cytopenias. *Eur J Cancer* 2016;54:49–56. DOI:10.1016/j.ejca.2015.11.013. PMID: 26720403.
5. Soenen V., Preudhomme C., Roumier C. et al. 17p Deletion in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Analysis of breakpoints and deleted segments by fluorescence in situ. *Blood* 1998;91(3):1008–15. PMID: 9446663.
6. Ковригина А.М., Глинкина С.А., Байков В.В. Принципы патоморфологической дифференциальной диагностики миелодиспластических синдромов. Клиническая онкогематология 2015;8(1):62–8. [Kovrigina A.M., Glinkina S.A., Baykov V.V. Principles of pathomorphological differential diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical oncohematology* 2015;8(1):62–8 (In Russ.)].
7. Della Porta M.G., Malcovati L., Boveri E. et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2009;27(5):754–62. DOI:10.1200/JCO.2008.18.2246. PMID: 19103730.
8. Кохно А.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Миелодиспластический синдром. Клиническая геронтология 2009;15(3):33–46. [Kokhno A.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Myelodysplastic syndrome. *Klinicheskaya gerontologiya* = *Clinical gerontology* 2009;15(3):33–46. (In Russ.)].
9. Кохно А.В., Пименова М.А., Паровичникова Е.Н. и др. Выявление скрытых аномалий кариотипа при миелодиспластическом синдроме. Гематология и трансфузиология 2014;59(1):25–8. [Kokhno A.V., Pimenova M.A., Parovichnikova E.N. et al. Detection of hidden karyotype anomalies in myelodysplastic syndrome. *Gematologiya i transfuziologiya* = *Hematology and Transfusiology* 2014;59(1):25–8 (In Russ.)].
10. Valent P., Horny H.P., Bennett J.M. et al. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res* 2007;31(6):727–36. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.11.009. PMID: 17257673.
11. Loken M.R., van de Loosdrecht A., Ogata K. et al. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: Report from a working conference. *Leuk Res* 2008;32(1):5–17. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.04.020. PMID: 17576013.
12. Porwit A., van de Loosdrecht A.A., Bettelheim P. et al. Revisiting guidelines for integration of flow cytometry results in the WHO classification of myelodysplastic syndromes-proposal from the International/European LeukemiaNet Working Group for Flow Cytometry in MDS. *Leukemia* 2014;28(9):1793–8. DOI: 10.1038/leu.2014.191. PMID: 24919805.
13. Westers T.M., Ireland R., Kern W. et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia* 2012;26(7):1730–41. DOI: 10.1038/leu.2012.30. PMID: 22307178.
14. van de Loosdrecht A.A., Alhan C., Bene M.C. et al. Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from the first European LeukemiaNet working conference on flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2009;94(8):1124–34. DOI: 10.3324/haematol.2009.005801. PMID: 19546437.
15. Aanei C.M., Picot T., Tavernier E. et al. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Front Oncol* 2016;6:161. DOI: 10.3389/fonc.2016.00161. PMID: 27446807.
16. Ogata K., Kishikawa Y., Satoh C. et al. Diagnostic application of flow cytometric characteristics of CD34+ cells in low-grade myelodysplastic syndromes. *Blood* 2006;108(3):1037–44. DOI: 10.1182/blood-2005-12-4916. PMID: 16574954.
17. van de Loosdrecht A.A., Westers T.M. Cutting edge: flow cytometry in myelodysplastic syndromes. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(7):892–902. PMID: 23847222.
18. Bellos F., Kern W. Flow cytometry in the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS) and the value of myeloid

- nuclear differentiation antigen (MNDA). *Cytometry B Clin Cytom* 2014;92(3):200–6. DOI: 10.1002/cytob.21190. PMID: 25258054.
19. Matarraz S., López A., Barrena S. et al. The immunophenotype of different immature, myeloid and B-cell lineage-committed CD34+ hematopoietic cells allows discrimination between normal/reactive and myelodysplastic syndrome precursors. *Leukemia* 2008;22(6):1175–83. DOI: 10.1038/leu.2008.49. PMID: 18337765.
 20. Chabannon C., Wood P., Torok-Storb B. Expression of CD7 on normal human myeloid progenitors. *J Immunol* 1992;149(6):2110–3. PMID: 1381397.
 21. Tien H.F., Wang C.H. CD7 positive hematopoietic progenitors and acute myeloid leukemia and other minimally differentiated leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998;31(1–2):93–8. DOI: 10.3109/10428199809057588. PMID: 9720718.
 22. Ogata K., Nakamura K., Yokose N. et al. Clinical significance of phenotypic features of blasts in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 2002;100(12):3887–96. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0222. PMID: 12393641.
 23. Jorgensen J.L., Chen S.S. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methods and best applications. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(Suppl 1):S49–53. DOI: 10.1016/j.clml.2011.03.023. PMID: 22035748.
 24. Jaso J.M., Wang S.A., Jorgensen J.L., Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant* 2014;49(9):1129–38. DOI: 10.1038/bmt.2014.99. PMID: 24842529.
 25. van de Loosdrecht A.A., Westers T.M., Westra A.H. et al. Identification of distinct prognostic subgroups in low- and intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood* 2008;111(3):1067–77. DOI: 10.1182/blood-2007-07-098764. PMID: 17971483.
 26. Davis B.H., Foucar K., Szczarkowski W. et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications. *Cytometry* 1997;30(5):249–63. PMID: 9383099.
 27. Moon H.W., Huh J.W., Lee M. et al. Immunophenotypic Features of Granulocytes, Monocytes, and Blasts in Myelodysplastic Syndromes. *Korean J Lab Med* 2010;30(2):97. DOI: 10.3343/kjlm.2010.30.2.97. PMID: 20445324.
 28. Gong P., Metrebian F., Dulau-Florea A. et al. Aberrant expression of CD56 on granulocytes and monocytes in myeloproliferative neoplasm. *J Hematop* 2013;6(3):127–34. DOI: 10.1007/s12308-013-0190-z.
 29. Kussick S.J., Wood B.L. Using 4-color flow cytometry to identify abnormal myeloid populations. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(9):1140–7. DOI: 10.1043/1543–2165(2003)127<1140:UCFCTI>2.0.CO;2. PMID: 12946231.
 30. Stetler-Stevenson M., Arthur D.C., Jabbour N. et al. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. *Blood* 2001;98(4):979–87. PMID: 11493442.
 31. Chung J.W., Park C.J., Cha C.H. et al. A combination of CD15/CD10, CD64/CD33, CD16/CD13 or CD11b flow cytometric granulocyte panels is sensitive and specific for diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42(3):271–80. PMID: 22964615.
 32. Lorand-Metze I., Ribeiro E., Lima C.S.P. et al. Detection of hematopoietic maturation abnormalities by flow cytometry in myelodysplastic syndromes and its utility for the differential diagnosis with non-clonal disorders. *Leuk Res* 2007;31(2):147–55. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.04.010. PMID: 16750852.
 33. Stachurski D., Smith B.R., Pozdnyakova O. et al. Flow cytometric analysis of myelomonocytic cells by a pattern recognition approach is sensitive and specific in diagnosing myelodysplastic syndrome and related marrow diseases: emphasis on a global evaluation and recognition of diagnostic pitfalls. *Leuk Res* 2008;32(2):215–24. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.06.012. PMID: 17675229.
 34. van de Vyver A., Visser A. Decreased CD10 expression in the bone marrow neutrophils of HIV positive patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2010;2(3):e2010032. DOI: 10.4084/mjhid.2010.032. PMID: 21776338.
 35. Keerthivasan G., Mei Y., Zhao B. et al. Aberrant overexpression of CD14 on granulocytes sensitizes the innate immune response in mDia1 heterozygous del (5q) MDS. *Blood* 2014;124(5):780–90. DOI: 10.1182/blood-2014-01-552463. PMID: 24891322.
 36. Cremers E.M. P., Westers T.M., Alhan C. et al. Implementation of erythroid lineage analysis by flow cytometry in diagnostic models for myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2017;102(2):320–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.147843. PMID: 27658438.
 37. Della Porta M.G., Picone C. Diagnostic Utility of Flow Cytometry in Myelodysplastic Syndromes. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2017;9(1):e2017017. DOI:10.4084/MJHID.2017.017. PMID: 28293405.
 38. Eidenschink Brodersen L., Menssen A.J., Wangen J.R. et al. Assessment of erythroid dysplasia by “difference from normal” in routine clinical flow cytometry workup. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;88(2):125–35. DOI: 10.1002/cyto.b.21199. PMID: 25490867.
 39. Westers T.M., Cremers E.M.P., Oelschlaegel U. et al. Immunophenotypic analysis of erythroid dysplasia in myelodysplastic syndromes. A report from the IMDSFlow working group. *Haematologica* 2017;102(2):308–19. DOI: 10.3324/haematol.2016.147835. PMID: 27758818.
 40. Wells D.A., Benesch M., Loken M.R. et al. Myeloid and monocytic dyspoiesis as determined by flow cytometric scoring in myelodysplastic syndrome correlates with the IPSS and with outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102(1):394–403. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2768. PMID: 12649150.
 41. Chu S.C., Wang T.F., Li C.C. et al. Flow cytometric scoring system as a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2011;35(7):868–73. DOI: 10.1016/j.leukres.2011.02.016. PMID: 21397943.

ORCID авторов

Ю.О. Давыдова: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

ORCID of authors

Yu. O. Davydova: <https://orcid.org/0000-0001-5932-0285>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Статья поступила: 27.12.2017. **Принята в печать:** 14.02.2018

Article received: 27.12.2017. **Accepted for publication:** 14.02.2018

Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей

И.А. Новикова¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, Л.В. Мовчан⁴, Г.А. Цаур^{2,3}, М.В. Белевцев⁴, А.М. Попов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

²ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

³ГИАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22а;

⁴ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»; Республика Беларусь, 223053 Минский р-н, Боровлянский сельсовет, дер. Боровляны, ул. Фрунзенская, 43

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Введение. На сегодняшний день данные иммунофенотипирования используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Необходимым условием эффективной диагностики методом проточной цитометрии является разработка единого подхода к подбору комбинаций антител, методике пробоподготовки, настройкам проточного цитометра и анализу данных. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей диктует необходимость разработки единых алгоритмов цитометрической диагностики.

Цель исследования — разработка единого подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики ОЛЛ у детей.

Материалы и методы. В разработке и стандартизации подходов к цитометрическому определению минимальной остаточной болезни приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва—Берлин». Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами, выбор реагентов для иммунофенотипирования, алгоритмы настройки проточных цитометров.

Результаты. Был разработан и успешно внедрен стандартный протокол иммунофенотипирования ОЛЛ методом проточной цитометрии. Применение такого подхода позволяет получить очень высокую сопоставимость данных, получаемых в разных лабораториях. Эффективная интеграция в систему референсных лабораторий показывает высокую воспроизводимость разработанных алгоритмов диагностики ОЛЛ. Это позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по терапии ОЛЛ у детей.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, проточная цитометрия, стандартизация

Для цитирования: Новикова И.А., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В. и др. Стандарт российско-белорусской кооперативной группы по иммунофенотипированию острого лимфобластного лейкоза у детей. Онкогематология 2018;13(1):73–82.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-73-82

Russian-belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics

I.A. Novikova¹, T. Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, L. V. Movchan⁴, G.A. Tsaur^{2,3}, M. V. Belevtsev⁴, A.M. Popov¹

¹D. Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., GSP-7, 117198 Moscow, Russia;

²Pediatric Oncology/Hematology Center, Regional Children Hospital № 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., 620149 Yekaterinburg, Russia;

³Research Institute of Medical Cell Technologies; 22a Karla Marksa St., 620026 Yekaterinburg, Russia;

⁴Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology; 43 Frunzenskaya St., Borovlyani, 223053 Minsk region, Republic of Belarus

Background. Flow cytometry is one of the key technologies for acute lymphoblastic leukemia (ALL) diagnostics. Nevertheless lack of technological standards hampers implementation of immunophenotyping data in treatment protocols.

Objective: development of harmonized guidelines for flow cytometric diagnostics of childhood ALL.

Materials and methods. Three reference laboratories of the immunophenotyping group “Moscow—Berlin” took part in the development and standardization of approaches to the cytometric determination of the minimal residual disease. The sequence of steps for staining with monoclonal antibodies, selection of reagents for immunophenotyping, flow cytometer adjustment algorithms were discussed.

Results. We developed and implemented in multicenter setting the harmonized approach for immunophenotyping flow cytometric childhood ALL. Successful integration of this protocol in the multicenter group has shown good level of our approach reproducibility.

Conclusion. These results will allow implementing diagnostic standards in stratification system of pediatric ALL treatment protocols of russian-belarusian multicenter group.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry, standardization

For citation: Novikova I., Verzhbitskaya T., Movchan L. et al. Russian-belarusian multicenter group standard guidelines for childhood acute lymphoblastic leukemia flow cytometric diagnostics. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):73–82.

Введение

Метод многоцветной проточной цитометрии является основным диагностическим инструментом, позволяющим определить иммунофенотип опухолевых клеток при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей и взрослых [1–3]. Диагностика острого лейкоза заключается в определении его линейной направленности (Т- или В-лимфобластный или миелоидный), установлении иммунологического варианта ОЛЛ и определении лейкозассоциированного иммунофенотипа [4], который необходим для дальнейшего мониторинга минимальной остаточной болезни.

В настоящее время для иммунологической классификации ОЛЛ используются система Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group of Immunological Markers for Leukemias, EGIL) [5] с учетом позднее внесенных изменений [6], а также классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [7, 8].

Несмотря на то, что иммунофенотипирование методом проточной цитометрии — важный метод диагностики ОЛЛ, несоответствия между различными существующими системами классификации, стандартами технологий и клиническими потребностями не всегда позволяют применять данный метод согласованно в разных исследовательских центрах. В связи с тем, что данные иммунофенотипирования используются для стратификации пациентов в рамках крупных многоцентровых исследований по терапии ОЛЛ, необходим стандартный подход, включающий выбор комбинации антител, методику пробоподготовки, настройку проточного цитометра и анализ получаемых данных [9–11]. Хотя различными группами периодически публикуются примеры применения классификаций EGIL и ВОЗ [12–14], каких-либо общих подходов к проведению цитометрической диагностики ОЛЛ до настоящего времени не разработано [15]. В то же время при проведенной нами ранее внешней оценке качества диагностики ОЛЛ методом проточной цитометрии было обнаружено, что в лабораториях, проводящих иммунофенотипирование, существуют совершенно разные подходы к пробоподготовке, настройкам приборов, анализу и интерпретации полученных результатов [15, 16].

Чаще всего стандартизованные протоколы иммунофенотипирования разрабатываются в рамках крупных исследовательских групп по лечению ОЛЛ [17]. Наличие в Российской Федерации и Республике Беларусь оригинальных протоколов терапии ОЛЛ у детей

[18, 19] диктует необходимость разработки собственных стандартов цитометрической диагностики.

Цель исследования — разработка стандартного подхода для многоцентровой иммунофенотипической диагностики ОЛЛ у детей в рамках российско-белорусской кооперативной группы протокола «Москва—Берлин».

Материалы и методы

В разработке и стандартизации подходов к иммунофенотипической диагностике ОЛЛ приняли участие 3 референсные лаборатории иммунофенотипирования группы «Москва—Берлин»: НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева (Москва), ОДКБ № 1 (Екатеринбург) и РНПЦ ДОГ (Минск). В 2 лабораториях диагностика ОЛЛ проводилась на проточном цитометре FACS Cantot II (Becton Dickinson (BD), США) (2 лазера, 6 цветов, затем 3 лазера, 8 цветов в обоих случаях), в одной — на FC 500 и Navios (оба Beckman Coulter (BC), США) (2 лазера, 5 цветов).

Данная работа включала следующие этапы:

- обсуждение принятых в каждой лаборатории подходов к иммунофенотипированию ОЛЛ;
- выработка общих рекомендаций по пробоподготовке, подбору антител и флуорохромов, настройке проточных цитометров;
- разработка алгоритма анализа цитометрических данных;
- участие в различных системах внешнего контроля качества;
- разработка стандартного операционного протокола (СОП) для проведения диагностического иммунофенотипирования ОЛЛ.

Обсуждение технологических аспектов, разработка общих подходов и оценка результатов работы проводились на встречах рабочей группы, созданной в рамках протокола «Москва—Берлин» (руководитель — проф. А.И. Карачунский). Обсуждались последовательность этапов при окрашивании моноклональными антителами (МкАТ), выбор реагентов для лизиса эритроцитов и отмывки клеток, подбор клонов антител и приемлемых для каждого маркера сочетаний антител—флуорохром, алгоритмы настройки проточных цитометров. Данные проточной цитометрии анализировали в программном обеспечении FACS Diva 6.1 (BD), а также СХР и Kaluza 1.5 (обе BC). Вырабатывались рекомендации для последовательного выделения на точечных графиках опухолевых клеток и дальнейшей оценки их антигенного профиля.

Результаты исследования

Были разработаны следующие рекомендации по проведению иммунофенотипирования костного мозга (КМ) с целью диагностики ОЛЛ.

Исследуемый материал

Материалом для исследования при постановке диагноза ОЛЛ и оценке иммунофенотипа должен являться КМ. Периферическая кровь может быть использована в крайне редких случаях, при низкой клеточности костного мозга, плохом его качестве и наличии массивного бластоза в крови. Забор КМ в объеме не менее 2 мл осуществляется в вакуумную пробирку, где в качестве антикоагулянта использована этилендиамин-тетрауксусная кислота. Предпочтительнее для исследования материал, полученный в самом начале пункции, что позволяет максимально избежать разведения КМ периферической кровью, которое может исказить результаты исследования. Все пробирки должны быть промаркированы — указана фамилия пациента, в направлении на иммунофенотипирование указаны Ф.И.О. пациента, возраст, дата, время забора материала, предполагаемый диагноз. Для обеспечения сохранности материал хранят и транспортируют при постоянной температуре 4 °С и доставляют в лабораторию не позднее 48 ч после забора. При обнаружении крупных сгустков, гемолиза или при более длительной транспортировке запрашивается повторный образец. Фильтрация КМ проводится при наличии хлопьев жира и мелких сгустков.

Подбор комбинации моноклональных антител осуществляется в соответствии с критериями EGIL (1995) для диагностики ОЛЛ [5], а для диагностики острого лейкоза со смешанным фенотипом — согласно рекомендациям ВОЗ [7, 8]. Многоцветный подход к окрашиванию является обязательным и основывается на наличии CD45 в каждой пробирке, маркеров Т- и В-лимфоидных и миелоидной линий для идентификации бластных и контрольных клеток.

Преимущества многоцветного подхода к иммунофенотипированию заключаются в следующем [17]:

- более точное гейтирование бластных клеток;
- возможность исследования небольших по размеру, а также гетерогенных популяций бластных клеток;
- возможность включения новых маркеров или их сочетаний, актуальных для более точной классификации и/или прогнозирования исхода заболевания.

К основным маркерам могут быть добавлены антигены, применяемые для мониторинга минимальной остаточной болезни (CD38, CD58, CD99, CD123), а также ассоциированные с прогностически важными генетическими абберациями (например, CD123 при гипердиплоидии или NG2 при перестройках с участием гена *KMT2A/MLL*).

Используемые антитела для диагностики ОЛЛ у детей представлены в таблице. Выбор клонов антител

и флуорохромов обычно проводится в соответствии с опытом лабораторий. Ключевые антитела, по которым происходит первичное выделение клеток (CD45, CD19, CD7), должны быть мечены флуорохромами с хорошим разделением интересующих популяций. При составлении панели антител учитывается не только наличие определенных детекторов флуоресценции у прибора, на котором выполняется исследование, но и то, насколько пары флуорохромов возможно использовать в 1 сочетании. Например, для PE-Cy5 и APC невозможно стабильно подобрать правильное значение цифровой компенсации, поскольку лазер 635 нм активирует не только APC, но и Cy5, находящийся в составе tandemного конъюгата.

Используемые антитела для проведения иммунофенотипирования методом проточной цитометрии при остром лимфобластном лейкозе у детей

Antibodies for immunophenotyping by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia

Используемые маркеры (комбинированные с CD45 в каждой пробирке)

Used markers (combined with CD45 in each tube)

В-линейные маркеры B-linear markers	iCD22, iCD79a, iIgM, CD10, CD19, CD20; CD22, Кappa, Lambda, IgM
Т-линейные/ NK-клеточные маркеры T-linear/NK-cells markers	iCD3, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD56, ТКР $\alpha\beta$, ТКР $\gamma\delta$
Миелоидные маркеры Myeloid markers	iLysozyme, iMPO, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD33, CD41a, CD61, CD64, CD65
Маркеры клеток-предшественников Cell-precursor markers	CD117, CD34, CD123, CD133, CD99
Линейно неограниченные маркеры Linearly unlimited markers	CD38, CD45, CD58, HLA-DR, NG2

Пробоподготовка

Для иммунофенотипирования острых лейкозов используется только 1 пробирка с КМ. Если в лабораторию поступило несколько пробирок, взятых из разных точек пункции, выбирается одна из них. В случае, если данному пациенту выполнялось цитологическое исследование, выбор точки для иммунофенотипирования осуществляется на основании результатов этого исследования. При этом выбирается точка с максимальным количеством бластных клеток. В случае, если цитологическое исследование в референсной лаборатории не выполнялось, выбирается пробирка с наибольшей клеточностью по данным исследования на гематологическом анализаторе.

Количество клеток в окрашиваемом образце должно быть достаточным для цитометрического исследования,

но в то же время не быть избыточным, так как в этом случае возможен недостаток количества антител для окрашивания всех молекул антигена, что, в свою очередь, будет приводить к неадекватно слабой флуоресценции клеток. Также важно подчеркнуть, что при большом объеме окрашиваемого КМ или периферической крови может быть затруднен лизис эритроцитов стандартным объемом лизирующего реагента. При первичном иммунофенотипировании не рекомендуется анализировать более 50 000 ядросодержащих клеток. Для того чтобы быть уверенным, что после всех этапов пробоподготовки в анализируемом образце останется достаточное количество клеток, нужно брать такой объем материала, чтобы количество вносимых клеток не менее чем в 4 раза превышало целевое количество анализируемых клеток. Таким образом, окрашивание даже 200 000 клеток приведет к анализу необходимых 50 000. Однако для более быстрой записи данных проточным цитометром и более адекватного количественного соотношения антиген/антитело лучше окрашивать $1-2 \times 10^6$ ядросодержащих клеток. Превышать это количество не рекомендуется. Внесение материала для окрашивания производится только после подсчета клеточности на гематологическом анализаторе и произведения расчетов необходимого объема материала.

Количество вносимых МкАТ напрямую зависит от количества клеток в окрашиваемом материале. Оптимальный объем раствора антитела на 2×10^6 клеток определяется путем титрования. Антитела должны вноситься непосредственно из флакона. Заблаговременное приготовление смесей (коктейлей) антител нецелесообразно, так как может привести к распаду относительно нестабильных тандемных флуорохромов.

Лизис эритроцитов проводится согласно инструкции фирмы-производителя лизирующего реагента. Порядок пробоподготовки при мембранном окрашивании включает: инкубацию с МкАТ → лизис эритроцитов → отмывку фосфатно-солевым буфером (ФСБ). При комбинировании мембранного и внутриклеточного окрашивания пробоподготовка состоит из следующих этапов: инкубация с мембранными МкАТ → лизис эритроцитов → отмывка ФСБ → пермеабиллизация → отмывка ФСБ → инкубация с цитоплазматическими МкАТ → отмывка ФСБ. Для пермеабиллизации могут быть использованы различные современные двухкомпонентные реагенты, в которых есть 2 раствора: для фиксации клеток и собственно для пермеабиллизации. При определении поверхностной или внутриклеточной экспрессии тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов перед окрашиванием проводят 3-кратную отмывку образца ФСБ.

Настройка проточного цитометра

Качество иммунофенотипического исследования во многом зависит от настроек используемого

прибора. Основными параметрами, влияющими на результат исследования, являются стабильность работы лазеров и жидкостной системы, чувствительность фотоэлектронных умножителей (ФЭУ) детекторов флуоресценции и цифровая компенсация данных флуоресценции.

Стабильность работы лазеров на большинстве приборов определяется по попаданию показателей работы лазеров в референсные диапазоны. У большинства производителей проточных цитометров существуют системы калибровочных частиц, позволяющие пользователю достаточно легко контролировать работу лазеров и ФЭУ. Персонал лаборатории обязан как минимум еженедельно контролировать стабильность работы лазеров для получения адекватных результатов анализа. Чувствительность ФЭУ жестко привязана к компенсации данных, поэтому ее настройка осуществляется одновременно с настройкой компенсации. Для настройки компенсации необходимо применять калибровочные материалы, производимые поставщиком проточного цитометра. При использовании реагентов различных производителей необходимо проводить настройку чувствительности ФЭУ и компенсации для конкретных комбинаций используемых антител.

Анализ данных

При анализе данных используют гистограммы, контурные и точечные графики, что позволяет более точно оценить экспрессию каждого маркера в отдельности и выявить все возможные коэкспрессии. Для точного выделения опухолевых клеток более предпочтительно использование точечных графиков, в то время как для оценки экспрессии каждого отдельного антигена более информативны гистограммы и контурные графики, поскольку они дают более полную информацию о распределении внутри опухолевой популяции по экспрессии антигена (рис. 1).

Последовательность действий при выделении опухолевых клеток представлена на рис. 2. На точечном графике прямого и бокового светорассеяния (forward vs side scatter, FSC/SSC) из анализа исключается дебрис (рис. 2а). Затем на графике, отображающем прямое светорассеяние в формате площади пика (FSC-A) и в формате высоты/ширины пика (FSC-H или FSC-W соответственно) выделяются синглеты (рис. 2б) и удаляются конгломераты клеток, способные давать завышенные значения флуоресценции. Опухолевые клетки выделяют на графике CD45/SSC (рис. 2в). Для исключения событий, попадающих в этот регион и не являющихся бластами (дебрис, лимфоциты, гранулоциты или моноциты), проводится дополнительное гейтирование клеток, выделенных по экспрессии CD45, на графике линейно-ассоциированный маркер/SSC (рис. 2г), если такой маркер есть в применяемой комбинации антител. В качестве линейно-ассоциированного антигена используют CD19, CD7 и CD33 для В-линейного

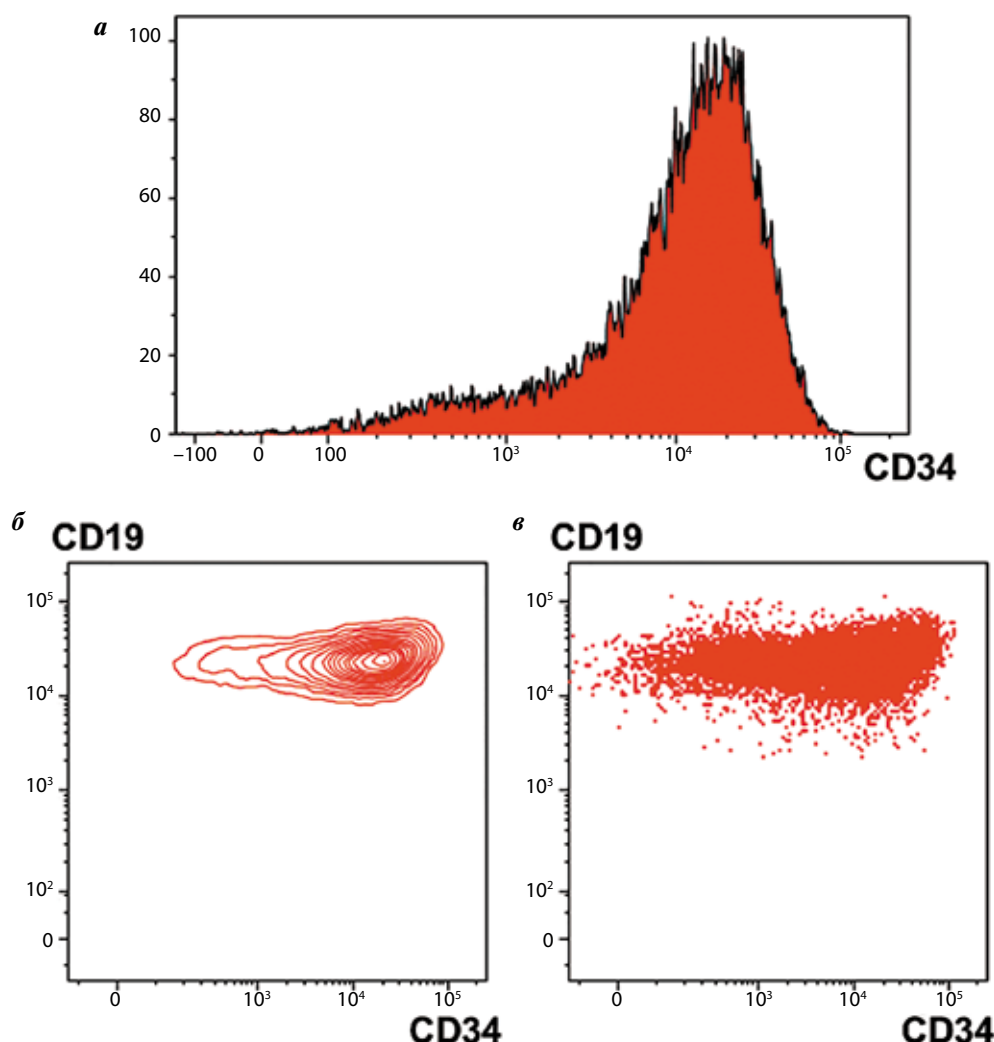


Рис. 1. Оценка экспрессии антигенов опухолевыми клетками на разных типах графиков. Гистограмма (а) и контурный график (б) дают больше информации о распределении клеток внутри опухолевой популяции по экспрессии CD34, чем точечный график (в)

Fig. 1. Evaluation of antigen expression by tumor cells on the different types of graphs. The histogram (a) and the contour graph (b) provide more information about cell distribution within the tumor population by CD34 expression than the dotted graph (c)

ОЛЛ, Т-лимфоидного ОЛЛ и острого миелоидного лейкоза соответственно. Допустимо проводить гейтирование и в обратном порядке, т. е. сначала выделять клетки по линейно-ассоциированному антигену (рис. 2а), а потом уже среди этих клеток выделять бласты по низкой экспрессии CD45 и соответствующим значениям SSC (рис. 2б). Если возникают сложности в выделении бластов при помощи только указанных антигенов, для этой цели допустимо использование любых антигенов, входящих в используемую комбинацию, однако сниженная экспрессия CD45 всегда является основным критерием бластной популяции.

Применение изотипического контроля считается нецелесообразным, так как в каждом образце присутствуют клетки, представляющие собой как положительный, так и отрицательный контроль для антигенов, экспрессируемых бластами. Например, для определения экспрессии CD19 положительным контролем являются нормальные В-лимфоциты, практически

всегда присутствующие в образце, а отрицательным — Т-лимфоциты или гранулоциты, которые также почти всегда хотя бы в небольшом количестве присутствуют в исследуемом материале. Необходимо учитывать, что с повышением значения SSC может повышаться аутофлуоресценция клеток и по каналам флуоресценции. Поэтому в качестве отрицательного контроля, если есть такая возможность, предпочтительно использовать клетки, имеющие сходное значение SSC с исследуемой популяцией. Ширина пика отрицательной контрольной популяции не является постоянной величиной и зависит от конкретного антитела, используемого флуорохрома, настроек прибора и особенностей клеток данного пациента.

Популяция считается позитивной по какому-либо антигену, если более 20 % клеток при мембранном окрашивании или более 10 % клеток при внутриклеточном окрашивании находятся правее правого края контрольной популяции [5]. В то же время, если

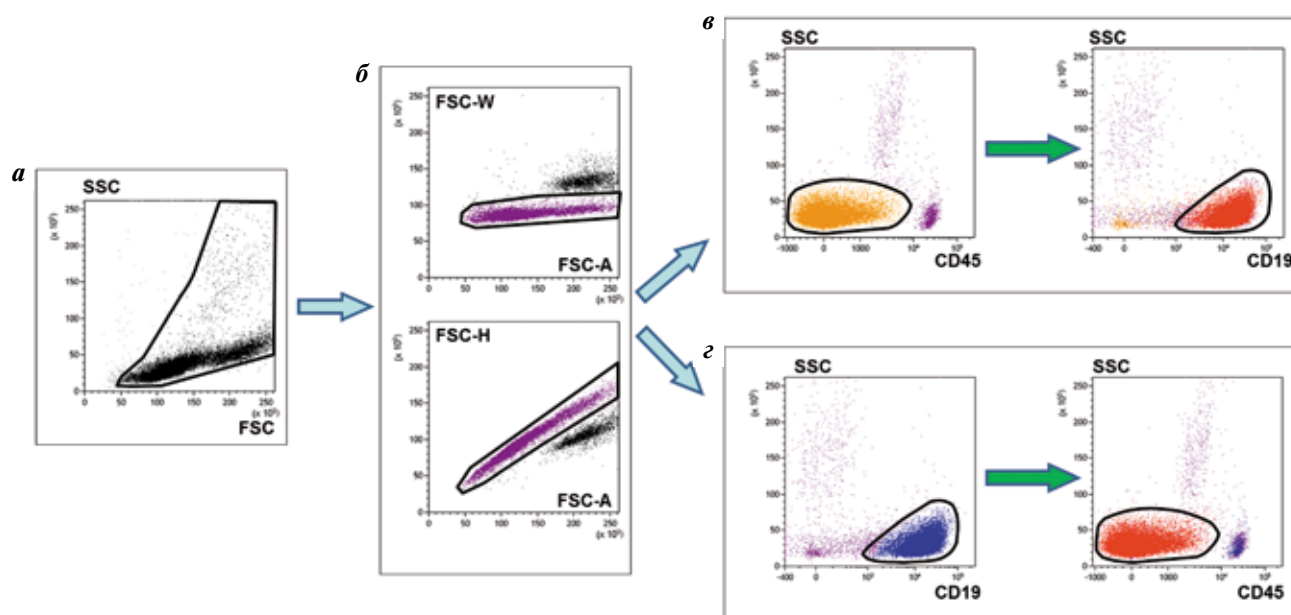


Рис. 2. Последовательность выделения опухолевых клеток для дальнейшей оценки иммунофенотипа: удаление из анализа разрушенных и мертвых клеток (а), исключение конгломератов клеток (б) и выделение бластных клеток (в, г). Опухолевая популяция показана красным. Пояснения в тексте
Fig. 2. Sequence of tumor cells isolation for further immunophenotype evaluation: removal of destroyed and dead cells (a), exclusion of cells conglomerates (б) and isolation of blast cells (в, г). Tumor population is shown in red. Explanations in the text

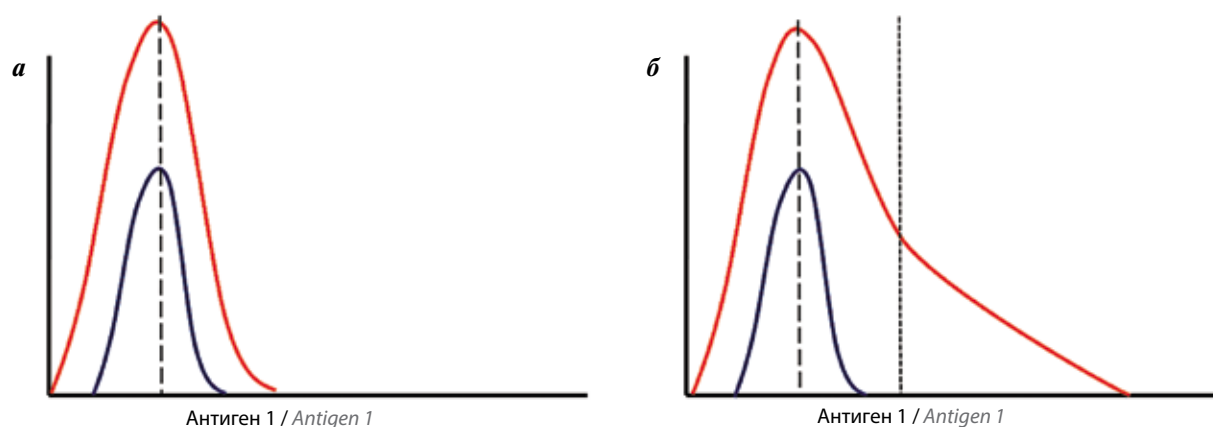


Рис. 3. Оценка экспрессии антигенов при большей вариации аутофлуоресценции опухолевой популяции (красная кривая) по сравнению с контрольными клетками (синяя кривая): отрицательный результат (а), и положительный на части клеток (б). Пояснения в тексте
Fig. 3. Evaluation of antigens expression with a greater autofluorescence variation of tumor population (red curve), compared to the control cells (blue curve): negative result (a), and positive on part of the cells (б). Explanations in the text

центры исследуемой и контрольной популяций совпадают, а флуоресценция в исследуемой популяции распределена нормально (кривая Гаусса на гистограмме, левый край левее левого края контрольной популяции настолько же, насколько правый край выступает за правый край популяции контрольных клеток), то популяция считается негативной (рис. 3а). Если центры исследуемой и контрольной популяций совпадают, опухолевая популяция может считаться позитивной только при ненормальном распределении флуоресценции внутри популяции и размере «плеча» более 20 или 10 % соответственно (рис. 3б).

Правой границей «негативной зоны» при определении экспрессии CD45 является левый край популяции нормальных гранулоцитов (рис. 4). Экспрессия

CD45 определяется как положительная, если выявляется существенное перекрытие (более 20 %) пиков опухолевой популяции и нормальных гранулоцитов [17].

Интерпретация данных

В-линейный ОЛЛ диагностируется в том случае, когда опухолевые бласты экспрессируют CD19, iCD79a, CD22. При этом они также могут экспрессировать другие В-линейные маркеры, такие как CD10, CD20, мембранные или цитоплазматические легкие или тяжелые (μ) цепи иммуноглобулинов. Для постановки диагноза достаточным является наличие экспрессии одного из линейно-специфических маркеров, если отсутствуют специфические маркеры других линий. При В-линейных ОЛЛ возможна коэкспрессия любых

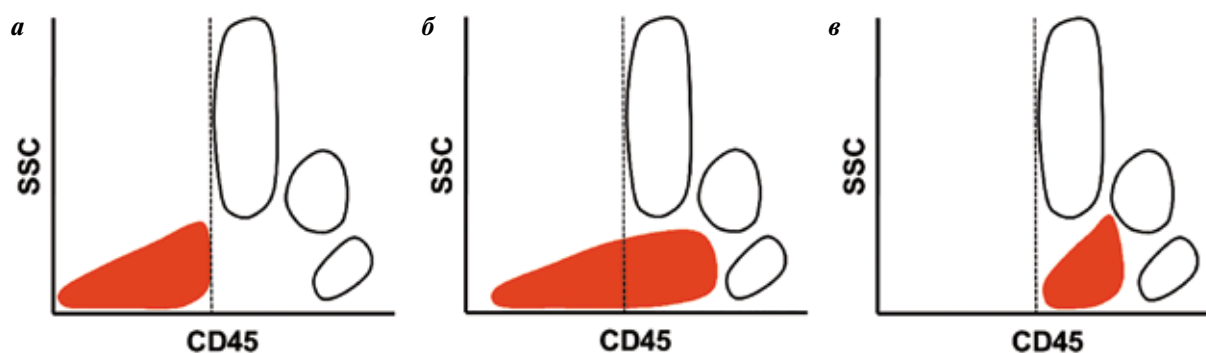


Рис. 4. Оценка экспрессии CD45 опухолевыми клетками (показаны красным): примеры расположения популяции при CD45-негативном (а), частичной экспрессии CD45 (б) и CD45-позитивном ОЛЛ (в)

Fig. 4. Evaluation of CD45 expression by tumor cells (shown in red): examples population location with CD45-negative (a), CD45 partial expression (б) and CD45-positive ALL (в)

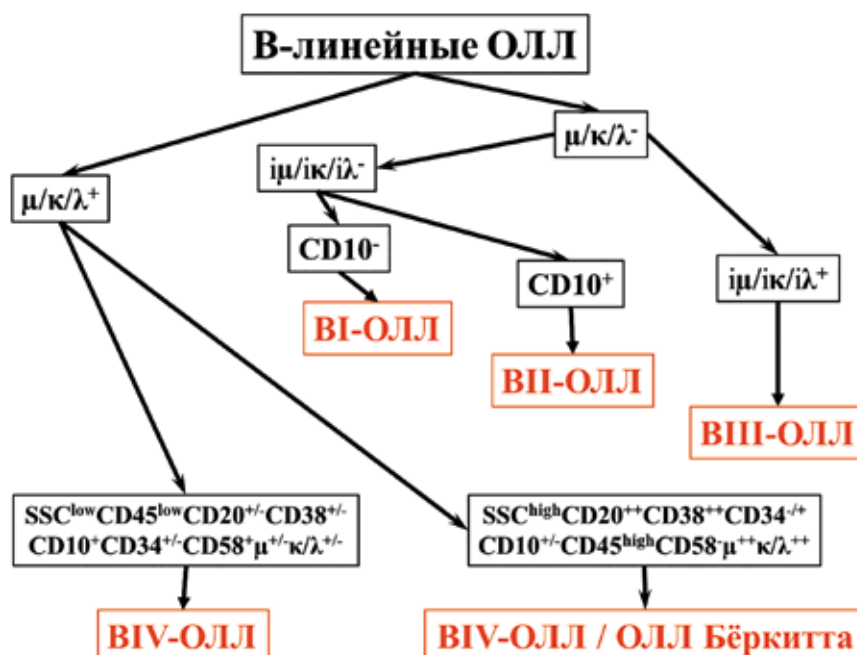


Рис. 5. Алгоритм дифференциальной диагностики В-линейных ОЛЛ согласно классификации EGIL [5] с учетом гетерогенности варианта BIV [22]

Fig. 5. The algorithm of B-linear ALL differential diagnosis, according to EGIL classification [5], taking into account the BIV-variant heterogeneity [22]

миелоидных антигенов (CD13, CD33, CD15, CD65, CD117) и их сочетаний, что не отменяет диагноз В-линейного ОЛЛ.

Т-линейный ОЛЛ диагностируется в том случае, если бласты экспрессируют CD7, а также цитоплазматический CD3. Эти клетки также могут экспрессировать CD2, CD5, CD3, CD1a, Т-клеточные рецепторы. Также при Т-ОЛЛ могут экспрессироваться В-линейные маркеры, такие как iCD79a и CD10, но не CD19 или CD22.

Острый миелоидный лейкоз диагностируется в том случае, если бласты экспрессируют миелоидные маркеры (CD13, CD33, CD15, CD65, CD117, iMPO) и не экспрессируют специфические лимфоидные.

Острый лейкоз со смешанным фенотипом диагностируют в тех случаях, когда бластные клетки экспрессируют одновременно специфические маркеры миелоидной и одной из лимфоидных линий [7, 8] либо

определяются 2 опухолевые популяции с разной линейной принадлежностью.

Среди как В-, так и Т-линейных ОЛЛ выделяют несколько вариантов, различающихся степенью «зрелости» опухолевых клеток (BI–BIV и TI–TIV) [5], а также отдельную группу ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) [20, 21].

Для В-линейных ОЛЛ степень зрелости определяется по наличию CD10, а также мембранных и цитоплазматических легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов [5]. Остальные маркеры, такие как CD20, CD34, TdT, CD58, имеют лишь вспомогательное значение и не являются основой для постановки диагноза. Алгоритм диагностики В-линейных ОЛЛ представлен на рис. 5. Варианты BI, BII и BIII относятся к ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ).

В части случаев возможна экспрессия iIgM при отсутствии CD10, что не отменяет диагноза BIII-ОЛЛ.

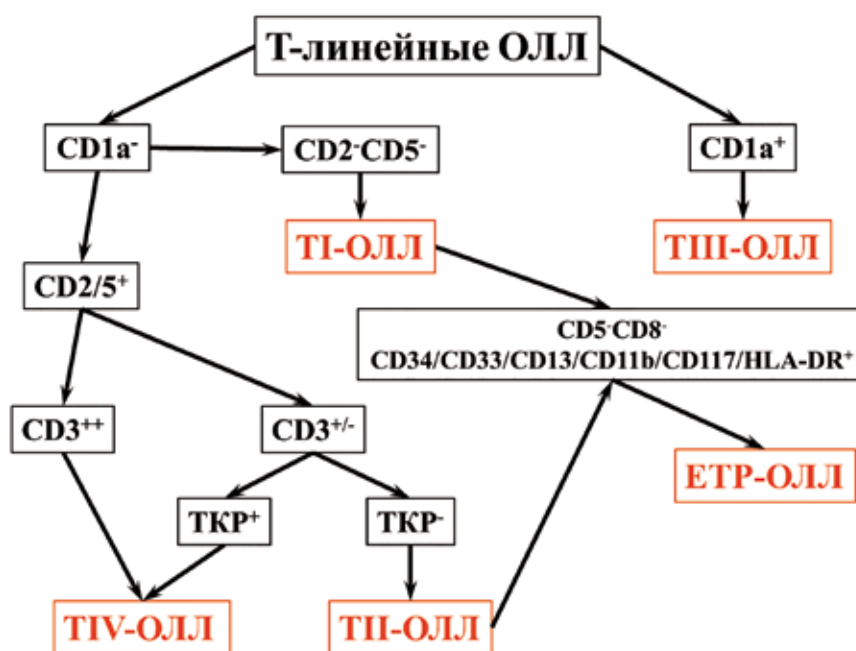


Рис. 6. Алгоритм дифференциальной диагностики Т-линейных ОЛЛ согласно классификации EGIL [5] с учетом отдельной группы ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) [20, 21]

Fig. 6. The algorithm of T-linear ALL differential diagnosis, according to the EGIL classification [5], taking into account a separate group of ALL from early T-linear precursors (ETP-ALL) [20, 21]

Если экспрессия CD10 при ВП-ОЛЛ составляет более 20 %, но менее 50 %, то такие случаи следует обозначать как VI/ВП-ОЛЛ. Если внутриклеточная экспрессия IgM обнаруживается только в 1 субпопуляции бластов (10–50 %), заключение может быть сформулировано как ВП/III. Некоторые случаи при частичной экспрессии iIgM могут быть классифицированы как VI/III. Редкие случаи ВП-ОЛЛ с поверхностной экспрессией легких цепей иммуноглобулина (на поверхности или в цитоплазме) не имеют других признаков лимфомы/лейкоза Беркитта (морфология L3 по классификации FAB, перестройки гена *MYC*, высокая скорость пролиферации) [17, 22]. Такие случаи относят к BIV [17], но включают в общепринятое лечение ОЛЛ. Зачастую у таких пациентов выявляются перестройки гена *KMT2A* [17, 22].

При Т-линейных ОЛЛ степень зрелости определяется по наличию CD2, CD5, CD1a, CD4 или CD8, мембранному CD3, а также Т-клеточным рецепторам (TKP) [5]. Алгоритм диагностики Т-линейных ОЛЛ представлен на рис. 6. Экспрессия CD3 на поверхности клеток встречается уже на достаточно ранних стадиях зрелости, а не только на стадии TIV [17]. Экспрессия CD1a независимо от других маркеров позволяет поставить диагноз TIII-ОЛЛ [5]. При частичной экспрессии CD1a при TIII-ОЛЛ заключение должно быть сформулировано как TII/TIII-ОЛЛ.

При ОЛЛ из ранних Т-линейных предшественников (ETP-ОЛЛ) бласты экспрессируют CD3 внутриклеточно, также для них характерны низкая (менее 75 %) экспрессия CD5, отсутствие экспрессии CD1a и CD8, экспрессия хотя бы одного из миелоидных

антигенов (CD13, CD33, CD11b, CD117) или маркеров клеток-предшественников [20, 21].

Формат заключения

При формулировании итогового заключения необходимо придерживаться общепринятой терминологии согласно критериям диагностики того или иного варианта ОЛЛ. В заключении отражается полная картина иммунофенотипирования, в которую входят идентификационные данные о больном, данные об экспрессии отдельных маркеров, характеристика преобладающего ростка, наличие и описание дополнительных опухолевых популяций, а также процентное содержание бластов в образце.

Иммунофенотип ОЛЛ определяется, когда популяцию бластов удастся четко отличить от нормальных клеток, независимо от численного порогового процентного содержания бластов. Учитываются фенотипически aberrантные популяции, дающие основание предполагать ОЛЛ, даже в случаях, когда процент бластов слишком мал для формальной постановки диагноза лейкоза.

В заключении указывается вариант острого лейкоза, а также коэкспрессия маркеров других линий (если есть).

Заключение

Таким образом, разработанный и представленный в данной работе стандартизованный подход к иммунофенотипированию ОЛЛ методом проточной цитометрии позволит в дальнейшем применять данную диагностическую технологию в системе референсных лабораторий в российско-белорусских многоцентровых исследованиях по лечению ОЛЛ у детей.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551–65. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7405. PMID: 21220611.
2. Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E., Relling M.V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120(6):1165–1174. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943. PMID: 22730540
3. Faderl S., O'Brien S., Pui C.H. et al. Adult acute lymphoblastic leukemia: concepts and strategies. *Cancer* 2010;116(5):1165–76. DOI: 10.1002/cncr.24862. PMID: 20101737.
4. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Фечина Л.Г. и др. Острые лейкозы: различия иммунофенотипа бластных клеток и их неопухолевых аналогов в костном мозге. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):302–13. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Fechina L.G. et al. Acute leukemias: Immunophenotyping differences between blast cells and their nonneoplastic analogues in bone marrow. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2016;9(3):302–13. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-302-313.
5. Bene M.C., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6. PMID: 7564526.
6. Bene M.C., Bernier M., Casasnovas R.O. et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 1998;92(2):596–9. PMID: 9657760.
7. Vardiman J., Thiele J., Arber D. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937–51. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209262. PMID: 17357394.
8. Arber D., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.
9. Wood B.L., Arroz M., Barnett D. et al. 2006 Bethesda international consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(Suppl. 1):S14–22. DOI: 10.1002/cyto.b.20363. PMID: 17803189.
10. Van Dongen J.J.M., Orfao A. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. *Leukemia* 2012;26(9):1899–907. DOI: 10.1038/leu.2012.121. PMID: 22948488.
11. Kalina T., Flores-Montero J., Lecomte Q. et al. Quality assessment program for EuroFlow protocols: summary results of four-year (2010–2013) quality assurance rounds. *Cytometry A* 2015;87(2):145–56. DOI: 10.1002/cyto.a.22581. PMID: 25345353.
12. Зуева Е.Е., Афанасьев Б.В., Тотолян А.А. Иммунофенотипирование в диагностике острых лейкозов (лекция). *Клиническая лабораторная диагностика* 2004; (7):25–32. [Zueva E.E., Afanasiev B.V., Totolyan A.A. Immunophenotyping in the diagnosis of acute leukemia (lecture). *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2004;(7):25–32 (In Russ.)].
13. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Туписин Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов. Тверь: ООО Издательство «Триада», 2005. 168 с. [Lugovskaya S.A., Pochtar M.E., Tupitsin N.N. Immunophenotyping in the hemoblastosis diagnosis. Tver: Triada, 2005. 186 p. (In Russ.)].
14. Антипова А.С., Баранова О.Ю., Френкель М.А. и др. Острые лейкозы со смешанным фенотипом: клинико-лабораторные особенности и прогноз. *Клиническая онкогематология* 2015; 8(2):136–50. [Antipova A.S., Baranova O.Yu., Frenkel M.A. et al. Mixed Phenotype Acute Leukemia: Clinical and Laboratory Features, and Prognosis. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2015;8(2):136–50 (In Russ.)].
15. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Зуева Е.Е. и др. Результаты внешнего контроля качества диагностики острого лимфобластного лейкоза методом точной цитометрии. *Онкогематология* 2016;11(3):68–75. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-3-68-75. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Zueva E.E. et al. Results of external quality control study in flow cytometric acute lymphoblastic leukemia diagnostics. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(3):68–75 (In Russ.)].
16. Попов А.М., Лагойко С.Н., Румянцев Ю.В. и др. Проблемы иммунофенотипирования в России: опыт работы референс-центра кооперированной клинической группы «Москва–Берлин». *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;14(1):58–61. [Popov A.M., Lagoiko S.N., Roumiantseva J.V. et al. Problems of flow cytometry immunophenotyping in Russia: Experience gained by the Reference Center of Moscow – Berlin Cooperative Clinical Group. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015;14(1):58–61 (In Russ.)].
17. Dworzak M., Buldini B., Gaipa G. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytometry* 2018;94(1):82–93. DOI: 10.1002/cyto.b.21518. PMID: 28187514.
18. Fechina L., Shorikov E., Tsaur G. et al. Contribution of all-trans retinoic acid to improved early relapse-free outcome in infant acute lymphoblastic leukemia comparing to the chemotherapy alone. *Blood* 2007;110(11):832A. Abstr. 2828.
19. Румянцев Ю.В., Карачунский А.И., Румянцев А.Г. Оптимизация терапии острого лимфобластного лейкоза у детей в России. *Педиатрия* 2009;87(4):19–27. [Roumiantseva J.V., Karachunskiy A.I., Rummyantsev A.G. Optimization of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy in Russia. *Pediatrriya = Pediatrics* 2009;87(4):19–27. (In Russ.)].
20. Coustan-Smith E., Mullighan C.G., Onciu M. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2009;10:147–156. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70314-0. PMID: 19147408.
21. Бойченко Э.Г., Попов А.М., Макарова Т.А. и др. Острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников Т-клеток (обзор литературы и собственные клинические наблюдения). *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015;14(1):38–45. [Boychenko E.G., Popov A.M., Makarova T.A. et al. Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (Review of literature and clinical case reports). *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii = Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology* 2015;14(1):38–45 (In Russ.)].
22. Дёмина И.А., Вержбицкая Т.Ю., Кашпор С.А. и др. Гетерогенность В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BIV-иммуновариант) у детей. *Онкогематология* 2017;12(4):34–40. [Demina I.A., Verzhbitskaya T.Yu., Kashpor S.A. et al. Heterogeneity of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (EGIL subtype BIV). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2017;12(4):34–40 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-34-40.

Вклад авторов

Новикова И.А.: концепция, дизайн и написание статьи;
Вержбицкая Т.Ю.: анализ результатов иммунофенотипирования, написание статьи;
Мовчан Л.В.: анализ результатов иммунофенотипирования, написание статьи;
Цаур Г.А.: концепция и дизайн;
Белевцев М.В.: концепция и дизайн;
Попов А.М.: концепция, дизайн исследования, написание статьи, правка статьи.

Authors' contributions

Novikova I.A.: concept, design and paper text writing;
Verzhbitskaya T.Yu.: flow cytometry data analysis, paper text writing;
Movchan L.V.: flow cytometry data analysis, paper text writing;
Tsaur G.A.: paper concept and design;
Belevtsev M.V.: paper concept and design;
Popov A.M.: study design, paper concept, paper text writing and editing.

ORCID авторов

И.А. Новикова: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>
Т.Ю. Вержбицкая: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>
Л.В. Мовчан: <https://orcid.org/0000-0002-0441-0109>
Г.А. Цаур: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>
М.В. Белевцев: <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>
А.М. Попов: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

ORCID of authors

I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0001-6689-5861>
T.Yu. Verzhbitskaya: <https://orcid.org/0000-0001-9329-1828>
L.V. Movchan: <https://orcid.org/0000-0002-0441-0109>
G.A. Tsaur: <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>
M.V. Belevtsev: <https://orcid.org/0000-0001-9533-4705>
A.M. Popov: <https://orcid.org/0000-0002-0889-6986>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 15.01.2018. **Принята к публикации:** 09.03.2018

Article received: 15.01.2018. **Accepted for publication:** 09.03.2018

Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы)

Т.И. Лобанова, И.В. Гальцева, Е.Н. Паровичникова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

Контакты: Татьяна Игоревна Лобанова lobanova_tanya@yahoo.com

Пациенты с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) имеют высокий риск развития рецидива, и определение наличия остаточных опухолевых клеток в период ремиссии позволяет прогнозировать его наступление. С высокой вероятностью развития рецидива также ассоциировано медленное снижение количества бластных клеток после курсов индукции ремиссии. Для диагностики минимальной остаточной болезни (МОБ) используют два наиболее чувствительных метода: молекулярный (полимеразная цепная реакция — ПЦР, капельная цифровая ПЦР, секвенирование нового поколения) и иммунофенотипический (многоцветная проточная цитофлуориметрия — МПЦ), которые имеют как преимущества, так и недостатки. Молекулярный метод более чувствителен, однако для получения результата требуется больше времени (от нескольких дней). Определение МОБ методом ПЦР применимо у 40–50 % пациентов с ОМЛ, а методом МПЦ — у 90 %. Метод МПЦ основан на выявлении сочетания антигенов, характерного для опухолевых клеток и не обнаруживаемого на нормальных гемопоэтических клетках. К недостаткам данного метода можно отнести смену иммунофенотипа опухолевого клона в ходе лечения, недостаточное различие антигенных профилей опухолевых и нормальных клеток, а также трудности в оценке МОБ-статуса при низкой клеточности образца костного мозга или крови.

У пациентов с ОМЛ в ходе многочисленных исследований было доказано влияние МОБ, исследованной методом МПЦ, на долгосрочные результаты лечения. Определение МОБ-статуса на раннем сроке позволяет оценить химиочувствительность опухоли и эффективность проводимой терапии. Несмотря на различные подходы в детекции МОБ, ее пороги и сочетания моноклональных антител, отсутствие стандартизации, «положительные» значения на ранних или более поздних этапах терапии ухудшают безрецидивную и общую выживаемость) пациентов с ОМЛ. До сих пор не разработаны принципы МОБ-направленной терапии, однако имеются протоколы по применению таргетных препаратов в сочетании со стандартной химиотерапией, что позволяет существенно снизить показатели МОБ. Доказано, что интенсификация лечения не оказывает влияния на количественное значение МОБ и отдаленные результаты терапии. Необходимы новые проспективные исследования, направленные на поиск универсальных маркеров МОБ, создание стандартизированной панели моноклональных антител и разработку эффективной терапии в соответствии со значениями МОБ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, минимальная остаточная болезнь, гематология, химиотерапия, рецидив

Для цитирования: Лобанова Т.И., Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н. Исследование минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (обзор литературы). Онкогематология 2018;13(1):83–102.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-83-102

Minimal residual disease assesment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review)

T.I. Lobanova, I.V. Galtseva, E.N. Parovichnikova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia, 4 Noviy Zykovskiy proezd, Moscow 125167, Russia

Patients with acute myeloid leukemia (AML) have a high risk of relapse. Determination of the presence of residual tumor cells during the remission of AML allows predicting the onset of relapse. Slow decrease of blast cells after induction courses is associated with a high probability of relapse. There are two most sensitive methods for determining minimal residual disease (MRD): molecular (polymerase chain reaction — PCR, droplet digital PCR, next generation sequencing — NGS) and immunophenotypic (multicolor flow cytometry — MFC). Both methods have advantages and disadvantages. The molecular diagnostic method is more sensitive, but it takes more time to get the result (from several days). Measurement of MRD by PCR is applicable in 40–50 % of AML patients, and by MFC — in 90 % of patients. The MFC method is based on the identification of antigens combination that is characteristic of tumor cells and is not found on normal hematopoietic cells. There are several drawbacks of the MFC method: the change of tumor clone immunophenotype during treatment, the inadequate difference in the antigen profiles of tumor cells and normal cells, difficulties in evaluating the MRD status in low cellularity bone marrow or blood

sample. In AML patients the effect of MRD, measured by the MFC method, on long-term treatment outcomes was well-demonstrated. Evaluation of early MRD status shows tumor chemosensitivity and therapy efficacy. Despite the different approaches in MRD detection, thresholds and the combination of monoclonal antibodies, the lack of standardization, "positive" MRD values in early or later stages of therapy worsen the disease-free (DFS) and overall survival (OS) in AML patients. So far, the principles of MRD-directed therapy have not been developed, but protocols exist with the use of targeted drugs in combination with standard chemotherapy that help to reduce the MRD level. It is proved that the intensification of treatment does not affect the quantitative value of MRD and the long-term results of therapy. New prospective studies are needed to search for universal MRD markers, to create a standardized panel of monoclonal antibodies and to develop a specific therapy strategy in accordance with the MRD values.

Key words: Minimal residual disease, hematology, chemotherapy, relapse

For citation: Lobanova T.I., Galtseva I.V., Parovichnikova E.N. Minimal residual disease assesment in patients with acute myeloid leukemia by multicolour flow cytometry (literature review). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2018;13(1)83–102.

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — одно из наиболее тяжелых злокачественных заболеваний системы крови. За последние 20 лет результаты лечения его у взрослых принципиально не изменились — полную ремиссию (ПР) после интенсивной химиотерапии (ХТ) подтверждают у 70–80 % пациентов, а вероятность 5-летней безрецидивной выживаемости (БРВ) составляет 30–40 % [1, 2]. Эффективность ХТ острых лейкозов зависит от специфичности цитостатического воздействия и выбора сопроводительного лечения. Биологические особенности лейкоемического клона (молекулярные маркеры, химиочувствительность, цитогенетические аномалии), наличие гиперлейкоцитоза в дебюте заболевания, концентрация лактатдегидрогеназы определяют его прогноз. Достаточно часто возникает рецидив, который в большинстве случаев плохо поддается лечению [3]. Персистенция остаточных опухолевых клеток — минимальная остаточная болезнь (МОБ) — может стать причиной развития рецидива ОМЛ. В ПР заболевания лейкоемические клетки возможно выявить с помощью высокочувствительных методов [4]. В ходе многочисленных исследований показано, что количественное определение МОБ служит независимым прогностическим фактором [5–9]. Пациенты с неопределяемой МОБ (МОБ-негативный статус) на ранних этапах терапии имеют благоприятный долгосрочный прогноз, а лицам с выявляемой МОБ (МОБ-позитивный статус) требуются интенсификация или смена лечения и новые терапевтические подходы. Предпосылками успешной трансплантации аллогенного костного мозга (аллоТКМ) являются минимальные значения МОБ до ТКМ и отсутствие МОБ после нее [10]. Поскольку исследование МОБ необходимо для контроля течения заболевания и его прогноза, а также способствует адекватному выбору наиболее эффективной и сопряженной с меньшим риском стратегии терапии [11], оно включено в многочисленные протоколы терапии взрослых пациентов и детей. Методы, используемые для определения МОБ, должны быть стандартизированными, специфичными, высокочувствительными и точными в плане измере-

ния количества остаточных опухолевых клеток с возможностью быстрого получения результата.

Методы диагностики минимальной остаточной болезни

Для диагностики МОБ используют методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и многоцветной проточной цитофлуориметрии (МПЦ) [4], их сравнительная характеристика представлена в табл. 1. Оба метода имеют преимущества и недостатки, однако применимость МПЦ у большинства больных ОМЛ, а также быстрое получение результата делают его более универсальным. Чувствительность детекции МОБ выражают величиной, обратной числу нормальных клеток, приходящихся на одну выявленную лейкозную клетку.

Молекулярные методы детекции минимальной остаточной болезни. В настоящее время высокочувствительные методы на основе определения дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот (ДНК и РНК) могут идентифицировать МОБ с высокой чувствительностью — одна опухолевая клетка на 1 млн нормальных. Опухолевая клетка может быть обнаружена путем определения нуклеотидных последовательностей генов, специфичных для конкретной опухоли. Наиболее часто МОБ определяют методом ПЦР, где в качестве мишени выступает ДНК. Если мишенью служит РНК, то требуется проведение дополнительного этапа — обратной транскрипции, когда на матрице РНК образуется комплементарная ей ДНК. Молекулярные мишени при ОМЛ подразделяют на следующие группы: химерные транскрипты, мутации в генах, гиперэкспрессия генов. Примеры использования различных молекулярных методов для определения МОБ приведены в табл. 2.

У больных ОМЛ наиболее часто встречаются хромосомные реаранжировки t(8;21) и inv(16)/t(16;16), которые ведут к появлению химерных генов *RUNX1/RUNX1T1* (*AML1-ETO*) и *CBFβ-MYH11* соответственно. Частота их обнаружения составляет 15 %, все они ассоциированы с благоприятным прогнозом [12]. Исследования по мониторингу МОБ с использованием в качестве мишеней *RUNX1/RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*

Таблица 1. Сравнительная характеристика методов определения минимальной остаточной болезни

Table 1. Comparative characteristics of MRD detection methods

Параметр сравнения Comparison parameter	Проточная цитометрия Flow cytometry	Полимеразная цепная реакция Polymerase chain reaction
Продолжительность исследования Detection duration	Результат в течение нескольких часов Result for several hours	Результат в течение нескольких дней Result for several days
Необходимость исследования в дебюте The need for detection in the disease onset	Необязательно, но желательно Optionally, but preferably	Обязательно Required
Чувствительность Sensitivity	Желательно наличие нескольких ЛАИФ и анализ минимум 200 000 событий для адекватной чувствительности (10^{-4}) It is desirable to have several LAIF and analyze at least 200,000 events for adequate sensitivity (10^{-4})	Высокая чувствительность, более высокая, чем при МПЦ (от 10^{-4} до 10^{-6}) High sensitivity, higher than by flow cytometry (from 10^{-4} to 10^{-6})
Стабильность исследуемых маркеров Stability of the investigated markers	ЛАИФ может изменяться в течение терапии LAIF can change during therapy	Большинство мишеней устойчивы и неизменны Most targets are stable and unchanged

Примечание: ЛАИФ — лейкоз-ассоциированный иммунофенотип; МПЦ — многоцветная проточная цитофлуориметрия.

Note: LAIF — leukemia-associated immunophenotype.

Таблица 2. Мишени для исследования минимальной остаточной болезни молекулярными методами [12]

Table 2. Targets for MRD detection by molecular methods [12]

Параметр Parameter	Химерные транскрипты Chimeric Transcripts	Внутренние мутации в генах Internal gene mutations	Гиперэкспрессия генов Genes hyperexpression
Примеры молекулярных маркеров Examples of molecular markers	<i>AML1-ETO, CBFβ-MYH11</i> , химерные гены с участием гена <i>MLL: MLL(KMT2A)-AF9</i> , <i>MLL-ELL, MLL-AF6</i> , <i>PML-RARα</i> <i>AML1-ETO, CBFβ-MYH11</i> , chimeric genes involving the <i>MLL</i> gene: <i>MLL(KMT2A)-AF9, MLL-ELL</i> , <i>MLL-AF6; PML-RARα</i>	<i>FLT3, NPM1, C/EBPα</i> , <i>N-RAS, K-RAS, JAK2, JAK3</i> , <i>PDGFR, p53, NF1, cKit</i>	<i>WT1, EVI1, PRAME</i>
Молекулярная мишень Molecular target	РНК (реакция ОТ-ПЦР) RNA (RT-PCR reaction)	ДНК DNA	РНК (реакция ОТ-ПЦР) RNA (RT-PCR reaction)
Недостатки метода Disadvantages of the method	Нестабильность РНК Различия в экспрессии РНК между клетками RNA instability Differences in RNA expression between cells	Нестабильность мутаций Instability of mutations	Нестабильность РНК Различия в экспрессии РНК между клетками RNA instability Differences in RNA expression between cells

Примечание: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР — метод ПЦР с обратной транскрипцией; РНК — рибонуклеиновая кислота.

Note: DNA — deoxyribonucleic acid; RT-PCR — reverse transcription polymerase chain reaction; RNA — ribonucleic acid.

немногочисленны и включают относительно малое число пациентов, что, вероятно, связано с небольшим процентом встречаемости этих мутаций. Так, в исследовании J. Krauter и соавт. приняли участие 37 больных: 22 — с t(8,21) и 15 — с inv(16), которым проводили стандартную индукционную ХТ. В дальнейшем пациентов разделяли на группы: больным с ≥ 5 % бластных

клеток проводили консолидирующие курсы высокодозной ХТ, а у лиц с < 5 % бластных клеток продолжали стандартную ХТ. В качестве контрольных точек исследования МОБ приняты период после 1-го и 2-го индукционных курсов, 1-го и 2-го консолидирующих курсов, а также момент рецидива. Пороговым значением была МОБ более 1 %; из 11 пациентов

с МОБ-позитивным статусом хотя бы в одной точке исследования у 10 констатировали рецидив ОМЛ (средняя продолжительность ремиссии — 10 мес) [13]. А. Guerasio и соавт. наблюдали 36 пациентов с *CBFβ/МУН11*. Контрольными точками в ПР служили периоды после индукции и после курсов консолидации, а также через 4–12 мес ПР. Оказалось, что практически у всех участников сохранялся аномальный транскрипт в ранние сроки после индукционной ХТ, а пороговое значение МОБ составило 0,01 %. У всех пациентов с положительными значениями МОБ констатировали рецидив [14]. S. Buonamici и соавт. включили в исследование 21 пациента с *inv(16)*, контрольные точки — окончание индукционного, консолидирующего курсов, а также период после выполненной аллоТКМ (наблюдение в течение 3 лет). Значения *CBF-МУН11/ABL* более 0,25 % ассоциировались с риском развития рецидива [15]. В ходе описанных выше исследований показано, что более высокие значения химерных транскриптов ассоциированы с более низкими показателями БРВ. В 2017 г. E. Jourdan и соавт. проанализировали образцы костного мозга (КМ) 198 пациентов, включенных в CBF-2006 trial в контрольные точки перед началом 1, 2 и 3 консолидации с пороговым значением МОБ 0,1 %. При этом пациенты были рандомизированы в группы стандартной и высокодозной ХТ. Показано, что оба направления протокола оказались одинаково эффективными. БРВ не отличалась в обеих группах, несмотря на более быстрое снижение МОБ в группе высокодозной ХТ в первых двух точках исследования. Точку МОБ-диагностики перед 2-й консолидацией использовали в качестве критерия стратификации пациентов на аллоТКМ при МОБ-редукции менее 3 логарифмов или $\geq 0,1$ % [16].

Химерные гены с участием *KMT2A (MLL)* возникают в результате реарранжировок региона 11q23, обнаруживаются в 10 % случаев и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Детекция МОБ с помощью этих маркеров — сложная задача, так как *KMT2A* может участвовать в более чем 50 различных транслокациях. Наиболее частые из них — *t(9;11)(p22;q23)*, *t(11;19)(q23;p13.3)* и *t(6;11)(q27;q23)* [17].

При остром промиелоцитарном лейкозе транслокация (15;17) приводит к образованию химерного гена *PML-RARα*, что является характерным признаком этого заболевания и «золотым стандартом» определения МОБ при данном варианте лейкоза [18].

Наиболее известным и изученным белком с мутациями в его гене, ассоциированным с ОМЛ, является рецепторная тирозинкиназа 3 (*FLT3*). Этот белок имеет функцию внутриклеточной тирозинкиназы и играет роль в росте и дифференцировке стволовых клеток [19]. В 30 % случаев ОМЛ выявляются мутации этого гена [20]. Наиболее часто встречаются внутренние tandemные дупликации (*FLT3-internal tandem duplication — ITD*), которые вызывают фактор-независимый рост клеток и ассоциированы с неблагоприятным прогно-

зом. У пациентов с выявленной мутацией *FLT3* чаще определяется нормальный кариотип, однако иногда отмечается сочетание *FLT3* и *t(6;9)(p23;q34)*, а также *t(15,17)(q22;q12)*. Мутации в киназном домене *FLT3 (FLT3/TKD)* встречаются у больных с нормальным кариотипом в 6–7 % случаев, однако прогностическое влияние на долгосрочные результаты терапии этих мутаций не доказано [21]. Ограничивает применение этой мутации в качестве мишени для мониторинга МОБ ее нестабильность в ходе терапии: мутации могут трансформироваться или исчезать [22].

Мутации в гене нуклеофосмина 1 также относят к прогностически значимым у лиц с ОМЛ. Ген *NPM1* располагается на хромосоме 5 и кодирует фосфопротеин, который участвует в поддержании стабильности генома, образовании рибосом, регуляции транскрипции и опухолевой супрессии [23]. У больных ОМЛ с нормальным кариотипом и отсутствием мутации *FLT3-ITD* мутации *NPM1* свидетельствуют о благоприятном прогнозе заболевания. В сравнении с мутациями гена *FLT3* мутации *NPM1*-гена стабильны и могут быть использованы для мониторинга МОБ [24].

Ген *C/EBPα* находится на хромосоме 19, и его продукт участвует в регуляции линейной дифференцировки клеток [25]. Мутации этого гена встречаются у 25 % пациентов с ОМЛ (чаще с M1- и M2-вариантами), при нормальном кариотипе — в 8–10 % случаев. Мутация в этом гене, особенно биаллельная, также ассоциирована с благоприятным прогнозом [23, 24]. В отличие от мутаций *FLT3*, пациенты с мутациями *C/EBPα* на момент первичной диагностики и в период рецидива имеют тот же тип мутации [26]. Существуют также герминальные (врожденные) мутации этого гена, они чаще всего биаллельные и встречаются до 15 % случаев ОМЛ, не влияют на результаты терапии и прогноз [27, 28]. В настоящее время исследований по применению *C/EBPα* для мониторинга МОБ не было [29].

Альтернативной мишенью для молекулярного мониторинга МОБ является исследование гиперэкспрессии генов, таких как *WT1*, *EVII* и *PRAME*. Эти гены экспрессируются в низких количествах в нормальных гемопоэтических клетках. *EVII* — протоонкоген, связанный с перестройками 3q26, встречается в 8 % случаев ОМЛ, и его высокая экспрессия в дебюте заболевания ассоциирована с неблагоприятным прогнозом [30]. Ограничением исследования генов *WT1* и *PRAME* является то, что в нормальных регенерирующих клетках КМ эти гены могут быть гиперэкспрессированы, что приводит к ложноположительным результатам при оценке МОБ. Однако в случаях, когда на фоне постоянной экспрессии *WT1* в периоде ремиссии его экспрессия повышается, можно заподозрить признаки развития рецидива [31]. С другой стороны, недостатком исследования экспрессии генов является то, что РНК подвергается деградации (особенно при длительном хранении и на этапе выделения), которая становится причиной ложнонегативных результатов.

Для получения количественного результата исследования МОБ методом ПЦР требуется использование стандартов с известным числом ДНК-мишеней или контрольного гена (например, гена «домашнего хозяйства»). В настоящее время используют цифровую капельную ПЦР, которая позволяет получить количественный результат напрямую, без использования калибраторов. Принцип этого метода основан на дроблении реакционной смеси на капли, в каждой из которой проходит реакция ПЦР. ПЦР-положительные и ПЦР-отрицательные капли затем подсчитывают и определяют абсолютное количество ДНК-мишеней в образце. С помощью этого метода исследуют многочисленные генетические маркеры при ОМЛ (гиперэкспрессии генов *STMN1*, *KITLG*, *CDK6*, *MCM5*, *ABL1*, *ANXA3*, *KRAS*, *CEBPA*, *MYC*, *ANGPT1*, *SRGN*, *RPLP0*, *ENO1*, *SET*, *STMN1*, *CAT*) [32, 33]. Появление технологий секвенирования нового поколения (СНП) ускорило открытие новых генетических повреждений у больных ОМЛ и позволило идентифицировать полный диапазон геномных изменений: точечные мутации, изменения количества копий и структурные перестройки, включая транслокации, критические перестановки, инверсии и сложные перегруппировки во всем геноме. У пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом СНП позволило обнаружить нескольких новых мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1* и др. Их прогностическое значение было недавно изучено как изолированно, так и в сочетании с другими известными молекулярными аномалиями [34].

Молекулярные маркеры для мониторинга МОБ при ОМЛ имеются у 40–60 % пациентов [11]. В частности, ПЦР-диагностику МОБ нельзя применить для мониторинга лейкозов с числовыми аномалиями кариотипа, а также с некоторыми делециями и транслокациями без расшифрованных молекулярных перестроек.

Многоцветная проточная цитофлуориметрия. Мониторинг МОБ методом МПЦ основан на детекции лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (ЛАИФ) [11]. ЛАИФ — это сочетание антигенов, характерное для опухолевых клеток и не обнаруживаемое (или обнаруживаемое в небольшом количестве) на нормальных гемопоэтических клетках [35]. Наиболее точные количественные результаты МОБ получают при одновременном анализе коэкспрессии 10 и более антигенов, меченных разными флуорохромами, что позволяет с большей достоверностью определить популяцию опухолевых клеток по их ЛАИФ [36]. Чувствительность метода определяется числом проанализированных клеток, т. е. зависит от количества клеток в образце КМ или крови. Теоретически чувствительность метода может достигать 10^{-4} – 10^{-6} , но на практике не всегда возможно выделить достаточное для анализа количество клеток, особенно после высокодозных курсов лечения [37]. По данным зарубежных авторов, аномальный лейкозный иммунофенотип можно выявить у 73–94 % пациентов с *de novo* ОМЛ [34, 35].

Существует два подхода для детекции МОБ методом МПЦ. Первый заключается в определении ЛАИФ в дебюте заболевания и последующего подбора пациент-специфичной панели моноклональных антител (МКА), которую затем используют для мониторинга МОБ в ходе терапии. Выделяют следующие типы ЛАИФ [36]:

- 1) коэкспрессия лимфоидных маркеров на миелобластах (CD2, CD22, CD5, CD19, CD56, CD7) — наиболее часто встречающийся вариант аберраций — до 41 % (рис. 1);
- 2) гиперэкспрессия антигена (например, CD33, CD34, CD99) на бластных клетках; встречается у 27 % пациентов с ОМЛ;
- 3) сниженная экспрессия или аномальное отсутствие антигена (CD33, CD13, CD38, HLA-DR, CD45) может также характеризовать фенотипически аберрантные миелоидные бластные клетки (до 35 % случаев);
- 4) асинхронная коэкспрессия «ранних» (CD34 или CD117) и «поздних» антигенов (CD15, CD11c, CD65) на миелоидных клетках (21 %) (рис. 2).

Следует учитывать, что на нормальных гемопоэтических клетках, особенно при регенерации КМ, может наблюдаться аномальная экспрессия ряда антигенов. К примеру, экспрессия CD7, CD56, 11b на CD34+ клетках, а также сочетание CD34+HLA-DR- встречается и у здоровых доноров [38].

Выявление комплексных ЛАИФ в дебюте заболевания повышает чувствительность и специфичность исследования МОБ. Однако этот подход имеет недостатки. Во-первых, иммунофенотип бластных клеток может меняться либо вследствие проведенной ХТ, либо в связи с селекцией минорного опухолевого клона, во-вторых, для использования этого подхода необходимо знать иммунофенотип опухолевых клеток в дебюте заболевания.

Второй подход определения МОБ («отличный от нормального», или «метод пустых мест») возможно применять даже при отсутствии данных инициального иммунофенотипирования. Этот подход основан на использовании стандартной панели антител на всех этапах химиотерапевтического воздействия. У здоровых доноров нормальное созревание и дифференцировка гемопоэтических клеточных линий ассоциированы с последовательной экспрессией антигенов [37]. Лейкемические клетки могут быть выявлены по их иммунофенотипическому отклонению от паттернов антигенной экспрессии нормальных гемопоэтических клеток определенной клеточной линии и стадии зрелости (рис. 3). Этот подход позволяет «обойти» проблему иммунофенотипических изменений в ходе химиотерапевтического воздействия. Выявление лейкозных клеток в данном случае основывается на сравнении паттернов антигенной экспрессии клеток в образце КМ донора и пациента с ОМЛ. Для такого анализа необходимы определенная квалификация и знание процесса нормального созревания клеток КМ на всех

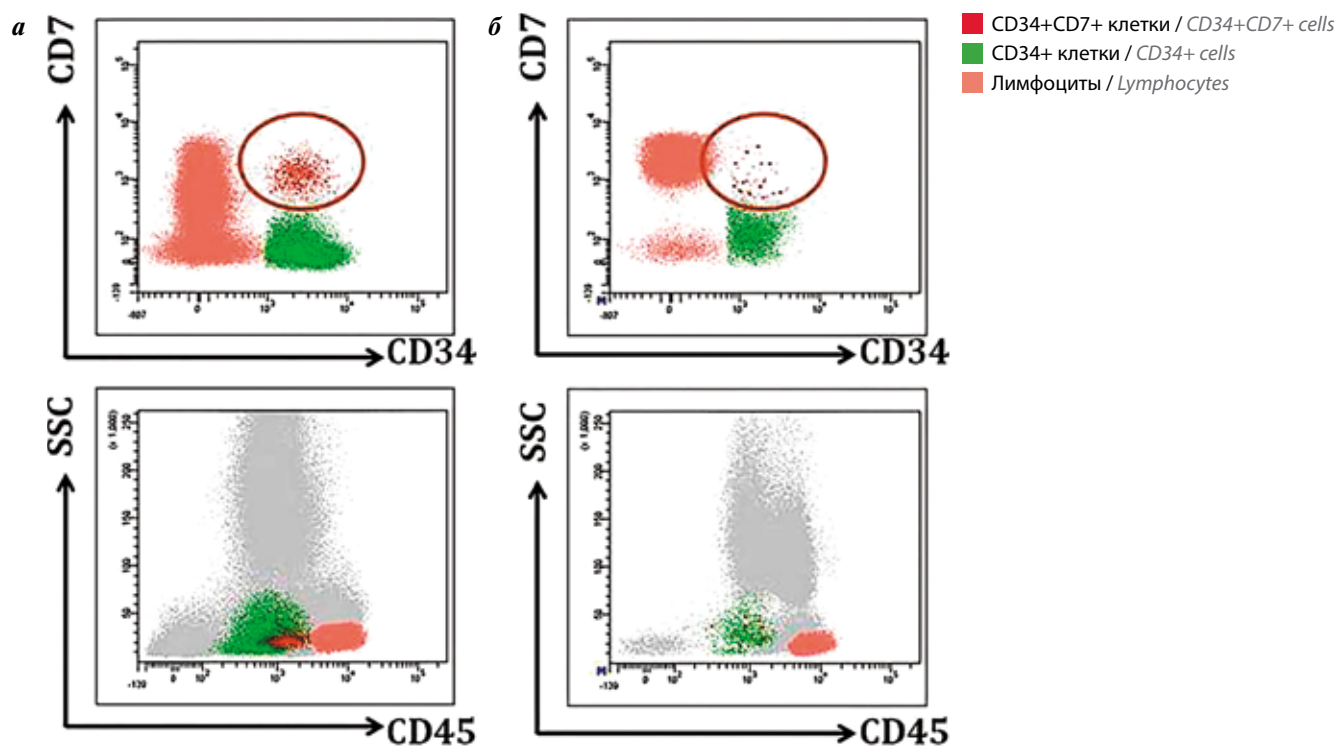


Рис. 1. Пример обнаружения CD34+ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с нелинейной коэкспрессией лимфоидного маркера CD7. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов
 Fig. 1. An example of CD34+ blast cells detection in AML patient (a) with nonlinear co-expression of CD7 lymphoid marker. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (б) are shown. Photo submitted by the authors

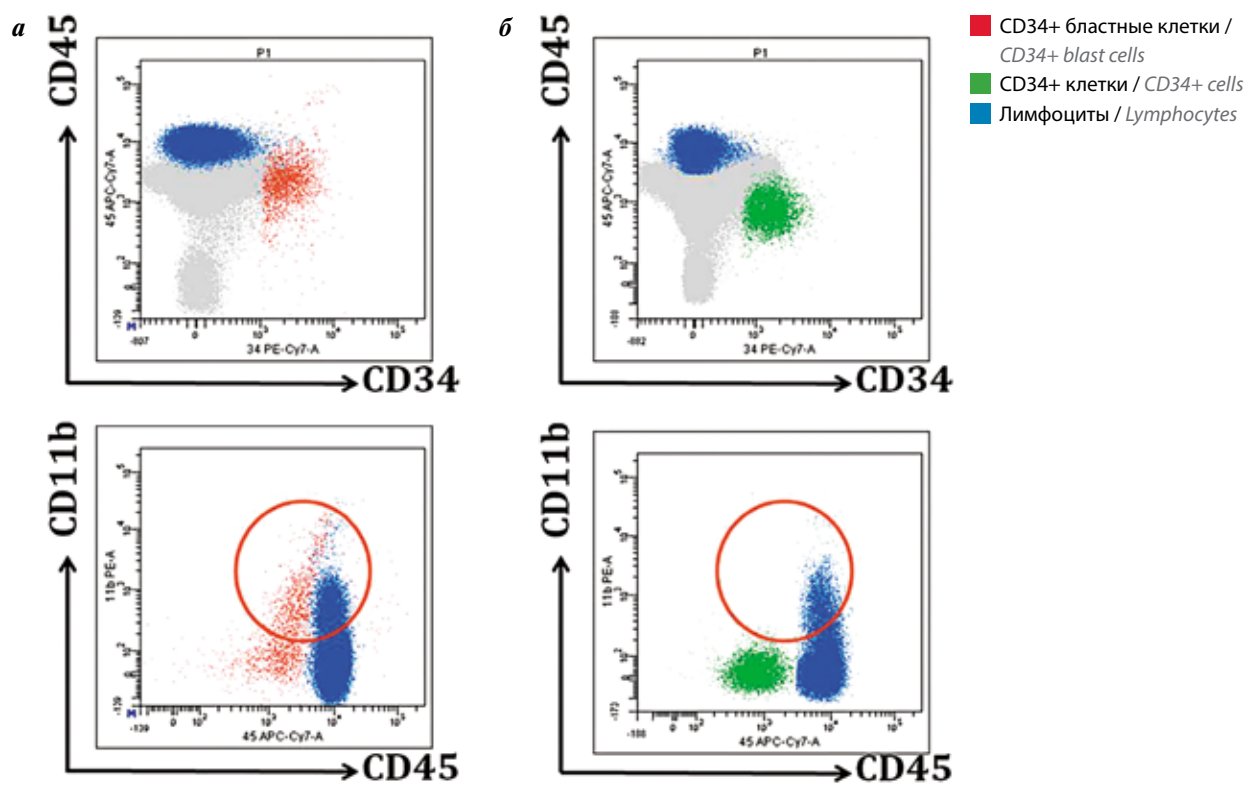


Рис. 2. Пример обнаружения части CD34+ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с асинхронной коэкспрессией «зрелого» маркера CD11b. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов
 Fig. 2. An example of a portion of CD34+ blast cells detection in a patient with AML (a) with asynchronous co-expression of the «mature» CD11b marker. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (б) are shown. Photo submitted by the authors

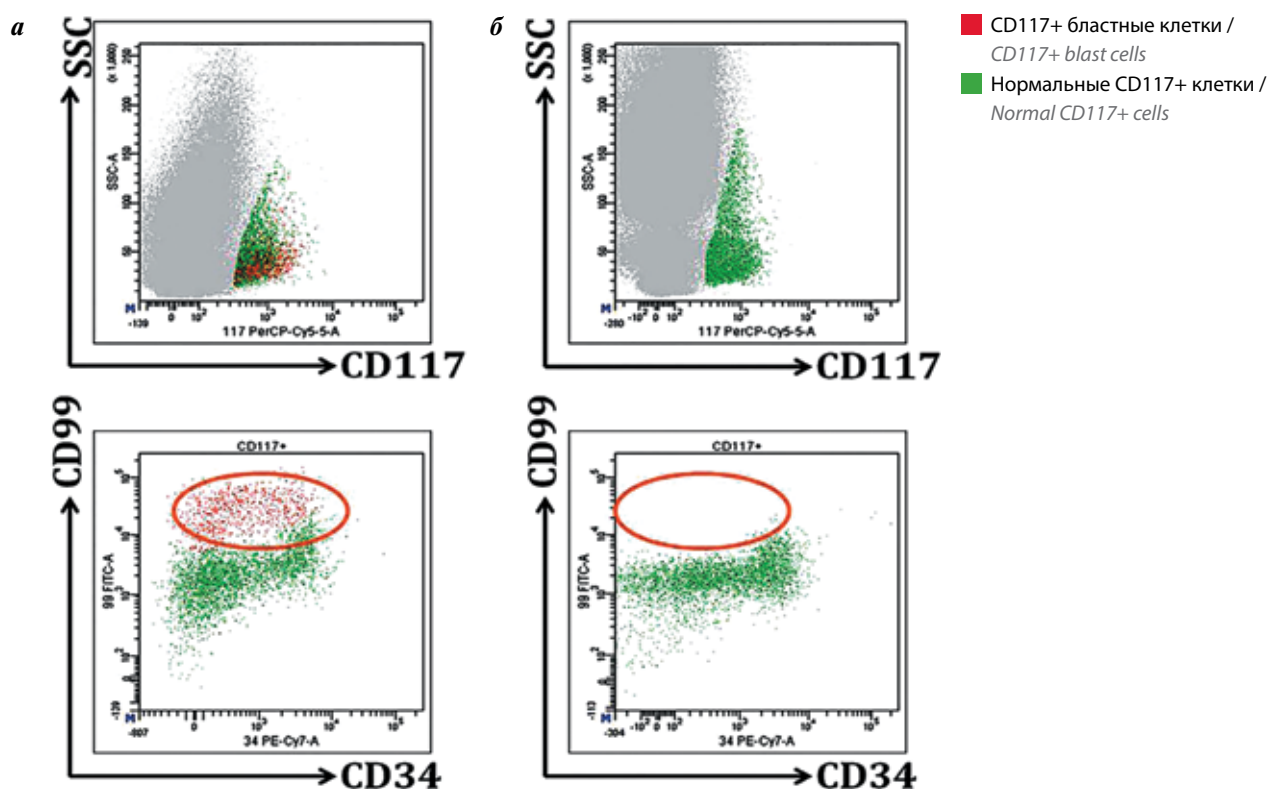


Рис. 3. Пример обнаружения CD117+ бластных клеток у пациента с ОМЛ (а) с аномальным паттерном CD34 vs CD99. Для сравнения показаны точечные диаграммы клеточных субпопуляций здорового донора (б). Фото авторов

Fig. 3. An example of CD117+ blast cells detection in a patient with AML (a) with an abnormal CD34 vs CD99 pattern. For comparison, the dot diagrams of healthy donor cell subpopulations (б) are shown. Photo submitted by the authors

этапах. Также этот подход требует наличия стандартизированной панели антител. Учитывая достоинства и недостатки двух методов, на практике часто прибегают к их сочетанию для более полного анализа МОБ [39].

Количественным результатом исследования МОБ является доля опухолевых клеток от всех ядросодержащих клеток или лейкоцитов. При этом опухолевые клетки должны составлять гомогенную популяцию клеток со схожими характеристиками экспрессии антигенов и показателей светорассеяния. Минимальное количество клеток, составляющее популяцию, устанавливается внутрилабораторно и в разных протоколах может отличаться (обычно это количество варьирует в пределах от 20 до 100 клеток). Если такая популяция не найдена, то делают заключение о том, что МОБ не выявлена [35, 36].

Чувствительность метода МПЦ устанавливается при каждом анализе и напрямую зависит от количества проанализированных клеток. Для ее расчета необходимо установить минимальное количество клеток, которое составляет популяцию. Если минимальной была принята популяция, состоящая из 20 клеток, то чувствительность определяется таким образом: 20, деленное на количество подсчитанных клеток и умноженное на 100 %. Если среди всех клеток не обнаружено 20 лейкоэмических клеток, то делается заключение,

что МОБ не выявлена при достигнутой чувствительности анализа. При этом имеется вероятность наличия МОБ, но ниже, чем достигнутый порог чувствительности. Таким образом, когда найдены опухолевые клетки, формирующие популяцию, то в заключении указывается количественное значение МОБ. Если опухолевые клетки не найдены, то в заключении необходимо указать чувствительность анализа и количество проанализированных ядросодержащих клеток или лейкоцитов.

Есть несколько факторов, снижающих чувствительность и специфичность метода МПЦ. Во-первых, после ХТ развивается глубокая панцитопения и КМ характеризуется низкой клеточностью, поэтому проанализировать достаточное количество клеток проблематично. Во-вторых, известен феномен «иммунофенотипического сдвига» — изменения фенотипа лейкоэмических клеток в течение терапии, что затрудняет их поиск и нередко приводит к ложноотрицательным результатам [37, 40].

«Имунофенотипический сдвиг» и «универсальный» маркер минимальной остаточной болезни

Согласно результатам исследований изменения в иммунофенотипе лейкозных клеток обнаруживаются как на фоне лечения, так и в момент рецидива. В литературе очень мало данных о феномене смены ЛАИФ в период индукции и консолидации ОМЛ. Основные

исследования посвящены изучению иммунофенотипа лейкозных клеток в рецидиве и при рефрактерном течении ОМЛ [38, 39].

По данным разных авторов, в период рецидива «дебютный» ЛАИФ может измениться у 16–91 % пациентов. М. Вагг и соавт. показали, что у 91 % пациентов с ОМЛ в рецидиве заболевания иммунофенотип бластных клеток изменяется, но это не было связано с прогнозом заболевания. При этом оценивались как полное изменение опухолевой популяции, так и приобретение/потеря каждого из антигенов на прежней популяции бластных клеток. Только у 9 % больных выявлялся абсолютно идентичный первичному ЛАИФ в рецидиве заболевания [41]. D. Voskova и соавт. описали смену иммунофенотипа опухолевой популяции и молекулярных маркеров у 49 пациентов с рецидивом ОМЛ. На основании изменений лейкоэмического иммунофенотипа больные были разделены на группы: 1-я группа — без изменения первичного ЛАИФ в момент развития рецидива (у 55 %), 2-я — с сохранением хотя бы одного дебютного аномально экспрессирующегося антигена в рецидиве (20 %) и 3-я группа — с полной сменой дебютного иммунофенотипа (25 %). Между группами наблюдались различия в изменении молекулярных маркеров (18 %, 0 % и 86 %, $p = 0,002$), но не в цитогенетических аномалиях (15 %, 20 % и 25 %, незначимо) [42].

Смена антигенного профиля также была продемонстрирована при рефрактерных ОМЛ. В 2013 г. W. Cui и соавт. исследовали 47 пациентов с рефрактерными ОМЛ и их рецидивами. В дебюте заболевания среднее количество аномально экспрессирующихся антигенов составило 2–3 для каждого пациента. Наиболее часто встречались отсутствие линейно-ассоциированного антигена (CD13, CD33 — у 22 % больных), а также асинхронная экспрессия CD117 и CD11b, CD34 и CD11b — у 18 % и 16 % больных соответственно. В рефрактерных ОМЛ наиболее часто наблюдались aberrantная экспрессия CD7 и CD56 (20 % и 9 % соответственно) на миелобластных клетках, асинхронная CD11b на CD34+ либо CD117+. В большинстве случаев рефрактерных ОМЛ и их рецидивов имелись различные модификации иммунофенотипа (от изменения экспрессии одного маркера до полной смены иммунофенотипа). При этом каждый маркер учитывали в анализе. У небольшого процента больных (27 % рефрактерных и 16 % с рецидивом ОМЛ) полностью сохранялся первичный иммунофенотип. А наиболее часто изменяющимися маркерами были CD13 (19 %), CD33 (16 %), CD7 (12 %). Среди рефрактерных больных только в 14 % случаев обнаруживались изменения цитогенетических перестроек [43]. В ходе исследования ОМЛ у детей было отмечено, что в рецидиве заболевания иммунофенотип лейкозных клеток становится незрелым («теряется» CD14, CD11b, CD15) [44].

Чтобы охватить все потенциальные изменения иммунофенотипа, необходимо использовать комплексную

стандартизированную панель антител, позволяющую определить как можно больше aberrантно экспрессирующихся антигенов, составляющих ЛАИФ в дебюте заболевания.

На сегодняшний день трудности в определении МОБ при ОМЛ определяют поиск «универсального» маркера МОБ или «универсального» сочетания МКА. Миелоидный ингибиторный С-лектин CLL-1 экспрессируется в 90 % случаев ОМЛ в его дебюте и считается достаточно стабильным маркером. CD123 также часто наблюдается в дебюте, но не является строго специфичным для ОМЛ. Сочетание CLL-1+/CD123+ на бластных клетках CD34+/CD117+ не меняется в ходе терапии, остается после индукционных курсов ХТ и в момент рецидива. Доля CLL-1+/CD123+ клеток после индукции и консолидации выше медианы доли этой популяции в регенерирующем КМ и была ассоциирована с риском возникновения рецидива [45, 46]. Другим полезным для диагностики МОБ маркером может быть CD87 (урокиназный рецептор активации плазминогена), выявляемый в 80 % CD34+ ОМЛ. Среди нормальных гемопоэтических клеток КМ CD87 экспрессируется на некоторых миелоидных предшественниках, моноцитах и до 0,2 % CD34+ клеток. М. Graf и соавт. описали взаимосвязь гиперэкспрессии CD87 на бластных клетках с более короткой БРВ и низкой частотой достижения ремиссии у таких больных [47], однако не во всех клинических исследованиях по изучению CD87 доказана его роль прогностического маркера [47, 48].

Пороговые значения, прогностическая значимость и клиническое применение исследования минимальной остаточной болезни методом многоцветной проточной цитофлуориметрии

Необходимо отметить, что пороговые величины чувствительности детекции МОБ и ее пороговые значения — различные понятия. Пороговое значение чувствительности представляет собой лабораторный показатель того, какую минимальную величину МОБ возможно определить в ходе конкретного анализа у конкретного пациента. В разных протоколах лечения приняты различные пороговые значения МОБ в зависимости от контрольной точки исследования (определяемые конкретным протоколом терапии), а также применяемого метода (МПЦ или ПЦР). Эти значения позволяют разделить пациентов на группы риска. Чтобы оценить влияние показателя МОБ на частоту возникновения рецидивов, используют анализ выживаемости и рассчитывают значения МОБ, по которым можно выделить больных с разными рисками развития рецидива. В табл. 3 суммированы данные по пороговым значениям МОБ, использованным в различных исследованиях. Кинетика редукции опухолевого клона служит важным независимым прогностическим фактором на ранних и поздних этапах ХТ, а также в период поддерживающего лечения в определенном

Таблица 3. Сравнительный анализ исследования МОБ методом МПЦ в различных исследовательских протоколах ОМЛ взрослых и детей
 Table 3. Comparative analysis of the MRD study by MFC in various research adults and children AML protocols

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источ- ник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов prognostic значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследования МОБ в педиатрических протоколах лечения ОМЛ Comparative analysis of the MRD study in pediatric AML protocols							
Coustan-Smith et al. (2003) [67]	46	КМ BM	После индукции 1+2 After induction 1+2	Да Yes	Цитогенетика, число лейкоцитов Cytogenetics, leukocytes number	2-летняя ОВ после 1 индукции 33,1 vs 72 %, 31,7 % vs 80 % после 2 индукции 2-year OS after 1 st induction 33.1 vs 72 %; after 2 nd induction 31.7 % vs 80 %	0,1 % 0.1 %
Sievers et al. (2003) [66]	252	КМ BM	После консолидации After consolidation	Да Yes	Возраст, пол, этническая принадлежность, гепатоспленомегалия, число лейкоцитов Age, gender, ethnicity, hepatosplenomegaly, leukocytes number	3-летняя ОВ 41% vs 69% после окончания консолидации 3-year OS 41 % vs 69 % after the end of consolidation	0,5 % 0.5 %
Langbrake et al. (2006) [68]	150	КМ BM	28-й день после индукции 1 28 day after 1 st induction	Нет No	Вариант по FAB, цитогенетика, процент бластов на 15-й день FAB variant, cytogenetics, percentage of blast cells on day 15	3-летняя БРВ 71 % vs 48 % 3-year RFS 71 % vs 48 %	0,1 % 0.1 %
Rubnitz et al. (2010) [52]	230	КМ BM	После индукции 1+2 After induction 1+2	Да Yes	Благоприятный цитогенетический риск, возраст, FLT3-ITD Favorable cytogenetic risk, age, FLT3-ITD	3-летняя БРВ (73,6 % vs 43,1 % после 1-й индукции, 71,2 % vs 35,8 % после 2-й индукции) 3-year EFS (73.6 % vs 43.1 % after 1 st induction, 71.2 % vs 35.8 % after 2 nd induction)	0,1 % 0.1 %
Loken et al. (2012) [65]	340	КМ BM	После индукции 1+2, после консолидации After induction 1+2, after consolidation	Только для БРВ Only for RFS	Молекулярный риск, цитогенетический риск, число лейкоцитов Molecular risk, cytogenetic risk, leukocytes number	После 1-й индукции БРВ 24 % для МОБ 0-1 % vs 36 % для МОБ ≥1 % и 65 % для МОБ-негативного значения, БРВ 29 % vs 65 % после 2-й индукции, БРВ 17 % vs 62 % в консолидации After 1 st induction, the RFS 24 % for MRD 0-1 % vs 36 % for MRD ≥1 % and 65% for MRD negative. RFS 29 % vs 65 % after 2 nd induction, RFS 17 % vs 62 % for consolidation	0-1 %, ≥1 % 0-1 %, ≥1 %
Tierens et al. (2015) [64]	101	КМ BM	После индукции 1 и 2 After 1 st and 2 nd induction	Да Yes	Возраст, пол, число лейкоцитов, молекулярный риск Age, gender, leukocytes number, molecular risk	БРВ: 22 % vs 65 %, ОВ 51 % vs 77 % После 2-й индукции: БРВ 11 % vs 57 %, ОВ 28 % vs 78 % RFS: 22 % vs 65%, OS 51 % vs 77 % After 2 nd induction RFS 11 % vs 57 %, OS 28 % vs 78 %	0,1 % 0.1 %

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогноза значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследования МОБ в педиатрических протоколах лечения ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in pediatric AML protocols</i>							
Buldini et al. (2017) [55]	142	КМ BM	После индукции 1-й и 2-й After 1 st and 2 nd induction	Да Yes	Возраст, пол, вариант ОМЛ по FAB-классификации, инициаль- ное число лейкоцитов, цитогене- тическая группа риска Age, gender, AML variant according to FAB classification, initial number of leukocytes, cytogenetic risk group	<0,1 %; 0,1-1 % и ≥1 %: 8-летняя БРВ составила 73 ± 5,6%, 37,8 ± 12,1% и 34 ± 8,8%; ОВ при МОБ <0,1 % и ≥0,1 %: 82,2 и 51,6 % После 2-й индукции: БРВ 68,4 ± 7,9 %; 20,1 ± 2 % и 23,8 ± 1,2 %; ОВ 77,1 % и 55,5 % <0,1 %; 0,1-1 % и ≥1 %: 8-years RFS 73 ± 5,6 %, 37,8 ± 12,1 % and 34 ± 8,8 %; OS with MRD < 0.1 % and ≥0.1 %: 82.2 % and 51.6 % After 2 nd induction: RFS – 68.4 ± 7.9 %; 20.1 ± 2 % and 23.8 ± 1.2 %; OS 77.1 % and 55.5 %	0,1 % 0,1 %
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
Гальцева И.В. (1997) [61]	37	КМ BM	Индукция 2 или консоли- дация 1 в зависимости от достижения ремиссии Induction 2 or consolidation 1 depending on the remission achievement	Да Yes	Вариант ОМЛ, вариант терапии, возраст, пол, достижение ремиссии AML variant, treatment option, age, gender, remission achievement	БРВ более 6 мес у пациентов с МРБ негативным статусом (короткий период наблюдения) RFS more than 6 months in patients with MRD negative status (short observation period)	0,12 % 0,12 %
San Miguel et al. (1997) [8]	53	КМ BM	Окончание индукции и интенсифика- ции терапии End of induction and intensifica- tion therapy	Да Yes	Число лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобин, число бластов, возраст, иммунофенотип Number of leukocytes, platelets, hemoglobin, number of blasts, age, immunophenotype	БРВ после индукции 17 мес vs не достигли, интенсификация: 16 мес vs не достигли, ОВ 25 мес vs не достигли RFS after induction – 17 months vs did not achieved, intensification: 16 months vs did not achieved, OS 25 months vs did not achieved	0,5 %: индукция, 0, 2 % консолидации 0,5 % induction, 0,2 % consolidation

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогностическое значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
San Miguel et al. (2001) [69]	126	КМ BM	Окончание индукции End of induction	Да Yes	Цитогенетика, число курсов до ПР, число лейкоцитов Cytogenetics, the number of courses before CR, leukocytes number	3-летняя БРВ 14, 50 и 84 % в группах МОБ более 1 %, от 0,01-1 и менее 0,01 %, ОВ – 29, 62 и 90 % 3-years RFS of 14 %, 50% and 84 % in MRD groups “more than 1 %”, “0,01-1” and “less than 0,01 %”, OS 29 %, 62 % and 90 %	0,01-1 % 0,01-1 %
Bussicano et al. (2006) [5]	100	КМ BM	Окончание индукции и консолидации End of induction and consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип, возраст, число лейкоцитов Cytogenetics, immunophenotype, age, leukocytes number	БРВ 71 % vs 13 %, ОВ 64 % vs 16 % после консолидации RFS 71 % vs 13 %, OS 64 % vs 16 % after consolidation	0,035 % 0,035 %
Maurillo et al. (2008) [6]	142	КМ BM	После индукции 1 и после консолидации After 1 st induction and after consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип Cytogenetics, immunophenotype	5-летняя БРВ 60 % vs 16 %, ОВ 62 % vs 23 % 5-year RFS 60 % vs 16 %, OS 62 % vs 23 %	0,035 % 0,035 %
Vendetti et al. (2000) [51]	56	КМ BM	После индукции 1 и после консолидации After 1 st induction and after consolidation	Только после консолидации Only after consolidation	Цитогенетика, иммунофенотип Cytogenetics, immunophenotype	77 % vs 17 % развитие рецидивов, ОВ более 10 мес vs не достигли Relapses – 77 % vs 17 %, OS more than 10 months vs did not achieved	0,035 % 0,035 %
Terwijn et al. (2013) [9]	517	КМ BM	После 1-го, 2-го курсов индукции, после консолидации After 1 st and 2 nd induction, after consolidation	Важность после 2-го курса индукции Importance after 2 nd course of induction	Цитогенетика, вариант ОМЛ, достижение ПР, число лейкоцитов, возраст, вариант консолидации Cytogenetics, AML variant, CR achievement, leukocytes number, age, variant of consolidation	БРВ 45 vs 70 % RFS 45 vs 70 %	0,1 % 0,1 %

Продолжение таблицы 3
Continuation of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогностическое значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols							
Kern et al. (2004) [62]	1054	КМ BM	После консолидации After consolidation	После индукции и консолидации для БРВ After induction and consolidation for RFS	Цитогенетика, число лейкоцитов, число бластов Cytogenetics, number of leukocytes, number of blasts	БРВ 83,3 % vs 25,7 %, ОВ 87,5 % vs 51,4 % RFS 83,3 % vs 25,7 %; OS 87,5 % vs 51,4 %	75-й перцентиль от логарифмической разницы The 75 th percentile of the logarithmic difference
Kern et al. (2004) [49]	106	КМ BM	День 16 (индукция) Day 16 (induction)	Да Yes	Цитогенетика, наличие FLT3, вторичный ОМЛ Cytogenetics, presence of FLT3, secondary AML	2-летняя БРВ 65 % vs 30 %, ОВ 58 % vs 43 % 2-years RFS 65% vs 30 %; OS 58 % vs 43 %	Логарифмическая разница Logarithmic difference = 2.11
Al-Mawali et al. (2009) [7]	54	КМ BM	После индукции и консолидации After induction and consolidation	Только после индукции Only after induction	Число лейкоцитов, вариант по FAB Leukocytes number, FAB variant	Количественные значения не приведены Quantitative values are not available	0,15 % 0.15 %
Maurillo et al. (2007) [58]	50	КМ и ПК BM and PB	После индукции и консолидации After induction and consolidation	После консолидации для развития рецидивов After consolidation for development of relapses	Число лейкоцитов, иммунофенотип Leukocytes number, immunophenotype	77 % рецидивов с МОБ-позитивным статусом после индукции vs 0; 82 % рецидивов после консолидации vs 0 77 % relapses with MRD-positive status after induction vs 0; 82 % relapse after consolidation vs 0	0,015 % 0.015 %
Chen et al. (2015) [63]	245	КМ BM	После индукции After induction	Корреляция ответа на терапию и значения МОБ Correlation of therapy response and MRD value	Цитогенетика, молекулярные маркеры Cytogenetics, molecular markers	71 % в ПР имели меньшие значения МОБ, в сравнении 19,6 % с ПР и полным восстановлением тромбоцитов и 9,4 % в ПР без восстановления нейтрофилов 71 % in CR had smaller MRD values, compared to 19.6% with PR and incomplete platelet recovery and 9.4 % in PR without neutrophils recovery	Любое положительное значение Any positive value

Окончание таблицы 3
End of table 3

Исследование Study	Число пациентов Number of patients	Источник образца Sample source	Временные точки Time points	Независимое от других факторов прогноза значение МОБ MRD prognostic value independent of other prognostic factors	Сравнительные параметры Comparative parameters	Параметры выживаемости Survival	Порог Threshold
Сравнительный анализ исследований МОБ у взрослых больных ОМЛ <i>Comparative analysis of the MRD study in adult AML protocols</i>							
Vidrales et al. (2015) [50]	306	КМ BM	После индукции After induction	Да Yes	Цитогенетика, возраст, число лейкоцитов Cytogenetics, age, leukocytes number	БРВ: 38, 50 и 71 % RFS 38 %, 50 % and 71 %	≥0,1 %; ≥0,01–0,1 %; и <0,01 % ≥0,1 %; ≥0,01–0,1 % and <0,01 %
Lacombe et al. (2017) [54]	276	КМ BM	После индукции, перед 2-й консолида- цией After induction, before 2 nd consolidation	Да Yes	Возраст, цитогенетика Age, cytogenetics	БРВ: 68 % vs 20 %, ОВ: 70 % vs 32 % RFS: 68 % vs 20 % OS: 70 % vs 32 %	0,05 % 0,05 %
Minetto et al. (2018) [56]	120	КМ BM	После индукции After induction	Да Yes	Возраст, число лейкоцитов, тромбоцитов, цитогенетика, вариант ОМЛ Age, number of leukocytes, platelets, cytogenetics, AML variant	5-летняя БРВ: 71 % <0,01 % vs 38 % (≥0,1 %) 5-years RFS: 71 % – <0,01 % vs 38 % – ≥0,1 %	0,1 % и 0,01 % 0,1 % and 0,01 %

Примечание: БРВ – безрецидивная выживаемость; МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОВ – общая выживаемость; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ПР – полная ремиссия; КМ – костный мозг; ПК – периферическая кровь.
Note: RFS – relapse-free survival; MRD – minimal residual disease; OS – overall survival; AML – acute myeloid leukemia; CR – complete remission; BM – bone marrow; PB – peripheral blood.

протоколе терапии. В многочисленных исследованиях показаны важность достижения МОБ-негативного статуса на ранних этапах терапии и ассоциация МОБ с долгосрочными результатами — БРВ и ОВ. В работе W. Kern и соавт. в участии 106 пациентов с ОМЛ в ранние сроки после индукции (на 16-й день) показано, что значения МОБ влияют на длительность 2-летней ОВ (58 % против 43 %, $p = 0,0133$), БРВ (53 против 2,8 мес, $p < 0,0001$) и вероятность сохранения ремиссии (81 % против 51 %, $p = 0,002$). При этом пороговым уровнем МОБ считалось 2-кратное логарифмическое снижение количества опухолевых клеток в сравнении с дебютом [49]. Коллектив испанских ученых в 2015 г. исследовал МОБ-статус у 306 больных ОМЛ в ПР, которым проводили одинаковые курсы ХТ. Группы прогноза для благоприятного, промежуточного и плохого цитогенетического риска — 12 %, 72 % и 16 % соответственно. Пороговым значением была МОБ $< 0,1$ % и исследовалась после 1-го курса индукции. Показано, что ранняя оценка МОБ-статуса позволяет разделить больных на дополнительные группы в плане прогноза. Пятилетняя БРВ при значениях МОБ $< 0,01$ %, от 0,01 % до 0,1 % и $\geq 0,1$ % составляла 71 %, 50 % и 38 % соответственно. Также оказалось, что МОБ-положительный статус ухудшал долгосрочные результаты в благоприятной цитогенетической группе (ЦГ), а МОБ-отрицательный в неблагоприятной ЦГ их улучшал [50]. Количественное значение МОБ после курсов консолидации также прогностически значимо. В ряде исследований пациенты, у которых не была выявлена МОБ после курсов консолидации, имели меньший риск развития рецидива и лучшие показатели ОВ и БРВ по сравнению с имеющими детектируемую МОБ после индукции [5, 6, 51]. В работе A. Venditti и соавт. с участием 56 пациентов с ОМЛ 34 из них (моложе 60 лет) лечили согласно протоколу AML-10, а лиц старше 60 лет ($n = 22$) — по протоколу AML-13. Исследования МОБ проводили после индукционного и после каждого консолидирующего курсов, перед аллотКМ, а также на протяжении последующих 2 лет каждые 3 мес. У пациентов с МОБ-положительными и МОБ-негативными результатами после индукции различий в вероятности развития рецидива ОВ и БРВ не было. Для последующей оценки МОБ после консолидации использовался порог 0,035 %, в зависимости от которого риск развития рецидива у пациентов составил 77 и 17 % ($p = 0,001$). Интересно, что частота МОБ-положительных результатов после консолидации была выше в группе цитогенетически неблагоприятного и промежуточного рисков. Длительность БРВ и ОВ строго коррелировала с МОБ-статусом после консолидации (7 мес против «медиана не достигнута», и 10 мес против «медиана не достигнута» соответственно). У 70 % пациентов с выявленной МОБ перед аллотКМ констатировали рецидив после трансплантации, а в группе без МОБ — лишь у 28 % участников ($p = 0,031$) [51]. В работе F. Bussicano с участием 100

первичных больных с ОМЛ также исследовали кинетику редукции опухолевой популяции, при этом задача исследования заключалась в том, чтобы установить оптимальную точку исследования МОБ и ее пороговое значение. Оказалось, что МОБ $\geq 0,035$ % наиболее прогностически значима в период после окончания курсов консолидации, а не после индукции. Пациенты, которые достигали МОБ-негативности только после консолидации, имели те же БРВ и ОВ, что и сразу достигшие отрицательных значений МОБ после 1-го курса. После консолидации 61 % больных были МОБ-положительны, из них в 84 % случаев в течение 15 мес диагностирован рецидив ОМЛ, а у пациентов с МОБ-негативным статусом — только в 25 % случаев ($p < 0,001$). БРВ и ОВ составили 71 % и 64 % в группе МОБ-негативных больных после консолидации и 13 % и 16 % в группе МОБ-положительных ($p < 0,0001$) [5]. При исследовании МОБ при ОМЛ в педиатрической группе после 1-го и 2-го курсов индукции также показано влияние размера опухолевого клона на прогноз заболевания, но только после 2-го индукционного курса: долгосрочные результаты (ОВ, БРВ) у пациентов со значением МОБ $< 0,1$ % после второй индукции и с МОБ-негативным статусом не различались. Пациенты с МОБ более 1 % после 1-го курса индукции имели значимо худшие показатели ОВ и БРВ независимо от степени цитогенетического риска [52]. В 2010 г. при ретроспективном анализе данных 143 взрослых больных ОМЛ выявлено, что положительный результат МОБ, определенный методом МПЦ, на момент окончания консолидации имеет большую прогностическую значимость, чем исходные цитогенетический и молекулярный риски. Так, у пациентов группы благоприятного цитогенетического риска — с $t(8,21)$ и $inv(16)$ — с МОБ-положительным статусом после курсов консолидации 4-летняя БРВ составила 15 %, а у больных группы промежуточного риска с МОБ-негативным статусом — 70 % ($p < 0,001$). В этом исследовании показана роль дополнительной стратификации пациентов на группы риска: благоприятного и промежуточного цитогенетического прогноза, включающая МОБ-негативных лиц, а также группа высокого риска, куда вошли больные с благоприятным, промежуточным, плохим цитогенетическим прогнозом и МОБ-положительностью [53]. Проблему МОБ у взрослых пациентов с ОМЛ изучают голландские исследователи, опубликовавшие в 2013 г. результаты первого мультицентрового проспективного исследования NOVON/SAAK [9]. У взрослых больных ОМЛ (18–60 лет) из 31 лечебного центра были исследованы образцы КМ в момент постановки диагноза, после 1-го и 2-го курсов индукции и после 2-й консолидации. Всем участникам проводили лечение согласно стандартному протоколу. Пациенты, у которых в контрольной точке 2 (после второй индукции) МОБ составила более 0,1 %, имели худшие показатели ОВ и БРВ ($p < 0,001$ %). Основная идея этого исследования состояла в предложении относить пациентов

из промежуточной группы риска с МОБ-положительными результатами в группу плохого прогноза и проводить им аллоТКМ [9]. В относительно недавно опубликованном крупном проспективном исследовании F. Lacombe и соавт. также изучалась прогностическая значимость МОБ методом МПЦ у 276 пациентов в ПР (из них 23 — дети младше 16 лет). В этом исследовании, проводившемся с 2006 по 2011 г., участвовали 17 клинических центров Франции, была разработана единая панель МКА (10 пробирок 5-цветной комбинации), а точками определения МОБ были окончание индукции, начало 2-й консолидации и окончание лечения. Все данные анализировали централизованно, что исключало различные интерпретации полученных результатов. Чтобы достичь чувствительности анализа 5×10^{-5} , у каждого пациента «собирали» как минимум 250 000 событий. Оказалось, что уровень МОБ $<0,05\%$ прогностически значим (для ОВ и БРВ, $p = 0,0001$) в каждой точке его определения независимо от проводимого курса ХТ. Интересно, что из 184 пациентов, которым был выполнен цитогенетический анализ (из них 15 % благоприятного прогноза, 74 % — промежуточного и 11 % — неблагоприятного), МОБ-статус в группе неблагоприятного прогноза оказывал влияние на долгосрочные результаты. Несмотря на то что 148 (54 %) больных в ходе исследования во всех точках имели отрицательные значения МОБ, у 31 (21 %) из них диагностирован рецидив заболевания [54]. Исходя из данных нескольких исследований, можно сделать вывод, что МОБ-диагностика — независимый фактор прогноза и, возможно, более важный маркер долгосрочного прогноза, чем ЦГ группы риска.

Проводя сравнение по изучению МОБ-статуса методом МПЦ у взрослых и детей, необходимо упомянуть исследование В. Buldini и соавт., результаты которого опубликованы в 2017 г. Итальянские ученые ретроспективно анализировали МОБ у 142 детей с ОМЛ, леченных в соответствии с протоколом AIEOP-AML 2002/01 (2003–2011 гг.). Пороговое клинически значимое значение МОБ составляло 0,1 %, а точками исследования были период после 1-й и 2-й индукций. Оказалось, что при разделении пациентов на группы по МОБ-статусу после 1-го индукционного курса ХТ $<0,1\%$; $0,1–1\%$ и $\geq 1\%$, 8-летняя БРВ составила $73 \pm 5,6\%$, $37,8 \pm 12,1\%$ и $34 \pm 8,8\%$ соответственно ($p < 0,01$). При выявлении МОБ $\geq 0,1\%$ после 1-го и 2-го курсов БРВ пациентов равнялась $22,8 \pm 8,9\%$; у больных с МОБ $<0,1\%$ после 2-го курса БРВ была выше — $45,4 \pm 16,7\%$, $p = 0,037$. Восьмилетняя ОВ для пациентов с МОБ $<0,1\%$ и $\geq 0,1\%$ после 1-го курса составила $82,2\%$ и $51,6\%$ соответственно ($p = 0,0005$). При анализе тех же данных после 2-го индукционного курса БРВ в трех группах составила $68,4 \pm 7,9$; $20,1 \pm 2$ и $23,8 \pm 1,2\%$ соответственно ($p < 0,01$), ОВ — $77,1\%$ и $55,5\%$ соответственно ($p = 0,0275$). В связи с тем, что доля больных с МОБ-положительным статусом после индукционного курса высока (до 49 %), исследователи

на сегодняшний день изучают влияние интенсификации первого курса ХТ на редукцию значений МОБ, в частности у больных благоприятной группы риска [55].

P. Minetto и соавт. в публикации 2018 г. исследовали МОБ у 120 пациентов с ОМЛ после интенсивного 1-го индукционного курса с высокими дозами цитарабина и применением флударабина. МОБ после этого курса ХТ расценивали как наиболее прогностически значимую, показывая, что курсы с применением флударабина, вероятнее всего, имеют больший антилейкемический эффект. При этом пороговое значение МОБ составило 0,025 %, а 3-летняя вероятность развития рецидива — 65 % и 10,6 % для МОБ-положительных и МОБ-негативных пациентов. Кроме того, авторы отмечают, что именно ранняя оценка МОБ позволяет вовремя изменить тактику лечения, а пациентов из группы промежуточного прогноза при МОБ-негативности причислить к группе благоприятного риска и не выполнять аллоТКМ в первой ПР [56].

Таким образом, суммируя данные многочисленных исследовательских групп, приведенные в табл. 3, необходимо отметить, что исследование МОБ методом МПЦ в комбинации с другими общеизвестными факторами прогноза у больных ОМЛ дает возможность более точно разделить больных на группы риска. Особенно важно выполнение этого исследования у пациентов группы промежуточного цитогенетического риска, не имеющих молекулярных маркеров-мишеней. Несмотря на различные протоколы терапии, точки исследования, пороги обнаружения и различную чувствительность, МОБ-статус остается важным критерием химиочувствительности, а его определенные значения ассоциированы с вероятностью наступления рецидива заболевания. МОБ сохраняет свою значимость и в различных ЦГ и при разных химиотерапевтических подходах, а также в период посткурсовой аплазии КМ [57]. Для улучшения долгосрочных результатов у пациентов с ОМЛ и положительным МОБ-статусом необходимы новые исследования и терапевтические подходы для редукции остаточного опухолевого клона.

Пока принципы терапии, основанной на оценке МОБ методом МПЦ, для взрослых больных ОМЛ не разработаны (как, например, для острых лимфобластных лейкозов). До сих пор нет абсолютной уверенности в том, нужна ли такая терапия пациентам с ОМЛ. В ходе исследования L. Maurillo показано, что использование высокодозной ХТ никак не влияет на скорость редукции МОБ, а также приводит к ее повышенным количественным значениям в сравнении с МОБ пациентов, получавших стандартные дозы химиопрепаратов. Пятилетняя ОВ у больных с МРБ-негативным статусом, принимающих стандартные и высокие дозы цитарабина, составляла 60 % и 30 % соответственно ($p = 0,007$) [58]. Терапевтическая тактика интенсификации терапии в зависимости от результатов МОБ не подтверждена у взрослых больных ОМЛ

и, следовательно, не улучшает прогноз заболевания. Кроме того, такая терапия высокотоксична и увеличивает риск развития тяжелых грибковых осложнений [52]. Введение высоких доз цитарабина у взрослых и детей никак не отразилось на уменьшении значения МОБ после курсов ХТ (PEDIATRIC CLINICAL TRIAL 2002–2008 гг.). В каждом конкретном случае необходимо разрабатывать индивидуальную тактику ведения больного. Например, риск-адаптивная терапия для детей с ОМЛ заключалась в раннем (на 22-й день терапии) выявлении МОБ (при $\text{МОБ} \geq 1\%$) и сопряженным с этим ранним началом следующего курса ХТ в сочетании с таргетными препаратами (гемтузумаб озогамидин), что позволило снизить частоту развития рецидивов в данном исследовании [52].

Корреляция методов определения минимальной остаточной болезни

Одновременное использование методов ПЦР и МПЦ для мониторинга МОБ помогает понять клиническую значимость каждого метода. В процессе педиатрического исследования было показано, что среди пациентов группы благоприятного цитогенетического риска (*RUNX1-RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*) только 10,7 % были МОБ-позитивными по результату МПЦ, а среди пациентов с *FLT3-ITD* — до 78 % [52]. В ходе мультицентрового исследования AML02 выяснилось, что у 99 % пациентов с отрицательными значениями МОБ, определенной методом МПЦ, не выявлены химерные транскрипты *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFβ-MYH11*, *KMT2A*. Девятнадцать из 197 (9,6 %) ПЦР-позитивных по *AML1-ETO* и *CBFβ-MYH11* образцов были позитивными методом МПЦ и в 8 из 13 *KMT2A*-позитивных образцов МОБ определялась и методом МПЦ [59]. J. Ouyang и соавт. провели исследование МОБ у пациентов с ОМЛ после первой индукции методом МПЦ и методом ПЦР с обратной транскрипцией по химерным транскриптам *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFβ-MYH11*. В данной работе показано, что при разделении больных на группы по количественному значению МОБ методом ПЦР в группах со значениями от 0,1–1 % и от 1–10 % вероятность развития рецидива была одинаковой. При этом отмечено, что в группе со значением МОБ от 0,01 до 0,1 % риск развития рецидива минимален, а при количестве транскрипта более 10 % возник рецидив в 50 % случаев. Среди пациентов со значением транскрипта от 0,1 до 10 % вероятность развития рецидива была выше при положительном результате МОБ методом МПЦ, $p = 0,006$ [60].

Таким образом, количественное определение МОБ методом МПЦ у лиц с *CBF*-лейкозами дает возможность более четко делить больных на группы по вероятности развития рецидива и избегать назначения необоснованных повторных высокоинтенсивных курсов ХТ.

Заключение

На сегодняшний день исследование МОБ — это суррогатный маркер для быстрой оценки химиочувствительности и, соответственно, эффективности ХТ. У пациентов с ОМЛ с МОБ-позитивным статусом на различных этапах ХТ высока вероятность рецидива заболевания. Однако и при отрицательных значениях МОБ не исключается его развитие, что связано с несколькими причинами: гетерогенностью опухолевого клона, его изменчивостью, а также с недостаточно высокой чувствительностью метода. Мониторинг МОБ в настоящее время служит для оценки эффективности лечения, сравнения различных видов терапии, стратификации пациентов на группы риска, контроля за сохранением ремиссии и максимально раннего обнаружения рецидива. Мониторинг МОБ с помощью методов ПЦР и МПЦ внедрен в современные протоколы лечения больных ОМЛ. Около 60 % пациентов с ОМЛ не имеют молекулярной «метки» для ПЦР-диагностики, поэтому в подобных случаях оптимально использование метода МПЦ. Необходимо выделить наиболее значимые аномально экспрессируемые антигены бластных клеток в дебюте заболевания и отслеживать их при мониторинге МОБ. Однако, учитывая феномен «иммунофенотипического сдвига», важно оценить антигенные паттерны созревания и их соответствие нормальным (т. е. применение «метода пустых мест»). В ходе многочисленных исследований показано, что количественное значение МОБ в период индукции и консолидации ассоциировано с ОВ и БРВ, что позволяет разделить пациентов на группы риска. Остается главный вопрос: способна ли МОБ-направленная терапия улучшать прогноз заболевания? Принципы такой терапии до сих пор не разработаны. Дальнейшие исследования должны быть направлены на стандартизацию панели МКА для исследования МОБ при ОМЛ методом МПЦ, четкое определение сроков проведения мониторинга и пороговых значений в этих точках. При этом не следует недооценивать уровень квалификации и опыта сотрудников, занимающихся изучением проблемы МОБ при ОМЛ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Büchner T., Hiddemann W., Wörmann B. et al. Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 1999;93(12):4116–24. PMID: 10361108.
2. Rai K.R., Holland J.F., Glidewell O.J. et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: A study by Cancer and Leukemia Group B. *Blood* 1981;58(6):1203–12. PMID: 6946847.
3. Ravandi F. Relapsed acute myeloid leukemia: Why is there no standard of care? *Best Pract Res Clin Haematol* 2013;26(3):253–59. DOI:10.1016/j.beha.2013.10.005. PMID: 24309527.
4. Hokland P., Ommen H.B., Nyvold C.G., Roug A.S. Sensitivity of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia in first remission – Methodologies in relation to their clinical situation. *Br J Haematol* 2012;158(5):569–80. DOI:10.1111/j.1365-2141.2012.09203.x. PMID: 22738609.
5. Buccisano F., Maurillo L., Gattei V. et al. The kinetics of reduction of minimal residual disease impacts on duration of response and survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006;20(10):1783–89. DOI:10.1038/sj.leu.2404313. PMID: 16838027.
6. Maurillo L., Buccisano F., Del Principe M.I. et al. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26(30):4944–51. DOI:10.1200/JCO.2007.15.9814. PMID: 18606980.
7. Al-Mawali A., Gillis D., Lewis I. The use of receiver operating characteristic analysis for detection of minimal residual disease using five-color multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia identifies patients with high risk of relapse. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76(2):91–101. DOI:10.1002/cyto.b.20444. PMID: 18727068.
8. San Miguel J.F., Martínez A., Macedo A. et al. Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90(6):2465–70. PMID: 9310499.
9. Terwijn M., Kelder A., Huijgens P.C. et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol* 2013;31(31):3889–97. DOI:10.1200/JCO.2012.45.9628. PMID: 24062400.
10. Buckley S.A., Wood B.L., Othus M. et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Haematologica* 2017;102(5):865–73. DOI:10.3324/haematol.2016.159343. PMID: 28126965.
11. Hourigan C.S., Karp J.E. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(8):460–71. DOI:10.1038/nrclinonc.2013.100. PMID: 23799371.
12. Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials. *Blood* 2010;116(3):354–65. DOI:10.1182/blood-2009-11-254441. PMID: 20385793.
13. Krauter J., Gorlich K., Ottmann O. et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4413–22. DOI: 10.1200/JCO.2003.03.166. PMID: 14645432.
14. Guerrasio A., Pilatino C., De Micheli D. et al. Assessment of minimal residual disease (MRD) in CBFbeta/MYH11-positive acute myeloid leukemias by qualitative and quantitative RT-PCR amplification of fusion transcripts. *Leukemia* 2002;16(6):1176–81. DOI: 10.1038/sj.leu.2402478. PMID: 12040450.
15. Buonamici S., Ottaviani E., Testoni N. et al. Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 2002;99(2):443–9. PMID: 11781223.
16. Jourdan E., Boissel N., Chevret S. et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2013;121(12):2213–24. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462879. PMID: 23321257.
17. Scholl C., Breiting H., Schlenk R.F. et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the quantification of the most frequent MLL/AF9 fusion types resulting from translocation t(9;11)(p22; q23) in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 2003;38(3):274–80. DOI:10.1002/gcc.10284. PMID: 14506704.
18. Chendamarai E., Balasubramanian P., George B. et al. Role of minimal residual disease monitoring in acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide in frontline therapy. *Blood* 2012;119(15):3413–9. DOI:10.1182/blood-2011-11-393264. PMID: 22374701.
19. Gilliland G.D., Griffin J.D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002;100(5):1532–42. DOI:10.1182/blood-2002-02-0492. PMID: 12176867.
20. Hayakawa F., Towatari M., Kiyoi H. et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene* 2000;19(5):624–31. DOI:10.1038/sj.onc.1203354. PMID: 10698507.
21. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(23):2209–21. DOI:10.1056/NEJMoa1516192. PMID: 27276561.
22. Kottaridis P.D., Gale R.E., Langabeer S.E. et al. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: Implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood* 2002;100(7):2393–8. DOI:10.1182/blood-2002-02-0420. PMID: 12239147.
23. Lindström M.S. NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochem Res Int* 2011;2011:195–209. DOI:10.1155/2011/195209. PMID: 21152184.
24. Schnittger S., Kern W., Tschulik C. et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation – specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood* 2009;114(11):2220–31. DOI:10.1182/blood-2009-03-213389. PMID: 19587375.
25. Radomska H.S., Huettner C.S., Zhang P. et al. CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha Is a Regulatory Switch Sufficient for Induction of Granulocytic Development from Bipotential Myeloid Progenitors. *Mol Cell Biol* 1998;18(7):4301–14. PMID: 9632814.

26. Kirstetter P., Schuster M.B., Bereshchenko O. et al. Modeling of C/EBP α Mutant Acute Myeloid Leukemia Reveals a Common Expression Signature of Committed Myeloid Leukemia-Initiating Cells. *Cancer Cell* 2008;13(4):299–310. DOI: 10.1016/j.ccr.2008.02.008. PMID: 18394553.
27. Su L., Gao S.J., Li W. et al. NPM1, FLT3-ITD, CEBPA, and c-kit mutations in 312 Chinese patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Hematology* 2014;19(6):324–8. DOI: 10.1179/1607845413Y.0000000132. PMID: 24164801.
28. Fos J., Pabst T., Petkovic V. et al. Deficient CEBPA DNA binding function in normal karyotype AML patients is associated with favorable prognosis. *Blood* 2011;117(18):4881–84. DOI: 10.1182/blood-2010-11-320747. PMID: 21389317.
29. Zeijlemaker W., Schuurhuis G.J. Minimal Residual Disease and Leukemic Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. In: *Leukemia*. Ed.: M. Guenova, G. Balatzenko. 2013. InTech. DOI: 10.5772/52080.
30. Lugthart S., van Drunen E., van Norden Y. et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: Prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood* 2008;111(8):4329–37. DOI: 10.1182/blood-2007-10-119230. PMID: 18272813.
31. Hämäläinen M.M., Kairisto V., Juvonen V. et al. Wilms tumour gene 1 overexpression in bone marrow as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2008;80(3):201–7. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.01009.x. PMID: 18081724.
32. Handschuh L., Kaźmierczak M., Milewski M.C. et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. *Int J Oncol* 2017; [Epub ahead of print]. DOI: 10.3892/ijo.2017.4233. PMID: 29286103.
33. Wang J., Zhao Y., Li J. et al. IDH1 mutation detection by droplet digital PCR in glioma. *Oncotarget* 2015;6(37):39651–60. DOI: 10.18632/oncotarget.5630. PMID: 26485760.
34. Ilyas A.M., Ahmad S., Faheem M. et al. Next Generation Sequencing of Acute Myeloid Leukemia: Influencing Prognosis. *BMC Genomics* 2015;16(Suppl.1):S5. DOI: 10.1186/1471-2164-16-S1-S5. PMID: 25924101.
35. Al-Mawali A., Gillis D., Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2009;131(1):16–26. DOI: 10.1309/AJCP5TSD3DZXFLCX. PMID: 19095561.
36. Kern W., Schnittger S. Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Curr Oncol Rep*. 2003;5(5):405–12. DOI: 10.1007/s11912-003-0027-5. PMID: 12895393.
37. Hauwel M., Matthes T. Minimal residual disease monitoring: The new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Med Wkly* 2014;144:w13907. DOI: 10.4414/sm.w.2014.13907. PMID: 24452390.
38. Zeijlemaker W., Kelder A., Oussoren-Brockhoff Y.J. et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2016;30(3):708–15. DOI: 10.1038/leu.2015.255. PMID: 26373238.
39. Al-Mawali A., Gillis D., Hissaria P., Lewis I. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2008;129(6):934–45. DOI: 10.1309/FY0UMAMM91VPMR2W. PMID: 18480011.
40. Buccisano F., Maurillo L., Ilaria M. et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012;119(2):332–41. DOI: 10.1182/blood-2011-08-363291. PMID: 22039260.
41. Baer M.R., Stewart C.C., Dodge R.K. et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 2001;97(11):3574–80. DOI: 10.1182/blood.V97.11.3574. PMID: 11369653.
42. Voskova D., Schoch C., Schnittger S. et al. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;62(1):25–38. DOI: 10.1002/cyto.b.20025. PMID: 15468339.
43. Cui W., Zhang D., Cunningham M.T., Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: Changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol* 2014;36(6):636–49. DOI: 10.1111/ijlh.12193.
44. Van Der Velden V.H.J., van Der Sluijs-Geling A., Gibson B.E.S. et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia* 2010;24(9):1599–606. DOI: 10.1038/leu.2010.153. PMID: 20668473.
45. Roug A.S., Larsen H.O., Nelderby L. et al. HMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone – a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2014;164(2):212–22. DOI: 10.1111/bjh.12614. PMID: 24152218.
46. Eissa D.S., Kandeel E.Z., Ghareeb M. Human myeloid inhibitory C-lectin: a highly specific and stable acute myeloid leukemia marker. *Hematol Oncol* 2017;35(4):814–20. DOI: 10.1002/hon.2352. PMID: 27734526.
47. Graf M., Reif S., Hecht K. et al. High expression of urokinase plasminogen activator receptor (UPA-R) in acute myeloid leukemia (AML) is associated with worse prognosis. *Am J Hematol* 2005;79(1):26–35. DOI: 10.1002/ajh.20337. PMID: 15849776.
48. Ceran F., Ozet G., Dagdas S. et al. Clinical Significance of CD87 Expression in Acute Myeloblastic Leukemia. *Int J Hematol Oncol* 2016;26(1):1–7. DOI: 10.4999/uhod.16900.
49. Kern W., Voskova D., Schoch C. et al. Prognostic impact of early response to induction therapy as assessed by multiparameter flow cytometry in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004;89(5):528–40. PMID: 15136215.
50. Vidriales M., Pérez-López E., Pegenaute C. et al. Minimal residual disease evaluation by flow cytometry is a complementary tool to cytogenetics for treatment decisions in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2016;40:1–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2015.10.002. PMID: 26598032.
51. Venditti A., Buccisano F., Del Poeta G. et al. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;96(12):3948–52. PMID: 11090082.
52. Rubnitz J.E., Inaba H., Dahl G. et al. Minimal Residual Disease-Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukemia: Results of the AML02 Multicenter Trial. *Lancet Oncol* 2010;11(6):543–52. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70090-5. PMID: 20451454.

53. Buccisano F., Maurillo L., Spagnoli A. et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;116(13):2295–303. DOI: 10.1182/blood-2009-12-258178. PMID: 20548095.
54. Lacombe F., Campos L., Allou K. et al. Prognostic value of multicenter flow cytometry harmonized assessment of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Hematol Oncol* 2017; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/hon.2488. PMID: 29218734.
55. Buldini B., Rizzati F., Masetti R. et al. Prognostic significance of flow-cytometry evaluation of minimal residual disease in children with acute myeloid leukaemia treated according to the AIEOP-AML 2002/01 study protocol. *Br J Haematol* 2017;177(1):116–26. DOI: 10.1111/bjh.14523. PMID: 28240765.
56. Minetto P., Guolo F., Clavio M. et al. Early minimal residual disease assessment after AML induction with fludarabine, cytarabine and idarubicin (FLAI) provides the most useful prognostic information. *Br J Haematol* 2018; [Epub ahead of print]. DOI: 10.1111/bjh.15106. PMID: 29359798.
57. Köhnke T., Sauter D., Ringel K. et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia* 2015;29(2):377–86. DOI: 10.1038/leu.2014.186. PMID: 24912430.
58. Maurillo L., Buccisano F., Piciocchi A. et al. Minimal residual disease as biomarker for optimal biologic dosing of ARA-C in patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2015;90(2):125–31. DOI: 10.1002/ajh.23893. PMID: 25377359.
59. Inaba H., Coustan-Smith E., Cao X. et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(29):3625–32. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.5323. PMID: 22965955.
60. Ouyang J., Goswami M., Peng J. et al. Comparison of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis and Quantitative RT-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol* 2016;145(6):769–77. DOI: 10.1093/ajcp/aqw038. PMID: 27298396.
61. Гальцева И.В., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Минимальная остаточная популяция лейкоэмических клеток у больных острыми миелоидными лейкозами. *Терапевтический архив* 1997;67(7):74–9. [Galtseva I.V., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. The minimal residual population of leukemic cells in patients with acute myeloid leukemia. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic archive* 1997;67(7):74–9 (In Russ.)].
62. Kern W., Voskova D., Schoch C. et al. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2004;104(10):3078–85. DOI: 10.1182/blood-2004-03-1036. PMID: 15284114.
63. Chen X., Xie H., Wood B.L. et al. Relation of clinical response and minimal residual disease and their prognostic impact on outcome in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2015;33(11):1258–64. DOI: 10.1200/JCO.2014.58.3518. PMID: 25732155.
64. Tierens A., Bjørklund E., Siitonen S. et al. Residual disease detected by flow cytometry is an independent predictor of survival in childhood acute myeloid leukaemia; results of the NOPHO-AML 2004 study. *Br J Haematol* 2016;174(4):600–9. DOI: 10.1111/bjh.14093. PMID: 27072379.
65. Loken M.R., Alonzo T., Pardo L. et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood* 2012;120(8):1581–8. DOI: 10.1182/blood-2012-02-408336. PMID: 22649108.
66. Sievers E.L., Lange B.J., Alonzo T. et al. Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2003;101(9):3398–406. DOI: 10.1182/blood-2002-10-3064. PMID: 12506020.
67. Coustan-Smith E., Ribeiro R.C., Rubnitz J.E. et al. Clinical significance of residual disease during treatment in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123(2):243–52. PMID: 14531905.
68. Langebrake C., Creutzig U., Dworzak M. et al. Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: The MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2006;24(22):3686–92. DOI: 10.1200/JCO.2005.05.4312. PMID: 16877738.
69. San Miguel J., Vidrales M., Lopez-Berges C. et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction. *Blood* 2001;98(6):1746–51. DOI: 10.1182/blood.V98.6.1746. PMID: 11535507.

Вклад авторов

Т.И. Лобанова: концепция, дизайн, написание статьи, сбор и анализ данных литературы;

И.В. Гальцева: интерпретация данных, участие в написании статьи;

Е.Н. Паровичникова: участие в написании статьи, концепция, окончательное одобрение статьи.

Authors' contributions

T.I. Lobanova: concept, design and article writing, data collection;

I.V. Galtseva: interpretation of data, article writing;

E.N. Parovichnikova: article writing, concept, final approval of the article.

ORCID авторов

Т.И. Лобанова: <http://orcid.org/0000-0001-6407-0428>

ORCID of authors

T.I. Lobanova: <http://orcid.org/0000-0001-6407-0428>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при хроническом лимфолейкозе

Д.С. Бадмажапова, И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов,
Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, Т.Н. Моисеева, А.М. Ковригина, В.Н. Дvirный,
У.Л. Джулакян, Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Дарима Сэмункоевна Бадмажапова badmazhapova-darima@mail.ru

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, которое проявляется накоплением опухолевых моноклональных В-лимфоцитов с характерным иммунофенотипом в костном мозге, периферической крови и вторичных лимфоидных органах. В настоящее время установлено, что клетки ХЛЛ способны образовывать иммунологические синапсы с клетками микроокружения, прямо и косвенно влияя на их функцию. Поэтому стало понятно, что в патогенезе заболевания лежит не только нарушение апоптоза опухолевых клеток, но и их способность вызывать анергию Т-лимфоцитов, тем самым избегая иммунного надзора.

Цель исследования — изучение экспрессии FAS, костимуляторных молекул CD80 и CD86, PD-1, PD-L1 на клетках ХЛЛ, а также основных субпопуляций Т-клеток (наивные, памяти, эффекторные).

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 46 пациентов с ХЛЛ. Из них у 16 заболевание прогрессировало после химиотерапии, а 30 имели впервые установленный диагноз ХЛЛ (первичные). Последних категоризировали согласно стадиям ХЛЛ по J. Binet. Стадия А установлена у 14 участников, В — у 10, С — у 6. В контрольную группу вошли 29 здоровых доноров. В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь. Исследование проводили на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Результаты. У больных ХЛЛ доля CD80⁺, CD86⁺, FAS⁺ В-клеток была достоверно ниже, чем у доноров. У первичных пациентов доля CD80⁺ клеток ХЛЛ была выше, чем у больных в стадии прогрессирования. Среди первичных пациентов доля CD80⁺ и CD86⁺ клеток оказалась ниже при продвинутых стадиях заболевания. У пациентов в стадии прогрессирования ХЛЛ доля FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных. Доля PD-1⁺ В-клеток у лиц с ХЛЛ была выше, чем у доноров, а среди первичных пациентов доля PD-1⁺ опухолевых клеток была достоверно ниже при продвинутых стадиях заболевания. Доля PD-L1⁺ В-клеток у пациентов с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. У первичных больных доля PD-L1⁺ В-лимфоцитов была выше при стадии А. Доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у пациентов с ХЛЛ по сравнению с группой доноров, а среди первичных пациентов выше при продвинутых стадиях заболевания. Доля PD-L1⁺ Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. Обнаружено снижение доли CD95⁺CD28⁺ клеток, в состав которых входят наивные клетки, у пациентов по сравнению с донорами и увеличение доли эффекторных клеток (CD95⁺CD28⁻), клеток памяти (CD95⁺CD28⁺), причем доля CD8⁺ клеток памяти была выше при продвинутой стадии заболевания.

Заключение. Таким образом, снижение доли CD80/CD86⁺ В-клеток при ХЛЛ может служить причиной неэффективности формирования иммунологического синапса опухолевых клеток с Т-клетками, что приводит к анергии Т-лимфоцитов. Снижение экспрессии FAS-рецептора позволяет опухолевым клеткам ХЛЛ избежать FAS-опосредованного апоптоза. Изменение пула Т-клеток в сторону клеток памяти и эффекторов, приобретение ими CD4⁺PD-1⁺ («истощенного») фенотипа приводит к усугублению нарушенного противоопухолевого иммунитета и, возможно, к прогрессированию заболевания.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, иммунологический синапс, наивные клетки, клетки памяти, эффекторные клетки, нарушение противоопухолевого иммунитета

Для цитирования: Бадмажапова Д.С., Гальцева И.В., Звонков Е.Е. и др. Особенности экспрессии антигенов, участвующих в формировании иммунологического синапса, при хроническом лимфолейкозе. Онкогематология 2018;13(1):103–114.

DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-1-103-114

Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia

D.S. Badmazhapova, I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, Yu.O. Davydova, N.M. Kapranov, N.G. Chernova, N.G. Gabeeva, T.N. Moiseeva,
A.M. Kovrigina, V.N. Dvirnyk, U.L. Dzhulakyan, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology; 4 Noviy Zykovskiy proezd, Moscow 125167, Russia

Background. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease that manifests by the accumulation of tumor monoclonal B-lymphocytes in the bone marrow, peripheral blood and secondary lymphoid organs. Recently it was found that CLL cells are able to form

immunological synapses with microenvironment cells, directly and indirectly affecting their function. Therefore, it became clear that the pathogenesis of CLL is not only escape of apoptosis but also the ability of CLL cells to cause T-lymphocyte anergy, thereby avoiding immune surveillance.

Objective: to study the expression of FAS, co-stimulatory molecules CD80 and CD86, PD-1, PD-L1 on CLL cells, and also to study the basic subpopulations of T-cells (naïve, memory, effector cells).

Materials and methods. The study included 46 CLL patients: 16 patients with disease progression after chemotherapy and 30 patients with newly diagnosed CLL. "Primary" patients are categorized according to J. Binet's CLL stages. Stage A was established in 14 patients, B — 10, C — 6. The control group included 29 healthy donors. Peripheral blood was used as a material for analysis. The study was performed on a 6-color flow cytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences, USA).

Results. In CLL patients, the proportion of CD80⁺, CD86⁺, FAS⁺ B-cells was significantly lower than in donors. In "primary" patients the proportion of CD80⁺ CLL cells was higher than in patients with CLL progression. Among "primary" patients the proportion of CD80⁺ and CD86⁺ was lower in advanced stages of the disease. In patients with CLL progression the proportion of FAS⁺ B cells was higher than in "primary" patients. The proportion of PD-1⁺ B cells in CLL patients was higher than in donors and "primary" patients. The proportion of PD-1⁺ tumor cells was significantly lower in advanced stages of the disease. The proportion of PD-L1⁺ B cells in CLL patients was lower than in donors. Among the "primary" patients, the proportion of PD-L1⁺ B-lymphocytes was higher in stage A. The proportion of PD-1⁺ T-helpers was higher in CLL patients than in donors, and among "primary" patients it was higher in advanced stages of the disease. The proportion of PD-L1⁺ T-helpers and cytotoxic T-cells in CLL patients was lower than in donors. The proportion of naïve cells (CD95⁺ CD28⁺) in patients compared with donors was lower and the proportion of effector cells (CD95⁺ CD28⁻), memory cells (CD95⁺ CD28⁺) was higher, a proportion of CD8⁺ memory T-cells was higher among patients in the advanced stage of CLL.

Conclusion. Therefore, a decline the CD80/CD86⁺ B-cells in CLL can cause ineffectiveness of an immunological synapse between tumor cells and T-cells, which leads to anergy of T-lymphocytes. Decline expression of the FAS receptor allows tumor CLL cells to avoid FAS-mediated apoptosis. A change in the T-cell pool toward memory cells and effectors, the acquisition of a CD4⁺ PD-1⁺ ("exhausted") phenotype impaired antitumor immunity and possible leads to disease progression.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, immunological synaps, naïve cells, memory cells, effector cells, impaired antitumor immunity

For citation: Badmazhapova D.S., Galtseva I.V., Zvonkov E.E. et al. Expression features of antigens involved in the formation of immunological synapse in chronic lymphocytic leukemia. *Onkologematologiya = Oncohematology* 2018;13(1):103–14.

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, которое проявляется накоплением опухолевых моноклональных В-лимфоцитов с характерным иммунофенотипом в костном мозге, периферической крови и вторичных лимфоидных органах. Это самый распространенный вид лейкоза у людей старшего возраста [1, 2]. Вследствие высокой частоты встречаемости и простоты определения и получения опухолевых клеток из периферической крови ХЛЛ служит идеальной моделью для исследования В-клеточных лимфопролиферативных заболеваний.

ХЛЛ — гетерогенное заболевание. Система стадирования (Binet, Rai) не позволяет полностью оценить прогноз таких пациентов, поэтому разработан международный прогностический индекс (CLL-IPI), включающий 5 параметров: возраст >65 лет, мутация гена *TP53/del17p13.1*, немутированный статус *IgVH*, количество β_2 -микроглобулина (более 3,5 г/л), стадия В/С по Binet или III–IV по Rai. Выделено 4 группы риска: низкого (0–1 балл), промежуточного (2–3 балла), высокого (4–6 баллов) и очень высокого (7–10 баллов) [1]. Однако к настоящему времени установлено, что важным фактором развития заболевания является взаимодействие опухолевых клеток с клетками микроокружения (моноциты, дендритные клетки, Т-клетки и т. д.).

Принятая на сегодняшний день концепция, предложенная G. Dunn и соавт. в 2002 г., объясняет процесс

развития опухоли, состоящий из 3 фаз: элиминация, равновесие и уклонение от иммунного ответа. Фаза элиминации характеризуется адекватным иммунным ответом: антигенпрезентирующие клетки (АПК) распознают опухолевые антигены и активируют Т-лимфоциты. АПК экспрессируют на своей поверхности молекулы CD80 и CD86, взаимодействующие с молекулой CD28 на поверхности Т-клеток и отвечающие за ко-стимуляторный сигнал. Фаза равновесия является субклинической, поскольку наблюдается неполная элиминация опухолевых клеток, а оставшиеся клетки приобретают новые биологические свойства. Фаза уклонения от иммунного ответа — стадия манифестации опухоли. На данном этапе опухолевые В-лимфоциты могут снижать экспрессию молекул МНС класса I и FAS (CD95) на своей поверхности, секретировать противовоспалительные цитокины (интерлейкины (ИЛ) 10), ингибировать созревание АПК (снижается способность экспрессии ими молекул CD80 и CD86), воздействовать на метаболизм клеточного микроокружения, который также приводит к ингибированию Т-клеточного ответа [3–10]. Таким образом, данная концепция заключается в том, что в процессе иммунного ответа происходит селекция клонов опухолевых клеток, что обеспечивает выживание только тех клонов, которые способны уклоняться от иммунного контроля [11]. Поэтому приобретение клетками опухолевого фенотипа — многоступенчатый процесс, в ходе которого они получают уникальные биологические свойства.

Известно, что в развитии опухолевых заболеваний основное место занимает анергия иммунной системы [11, 12]. Помимо уменьшения ко-стимуляторных сигналов на АПК, большое значение в развитии анергии иммунной системы имеет PD-1/PD-L1-путь, играющий важную роль при функционировании иммунологического синапса. PD-1 (program death 1, CD279) — рецептор, который экспрессируется на Т-клетках после их активации. Благодаря взаимодействию с его лигандами (PD-L1 (CD274), PD-L2 (CD273)) PD-1 отрицательно влияет на пролиферацию клеток, производство цитокинов и цитотоксические возможности Т-клеток, поддерживая процесс периферической толерантности [13]. PD-L1 может экспрессироваться на Т- и В-клетках, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках, и обычно экспрессия PD-L1 повышается при активации клеток. PD-L1 также представлен в ряде негемопоэтических тканей [13, 14]. Экспрессия PD-L1 негематологическими тканями играет важную роль в регуляции иммунных реакций. В дополнение к этому PD-L1 часто чрезмерно экспрессируется при опухолевых заболеваниях как один из механизмов уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [15–18].

Для понимания механизмов развития опухоли важна не только оценка иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток, но и изучение Т-клеточного звена иммунной системы. Оценить состояние Т-клеточного звена иммунитета можно с помощью разделения Т-клеток на различные субпопуляции: CD28⁺CD95⁻-клетки (в их состав входят наивные клетки), эффекторные (CD28⁻CD95⁺) и клетки памяти (CD28⁺CD95⁺). Эти клетки отличаются пролиферативным потенциалом, иммунофенотипом. Наивные клетки обладают наибольшим пролиферативным потенциалом, на их поверхности отсутствует экспрессия FAS (CD95). В ответ на стимуляцию антигеном наивные клетки переходят в состояние клеток памяти — на их поверхности начинает экспрессироваться CD95, пролиферативный потенциал незначительно снижается и появляются некоторые эффекторные функции. После дальнейшей активации клетки памяти становятся эффекторными — они теряют способность получать ко-стимуляторные сигналы и обладают наиболее выраженными эффекторными функциями (секреция цитокинов, цитотоксическое действие) [19].

Цель исследования — установление взаимосвязи между течением ХЛЛ, фенотипом опухолевых В-лимфоцитов и особенностями Т-клеточного звена иммунитета. У пациентов с ХЛЛ мы исследовали экспрессию FAS, PD-L1, PD-1, CD80 и CD86 на опухолевых CD19⁺/CD5⁺-В-лимфоцитах. Определяли долю Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD8⁺) с коэкспрессией PD-1, PD-L1. Кроме того, определяли соотношение популяций CD95⁻CD28⁺ клеток, эффекторных (CD95⁺CD28⁻) и Т-клеток памяти (CD95⁺CD28⁺).

Материалы и методы

С 2016 по 2017 г. в исследовании приняли участие 46 пациентов с ХЛЛ. Из них у 16 человек заболевание прогрессировало после химиотерапии, у 30 впервые установлен диагноз ХЛЛ (первичные больные), ранее специфическую терапию они не получали. Первичные пациенты категоризированы согласно стадиям ХЛЛ по J. Binet. Стадия А установлена у 14 пациентов, В — у 10, С — у 6. Характеристики пациентов представлены в табл. 1.

В контрольную группу вошли 29 здоровых доноров. Медиана возраста составила 37 лет (24–54 года), соотношение мужчин и женщин — 8:21.

В качестве материала для анализа использовали периферическую кровь с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Сначала проводили лизис эритроцитов раствором, содержащим хлорид аммония, Pharm-Lyse (BD Biosciences, США), затем клетки осаждали центрифугированием и отмывали в растворе CellWash (BD Biosciences, США). Панель моноклональных антител включала антитела против: CD19 PE (SJ25C1), CD5 PerCP-Cy5.5 (L17F12), CD4 APC-Cy7 (SK3), CD8 PerCP (SK1), CD3 APC (SK7), CD279 (PD-1) FITC (M1H4), CD274 (PD-L1) PE-Cy7 (M1H1), CD80 FITC (L307.4), CD86 APC (2331), CD95 (FAS) PE-Cy7 (DX2), CD28 PE (CD28.2), CD45 APC-Cy7 (2D1) производства BD Biosciences. Исследование проводили на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences, США).

Опухолевые В-клетки у пациентов с ХЛЛ выделяли по экспрессии CD19 и CD5 и определяли долю В-клеток, экспрессирующих CD80, CD86, PD-1, PD-L1 и FAS. В-клетки здоровых доноров выделяли на основании экспрессии CD19. Пример цитометрического анализа приведен на рис. 1. Для выделения субпопуляции, экспрессирующей определенный антиген, использовали так называемый метод флуорохром-минус-один (ФМО).

Т-клетки выделяли по экспрессии CD3 и подразделяли на CD4⁺ Т-хелперы и CD8⁺ цитотоксические Т-клетки. Среди Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток определяли долю CD95⁻CD28⁺ клеток (включающих в свой состав наивные клетки), эффекторных клеток (клетки CD95⁺CD28⁻, включающие эффекторные клетки памяти и терминальные эффекторные клетки [19]) и клеток памяти (CD95⁺CD28⁺ — клетки, включающие стволовые клетки центральной памяти, клетки центральной памяти и транзитные клетки памяти [19]) (табл. 2). Также подсчитывали долю клеток CD4⁺ и CD8⁺, экспрессирующих молекулы PD-1 и PD-L1.

Статистический анализ проводили с помощью GraphPadPrism 6.01. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартной ошибки среднего. Нормальность распределения данных проверяли, используя критерий Шапиро–Уилка (при $p < 0,05$ распределение не нормальное). Проверку достоверности различий средних выборок с нормальным распределением

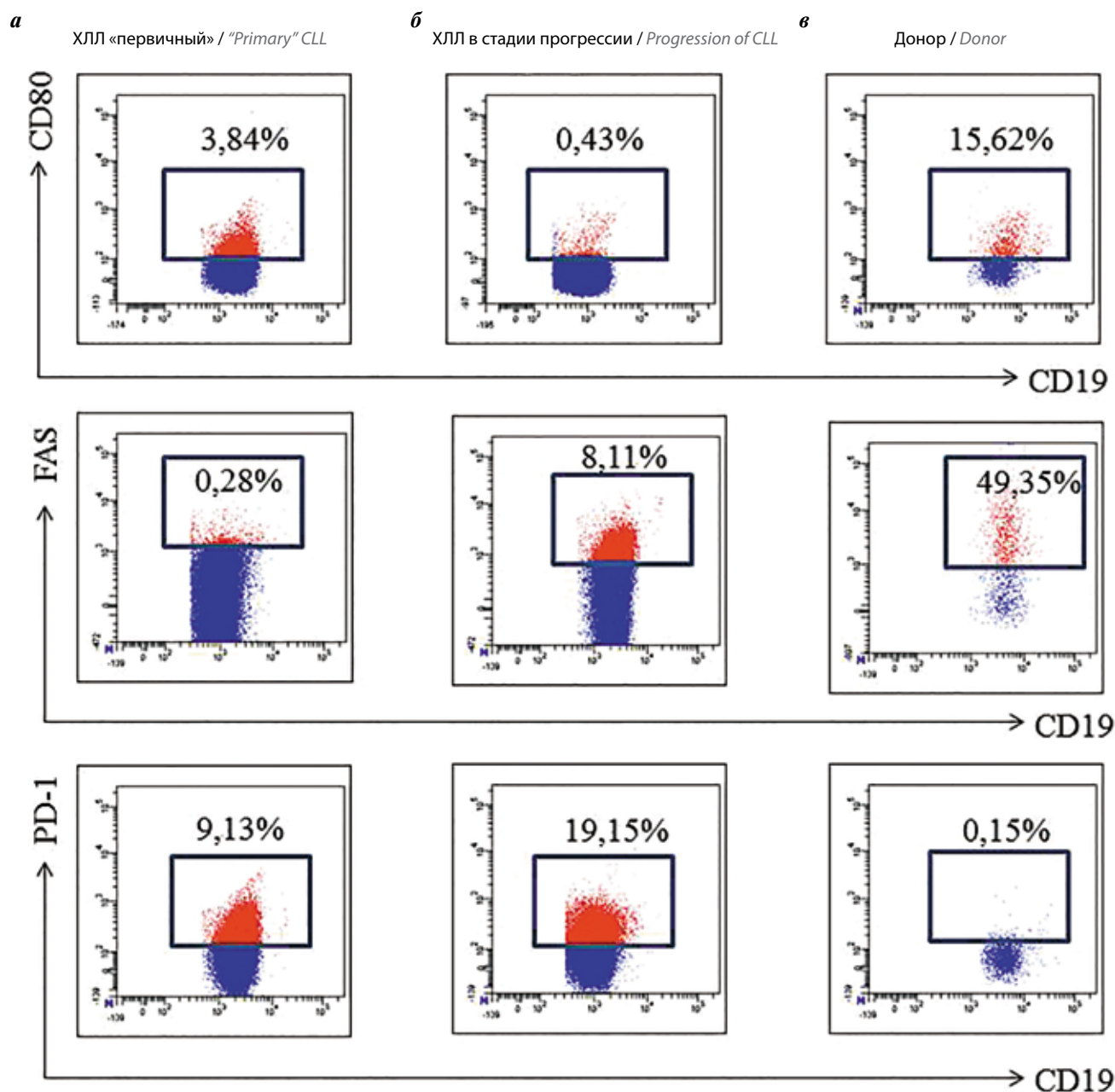


Рис. 1. Примеры точечных диаграмм экспрессии CD80, FAS, PD-1 на В-клетках: а – у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом; б – у пациентов с прогрессирующим хроническим лимфолейкозом; в – у доноров

Fig. 1. Point diagrams examples of CD80, FAS, PD-1 expression on B-cells: а – patients with «primary» chronic lymphocytic leukemia; б – patients with progression of chronic lymphocytic leukemia; в – donors

осуществляли с помощью критерия Стьюдента. Для проверки достоверности различий выборок, подчиняющихся ненормальному распределению, использовали критерий Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Мы провели сравнение исследуемых параметров В- и Т-клеток в 3 группах пациентов: 1-я группа – первичные с ХЛЛ без терапии, 2-я – с ХЛЛ в стадии прогрессии после терапии и 3-я – здоровые доноры. Доля В-клеток, экспрессирующих ко-стимуляторные

молекулы CD80 и CD86, у лиц с ХЛЛ обеих групп была достоверно ниже, чем у доноров (табл. 3). У первичных пациентов доля CD80⁺ В-клеток ХЛЛ была выше, чем у больных, находящихся в стадии прогрессии ($4,02 \pm 1,04$ % против $1,15 \pm 0,43$ %, $p = 0,04$) (см. табл. 3).

Доля PD-1⁺ В-клеток у пациентов с ХЛЛ была выше, чем у доноров, а доля PD-L1⁺ В-клеток ХЛЛ оказалась ниже. У пациентов 1-й и 2-й групп отличий по экспрессии PD-1 и PD-L1 не наблюдалось (табл. 3). Доля FAS⁺ В-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров. У участников в стадии прогрессии ХЛЛ доля

Таблица 1. Характеристика участников исследования с хроническим лимфолейкозом

Table 1. Characteristics of CLL patients included in the study

Показатель Parameter	Пациенты в стадии прогрессирования ХЛЛ (n = 16) CLL patients with progression (n = 16)	Пациенты с впервые установленным диагнозом ХЛЛ Primary diagnosed CLL patients			
		A (n = 14)	B (n = 10)	C (n = 6)	Всего (n = 30) Total (n = 30)
Медиана возраста Age, mediane	57	58	62	63,5	60,5
Соотношение мужчины: женщины Males:females ratio	12:4	9:5	5:5	5:1	19:11

Примечание: ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

Note: CLL — chronic lymphocytic leukemia.

Таблица 2. Иммунофенотип исследуемых субпопуляций Т-клеток

Table 2. Immunophenotype of T-cell subpopulation

Антиген Antigen	Наивные Т-клетки Naive T-cells	Т-клетки памяти Memory T-cells	Т-клетки эффекторы Effector T-cells
CD28	+	+	—
CD95	—	+	+

FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных пациентов ($11,34 \pm 2,60$ против $6,14 \pm 1,21$, $p = 0,036$) (табл. 3).

Доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у участников с ХЛЛ по сравнению с участниками группы доноров. Доля PD-1⁺ Т-хелперов у больных с прогрессирующим ХЛЛ выше, чем у первичных пациентов. Однако среди цитотоксических клеток отличий между группами ХЛЛ и донорами по экспрессии PD-1 не наблюдалось. Доля PD-L1⁺ Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток у лиц с ХЛЛ была ниже, чем у доноров (табл. 3).

Доля CD95-CD28⁺ Т-хелперов у первичных пациентов с ХЛЛ была такой же, как в группе доноров. У лиц с прогрессирующим заболеванием она была ниже, чем у доноров ($5,35 \pm 1,90$ % против $40,20 \pm 3,83$ %, $p < 0,0001$) и первичных пациентов ($5,35 \pm 1,90$ % против $30,93 \pm 3,74$ %, $p < 0,0001$). Доля CD95-CD28⁺ цитотоксических Т-клеток оказалась ниже у пациентов обеих групп по сравнению с донорами, а у пациентов в стадии прогрессии — ниже, чем у первичных пациентов ($3,76 \pm 1,61$ % против $16,92 \pm 3,39$ %, $p = 0,0001$). Доля CD4⁺ клеток памяти (CD4⁺CD95⁺CD28⁺) была выше у лиц с прогрессирующим ХЛЛ по сравнению с первичными пациентами и донорами. Доля эффекторных цитотоксических клеток (CD8⁺CD95⁺CD28⁻) была выше среди участников 1-й и 2-й групп по сравнению с донорами. Среди CD8⁺ клеток памяти (CD8⁺CD95⁺CD28⁺), эффекторных Т-хелперов (CD4⁺CD95⁺CD28⁻) отличий не было (см. табл. 3).

Нами было проведено сравнение опухолевых В-лимфоцитов и Т-клеток у первичных пациентов (ранее

не получавших терапию) по стадиям заболевания. Доля CD80⁺ и CD86⁺ клеток среди опухолевых В-лимфоцитов у пациентов с ХЛЛ в стадии С была ниже в сравнении с больными со стадией А. Доля CD86⁺ В-клеток была ниже у пациентов в стадии В, чем у лиц в стадии А (табл. 4, рис. 2).

Доля PD-1⁺ опухолевых клеток была достоверно выше у пациентов с ХЛЛ в стадиях В и С, чем у лиц с заболеванием в стадии А. Доля PD-L1⁺ В-лимфоцитов у пациентов в стадии А была выше, чем у больных со стадией В. Экспрессия FAS у пациентов в разных стадиях не различалась (см. табл. 4).

Доля CD4⁺PD-1⁺ клеток была выше у лиц с ХЛЛ в стадии С, чем В ($27,43 \pm 4,75$ % против $14,43 \pm 2,51$ %, $p = 0,046$). При этом доля CD8⁺PD-1⁺ клеток не различалась у больных в разных стадиях. Доля CD8⁺ клеток памяти (CD8⁺CD95⁺CD28⁺) была выше у пациентов со стадией С по сравнению со стадией А. Различий по CD95-CD28⁺ клеткам и эффекторным Т-клеткам (CD95⁺CD28⁻) у пациентов с ХЛЛ в разных стадиях не наблюдалось (см. табл. 4).

Одним из факторов, от которого могут зависеть особенности Т-клеточного иммунитета, является возраст. Группы первичных пациентов и лиц с заболеванием в стадии прогрессии, вошедшие в исследование, не различались по возрасту ($p = 0,462$). В группе первичных пациентов различий между стадиями также не было. Медиана возраста доноров составила 35,5 года и была достоверно ниже ($p < 0,0001$), чем у первичных пациентов (медиана возраста — 60,5 года) и у больных в стадии прогрессии (57 лет).

Обсуждение

ХЛЛ — заболевание, динамически протекающее в течение длительного времени. В отличие от солидных опухолей, при ХЛЛ, как и при других лимфомах, опухолевые В-лимфоциты экспрессируют МНС класса II и костимуляторные молекулы CD80 и CD86, которые функционально активны [20]. Мы обнаружили, что при ХЛЛ доля CD80/CD86⁺ В-клеток ХЛЛ ниже по сравнению с нормальными В-лимфоцитами [21].

Таблица 3. Сравнение особенностей иммунофенотипа В-лимфоцитов и Т-клеток у лиц с ХЛЛ в стадии прогрессирования, первичных пациентов с ХЛЛ и доноров

Table 3. Comparison of B-lymphocytes and T-cells immunophenotype in «primary» CLL patients, in patients with progression and healthy donors

Показатель Parameter	Больные ХЛЛ первичные, % «Primary» CLL patients	Больные ХЛЛ в стадии прогрессирования, % CLL patients with progression	Доноры, % Healthy donors
В-лимфоциты B-lymphocytes			
CD19 ⁺ CD80 ⁺	4,02 ± 1,04	1,15 ± 0,43**	16,89 ± 1,55*
CD19 ⁺ CD86 ⁺	5,81 ± 1,62	2,46 ± 0,66	9,77 ± 2,32*
CD19 ⁺ PD-1 ⁺	12,31 ± 2,64	19,57 ± 3,75	1,27 ± 0,23*
CD19 ⁺ PD-L1 ⁺	5,17 ± 2,78	4,14 ± 2,99	35,76 ± 3,13*
CD19 ⁺ FAS ⁺	6,14 ± 1,21	11,34 ± 2,60**	16,59 ± 1,99*
Т-клетки T-cells			
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	19,8 ± 2,21	30,05 ± 3,90**	10,78 ± 0,93*
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	18,14 ± 2,30	15,35 ± 2,39	16,89 ± 1,36
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	0,93 ± 0,15	0,59 ± 0,12	1,21 ± 0,16***
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,43 ± 0,08	0,25 ± 0,05	1,09 ± 0,26*
Наивные CD4 ⁺ “Naive” CD4 ⁺ cells	30,93 ± 3,74	5,35 ± 1,90**	40,20 ± 3,83***
CD4 ⁺ клетки памяти “Memory” CD4 ⁺ cells	59,47 ± 3,53	78,76 ± 4,54**	54,36 ± 3,27***
CD4 ⁺ эффекторные “Effectors” CD4 ⁺ cells	9,32 ± 2,17	15,75 ± 4,68	5,24 ± 1,85
Наивные CD8 ⁺ “Naive” CD8 ⁺ cells	16,92 ± 3,39	3,76 ± 1,61**	34,39 ± 3,90*
CD8 ⁺ клетки памяти “Memory” CD8 ⁺ cells	26,75 ± 2,49	33,74 ± 4,60	27,97 ± 2,03
CD8 ⁺ эффекторные “Effectors” CD8 ⁺ cells	9,32 ± 2,17	15,75 ± 4,68	5,24 ± 1,85*

Примечание: ХЛЛ — хронический лимфолейкоз. *Различия между донорами и обеими группами пациентов с ХЛЛ, **различия между 2 группами пациентов с ХЛЛ, ***различия между донорами и пациентами с прогрессирующим ХЛЛ.

Note: CLL — chronic lymphocytic leukemia. *Differences between donors and both groups of CLL patients, **differences between the two groups of CLL patients, ***differences between donors and CLL patients in progression.

Эти данные соответствуют результатам других групп исследователей [22, 23]. Данный факт служит доказательством неэффективности формирования ИС клеток ХЛЛ с Т-клетками, что приводит к снижению функциональной способности Т-лимфоцитов и к неэффективному противоопухолевому иммунитету. У лиц с прогрессирующим заболеванием доля CD80 и CD86 на опухолевых клетках ниже, чем у первичных пациентов с ХЛЛ, а у пациентов в стадии С доля В-клеток с экспрессией этих антигенов оказалась ниже, чем у больных в стадиях А и В. У первичных пациентов в менее продвинутой стадии заболевания Т-клеточный иммунитет в большей степени способен контролировать опухоль, поскольку при отсутствии ко-стимулирующего сигнала происходит апоптоз или анергия

Т-клеток [24], что служит показателем более глубокого нарушения формирования ИС. Однако при ХЛЛ происходят и другие изменения В- и Т-клеток, которые нарушают формирование ИС, например снижение экспрессии молекул адгезии [25].

Известно, что доля FAS⁺ опухолевых клеток ХЛЛ снижена [26, 27], это подтверждается и в нашем исследовании. И у первичных пациентов с ХЛЛ, и у больных в стадии прогрессии доля FAS⁺ В-клеток была ниже, чем у здоровых доноров. Это свидетельствует о наличии дополнительного механизма опухолевого уклонения клеток ХЛЛ от иммунного контроля, обусловленного блокированием FAS-опосредованного пути апоптоза. Интересно, что у лиц в стадии прогрессии ХЛЛ доля FAS⁺ В-клеток была выше, чем у первичных

Таблица 4. Особенности иммунофенотипа опухолевых В-лимфоцитов и Т-клеток у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом без предшествующей терапии в зависимости от стадии заболевания по J. Binet

Table 4. Immunophenotype features of tumor B-lymphocytes and T-cells in patients with “primary” chronic lymphocytic leukemia without prior therapy depending on the J. Binet disease stage

Показатель Parameter	Стадия А Stage A	Стадия В Stage B	Стадия С Stage C	р
В-лимфоциты B-lymphocytes				
CD19 ⁺ CD80 ⁺	5,94 ± 1,61	3,49 ± 1,95	0,43 ± 1,67	А против С, $p = 0,0006$ А vs С, $p = 0,0006$
CD19 ⁺ CD86 ⁺	8,95 ± 2,49	4,04 ± 3,11	1,45 ± 0,75	А против С, $p = 0,046$ А против В, $p = 0,008$ А vs С, $p = 0,046$ А vs В, $p = 0,008$
CD19 ⁺ PD-1 ⁺	15,37 ± 4,38	12,40 ± 4,72	5,02 ± 2,01	А против В, $p < 0,0001$ В против С, $p = 0,005$ А vs В, $p < 0,0001$ В vs С, $p = 0,005$
CD19 ⁺ PD-L1 ⁺	10,02 ± 5,75	0,25 ± 0,03	2,05 ± 1,32	А против В, $p = 0,004$ А vs В, $p = 0,004$
CD19 ⁺ FAS ⁺	8,87 ± 2,04	2,91 ± 1,48	5,13 ± 1,90	—
Т-клетки T-cells				
CD4 ⁺ PD-1 ⁺	20,37 ± 3,61	14,43 ± 2,51	27,43 ± 4,75	В против С, $p = 0,046$ В против С, $p = 0,046$
CD4 ⁺ PD-L1 ⁺	1,04 ± 0,27	0,63 ± 0,14	1,17 ± 0,30	—
CD8 ⁺ PD-1 ⁺	17,06 ± 3,20	14,46 ± 1,98	26,78 ± 7,70	—
CD8 ⁺ PD-L1 ⁺	0,42 ± 0,13	0,31 ± 0,08	0,65 ± 0,22	—
CD4 ⁺ “CD95-5CD28 ⁺ ”	35,75 ± 6,74	27,87 ± 5,24	26,48 ± 7,77	—
CD4 ⁺ клетки памяти “Memory” CD4 ⁺ cells	51,54 ± 6,16	63,61 ± 4,19	68,64 ± 7,38	—
CD4 ⁺ эффекторы “Effectors” CD4 ⁺ cells	12,41 ± 4,54	8,18 ± 2,22	4,82 ± 2,57	—
CD8 ⁺ “CD95-CD28 ⁺ ”	20,65 ± 6,68	15,62 ± 4,87	11,34 ± 2,16	—
CD8 ⁺ клетки памяти “Memory” CD8 ⁺ cells	20,48 ± 3,16	30,28 ± 4,41	33,48 ± 4,48	А против С, $p = 0,028$ А vs С, $p = 0,028$
CD8 ⁺ «эффекторы» “Effectors” CD8 ⁺ cells	51,03 ± 6,34	48,73 ± 7,76	53,04 ± 4,75	—

пациентов. Предполагается, что в стадии прогрессии заболевания опухолевые клетки активно пролиферируют, а за счет взаимодействия с Т-клетками посредством связывания с CD40 индуцируется экспрессия FAS на клетках ХЛЛ, но парадоксальным образом это приводит к сильным опосредованным NF-κB сигналам, которые были необходимы для выживания лейкоэмических клеток в условиях *in vitro* [28]. Не исключаются и дополнительные механизмы преодоления FAS-опосредованного апоптоза при прогрессировании заболевания.

Недавно при изучении функционирования нормальных В-лимфоцитов стало известно, что экспрессия рецептора PD-1 регулируется и индуцируется поступлением сигнала через В-клеточный рецептор (BCR — B-cell receptor), и не исключено, что антиген PD-1 может играть роль в выборе клона В-лимфоцитов, так как позволяет отобрать наиболее аффинный BCR [29]. Установлено, что PD-1 экспрессируется как на наивных, так и на В-клетках памяти, при активации Т- и В-клеток, а также на моноцитах и дендритных клетках. Стоит сказать, что на активированных

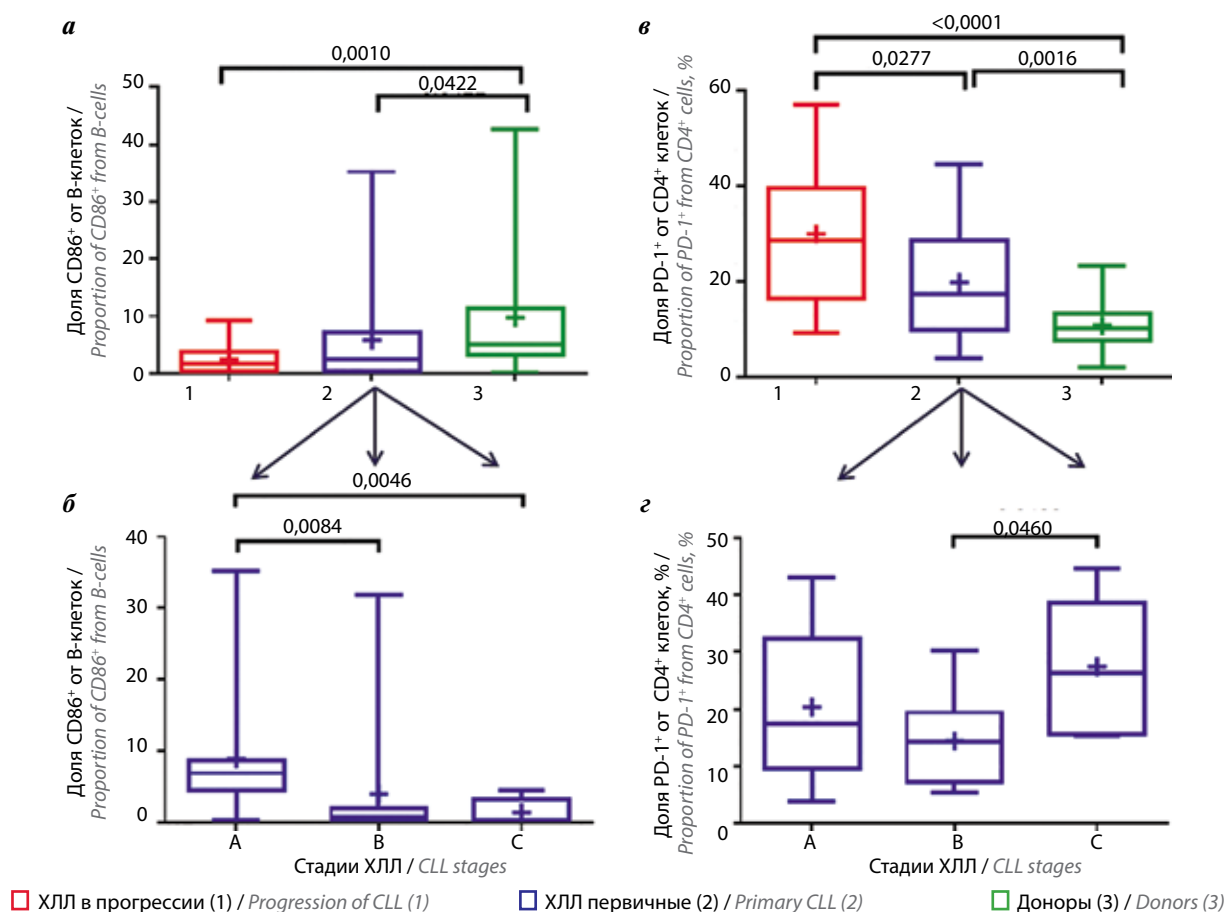


Рис. 2. Экспрессия CD86 и PD-1 на В-лимфоцитах доноров и опухолевых клетках пациентов с хроническим лимфолейкозом: а — доля CD86⁺ В-клеток в периферической крови у лиц с прогрессирующим хроническим лимфолейкозом, первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом и доноров; б — доля CD86⁺ В-клеток в периферической крови у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания (А, В, С); в — доля PD-1⁺CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у лиц с хроническим лимфолейкозом в стадии прогрессии, у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом и доноров; г — доля PD-1⁺CD4⁺ Т-клеток в периферической крови у первичных пациентов с хроническим лимфолейкозом в зависимости от стадии заболевания (А, В, С)

Fig. 2. Expression of CD86 and PD-1 on donors B-lymphocytes and CLL patients tumor cells: а — proportion of CD86⁺ B-cells in peripheral blood of CLL patients with progression, “primary” CLL patients and donors; б — the proportion of CD86⁺ B-cells in peripheral blood of “primary” CLL patients, depending on disease stage (A, B, C); в — the proportion of PD-1⁺CD4⁺ T-cells in the peripheral blood of CLL patients with progression, “primary” CLL patients and donors; г — the proportion of PD-1⁺CD4⁺ T-cells in peripheral blood of “primary” CLL patients, depending on disease stage (A, B, C)

В-клетках экспрессия PD-1 выше, чем на наивных В-клетках [30, 31]. При входе В-лимфоцита в герминальный центр экспрессия PD-1 снижается или полностью исчезает. После выхода В-клетки из герминального центра PD-1 вновь начинает экспрессироваться. Это свидетельствует о том, что PD-1 является регулятором неконтролируемой активации В-лимфоцитов [31].

По нашим данным, доля PD-1⁺ В-клеток как у первичных пациентов, так и у лиц с прогрессирующим ХЛЛ была выше, чем у доноров, что свидетельствует о наиболее выраженной негативной регуляции BCR, возможном активированном фенотипе данных клеток, прошедших деление в герминальных центрах лимфоузлов. У пациентов в стадии прогрессии после терапии доля PD-1⁺ В-клеток была выше, чем у первичных. С другой стороны, среди первичных пациентов доля PD-1⁺ опухолевых клеток была ниже в более продвинутых стадиях. В настоящее время клиническое значение этого факта остается невыясненным. Можно

предположить, что сниженная экспрессия PD-1 на опухолевых клетках также свидетельствует об их наивном фенотипе и высокой способности к активации BCR и, соответственно, более агрессивному течению заболевания.

Лигандом PD-1 рецептора выступает PD-L1, который широко экспрессируется гемопоэтическими (Т- и В-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, миелоидные супрессорные клетки) и негематологическими клетками (эндотелиальные, эпителиальные, мышечные, клетки трофобласта, клетки островков Лангерганса поджелудочной железы и др.). При взаимодействии PD-L1 с его рецептором происходит инактивация и/или апоптоз клетки, этот механизм играет важную роль в регуляции иммунного ответа и препятствует аутоагрессии Т-клеток. Предполагается также, что данный механизм широко используется опухолевыми клетками для уклонения от иммунного контроля. Однако в ходе исследования мы

выяснили, что доля PD-L1⁺ В-клеток была ниже у пациентов с ХЛЛ, чем у здоровых доноров. Вероятно, что в патогенезе ХЛЛ данный механизм уклонения от иммунного контроля не играет значительной роли. В большей степени клетки ХЛЛ вызывают анергию Т-клеток за счет снижения экспрессии ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86 и избегают FAS-опосредованного апоптоза. С другой стороны, клетки ХЛЛ у больных в стадии А в большей степени экспрессируют не только CD80 и CD86, но и PD-L1, чем в более продвинутых стадиях. Вполне вероятно, что в менее продвинутых стадиях опухолевые клетки в большей степени используют PD-1-опосредованный механизм уклонения от Т-клеточной агрессии. Данный факт также можно объяснить и тем, что клетки ХЛЛ в периферической крови значительно отличаются от опухолевых клеток, расположенных в лимфатических узлах. Имеются данные о том, что клетки ХЛЛ в лимфатических узлах способны к активации, взаимодействуя с Т-клетками и другими клетками микроокружения, а клетки ХЛЛ в периферической крови такой способностью не обладают или обладают в меньшей степени [3].

В работе М. Grzywnowicz и соавт. [32] показано, что доля PD1⁺ клеток ХЛЛ и доля PD1⁺ Т-лимфоцитов выше, чем у здоровых доноров. Не отмечено взаимосвязи экспрессии PD-1 с полом, возрастом, стадией заболевания согласно классификации Binet, экспрессией ZAP-70 и CD38, хромосомными aberrациями. В образцах крови пациентов с мутированными генами *IGHV* экспрессия PD-1 была выше, чем при немутированном статусе [32]. В работе J. Lee и соавт. [33] также показано повышение экспрессии PD-1 у пациентов с ХЛЛ, однако не наблюдалась корреляции с PD-1 и мутационным статусом *IGHV* или экспрессией CD38. Показано, что гипометилирование ДНК в области промотора *PD-1* приводит к aberrантной сверхэкспрессии PD-1 на поверхности В-клеток ХЛЛ [33]. В работе J. Li и соавт. [34] PD-1 и PD-L1 были высокоэкспрессированы на клетках ХЛЛ и коррелировали со стадией заболевания по Rai, наличием CD38, ZAP-70, аномальным кариотипом, но не с β_2 -микроглобулином. Предполагается, что PD-1 и PD-L1 может быть прогностическим фактором при ХЛЛ [34]. В исследованиях D. Brusa и соавт. [45], A. Ramsay и соавт. [39] продемонстрирована высокая экспрессия PD-L1, однако в данных работах проводилась предварительная стимуляция опухолевых клеток, что, вероятно, и повлияло на данные результаты. Как известно, стимуляция В-клеток приводит к повышению экспрессии PD-L1.

В течение заболевания клетки ХЛЛ постоянно взаимодействуют с Т-клетками. Поэтому мы изучали основные характеристики Т-клеточного звена, а именно доли CD95⁺CD28⁺ клеток, в состав которых входят наивные клетки, эффекторных (CD95⁺CD28⁻) и Т-клеток памяти (CD95⁺CD28⁺) среди CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток.

В результате наших исследований было установлено, что доля CD95⁺CD28⁺ Т-хелперов ниже у паци-

ентов с прогрессирующим заболеванием, чем у доноров и первичных пациентов. Доля наивных цитотоксических Т-лимфоцитов была ниже среди пациентов 1-й и 2-й групп, чем у доноров, причем доля CD95⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток была ниже у пациентов в стадии прогрессии по сравнению с «первичными» пациентами. Уменьшение пула CD95⁺CD28⁺ Т-клеток у пациентов с ХЛЛ в стадии прогрессирования могло быть связано с воздействием предшествующей терапии или угнетающего действия опухолевых клеток ХЛЛ. Более низкое количество CD95⁺CD28⁺ цитотоксических Т-клеток у первичных пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами, скорее всего, связано с тем, что они были разного возраста, а, как известно, у людей более молодых количество наивных Т-клеток, входящих в данную Т-клеточную субпопуляцию, выше [35]. Доля Т-хелперов памяти оказалась выше у пациентов с прогрессирующим ХЛЛ по сравнению с первичными пациентами и донорами. Доля эффекторных цитотоксических Т-клеток была выше среди пациентов обеих групп по сравнению с донорами. Среди эффекторных Т-хелперов различий не зарегистрировано. В группе первичных пациентов различия наблюдали только в компартменте цитотоксических Т-клеток памяти: в стадии А их было меньше, чем в стадии С.

Также мы изучили экспрессию негативного регулятора PD-1 и его лиганда — PD-L1 на Т-хелперах и цитотоксических Т-клетках. По нашим данным, доля PD-1⁺ Т-хелперов была выше у пациентов ХЛЛ, чем у доноров, а у пациентов в стадии прогрессии она была выше, чем у первичных пациентов. У первичных пациентов в стадии В доля PD-1⁺ Т-хелперов была ниже, чем в стадии С. Среди цитотоксических клеток никаких различий между группами ХЛЛ и между донорами по экспрессии PD-1 не было. Доля PD-L1 на Т-хелперах у пациентов в стадии прогрессии была ниже по сравнению с донорами, а среди цитотоксических Т-клеток — ниже по сравнению с донорами в обеих группах пациентов.

В настоящее время известно, что при ХЛЛ наблюдается сужение репертуара Т-лимфоцитов, что, вероятно, связано с постоянным взаимодействием В-клеток ХЛЛ с Т-лимфоцитами, специфичными к тому же антигену [36]. В других исследованиях отмечено смещение иммунофенотипа CD8⁺ Т-клеток в сторону терминальной дифференцировки (CD8⁺CCR7⁻CD45RO⁺) и приобретение «стареющего» Т-клеточного фенотипа (CD57⁺CD28⁻CD27⁻), что являлось фактором неблагоприятного прогноза заболевания [37, 38]. A. Ramsay и соавт. [39] показали, что экспрессия PD-1 на Т-клетках значительно выше у пациентов с ХЛЛ по сравнению со здоровыми донорами и связана с плохим прогнозом. Нами так же было установлено, что Т-клетки лиц с прогрессирующим ХЛЛ характеризуются большей экспрессией PD-1, чем у первичных пациентов. Было показано, что Т-клетки (CD4⁺ и CD8⁺) ХЛЛ имеют

так называемый истощенный фенотип ($CD4^+PD-1^+$ и $CD8^+PD-1^+$), т. е. имеют гиперэкспрессию PD-1, а также нарушена их секреторная функция [40, 41]. Подобное истощение Т-клеточного звена иммунитета было отмечено и при хронических инфекциях (цитомегаловирусной, вирусе иммунодефицита человека и Эпштейна–Барр) и связано с повышенной экспрессией PD-1 [42, 43]. Под влиянием PD-1 возникает снижение пролиферации Т-клеток наряду с уменьшением количества воспалительных цитокинов, включая фактор некроза опухоли α , интерферон γ и ИЛ-2. Одним из регулирующих экспрессию PD-1 факторов является T-bet, необходимый для развития Т-хелперов 1-го типа и осуществления цитотоксического иммунного ответа. После повторных антигенных стимуляций T-bet снижается, что приводит к экспрессии PD-1 и истощению Т-клеточного звена [43, 44]. Обнаружены эпигенетические механизмы, регулирующие PD-1 посредством метилирования ДНК, вирусная инфекция приводит к его потере в $CD8^+$ Т-клетках, следствием чего является транскрипция гена *PD-1*. Полученные нами данные могут свидетельствовать о постоянном антигенном воздействии опухолевых клеток на Т-лимфоциты, истощении пула $CD95^+CD28^+$ Т-клеток, увеличении доли Т-клеток памяти и Т-эффекторных клеток и повышении доли Т-клеток с ко-экспрессией PD-1.

Заключение

Нами показано, что опухолевые В-лимфоциты характеризуются иммунофенотипом, отличным от фенотипа В-клеток здоровых доноров, позволяющим им избегать иммунного контроля. Отмечено снижение доли $CD80^+$ и $CD86^+$ среди В-клеток пациентов с ХЛЛ, которая тем ниже, чем более продвинута стадия заболевания, — определялась более высокая доля $PD-1^+$

В-клеток ХЛЛ и более низкая FAS^+ и $PD-L1^+$ В-клеток по сравнению со здоровыми донорами. Снижение экспрессии FAS-рецептора позволяет опухолевым клеткам ХЛЛ избегать FAS-опосредованного апоптоза. Снижение ко-стимулирующего сигнала приводит к хронической антигенной стимуляции Т-клеток и их истощению, что подтвердилось тем, что у лиц с ХЛЛ уменьшен пул $CD95^+CD28^+$ Т-клеток и повышена экспрессия PD-1 на Т-хелперах. Хотя возможно, что снижение доли $CD95^+CD28^+$ Т-клеток у пациентов с ХЛЛ в стадии прогрессии было связано с предшествующей терапией, а более низкая доля $CD95^+CD28^+$ цитотоксических Т-клеток у первичных пациентов с ХЛЛ по сравнению с донорами могла быть связана с принадлежностью их к разным возрастным группам. Однако в группе первичных пациентов с ХЛЛ доля $PD-1^+$ Т-хелперов клеток была выше в стадии С, чем В, хотя участники были одного возраста.

Современная терапия ХЛЛ дает возможность получить хорошие результаты, но не позволяет добиться эрадикации опухолевых клеток. Остаются рефрактерные формы ХЛЛ или заболевание прогрессирует даже на фоне терапии. В настоящее время продолжают поиски новых подходов в обследовании пациентов и разработке препаратов. Воздействие на ко-стимулирующие и ко-ингибирующие молекулы, так называемые иммунные контрольные точки, является перспективным направлением в лечении ХЛЛ. Для применения данной терапии необходимы дополнительное обследование пациентов с ХЛЛ, определение наличия или отсутствия на опухолевых клетках антигенов, позволяющих им уклониться от иммунного ответа, а понимание механизмов регуляции данных молекул поможет применить адекватную иммунотерапию на различных этапах болезни.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute – Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111(12):5446–56. DOI: 10.1182/blood-2007-06-093906. PMID: 11492984.
2. Eichhorst B., Robak T., Montserrat E. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(Suppl 5):v78–v84. DOI: 10.1093/annonc/mdv303. PMID: 26314781.
3. Vladimirova R., Popova D., Vikentiev E., Guenova M. Chronic Lymphocytic Leukemia – Microenvironment and B Cells. In: *Leukemias – Updates and New Insights*. Ed.: M. Guenova, G. Balatzenko, 2015. InTech. DOI: 10.5772/60761.
4. Mellor A.L., Munn D.H. Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity. *J Immunol* 2003;170(12):5809–13. DOI: 10.4049/jimmunol.170.12.5809. PMID: 12794104.
5. Burger J.A., Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol* 2014;34(12):592–601. DOI: 10.1016/j.it.2013.07.002. PMID: 23928062.
6. Han T.T., Fan L., Li J.-Y. et al. Role of chemokines and their receptors in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Biol Ther* 2014;15(1):3–9. DOI: 10.4161/cbt.26607. PMID: 24149438.
7. Burger J.A. Targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia is changing the therapeutic landscape. *Curr Opin Oncol* 2012;24(6):643–9. DOI: 10.1097/CCO.0b013e3283589950. PMID: 22960555.
8. Казанский Д.Б. Т-лимфоциты в развитии хронического лимфолейкоза. *Клиническая онкогематология* 2012;5(2):85–95. [Kazanskiy D.B. T-lymphocytes in development of chronic lymphocytic leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncology* 2012;5(2):85–95. (In Russ.)].
9. Qorraj M., Böttcher M., Mougiakakos D. PD-L1/PD-1: new kid on the “immune metabolic” block. *Oncotarget* 2017;8(43):73364–5. DOI: 10.18632/oncotarget.20639. PMID: 29088710.

10. Kirkwood J.M., Tarhini A.A., Panelli M.C. et al. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3445–55. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.6423. PMID: 18612161.
11. Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3(11):991–8. DOI: 10.1038/ni1102–991. PMID: 12407406.
12. Pizzi M., Boi M., Berton F., Inghirami G. Emerging therapies provide new opportunities to reshape the multifaceted interactions between the immune system and lymphoma cells. *Leukemia* 2016;30(9):1805–15. DOI: 10.1038/leu.2016.161. PMID:27389058.
13. Freeman G.J., Long A.J., Iwai Y. et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027–34. DOI: 10.1084/jem.192.7.1027. PMID: 11015443.
14. Dong H., Zhu G., Tamada K. et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932. PMID:10581077.
15. Upadhyay R., Hammerich L., Peng P. et al. Lymphoma: Immune evasion strategies. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):736–62. DOI: 10.3390/cancers7020736. PMID: 25941795
16. Brahmer J.R., Drake C.G., Wollner I. et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1(MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28(19):3167–75. DOI: 10.1200/JCO.2009.26.7609. PMID: 20516446.
17. Xia Y., Jeffrey Medeiros L., Young K.H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta* 2016;1865(1):58–71. DOI: 10.1016/j.bbcan.2015.09.002. PMID: 26432723
18. Armand P. Immune checkpoint blockade in hematologic malignancies. *Blood* 2015;125(22):3393–401. DOI: 10.1182/blood-2015-02-567453. PMID:26637703.
19. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43(11):2797–809. DOI: 10.1002/eji.201343751. PMID: 24258910.
20. Xu-Monette Z.Y., Zhou J., Young K. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood* 2018;131(1):68–83. DOI: 10.1182/blood-2017-07-740993. PMID: 29118007.
21. Graves P., Gribben J.G. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* 2013;121(5):734–44. DOI: 10.1182/blood-2012-10-385591. PMID: 23223433.
22. Vyth-Dreese F.A., Boot H., Dellemijn T.A. et al. Localization in situ of costimulatory molecules and cytokines in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Immunology* 1998;94(4):580–6. DOI: 10.1046/j.1365-2567.1998.00550.x. PMID: 9767448.
23. Dakappagari N., Ho S.N., Gascoyne R.D. et al. CD80(B7.1) is expressed on both malignant B cells and nonmalignant stromal cells in non-Hodgkin lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82(2):112–9. DOI: 10.1002/cyto.b.20631. PMID: 22076940.
24. Suvas S., Singh V., Sahdev S. et al. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 2002;277(10):7766–75. DOI: 10.1074/jbc.M105902200. PMID: 11726649.
25. Ramsay A.G., Johnson A.J., Lee A.M. et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation. *J Clin Invest* 2008;118(7):2427–37. DOI: 10.1172/JCI35017. PMID: 18551193.
26. Williams J.F., Petrus M.J., Wright J.A. et al. Fas-mediated lysis of chronic lymphocytic leukaemia cells: Role of type I versus type II cytokines and autologous FasL-expressing T cells. *Br J Haematol* 1999;107(1):99–105. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01670.x. PMID: 10520029.
27. Schattner E.J. CD40 ligand in CLL pathogenesis and therapy. *Leuk Lymphoma* 2000;37(5–6):461–72. DOI: 10.3109/10428190009058499. PMID: 11042507.
28. Agata Y., Kawasaki A., Nishimura H. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8(5):765–72. DOI: 10.1093/intimm/8.5.765. PMID: 8671665.
29. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11(11):3887–95. DOI: 10.1128/EMBO.11.11.3887. PMID: 1396582.
30. Chang T.T., Kuchroo V.K., Sharpe A.H. Role of the B7-CD28 / CTLA-4 Pathway. *Curr Dir Autoimmun* 2002;5(1):113–30. DOI: 10.1159/000060550. PMID:11826754.
31. Thibult M.-L., Mamessier E., Gertner-Dardenne J. et al. PD-1 is a novel regulator of human B-cell activation. *Int Immunol* 2013;25(2):129–37. DOI: 10.1093/intimm/dxs098. PMID: 23087177.
32. Grzywnowicz M., Karabon L., Karczmarczyk A. et al. The function of a novel immunophenotype candidate molecule PD-1 in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2015;56(10):2908–13. DOI: 10.3109/10428194.2015.1017820. PMID: 25682964.
33. Lee J., Liu J., Speir E. et al. DNA Hypomethylation Leads to Aberrant Expression of PD-1 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* 2012;120:3504. Abstr. 3504.
34. Li J., Pang N., Zhang Z. PD-1/PD-L1 expression and its implications in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2017;38(03):198–203. [Article in Chinese, Abstract in English]. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253–2727.2017.03.005. PMID: 28395442.
35. Pfister G., Weiskopf D., Lazuardi L. et al. Naïve T cells in the elderly: Are they still there? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067(1):152–57. DOI: 10.1196/annals.1354.018. PMID: 16803980.
36. Hofbauer J.P., Heyder C., Denk U. et al. Development of CLL in the TCL1 transgenic mouse model is associated with severe skewing of the T-cell compartment homologous to human CLL. *Leukemia* 2011;25(9):1452–8. DOI: 10.1038/leu.2011.111. PMID: 21606964.
37. Walton J.A., Lydyard P.M., Nathwani A. et al. Patients with B cell chronic lymphocytic leukaemia have an expanded population of CD4+ perforin expressing T cells enriched for human cytomegalovirus specificity and an effector-memory phenotype. *Br J Haematol* 2010;148(2):274–84. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07964.x. PMID: 19895614.
38. Nunes C., Wong R., Mason M. et al. Expansion of a CD8+PD-1+ replicative senescence phenotype in early stage CLL patients is associated with inverted CD4: CD8 ratios and disease progression. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):678–87. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2630. PMID: 22190592.
39. Ramsay A.G., Clear A.J., Fatah R. Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide. *Blood* 2013;120(7):1412–21. DOI: 10.1182/blood-2012-02-411678. PMID: 22547582.
40. Riches J.C., Davies J.K., McClanahan F. et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood* 2013;121(9):1612–21.

- DOI: 10.1182/blood-2012-09-457531. PMID: 23247726.
41. Brown J.A., Dorfman D.M., Ma F.-R. et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. *J Immunol* 2003;170(3):1257–66. DOI: 10.4049/jimmunol.170.3.1257. PMID: 12538684.
 42. Duraiswamy J., Ibegbu C.C., Masopust D. et al. Phenotype, function, and gene expression profiles of programmed death-1(hi) CD8 T cells in healthy human adults. *J Immunol* 2011;186(7):4200–12. DOI: 10.4049/jimmunol.1001783. PMID: 21383243.
 43. Rosignoli G., Lim C.H., Bower M. et al. Programmed death (PD) – 1 molecule and its ligand PD-L1 distribution among memory CD4 and CD8 T cell subsets in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Clin Exp Immunol* 2009;157(1):90–7. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03960.x. PMID: 19659774.
 44. Chinai J.M., Janakiram M., Chen F. et al. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36(9):587–95. DOI: 10.1016/j.tips.2015.06.005. PMID: 26162965.
 45. Brusa D., Serra S., Coscia M. et al. The PD-1/PD-L1 axis contributes to T-cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98(6):953–63. DOI: 10.3324/haematol.2012.077537. PMID: 23300177.

Вклад авторов

Д.С. Бадмажапова: концепция, дизайн и написание статьи, сбор данных;
И.В. Гальцева, Е.Е. Звонков, Е.Н. Паровичникова: интерпретация данных, участие в написании статьи;
Т.Н. Моисеева: ведение больных, предоставление материалов;
Н.Г. Чернова, Н.Г. Габеева, У.Л. Джулакян: участие в написании статьи;
Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов: проведение статистического анализа, участие в написании статьи, сбор данных;
А.М. Ковригина: выполнение гистологического и иммуногистохимического исследования биопсийного материала, верификация диагноза;
В.Н. Двирнык: выполнение цитологического исследования пунктатов костного мозга, периферической крови, иммунофенотипирование крови, костного мозга, биопсийного материала, верификация диагноза;
В.Г. Савченко: концепция, окончательное одобрение рукописи.

Authors' contributions

D.S. Badmazhapova: concept, design and article writing, data collection;
I.V. Galtseva, E.E. Zvonkov, E.N. Parovichnikova: interpretation of data, article writing;
T.N. Moiseeva: management of patients, provision of materials;
N.G. Chernova, N.G. Gabeeva, U.L. Dzhulakyan: article writing;
Yu.O. Davidova, N.M. Kapranov: statistical analysis, article writing, data collection;
A.M. Kovrigina: performance of histological and immunohistochemistry of biopsy specimen, verification of diagnosis;
V. N. Dvirnyk: performance of cytological examination of peripheral blood, bone marrow, flow cytometry of blood, bone marrow, biopsy specimen, diagnosis verification;
V.G. Savchenko: concept, final approval of the article.

ORCID авторов

Д.С. Бадмажапова: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
И.В. Гальцева: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
Е.Е. Звонков: <https://orcid.org/0000-0002-2639-7419>

ORCID of authors

D.S. Badmazhapova: <https://orcid.org/0000-0002-4223-2366>
I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
E.E. Zvonkov: <https://orcid.org/0000-0002-2639-7419>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.01.2018. **Принята к публикации:** 14.03.2018

Article received: 11.01.2018. **Accepted for publication:** 14.03.2018

Москва, 22 марта 2018 г.

Компания AbbVie объявляет об одобрении препарата Венклекста (венетоклакс) в Российской Федерации для монотерапии рецидивирующего/рефрактерного хронического лимфоцитарного лейкоза

- Венклекста — первый одобренный ингибитор BCL-2.
- По результатам клинических исследований II фазы препарата Венклекста с участием 158 пациентов с делецией 17p, ранее получавших терапию по поводу хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), общая частота ответа (ОЧО) составила 79 %¹.
- В клинических исследованиях II фазы препарата Венклекста у 64 пациентов с ХЛЛ с неэффективностью предшествующей терапии ибрутинином или иделалисибом ОЧО составила 64 %¹.

МОСКВА, Россия, 22 марта 2018 года. Глобальная биофармацевтическая научно-исследовательская компания AbbVie сообщает о том, что Министерство здравоохранения Российской Федерации одобрило препарат Венклекста (венетоклакс) для приема внутрь перорально. Препарат является мощным селективным ингибитором антиапоптозного белка В-клеточной лимфомы (BCL-2). Венклекста показана в качестве монотерапии для лечения ХЛЛ с 17p-делецией или TP53-мутацией у взрослых пациентов, которым лечение ингибиторами сигнального пути В-клеточного рецептора не подходит или не показало ожидаемого результата, а также без 17p-делеции или TP53-мутации у взрослых пациентов, не ответивших на химиоиммунотерапию и лечение ингибиторами сигнального пути В-клеточного рецептора.

Разработкой препарата Венклекста совместно занимаются компании AbbVie и Roche. Коммерциализацию в США проводят совместно AbbVie и компания Genentech, входящая в Roche Group, за пределами США — компания AbbVie.

«Терапия рецидивирующего и/или рефрактерного хронического лимфолейкоза — одна из сложных проблем современной онкогематологии, — отметила **Ирина Поддубная, д.м.н., профессор, академик Российской академии наук, проректор по учебной работе и международному сотрудничеству, заведующая кафедрой онкологии Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения РФ.** — Применение препарата венетоклакс дает возможность лечения пациентов, у которых уже были безуспешно использованы все существующие

терапевтические опции. Новая терапия не только увеличивает общую продолжительность жизни пациентов, но и способствует улучшению ее качества. Это является бесспорно ценной дополнительной характеристикой препарата и имеет несомненно большое значение, так как ХЛЛ все чаще встречается в нашей стране среди лиц трудоспособного возраста».

ХЛЛ — это, как правило, медленно прогрессирующий рак костного мозга и крови.² Пациенты с делецией 17p — геномной перестройкой, сопровождающейся потерей части хромосомы 17, составляют от 3 до 10 % всех случаев ХЛЛ у пациентов без предшествующего опыта лечения и 30–50 % случаев рецидивирующего или рефрактерного ХЛЛ.³ Мутация TP53 встречается у 8–15 % больных в первой линии терапии и у 35–50 % больных с рефрактерным ХЛЛ.³ Наиболее неблагоприятный прогноз³ отмечается у пациентов с делецией 17p или мутацией TP53 с медианой выживаемости при использовании стандартных схем лечения от менее 2 до 3 лет.⁴

«AbbVie стремится разрабатывать инновационные подходы к лечению в терапевтических областях с наибольшими неудовлетворенными медицинскими потребностями, — подчеркнул **Энтони Вонг, региональный вице-президент AbbVie (Россия, Украина и страны СНГ).** — Во всем мире лечение онкологических заболеваний по-прежнему остается серьезной проблемой, и мы стремимся к тому, чтобы изменить парадигму лечения для достижения лучших и более длительных результатов. Рецидивирующий/рефрактерный ХЛЛ при наличии делеции 17p был одним из самых сложных для лечения заболеваний. Поэтому чрезвычайно важно, что мы смогли предложить новую терапевтическую опцию, способную помочь таким пациентам».

Программа клинических исследований препарата Венклекста

Исследование 1

Пациенты с рецидивирующим/рефрактерным ХЛЛ и делецией 17p¹

Безопасность и эффективность препарата Венклекста оценивали в многоцентровом открытом не сравнительном исследовании II фазы у 107 пациентов

(основная когорта) с делецией 17p, прошедших лечение ХЛЛ, и дополнительно у 51 пациента из расширенной когорты с анализом безопасности. Пациенты следовали схеме повышения дозы, рассчитанной на срок от 4 до 5 нед, начиная с дозы 20 мг и увеличивая ее до 50, 100, 200 мг и, наконец, до 400 мг 1 раз в сутки. Пациенты продолжали получать препарат Венклекста 400 мг 1 раз в сутки до появления признаков прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. Медиана времени терапии составила 12 мес (от 0 до 22 мес) для основной когорты. Медиана времени терапии в объединенной когорте (основная когорта и когорта с расширенной оценкой безопасности, $n = 158$) составила 25 мес (от 0,5 до 50 мес). Оценку данных основной когорты проводила независимая экспертная комиссия, а оценку данных объединенной когорты проводили исследователи. Приведенные результаты¹:

- Первичная конечная точка эффективности, ОЧО, достигла 79 % (95 % доверительный интервал (ДИ) 70,5–86,6) в основной когорте и 77 % (95 % ДИ 69,9–83,5) в объединенной когорте.
- Медиана продолжительности ответа не была достигнута в основной когорте и составила 27,5 мес (95 % ДИ 26,5–83,5) в объединенной когорте.
- Медиана выживаемости без прогрессирования (ВБП) не была достигнута в основной когорте и составила 27,2 мес (95 % ДИ 21,9) не достигнута в объединенной когорте.
- Полной ремиссии (ПР) и полной ремиссии с неполным восстановлением костного мозга (ПРн) достигали 7 % пациентов в основной когорте и 18 % пациентов в объединенной когорте.
- Частичной ремиссии (ЧР) достигали 69 % пациентов в основной когорте и 53 % пациентов в объединенной когорте.
- Частичной нодулярной ремиссии (нЧР) достигали 3 % пациентов в основной когорте и у 6 % пациентов в объединенной когорте.
- Минимально остаточную болезнь (МОБ) оценили у 93 из 158 пациентов, достигших при лечении препаратом Венклекста ПР, ПРн или нЧР. МОБ-отрицательный статус в периферической крови отмечали у 27 % (41/158) пациентов, включая 15 пациентов с МОБ-отрицательным статусом в костном мозге. МОБ-отрицательный статус являлся исследовательской конечной точкой.

Исследование 2

Пациенты с ХЛЛ, резистентными к лечению ингибитором сигнального пути В-клеточного рецептора¹

Безопасность и эффективность препарата Венклекста оценивали в многоцентровом открытом нерандомизированном исследовании II фазы у пациентов с ХЛЛ, ранее получавших ибрутиниб (медиана числа предшествующих курсов противоракового лечения равнялась 4 (от 1 до 12)) или иделагисиб (медиана числа

предшествующих курсов противоракового лечения равнялась 3 (от 1 до 11)). Пациенты получали препарат Венклекста исходя из рекомендованного графика увеличения дозы. Они продолжали получать Венклекста 400 мг 1 раз в сутки до появления признаков прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности. На момент завершения сбора данных в исследовании участвовали и принимали препарат Венклекста 64 пациента. Из них 43 пациента ранее получали лечение ибрутинибом (группа А) и 21 пациент ранее получал лечение иделагисибом (группа В). У 91 % пациентов (39/42) в группе А и у 67 % пациентов (14/21) в группе В наблюдали рецидивы или резистентность к ибрутинибу и иделагисибу соответственно. Хромосомные перестройки включали делецию 11q (30 %, 19/62), делецию 17p (36 %, 23/61), мутацию TP53 (26 %, 16/61) и немутированный ген IgVH (86 %, 36/42). На момент оценки медиана продолжительности лечения препаратом Венклекста составила 11,7 мес (от 0,1 до 17,9 мес). Приведенные результаты¹:

- Первичная конечная точка эффективности, ОЧО, составила 67 % (95 % ДИ 51,5, 80,9) в группе А, 57 % (95 % ДИ 34,0–78,2) в группе В и 64 % (95 % ДИ 51,1–75,7) в общей исследованной популяции согласно оценке исследователя. Данные по эффективности дополнительно оценивала независимая экспертная комиссия, согласно которой ОЧО составила 67 % в объединенной группе (группа А: 70 %, группа В: 62 %).
- ОЧО для пациентов с делецией 17p/мутацией TP53 составил 71 % (15/21) (95 % ДИ 47,8–88,7) в группе А и 50 % (95 % ДИ 1,3–98,7) в группе В.
- ОЧО для пациентов без делеции 17p/мутаций TP53 составил 68 % (15/22) (95 % ДИ 45,1–86,1) в группе А и 63 % (95 % ДИ 38,4–83,7) в группе В.
- За средний период наблюдения, равный 12 мес, медиана ВБП и продолжительности ответа не достигла 12 мес для группы А и 9 мес для группы В.
- В соответствии с оценкой исследователя в совокупности ПР и ПРн достигли 7 % пациентов группы А, 14 % пациентов группы В и 9 % пациентов из общей популяции пациентов.
- В соответствии с оценкой исследователя ПР достигли 56 % пациентов группы А, 43 % пациентов группы В и 52 % пациентов из общей популяции пациентов.
- В соответствии с оценкой исследователя, ПРн достигли 5 % пациентов группы А, ни один из пациентов группы В и 3 % пациентов из общей популяции пациентов.

Оценка безопасности препарата Венклекста основана на объединенных данных по 296 пациентам, получавшим лечение венетоклаком в 2 исследованиях II фазы и в 1 исследовании I фазы. В совокупности в исследования включили пациентов с предшествующим опытом лечения ХЛЛ, в том числе 188 пациентов с делецией 17p и 92 пациента, ранее получавших ингибитор сигнального пути В-клеточного рецептора.

Наиболее распространенными нежелательными явлениями (≥ 20 %) всех степеней тяжести у пациентов, получавших препарат Венклекста, являлись нейтропения/снижение числа нейтрофилов, диарея, тошнота, анемия, инфекция верхних дыхательных путей, быстрая утомляемость, гиперфосфатемия, рвота и запоры. Наиболее часто регистрируемыми серьезными нежелательными явлениями (≥ 2 %) являлись пневмония, фебрильная нейтропения и синдром лизиса опухоли (СЛО). Прервали прием препарата из-за побочных реакций у 9,1 % пациентов. Корректировку дозы из-за побочных реакций провели у 11,8 % пациентов.

О препарате Венклекста (венетоклакс)

Венклекста — препарат для приема внутрь, мощный селективный ингибитор антиапоптозного белка В-клеточной лимфомы (BCL-2), прошел оценку в качестве лекарственного средства для лечения пациентов со злокачественными заболеваниями крови^{1, 5–8}. Белок BCL-2 предупреждает апоптоз (запрограммированную гибель) некоторых клеток, в том числе лимфоцитов, и может в избыточном количестве экспрессироваться клетками ХЛЛ.¹ Венклекста, которую принимают 1 раз в сутки, предназначена для селективного ингибирования функции белка BCL-2.¹

Разработкой препарата Венклекста занимаются компании AbbVie и Roche. Коммерциализацией препарата в США совместно занимаются компании AbbVie и Genentech, член «Roche Group», за пределами США — компания AbbVie. Компании взяли на себя совместные обязательства по проведению исследований влияния венетоклакса на BCL-2. В настоящее время в клинических испытаниях III фазы проводится оценка препарата для лечения рецидивирующей/рефрактерной хронической лимфоцитарной лейкемии, наряду с этим, в других исследованиях — для лечения некоторых других онкологических заболеваний.

В декабре 2016 г. Европейская комиссия выдала условное регистрационное удостоверение на препарат Венклекста в качестве препарата для монотерапии подходящих пациентов с трудно поддающимися лечению ХЛЛ. Условное регистрационное удостоверение предоставляется лекарственным препаратам, устраняющим неудовлетворенную медицинскую потребность, когда польза от их немедленной доступности для пациентов перевешивает риск ограниченной доступности данных при условии предоставления исчерпывающих данных.⁹ В апреле 2016 г. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в ускоренном порядке одобрило препарат Венклекста (венетоклакс) таблетки для лечения ХЛЛ у пациентов с делецией 17p, обнаруживаемой с по-

мощью одобренного FDA теста, которые ранее прошли минимум 1 курс терапии. FDA утвердило это показание в ускоренном порядке на основании общей частоты ответа, а одобрение на более длительный период может зависеть от данных по клинической пользе, полученных в подтверждающем испытании. В настоящее время AbbVie в сотрудничестве с Roche и Genentech работает с регулирующими органами по всему миру, чтобы обеспечить данным препаратом нуждающихся в нем подходящих пациентов.

Об онкологическом направлении AbbVie

В партнерстве с учеными, врачами, другими фармацевтическими компаниями и пациентскими организациями AbbVie стремится победить рак с помощью открытий и разработок новых подходов к терапии, для того, чтобы оказать значительное влияние на жизнь онкологических пациентов по всему миру. Наша цель — предоставить лекарственные препараты, обеспечивающие кардинальные улучшения в лечении рака и результатах терапии онкологических больных. AbbVie открывает новые горизонты в лечении некоторых из наиболее распространенных и трудно поддающихся лечению онкологических заболеваний за счет поиска инновационных подходов и инвестиций в новые направления, технологии и стратегии лечения. Мы также ищем решения, помогающие пациентам получить доступ к онкологическим препаратам компании. С приобретением Pharmacyclics в 2015 г. и Stemcentrx в 2016 г., а также благодаря проектам, реализуемым совместно с другими фармацевтическими компаниями, в портфель онкологических разработок AbbVie входят как широко представленные на рынке лекарственные средства, так и новые препараты для лечения 20 различных форм рака, прошедшие проверку примерно в 200 клинических испытаниях. Дополнительная информация об онкологическом направлении AbbVie приводится на сайте <http://abbvieoncology.com>.

Об AbbVie

AbbVie — глобальная научно-исследовательская биофармацевтическая компания, приверженная разработке инновационной терапии для лечения некоторых из самых сложных заболеваний в мире. Миссия компании — использовать экспертизу, опыт преданных делу сотрудников и уникальный подход к инновациям для развития и вывода на рынок передовых методов лечения, в первую очередь в области иммунологии, онкологии, вирусологии и неврологии. Сотрудники компании AbbVie ежедневно работают в 75 странах мира для совершенствования решений для здравоохранения.

Ссылки:

¹Venetoclax SPC, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004106/WC500218800.pdf, electronic source, assessed on 06/03/2018.

²American Cancer Society (2015). Leukemia – Chronic Lymphocytic. <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003111-pdf.pdf>. Accessed December 2016.

³Schnaiter A. et al. 17p deletion in chronic lymphocytic leukemia: risk stratification and therapeutic approach. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2013;27:289–301.

⁴Stilgenbauer S. et al. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010; 1:481–8.

⁵Clinicaltrials. gov.NCT01889186: A study of the efficacy of ABT-199 in subjects with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia with the 17p deletion. Accessed October 2016.

⁶Clinicaltrials. gov.NCT01994837: A Phase 2 Study of ABT-199 in subjects with Acute Myelogenous Leukemia (AML). Accessed October 2016.

⁷Clinicaltrials. gov.NCT01794520: Study evaluating ABT-199 in subjects with relapsed or refractory Multiple Myeloma. Accessed October 2016.

⁸Clinicaltrials. gov.NCT01328626: A Phase 1 study evaluating the safety and pharmacokinetics of ABT-199 in subjects with relapsed or refractory Chronic Lymphocytic Leukemia and Non-Hodgkin Lymphoma. Accessed October 2016.

⁹European Medicines Agency. Conditional Marketing Authorisation. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000925.jsp. Accessed October 2016.

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Онкогематология» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами:

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным решением на публикацию, заверенным печатью учреждения, в котором работает первый в списке автор. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (бóльший объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),

- при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т.д.),
- благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, онкогематология (ОГ)).

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, PMID и DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу j.roumiantseva@mail.ru с пометкой «Ответственному секретарю. Публикация в ОГ». С обязательным указанием названия журнала.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.