

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«КИРОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ
И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

МАТЕРИАЛЫ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ «КИРОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии

г.Киров

7-8 ноября 2024 года

УДК 615.38+616.1/.9

ББК 53

A437

Актуальные вопросы трансфузиологии и онкогематологии [Текст]: сб. материалов научн.-практ. конф. молодых ученых и спец. / [редкол.: И.В.Парамонов (отв. ред.) и др.] - Киров: ООО «Флат-Принт», 2024. – 208 с. Тираж 500 экз.

Conference Organizer:

FSBSI «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion

FMBA of Russia» Editorial Council:

Responsible editor: I. V. Paramonov - Ph.D., director of FGBUN «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia»;

Deputy Executive Editor: K.A. Vorobiev - Doctor of Biology Sciences, Deputy of Director for Research;

Executive Secretary: M.E. Kovtunova - Associate Professor, Scientific Secretary of the Institute.

Topical issues of transfusiology and oncohematology / FSBSI RRI of H&BT of FMBA of Russia. - Kirov: Open Company «Flat-Print», 2024. - 208 with.

ISBN

Collection of scientific works of the Scientific and Practical Conference of young scientists and specialists «Actual questions of transfusion and oncohematology». The collection contains articles on topical problems of industrial and clinical transfusiology, diagnosis and treatment of oncohematological diseases.

© FSBSI «Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia», 2024

© Design. LLC «Concordica», 2024 ISBN

СОДЕРЖАНИЕ

Дудина Ю.И., Логинова М.А., Смирнова Д.Н., Обухов И.П., Махова О.А., Морозова Н.А., Парамонов И.В. Оценка иммуногенетических особенностей доноров, проживающих на территории Кировской области	7
Жижина О.Г., Ванеева Е.В., Росин В.А., Самарина С.В. Взаимосвязь CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов микроокружения опухоли с прогнозом течения диффузной В-крупноклеточной лимфомы	21
Кокорева М.А., Лучинин А.С. Прогнозирование побочных эффектов циклоспорина у больных приобретенной апластической анемией при проведении иммуносупрессивной терапии	33
Коновалова Е.А., Росина Е.В., Калинина Е.Н., Зиганшина С.Е., Пивошенко Я.Д., Кормщикова Е.С. Получение кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В	43
Коробов С.О., Назарова Е.Л., Докшина И.А. Прогностическое моделирование тяжелых инфекционных осложнений у пациентов с острым миелоидным лейкозом	54
Кудрявцева Т.Л., Попонина Е.А., Пестрикова А.О., Исаева Н.В., Морозова М.Л., Шерстнев Ф.С. Использование лейкоцитарных концентратов в качестве источника дендритных клеток	64
Лагунова М.В., Зорина Н.А., Минаева Н.В., Хоробрых М.Н. Ранние осложнения ауто-ТГСК у пожилых больных с множественной миеломой	73
Ларионова А. А., Самарина С.В. Обинутузумаб в сравнении с ритуксимабом в иммунохимиотерапии первой линии при фолликулярной лимфоме	80
Минаев М.С., Ванеева Е.В., Глубоковских Н.В., Дьяконов Д.А. Роль опухолевого микроокружения в прогнозе течения нодулярного склероза классической лимфомы Ходжкина	86
Морозова М.Л., Исаева Н.В., Назарова Е.Л., Попонина Е.А., Пестрикова А.О., Попова С.В., Воробьев К.А. Изменение состава Т-лимфоцитов в процессе получения CAR Т- клеток	99

Осипова Е.С., Самарина С.В., Дьяконов Д.А. Эффективность индукционных схем терапии при лечении пациентов с фолликулярной лимфомой в зависимости от химиотерапевтического агента	110
Пестрикова А.О., Попонина Е.А., Попова С.В., Кудрявцева Т.Л., Назарова Е.Л., Исаева Н.В., Морозова М.Л., Воробьев К.А. Оценка цитотоксической активности лимфоцитов, несущих универсальный химерный антигенный рецептор	120
Поликарпов А.Д., Самарина С.В., Росин В.А., Дьяконов Д.А. Оценка эффективности первой линии терапии у пациентов с диагнозом лимфома из клеток мантии	129
Рыболовлева Т.Н., Трегубова Е.В., Назарова Е.Л., Сарпова М.В., Докшина И.А. Прогностическая значимость мутаций генов <i>KRAS</i> и <i>NRAS</i> у пациентов с множественной миеломой	140
Сарпова М.В., Дьяконов Д.А., Ванеева Е.В., Росин В.А., Самарина С.В., Соколова А.Н., Карпачева О.В. Взаимосвязь делеции хромосомного региона 9p21 и экспрессии протеинов p16INKa, p14ARF, p53 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой	149
Смирнова Д.Н., Логинова М.А., Махова О.А., Обухов И.П., Зорина Н.А., Парамонов И.В. Анализ результатов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от степени HLA-совместимости донора и реципиента в аллельном разрешении	160
Смольникова М.В., Йовдий А. В., Шерстнёв Ф. С. Специфичность антител к антигенам эритроцитов у пациентов с заболеваниями системы крови	167
Трегубова Е.В., Исаева Н.В., Назарова Е.Л. Взаимосвязь молекулярно-генетических и иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток при хроническом лимфолейкозе	173
Эндакова А.И., Докшина И.А., Лагунова О.Р., Фокина Е.С. Эффективность терапии ингибитором BCL-2 при лечении пациентов с острым миелоидным лейкозом	181

Ю.И. Дудина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
прикладной иммуногенетики

J.I. Dudina

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Junior researcher of the research laboratory of applied immunogenetics
e-mail: dudina@niigpk.ru

М.А. Логинова

«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской
лабораторией прикладной иммуногенетики

M.A. Loginova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied
immunogenetics
e-mail: loginova@niigpk.ru

Д.Н. Смирнова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, научный сотрудник
научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики

D.N. Smirnova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of biological sciences, researcher of the research laboratory of applied
immunogenetics
e-mail: smirnovadn@niigpk.ru

И.П. Обухов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь научно-исследовательской
лаборатории прикладной иммуногенетики

I.P. Obukhov

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics
e-mail: obuhov@niigpk.ru

О.А. Махова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
прикладной иммуногенетики

O.A. Makhova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Junior researcher of the research laboratory of applied immunogenetics
e-mail: mahova@niigpk.ru

Н.А. Морозова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь научно-исследовательской
лаборатории прикладной иммуногенетики

N.A. Morozova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics
e-mail: morozova@niigpk.ru

И.В. Парамонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор медицинских наук, директор института

I.V. Paramonov

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Doctor of Sciences in Medicine, Director of the Institute
e-mail: paramonov@niigpk.ru

**Оценка иммуногенетических особенностей доноров, проживающих на
территории Кировской области**

**Assessment of immunogenetic characteristics of donors located in the Kirov
region**

Аннотация. Проведено HLA-типирование 1087 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих в Кировской области, методом NGS в высоком разрешении (2-fields) по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1. В результате исследо-

вания определено 34 аллеля по локусу HLA-A, 58 – по локусу HLA-B, 30 – по локусу HLA-C, 17 – по локусу HLA-DQB1, 33 – по локусу HLA-DRB1. Выявлен наиболее встречающийся гаплотип – A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (4,1%).

Abstract. HLA-typing of 1087 potential donors of hematopoietic stem cells living in the Kirov region by NGS method in high resolution (2-fields) for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 loci. As a result of the HLA-typing identified 34 alleles at the HLA-A locus, 58 at the HLA-B locus, 30 at the HLA-C locus, 17 at the HLA-DQB1 locus, and 33 at the HLA-DRB1 locus. The most common haplotype was identified – A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (4,1 %).

Ключевые слова: HLA-типирование; HLA-аллели; гаплотипы; NGS.

Index terms: HLA-typing; HLA- alleles; haplotypes; NGS.

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) – один из самых эффективных методов терапии пациентов с заболеваниями кроветворной системы, в том числе со злокачественными [18].

ТГСК впервые успешно проведена в 1950-х годах в экспериментах на мышах, которые показали, что инфузия здоровых гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в миелосупрессированный костный мозг может индуцировать восстановление его функции у реципиента. В 1957 году данный метод доказал свою эффективность в лечении острого лейкоза у человека. С тех пор количество как аллогенных ТГСК, так и аутологичных ТГСК возросло во всём мире [14]. Так, в последние 10 лет число аллогенных ТГСК в России увеличилось приблизительно в 5 раз, что связано с усовершенствованием технологии трансплантации от гаплоидентичных и неродственных доноров [3].

Главным условием для аллогенной ТГСК является совместимость по HLA-системе (HLA-Human Leukocyte Antigens). Гены данного комплекса располагаются на коротком плече 6 хромосомы и кодируют человеческие лейкоцитарные антигены. Гены HLA обладают высоким полиморфизмом и делятся на два класса. К I классу генов HLA относятся: HLA-A; HLA-B; HLA-C. Продукты генов HLA I класса экспрессируются на всех типах клеток и распознаются CD8⁺ Т-клетками. Комплекс HLA II класса включает в себя гены и экспрессируемые ими белки, такие как HLA-DPB, HLA-DQB и HLA-DRB. Антигены II класса представлены на поверхности антигенпрезентирующих клеток и распознаются CD4⁺ Т-клетками [14].

Совокупность HLA-генов, расположенных на одной хромосоме – HLA-гаплотип, который наследуется как менделевский признак. У потомков одних и

тех же родителей возможны четыре варианта наследования гаплотипов, по этой причине вероятность совпадения HLA-генотипов у сиблингов составляет 25% [13]. По статистике, только для 10-20% российских пациентов находится полностью совместимый сиблинг [2]. Для остальных пациентов необходим поиск неродственного донора или, в случае его отсутствия, осуществляется трансплантация от гаплоидентичного родственного донора [9, 16, 17]. Таким образом, одной из стратегий, способствующей увеличению вероятности нахождения полностью совместимого неродственного донора, является расширение Федерального регистра доноров и изучение особенностей распределения HLA-аллелей, а также гаплотипов в различных регионах РФ.

Цель работы – изучить иммуногенетические особенности потенциальных доноров ГСК, проживающих на территории Кировской области.

Материалы и методы. Исследовано 1087 образцов цельной крови, полученных от доноров, проживающих на территории Кировской области. Препараты геномной ДНК выделены из замороженных образцов цельной крови (антикоагулянт - K3EDTA) с помощью наборов реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) и автоматической станции выделения нуклеиновых кислот и белков QIAcube (QIAGEN, Германия). Концентрацию препаратов ДНК определяли на спектрофотометре TECAN Infinite 200 (TECAN, Швейцария).

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в высоком разрешении (2-fields) проводили методом NGS (Next-generation sequencing) с использованием наборов реагентов VariFind™ HLA Solution (ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Россия). Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq™ System (Illumina Inc., США). Полученные данные проанализировали в программе VariFind™ HLA Software (ООО «ПАРСЕК ЛАБ»).

Частоты встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов с использованием метода максимального правдоподобия (ЕМ-алгоритм) для полилокусных данных рассчитывали в программе Arlequin v.3.5 [12]. Распределение генов по закону Харди-Вайнберга с количеством шагов в цепи Маркова, равным 100 000, также вычисляли с помощью программного обеспечения Arlequin v.3.5.

Результаты. Частоты встречаемости аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 с соответствующими стандартными отклонениями представлены в таблицах 1 и 2.

Выявлено следующее количество аллелей по каждому из пяти локусов: 34 аллеля по локусу HLA-A; 58 – по HLA-B; 30 – по HLA-C; 33 – по локусу HLA-DRB1; 17 – по локусу HLA-DQB1.

Из представленных аллелей по локусу HLA-A самыми распространенными являются (более 10% встречаемости): A*02:01 (27,0%); A*03:01 (17,5%); A*24:02 (12,3%), A*01:01 (10,3%). Аллели A*02:07, A*02:09, A*74:01 выявлены каждый в одном случае.

Аллель HLA-B*07:02 характеризуется максимальной частотой встречаемости – 15,6%. Остальные аллели по данному локусу встречаются с частотой менее 10%. Аллели B*15:10, B*15:10, B*15:15, B*40:06, B*46:01, B*50:02, B*51:05, B*51:07, B*51:08, B*57:03 определены каждый в одном случае.

Наиболее распространенными по локусу HLA-C являются следующие аллели: C*07:02 (17,9%); C*04:01 (13,1%); C*06:02 (12,0%). По одному разу выявлены аллели C*07:06, C*07:18, C*15:06.

По локусам II класса чаще всего встречаются аллели DQB1*03:01 (17,1%), DQB1*05:01 (14,8%), DQB1*06:02 (14,6%), DQB1*02:02 (10,9%), DRB1*15:01 (15,5%), DRB1*07:01 (14,4%), DRB1*01:01 (12,9%). Наименьшую частоту встречаемости имеют аллели DQB1*06:09 (0,6%), DQB1*03:04 (0,5%), DQB1*03:05 (0,2%), DQB1*05:04 (0,1%). Аллели DRB1*08:04, DRB1*11:16, DRB1*16:02 выявлены каждый в одном случае.

Гаплотипы HLA-A-B-C-DRB1-DQB1 с частотой встречаемости более 1% представлены в таблице 3. Исследование показало, что самым распространенным на территории Кировской области является гаплотип A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (4,1%).

Результаты анализа на соответствие равновесного распределения закону Харди-Вайнберга представлены в таблице 4. Для всех локусов значение $p > 0,05$, что свидетельствует о соответствии распределения генотипов закону Харди-Вайнберга.

Выявлены два новых аллеля, характеристика которых представлена в таблице 5. Новые последовательности нуклеотидов, подтвержденные методом SBT (Sequence Based Typing) с использованием наборов реагентов HLAAssure SE SBT Kit (TBG Diagnostics Limited, Тайвань), зарегистрированы в Международном ко-

митете по номенклатуре факторов HLA-системы Всемирной организации здравоохранения (WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), где получили номера В*58:01:42 и В*35:603 [15, 11]. Данные аллели выявлены по одному разу.

Таблица 1 – Частоты встречаемости HLA-аллелей локусов I класса

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
A*02:01	0.270009	0.009652	B*07:02	0.156854	0.006498	C*07:02	0.179853	0.008058
A*03:01	0.174793	0.008133	B*35:01	0.086477	0.005198	C*04:01	0.131555	0.006619
A*24:02	0.123275	0.006674	B*18:01	0.068077	0.005118	C*06:02	0.120515	0.006918
A*01:01	0.103496	0.006197	B*13:02	0.065317	0.005369	C*12:03	0.089696	0.006451
A*11:01	0.061638	0.004522	B*15:01	0.048298	0.004240	C*07:01	0.087856	0.006466
A*25:01	0.043238	0.004967	B*08:01	0.047838	0.004146	C*03:04	0.061638	0.005243
A*26:01	0.039558	0.003859	B*44:02	0.044158	0.004433	C*02:02	0.048298	0.005201
A*32:01	0.026219	0.003072	B*27:05	0.040018	0.004445	C*01:02	0.042778	0.004486
A*68:01	0.026219	0.003288	B*51:01	0.037259	0.004039	C*03:03	0.041858	0.004232
A*31:01	0.022079	0.003433	B*40:01	0.035879	0.003941	C*05:01	0.040938	0.004618
A*30:01	0.021159	0.002846	B*57:01	0.030359	0.003934	C*08:02	0.022539	0.003148
A*23:01	0.017019	0.002818	B*44:03	0.026679	0.003759	C*07:04	0.020699	0.002735
A*33:01	0.015639	0.002832	B*39:01	0.026219	0.003448	C*12:02	0.020239	0.003284
A*33:03	0.009660	0.002084	B*38:01	0.024839	0.002805	C*17:03	0.015639	0.002388
A*29:02	0.007820	0.001895	B*35:03	0.021159	0.003109	C*15:02	0.012420	0.002163
A*68:24	0.006440	0.001613	B*14:02	0.020239	0.002716	C*03:02	0.011040	0.002144
A*02:06	0.005520	0.001501	B*52:01	0.020239	0.003022	C*08:01	0.010120	0.002317
A*02:05	0.005060	0.001474	B*40:02	0.019319	0.002984	C*16:01	0.009660	0.001933
A*66:01	0.002760	0.001103	B*56:01	0.019319	0.003219	C*14:02	0.008740	0.002176
A*29:01	0.002300	0.001029	B*41:02	0.015639	0.002619	C*08:03	0.006900	0.001528
A*02:35	0.001840	0.000830	B*48:01	0.015179	0.002794	C*16:02	0.005520	0.001678
A*30:02	0.001840	0.000956	B*44:27	0.012420	0.002288	C*17:01	0.002760	0.001189
A*68:02	0.001840	0.000822	B*49:01	0.011960	0.002345	C*15:13	0.002300	0.000998
A*01:02	0.001380	0.000719	B*58:01	0.011040	0.002224	C*15:05	0.001840	0.000912
A*03:02	0.001380	0.000679	B*37:01	0.010120	0.002153	C*16:04	0.001380	0.000831
A*24:03	0.001380	0.000741	B*35:02	0.009200	0.002197	C*15:04	0.000920	0.000649
A*26:08	0.001380	0.000944	B*50:01	0.009200	0.002018	C*17:38	0.000920	0.000644
A*02:02	0.000920	0.000642	B*44:05	0.007820	0.001892	C*07:06	0.000460	0.000428
A*02:17	0.000920	0.000564	B*55:01	0.006440	0.001495	C*07:18	0.000460	0.000473
A*30:04	0.000920	0.000580	B*41:01	0.005980	0.001422	C*15:06	0.000460	0.000400
A*69:01	0.000920	0.000668	B*07:04	0.005520	0.001762			
A*02:07	0.000460	0.000473	B*27:02	0.005060	0.001597			
A*02:09	0.000460	0.000488	B*39:06	0.004600	0.001637			
A*74:01	0.000460	0.000503	B*14:01	0.003220	0.001186			

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
			B*35:08	0.003220	0.001081			
			B*15:17	0.002300	0.000987			
			B*18:03	0.002300	0.001047			
			B*47:01	0.002300	0.001151			
			B*27:14	0.001840	0.000865			
			B*07:05	0.001380	0.000789			
			B*15:16	0.001380	0.000780			
			B*15:24	0.001380	0.000697			
			B*39:24	0.001380	0.000724			
			B*07:10	0.000920	0.000616			
			B*13:01	0.000920	0.000684			
			B*15:07	0.000920	0.000627			
			B*45:01	0.000920	0.000620			
			B*53:01	0.000920	0.000649			
			B*57:02	0.000920	0.000663			
			B*15:08	0.000460	0.000482			
			B*15:10	0.000460	0.000397			
			B*15:15	0.000460	0.000462			
			B*40:06	0.000460	0.000436			
			B*46:01	0.000460	0.000428			
			B*50:02	0.000460	0.000368			
			B*51:05	0.000460	0.000444			
			B*51:07	0.000460	0.000423			
			B*51:08	0.000460	0.000490			
			B*57:03	0.000460	0.000445			
			B*35*603	0.000460	0.000443			

Таблица 2 – Частоты встречаемости HLA-аллелей локусов II класса

HLA-DQB1			HLA-DRB1		
Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
DQB1*03:01	0.170653	0.007532	DRB1*15:01	0.155014	0.007909
DQB1*05:01	0.148574	0.007210	DRB1*07:01	0.144434	0.007761
DQB1*06:02	0.146274	0.008699	DRB1*01:01	0.128795	0.007113
DQB1*02:02	0.109476	0.006876	DRB1*03:01	0.080957	0.006332
DQB1*03:02	0.085557	0.005462	DRB1*13:01	0.071757	0.006409
DQB1*02:01	0.080497	0.006503	DRB1*11:01	0.057498	0.004400
DQB1*06:03	0.074977	0.005602	DRB1*04:01	0.057038	0.004658
DQB1*03:03	0.063017	0.005445	DRB1*08:01	0.031279	0.003472
DQB1*04:02	0.033579	0.003692	DRB1*04:04	0.030819	0.003762
DQB1*05:02	0.028059	0.003688	DRB1*11:04	0.029899	0.004059
DQB1*06:04	0.016559	0.002806	DRB1*09:01	0.027599	0.003399

HLA-DQB1			HLA-DRB1		
Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение	Аллель	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
DQB1*05:03	0.015179	0.002682	DRB1*13:02	0.024379	0.003431
DQB1*06:01	0.012879	0.002528	DRB1*16:01	0.024379	0.003289
DQB1*06:09	0.006440	0.001774	DRB1*13:03	0.022539	0.003033
DQB1*03:04	0.004600	0.001302	DRB1*12:01	0.020239	0.003194
DQB1*03:05	0.002300	0.000922	DRB1*14:01	0.013799	0.002615
DQB1*05:04	0.001380	0.000722	DRB1*15:02	0.011960	0.002313
			DRB1*10:01	0.010580	0.002128
			DRB1*01:02	0.009660	0.002009
			DRB1*11:03	0.008280	0.001717
			DRB1*04:02	0.007360	0.001953
			DRB1*04:03	0.007360	0.001737
			DRB1*04:07	0.005980	0.001599
			DRB1*04:08	0.005980	0.001986
			DRB1*08:03	0.003220	0.001227
			DRB1*04:05	0.002760	0.001064
			DRB1*01:03	0.001840	0.000878
			DRB1*08:02	0.001380	0.000832
			DRB1*14:03	0.000920	0.000655
			DRB1*14:04	0.000920	0.000769
			DRB1*08:04	0.000460	0.000408
			DRB1*11:16	0.000460	0.000504
			DRB1*16:02	0.000460	0.000422

Таблица 3 – Частоты встречаемости гаплотипов HLA-A-B-C-DRB1-DQB1

Гаплотипы HLA-A-B-C-DQB1-DRB1	Частота встречаемости	Стандартное отклонение
A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01	0.040939	0.004017
A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0.035319	0.004559
A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01	0.031612	0.003424
A*02:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0.028420	0.003950
A*02:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.025648	0.003877
A*25:01-B*18:01-C*12:03-DRB1*15:01-DQB1*06:02	0.015966	0.002828
A*30:01-B*13:02-C*06:02-DRB1*07:01-DQB1*02:02	0.011429	0.002164
A*24:02-B*39:01-C*07:02-DRB1*04:04-DQB1*03:02	0.010969	0.002131

Примечание: определено 909 гаплотипов из 20181 потенциально возможных.

Таблица 4 – Уровни соответствия закону Харди-Вайнберга и ожидаемая гетерозиготность изученных локусов

Локус	Количество образцов	Ожидаемая гетерозиготность	Гетерозиготность, полученная экспериментально	Доверительный уровень значимости (P-value)	Стандартное отклонение
HLA-A	1087	0.85925	0.86132	0.97447	0.00011
HLA-B	1087	0.94940	0.94222	0.81877	0.00019
HLA-C	1087	0.90892	0.90689	0.44848	0.00019
HLA-DQB1	1087	0.87305	0.89012	0.11501	0.00017
HLA-DQB1	1087	0.91168	0.91418	0.10268	0.00018

Таблица 5 – Характеристика новых аллелей

№ образца	HLA-локус	Новый аллель	Референсный аллель	Описание замены	Тип замены	Дата регистрации
71250	HLA-B	HLA-B*58:01:42	HLA-B*58:01:01:01	Нуклеотидная замена в позиции 981 пятого экзона, где вместо С стоит Т, кодон 303 изменен с GTC на GTT	Синонимичная	30.11.2021
150534	HLA-B	HLA-B*35:603	HLA-B*35:01:01:01	Нуклеотидная замена в позиции 970 пятого экзона, где вместо G стоит A, кодон 300 изменен с GGA на AGA	Кодирующая	29.02.2024

Обсуждение. По официальным данным в состав популяции Кировской области, которая располагается на востоке Восточно-Европейской равнины, входят представители более 110 национальностей. Большую часть населения составляют русские – 89,4%. Незначительная часть представлена татарами – 2,7%, марийцами – 2,2%, удмуртами – 1,0%, а также украинцами, азербайджанцами, белорусами, армянами и другими национальностями [1].

Впервые получены данные по частотам встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов у потенциальных доноров ГСК, проживающих на территории Кировской области, в высоком разрешении (2-fields). В исследуемой в группе (n=1087) выявлено следующее количество аллелей по каждому из пяти локусов: 34 аллеля по локусу HLA-A; 58 – по HLA-B; 30 – HLA-C; 33 – по локусу HLA-DRB1; 17 – по локусу HLA-DQB1.

По локусу HLA-A получено распределение частот аллелей: A*02:01 (27,0%); A*03:01 (17,5%); A*24:02 (12,3%); A*01:01 (10,3%). Аллели A*02:01 (27,1%), A*03:01 (13,0%), A*01:01 (11,6%) с высокой частотой встречаются на территории России [6]. Проведенные ранее исследования выявили, что аллель HLA-A*24:02

с наибольшей частотой определяется среди бурят Иркутской области (22,1%), у которых HLA-профиль распределения частот встречаемости аллелей имеет сходство с некоторыми популяциями монгольских народов [4, 5]. С частотой 12,9%, которая практически соответствует частоте встречаемости у исследуемой популяции, выявлена у башкир, проживающих на территории Республики Башкортостан [7]. По данным Allele Frequency Net Database [10], профиль распределения частот по локусу HLA-A популяции Кировской области схож с профилем популяции доноров Карелии, где распределение частот аллелей выглядит следующим образом: A*02:01 (29,6%); A*03:01 (16,4%); A*24:02 (11,91%); A*01:01 (10,1%).

Для локуса HLA-B наиболее широко встречаемым в Кировской области является аллель B*07:02 (15,6%). Остальные аллели встречаются реже (частота встречаемости менее 10%), и распределение по частотам встречаемости для этих аллелей выглядит следующим образом: B*35:01 (8,7%); B*18:01 (6,8%); B*13:02 (6,5%). По данным Allele Frequency Net Database [10], аллель B*07:02 наиболее часто встречается у ненцев, проживающих на территории Северо-Восточной Азии (18,75%), у доноров, проживающих на территории Вологодской области (18,1%), Карелии (12,9%), Белгорода (10,5%). Аллель B*35:01 с такой же частотой распространен в популяции доноров Карелии (8,5%) и Вологодской области (8,8%). Аллель B*13:02 преобладает у доноров ГСК Северного Кавказа (12,1%) [8] и выявлен с наименьшими частотами в популяциях алеутов острова Беринга (3,8%), Карелии (4,9%), Тувы (3,3%).

По локусу HLA-C в Кировской области наиболее часто встречаются аллели C*07:02 (17,9%), C*04:01 (13,1%), C*06:02 (12,0%). Аллель C*07:02 широко распространен на территории РФ [6] и имеет похожую частоту встречаемости у жителей Северной Осетии (16,9%), C*04:01 встречается с частотой 13,4% в Белгородской области [10]. Аллель C*06:02 обнаружен с частотой более 10% на территории Северной Осетии (15,3%), Архангельска (13,0%), у популяции бурят (11,7%) и жителей Тувы (11,5%). Таким образом, профили распределения частот по локусам HLA-B и HLA-C популяции, проживающей на территории Кировской области, не имеют схожести ни с одним известным профилем распределения частот среди популяций, населяющих другие регионы России.

Получен следующий профиль распределения частот аллелей по локусу HLA-DQB1: DQB1*03:01 (17,1%); DQB1*05:01 (14,8%); DQB1*06:02 (14,6%). Аллель DQB1*03:01 имеет высокую частоту встречаемости во многих регионах

РФ. С частотой около 17% обнаружен у жителей Карелии (17,0%) и Белгородской области (16,6%). Аллель DQB1*05:01 встречается с частотой примерно 14% в популяциях, проживающих на территории Северо-Западного федерального округа, с частотой 15,3% – на территории Белгородской области. Аллель DQB1*06:02 обнаружен с частотой около 14% в следующих регионах России: в Мурманской области (13,6%); ХМАО (13,6%); в Иркутской области (13,9%). С частотой 12,9% встречается на территории Карелии. Таким образом, профиль распределения частот аллелей локуса HLA-DQB1 в Кировской области имеет сходство с профилем распределения частот аллелей на территории Карелии.

В Кировской области наиболее распространены аллели локуса HLA-DRB1: DRB1*15:01 (15,5%); DRB1*07:01 (14,4%); DRB1*01:01 (12,9%). Аллель DRB1*15:01 встречается с частотой 15,1% у жителей Иркутской области. HLA-DRB1*07:01 имеет частоту встречаемости 14-16% на территориях Бурятии (14,7%) и Чувашии (14,6%), а также в популяции алеутов острова Беринга (15,3%). Аллель DRB1*01:01 является самым распространенным у русских (11,6%). По имеющейся информации, DRB1*01:01 чаще всего встречается у жителей Карелии (12,7%) и Чувашии (18,3%). Показано, что профиль распределения частот в Кировской области по локусу DRB1 не нашел похожего профиля среди жителей других регионов России.

Выявлены следующие наиболее часто встречающиеся гаплотипы. Первое место по частоте встречаемости занимает гаплотип A*03:01-B*35:01-C*04:01-DRB1*01:01-DQB1*05:01 (4,1%), который с такой же частотой встречается у татар, проживающих на территории Республики Башкортостан. Вторым по встречаемости оказался гаплотип A*03:01-B*07:02-C*07:02-DRB1*15:01-DQB1*06:02 (3,5%), который встречается у русских, проживающих на территории Нижнего Новгорода (2,6 %), у татар Республики Башкортостан (1,1%). Гаплотип A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01-DQB1*02:01 также входит в тройку самых распространенных на территории Кировской области (3,2%). На территории России практически с такой же частотой он встречается у татар Республики Башкортостан (3,4%) [10].

Заключение. Получена иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров, проживающих на территории Кировской области. Определены частоты встречаемости аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1 в высоком разрешении (2-fields) и пятилокусных гаплотипов.

Сравнительный анализ данных с другими российскими популяциями показал, что аллели, выявленные с высокой частотой встречаемости у жителей Кировской области, распространены также у доноров других регионов РФ [10]. Гаплотипы, встречающиеся на территории Кировской области, также представлены с различными частотами среди исследованных популяций России. Таким образом, для увеличения иммуногенетического разнообразия регистра доноров необходимо проводить интенсивную рекрутинговую активность в других регионах страны, а в Кировской области в стандартном режиме.

Список литературы

1. Анализ ситуации в этноконфессиональной сфере [Электронный ресурс]. URL: Анализ ситуации в этноконфессиональной сфере (kirovreg.ru).
2. Бубнова, Л. Н. Проблемы организации регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток в России [Текст] / Л.Н. Бубнова, И.Е. Павлова, Т.В. Глазанова [и др.] // Трансфузиология. – 2016. – Т. 17. – №. 1. – С. 4-10.
3. Васильева, В. А. Выполнение трансплантаций аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от неродственных доноров из Российского и зарубежного регистров в одном трансплантационном центре [Текст] / В.А. Васильева, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. 3. – С. 299-311.
4. Кутявина, С. С. Генетические особенности HLA-аллелей у бурят, проживающих на территории Иркутской области [Текст] / С.С. Кутявина, М.А. Логинова, В.В. Черанев, И.В. Парамонов [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2017. – Т. 62. – №. 3. – С. 147-152.
5. Кутявина, С. С. Иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров, проживающих на территории Иркутской области [Текст] / С.С. Кутявина, М.А. Логинова, Д.Н. Смирнова [и др.] // Вестн. гематологии. – 2019 – Т. 15. – № 3. – С. 36-37.
6. Леонов, Е. А. Аллельный и гаплотипический полиморфизм HLA-генов доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра, самоопределившихся как русские: дис. [Текст] / Е.А. Леонов // Национальный медицинский исследовательский центр гематологии. – 2022.
7. Логинова, М. А. Генетические особенности популяции, проживающей на территории Республики Башкортостан [Текст] / М.А. Логинова, И.В. Парамонов, В.Н. Павлов, Г.Ш. Сафуанова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – №. 1. – С. 58-66.

8. Логинова, М. А. Иммуногенетическая характеристика потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, рекрутированных на территории Северного Кавказа [Текст] / М.А. Логинова, Д.Н. Смирнова, С.С. Кутявина [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41. – №. 1. – С. 69-80.
9. Менделеева, Л. П. Анализ трансплантационной активности в РФ за 2018 г. (отчет меж-регионального регистра) [Текст] / Л.П. Менделеева, В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. S1. – С. 180.
10. Allele Frequency Net Database. [Electronic resource]. URL: <http://www.allelefrequencys.net>.
11. Allele Report for B*35:603 [Electronic resource]. URL: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/alleles/allele/?accession=HLA39463>.
12. Excoffier, L. Arlequin (version 3,0): An integrated software package for population genetics data analysis [Text] / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evolutionary Bioinformatics Online. – 2007. Vol. – 23. № 1. – P. 47-50.
13. Hurley, C.K. DNA METHODS FOR HLA TYPING A WORKBOOK FOR BEGINNERS / C.K. Hurley // CW Bill Young Marrow Donor Recruitment and Research Program Department of Oncology, Georgetown University School of Medicine, Washington, DC. – 2005. – Vol. 41.
14. Khaddour, K. Hematopoietic Stem Cell Transplantation [Text] / K. Khaddour, CK. Hana, P. Mewawalla // StatPearls [Internet]. – 2023 – PMID: 30725636.
15. Loginova, M. The HLA-B*58:01:42 allele identified in a volunteer bone marrow donor [Text] / M. Loginova, D. Smirnova, S. Kutyavina, I. Paramonov // HLA. – 2022. – Vol. 99. – № 4. – P. 391-392.
16. Passweg, J.R. Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report [Text] / J.R. Passweg, H. Baldomero, P. Bader [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2018 – Vol. 53. – № 9 – P. 1139–1148.
17. Rosenmayr, A. What are a patient's current chances of finding a matched unrelated donor? Twenty years' central search experience in a small country [Text] / A. Rosenmayr, M. Pointner-Prager, A. Mitterschiffthaler [et al.] // Bone Marrow Transplant. – 2012. – Vol. 47. – № 2. – P. 172 - 180.
18. Savchenko, V.G. Allogenic and autologous hematopoietic stem cells transplantation in patients with acute leukemia (results of 20 years old experience) [Text] / V.G. Savchenko, L.S. Lubimova, E.N. Parovichnikova [et al.] // Terapevticheskiy arkhiv. – 2007. – Vol. 79. – № 7. – P. 30-35.

УДК 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

О.Г. Жижина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии

O.G. Zhizhina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Laboratory Research Assistant of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: zhizhina@niigpk.ru

Е.В. Ванеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии

E.V. Vaneeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: vaneeva@niigpk.ru

В.А. Росин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории
патоморфологии

V.A. Rosin

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of
Pathomorphology
E-mail: rosin@niigpk.ru

Д.А. Дьяконов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии

D.A. Dyakonov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology
E-mail: dyakonov@niigpk.ru

Н.В.Глубоковских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии

N.V. Glubkovskikh

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Laboratory Research Assistant of the Laboratory of Pathomorphology
mazda_n@mail.ru

С.В. Самарина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
Заведующий клинико-диагностическим отделением гематологии и
химиотерапии

S.V. Samarina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Head of the Clinical and Diagnostic Department of Haematology and Chemotherapy
E-mail: samarina@niigpk.ru

Взаимосвязь CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов микроокружения опухоли с прогнозом течения диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Relationship of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes in the tumour microenvironment with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma

Аннотация. Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) представляет собой агрессивную опухоль со множеством подтипов. В последнее время большое внимание уделяется исследованию различных компонентов реактивного клеточного окружения, участвующего в регуляции иммунного надзора над опухолью. Прежде всего это относится к субпопуляциям CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Результаты исследований их прогностического значения при ДВКЛ противоречивы.

Abstract. Diffuse Large B-cell lymphoma (DLBCL) is an aggressive tumor with many subtypes. Recently, much attention has been paid to the study of various components of the reactive cellular environment involved in the regulation of immune surveillance of tumors. First of all, this applies to subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. The results of studies of their prognostic value in DVCL are contradictory.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома; CD4; CD8; выживаемость.

Index terms: diffuse large B-cell lymphoma; CD4; CD8; survival.

Введение. ДВКЛ представляет собой агрессивную опухоль со множеством подтипов, имеющих различные клинические, морфологические и молекулярно-генетические характеристики. При использовании стандартной иммунохимиотерапии по схеме R-СНОР в 30-40% случаев отмечаются резистентность к лечению и/или развитие рецидивов заболевания [16; 4; 5].

Известно, что в процессе развития и прогрессии опухоли неопластические клетки могут приобретать новые свойства, способствующие их неограниченной пролиферации и позволяющие им уходить от иммунологического надзора, в том числе, посредством изменения взаимодействия с реактивным клеточным микроокружением [7; 17].

Микроокружение ДВКЛ представлено Т-лимфоцитами, макрофагально-гистиоцитарными элементами, плазмócитами, гранулоцитами, стромальными клетками, кровеносными сосудами и внеклеточным матриксом [2]. Среди иммунных клеток Т-лимфоциты занимают особое место и имеют решающее значение в развитии клеточного иммунитета. Они принимают непосредственное

участие в распознавании неопластических клеток, препятствуют росту и способствуют регрессии опухоли. Основные морфологически и функционально различные подтипы Т-клеток представлены: $CD4^+$ хелперами, $CD8^+$ цитотоксическими лимфоцитами, $CD56^+/CD16^+$ NK-клетками и $CD25^+/FoxP3^+$ регуляторными Т-лимфоцитами [3; 18].

Т-хелперы играют важную роль в адаптивной иммунной системе, являясь «вспомогательными» клетками, запускающими реакцию организма на чужеродные антигены. Они секретируют интерферон- γ , фактор некроза опухоли- α и ростовой цитокин IL2, которые стимулируют активацию $CD8^+$ Т-клеток [1; 7].

Цитотоксические $CD8^+$ лимфоциты являются основными эффекторными Т-клетками, участвуют в регуляции апоптоза злокачественных клеток с помощью гранзим-перфоринового механизма или за счет взаимодействия с мембранным рецептором клетки-мишени CD95. Дефицит $CD8^+$ лимфоцитов ослабляет противоопухолевый иммунитет, а их избыток может провоцировать аутоагрессию [15; 20].

Некоторыми авторами показано благоприятное влияние на течение ДВКЛ как общей Т-клеточной популяции, входящей в состав микроокружения опухоли, так и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов. В работах Rajnai H. at al. (2018), Liu B. at al. (2022) установлено, что увеличение количества цитотоксических $CD8^+$ клеток в биопсийном материале более 5% связано с лучшей общей выживаемостью пациентов [15; 13]. Данные расходятся с исследованием Muris J.J.F. at al., где повышение числа $CD8^+$ Т-лимфоцитов более 15% ассоциировано с недостижением полной ремиссии у больных [14]. Galand C. at al. на основании анализа нескольких работ показали связь высокого количества цитотоксических клеток с неблагоприятным исходом у пациентов ДВКЛ [9]. Keane C. at al. установили, что содержание $CD8^+$ клеток выше порогового значения (порог 15%) не влияло на течение заболевания, а увеличение доли $CD4^+$ Т-лимфоцитов более 23% ассоциировано с благоприятным исходом заболевания и является независимым фактором прогноза [12].

Таким образом, результаты исследований неоднозначны и противоречивы. Связь Т-лимфоцитов микроокружения с течением заболевания изучена недостаточно.

Цель. Оценить взаимосвязь $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-лимфоцитов микроокружения опухоли в биопсийном материале с прогнозом течения ДВКЛ.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включены 124 первичных пациента с морфологически и иммуногистохимически подтвержденным диагнозом ДВКЛ, установленным в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008-2017 гг. Медиана возраста больных – 59 лет (от 23 до 80 лет), из них 62 – мужчины, 62 – женщины. Все пациенты наблюдались в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с 2014 по 2020 гг. и получали химиотерапию 1 линии по схеме R-СНОР. Характеристика обследованных представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Показатели	Количество пациентов, %
В-симптомы: нет / есть	40 / 60
Стадия (по Ann Arbor): I-II / III-IV	40 / 60
Наличие экстранодального поражения: нет / есть	49 / 51
Концентрация ЛДГ: норма / выше нормы	31 / 69
Ответ на терапию: ПО / отсутствие ПО	56 / 44
МПИ, группы риска: МПИ ≥ 2 / МПИ < 2	50 / 50
ИГХ подтип ДВКЛ: GCB / non-GCB	36 / 64
Статус пациента на момент исследования: продолжают наблюдение / летальный исход	61 / 39

Примечание: ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ПО – полный ответ, ИГХ – иммуногистохимический подтип ДВКЛ

Для исследования использованы архивные образцы (парафиновые блоки) лимфатических узлов или других, вовлеченных в патологический процесс органов и тканей (послеоперационные биопсии). Постановку иммуногистохимических реакций осуществляли непрямым пероксидазным методом в соответствии с протоколом системы визуализации EnVISION (DAB+, «Dako») с использованием широкой диагностической панели антител. Для детекции Т-лимфоцитов микроокружения гистологические срезы инкубировали с моноклональными антителами к CD4 (клон 4B12) и CD8 (клон C8/144B).

Морфометрический подсчет относительного количества Т-клеток опухолевого микроокружения выполняли с помощью светового микроскопа «AxioScope. A1» со встроенной фото/видеокамерой, программным обеспечением анализа изображений (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Оценивали 10 полей зре-

ния в каждом образце с применением окуляров $\times 10$ и объектива $\times 100$. Исходя из полученных результатов вычисляли среднее содержание антиген-позитивных клеток в биопсийном материале.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения STADIA. В качестве прогностически значимого порога относительного количества Т-лимфоцитов в биоптатах использовали значение медианы. Оценку наличия/отсутствия ассоциации $CD4^+$, $CD8^+$ клеток микроокружения опухоли с клинико-лабораторными характеристиками больных осуществляли методом хи-квадрат Пирсона (χ^2) с расчетом значений отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). В случае числа ожидаемых частот менее 5 применяли точный двусторонний критерий Фишера (F). Пятилетнюю общую (ОВ) и беспрогрессивную (БПВ) выживаемость рассчитывали по методу Каплана-Мейера с графическим построением соответствующих кривых, межгрупповые различия оценивали с помощью log-rank test. Влияние факторов на выживаемость пациентов анализировали методом регрессии Кокса. Показатели считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. $CD4^+$ Т-лимфоциты выявлены в биоптатах 70 (56,5%) из 124 больных. Цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки определены в биопсийном материале у 118 (95,2%) из 124 пациентов. Относительное число $CD4^+$ лимфоцитов у разных обследованных варьировало в пределах от 0% до 44% (рисунок 1а). Количество $CD8^+$ клеток в биопсийном материале также было неодинаковым. Разброс составил от 0% до 57% (рисунок 1б).

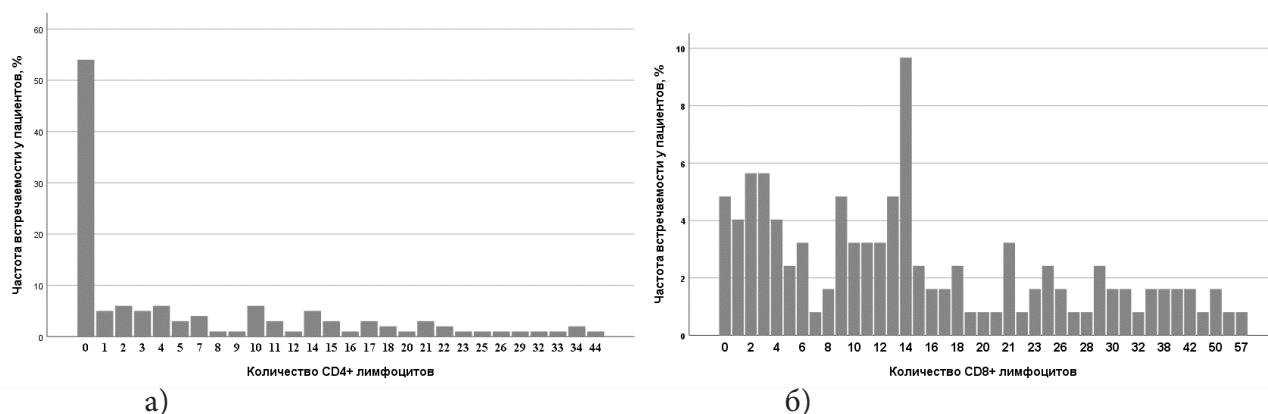


Рисунок 1 – Процентное содержание $CD4^+$ (а) и $CD8^+$ (б) Т-клеток в биоптатах

Медиана относительного содержания $CD4^+$ хелперов соответствовала 2%, для $CD8^+$ лимфоцитов она составила 13% (рисунок 2). На основании данных значений всех пациентов разделили на группы: с низким/подпороговым ($CD4^+ < 2\%$; $n=59$ и $CD8^+ \leq 13\%$; $n=64$) и высоким/надпороговым ($CD4^+ \geq 2\%$; $n=65$ и $CD8^+ > 13\%$; $n=60$) содержанием Т-клеток микроокружения.

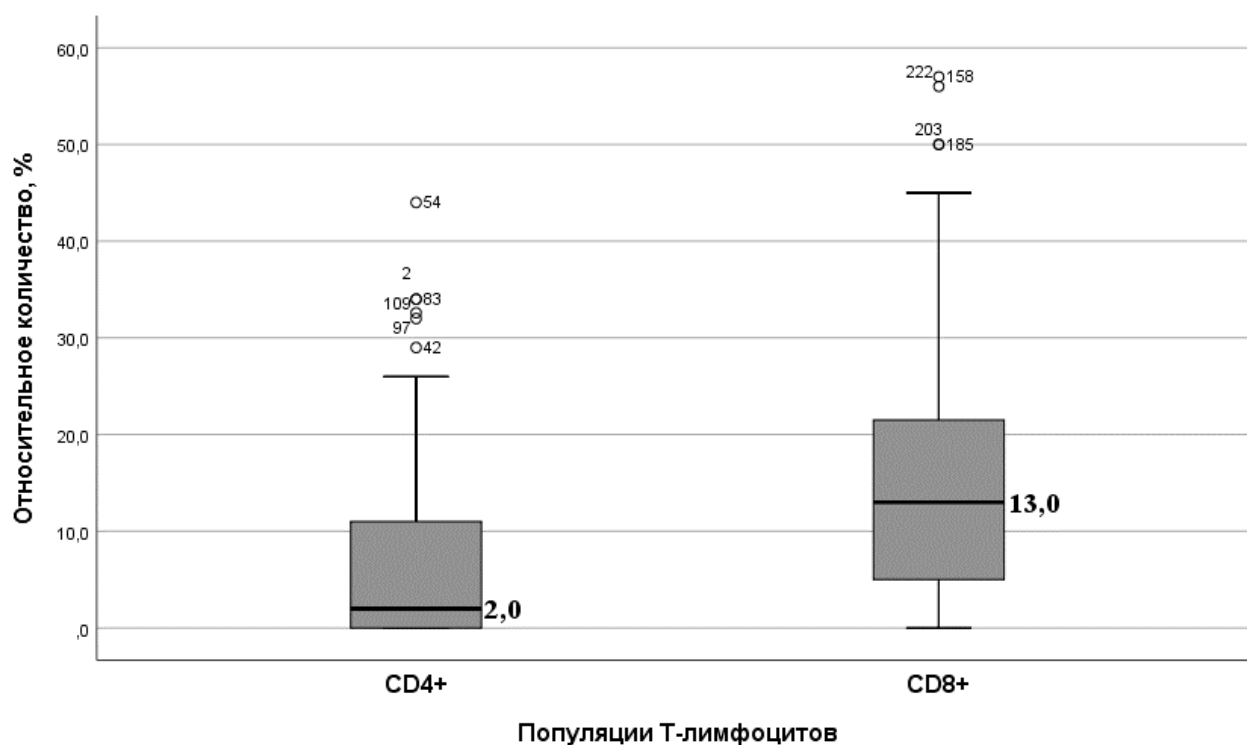


Рисунок 2 - Медианы относительного содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в биоптатах

Проанализированы особенности распределения $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток у пациентов с разными клинико-лабораторными характеристиками ДВКЛ (таблица 2). Согласно полученным данным, установлено статистически значимое повышение частоты встречаемости В-симптомов у больных с высоким содержанием $CD4^+$ Т-клеток в биоптатах ($p=0,004$). Пациенты с наличием экстранодального поражения чаще регистрировались в группе с низким уровнем $CD8^+$ Т-лимфоцитов в отличие от обследованных с высоким их содержанием: 61% против 39% соответственно ($p=0,049$).

Таблица 2 – Взаимосвязь количества CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов с клинико-лабораторными параметрами больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Параметры	Количество CD4 ⁺		р, ОШ (95% ДИ)	Количество CD8 ⁺		р, ОШ (95% ДИ)
	≥2%, абс. (%)	<2%, абс. (%)		>13%, абс. (%)	≤13%, абс. (%)	
Стадия (по Ann Arbor):						
I-II	30 (60,0)	20 (40,0)	0,16	29(58,0)	21 (42,0)	0,078
III-IV	35 (47,3)	39 (52,7)	0,6 (0,3-1,2)	31 (41,9)	43 (58,1)	1,9 (0,9-3,9)
В-симптомы:						
нет	31 (41,9)	43 (58,1)	0,004*	26 (52,0)	24 (48,0)	0,51
есть	34 (68,0)	16 (32,0)	0,3 (0,2-0,7)	31 (45,9)	40 (54,1)	1,3 (0,6-2,6)
Экстранодальное поражение:						
нет	32 (52,5)	29 (47,5)	0,99	35 (57,4)	26 (42,6)	0,049*
есть	33 (52,4)	30 (47,6)	0,8 (0,4-2,0)	25 (39,0)	38 (61,0)	2,0 (0,4-1,8)
Концентрация ЛДГ:						
норма	23 (59,0)	16 (41,0)	0,32	18 (46,2)	21 (53,8)	0,73
выше нормы	42 (49,4)	43(50,6)	0,6 (0,4-1,5)	42 (49,4)	43 (50,6)	0,8 (0,4-1,8)
МПИ, группы риска:						
МПИ≤2	34 (54,8)	28 (45,2)	0,59	34 (54,8)	28 (45,2)	0,15
МПИ>2	31 (50,0)	31 (50,0)	0,8 (0,4-1,7)	26 (41,9)	36 (58,1)	1,6 (0,8-3,4)
Ответ на терапию:						
ПО	33 (47,1)	37 (53,9)	0,18	40 (57,1)	30 (42,9)	0,026*
Отсутствие ПО	32 (59,3)	22(40,7)	1,6 (1,0-4,3)	20 (37,0)	34 (63,0)	2,2 (1,0-5,0)
Подтип ИГХ:						
GCB	28 (62,2)	17 (37,8)	0,099	21 (46,7)	24 (53,3)	0,77
non-GCB	37 (46,8)	42 (53,2)	0,5 (0,3-1,1)	39 (49,4)	40 (50,6)	0,9 (0,4-1,8)

Примечание: * - статистически значимые различия между группами; ПО – полный ответ.

У больных с подпороговым уровнем CD8⁺ клеток вероятность недостижения полной ремиссии увеличивалась в 2,2 раза по сравнению с пациентами, имевшими надпороговое количество цитотоксических лимфоцитов (ОШ=2,2; 95% ДИ 1,1-4,7; p=0,026). Значимых ассоциаций количества Т-лимфоцитов микроокру-

жения с другими клинико-лабораторными показателями не выявлено. Отмечена тенденция к преобладанию распространенных стадий заболевания у лиц с содержанием CD8⁺ клеток в биоптатах ниже порогового значения, чем у обследуемых с количеством цитотоксических Т-клеток >13% (p=0,078).

С помощью однофакторного анализа Кокса исследована зависимость риска развития неблагоприятных событий в отношении ОВ и БПВ от доли опухоль-ассоциированных Т-лимфоцитов в биоптатах больных ДВКЛ (таблица 3). В результате отмечено статистически значимое увеличение вероятности возникновения летального исхода и прогрессии заболевания у пациентов с низким содержанием CD8⁺ лимфоцитов (p=0,001 и 0,039 соответственно).

Таблица 3 – Однофакторный анализ предикторов течения диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Параметр	ОВ			БПВ		
	ОР	95% ДИ	p	ОР	95% ДИ	p
CD4 ⁺ ≥2%	0,89	0,95-1,02	0,342	1,0	0,97-1,02	0,995
CD8 ⁺ ≤13%	3,2	1,69-6,07	0,001*	1,7	1,25-2,91	0,039*

Графически данная зависимость представлена на рисунке 3. Установлено, что 5-летняя ОВ в группе больных с высоким уровнем CD8⁺ лимфоцитов соответствовала 78,3% (медиана не достигнута) против 45,2% (Ме - 40 мес.) у пациентов с низким их количеством (p=0,001).

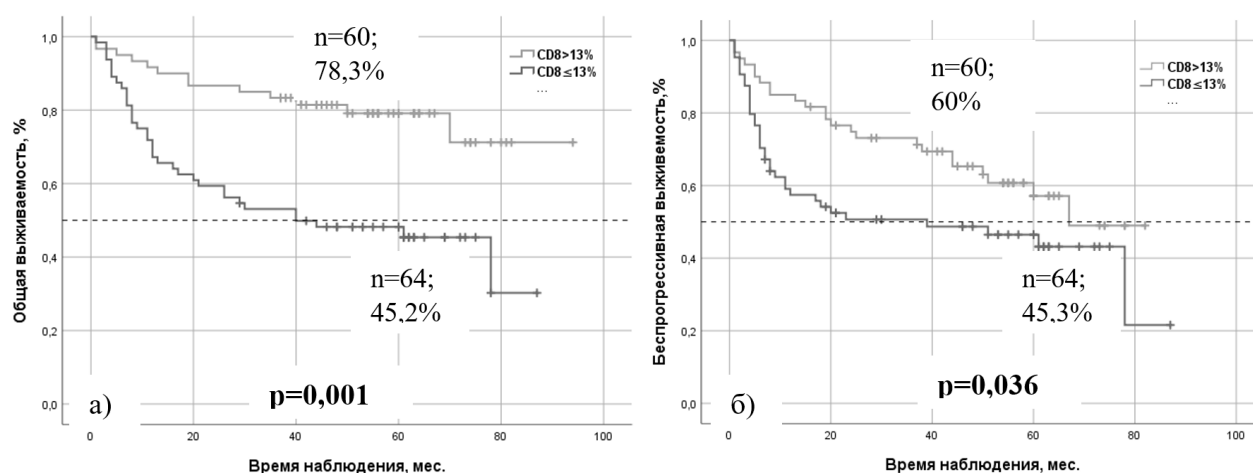


Рисунок 3 – ОВ (а) и БПВ (б) больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от количества CD8⁺ лимфоцитов в биоптатах

Значение 5-летней БПВ в случаях с подпороговым содержанием $CD8^+$ Т-клеток соответствовало 45,3% (Ме - 23 мес.), с надпороговым – 60% (медиана не достигнута, $p=0,036$). Взаимосвязи между количеством $CD4^+$ хелперов и выживаемостью пациентов с ДВКЛ не найдено (рисунок 4).

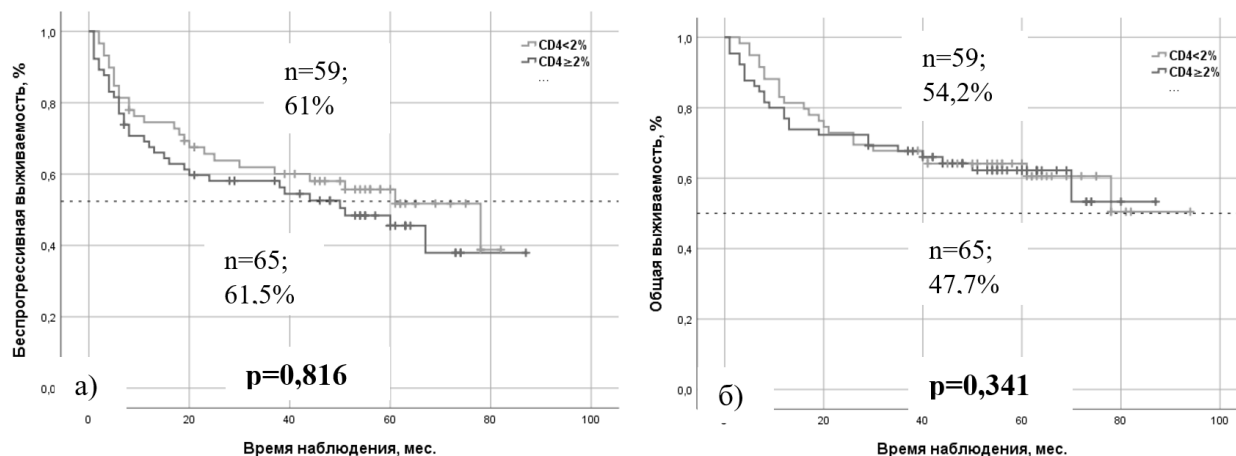


Рисунок 4 – ОВ (а) и БПВ (б) больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой в зависимости от количества $CD4^+$ Т-лимфоцитов в биоптатах

Заключение. Важное значение в развитии опухолевого процесса имеет окружающая микросреда, которая формируется в результате образования перекрестных связей между опухолевыми клетками и разными типами окружающих их клеток реактивного фона. Среди последних ключевое значение имеют эффекторные Т-лимфоциты. Под влиянием опухоли Т-клетки могут проявлять как противоопухолевую, так и проопухолевую активность [19]. Поэтому процессы, влияющие на иммунный профиль опухолевого микроокружения, вызывают повышенное внимание исследователей.

Нами проведена количественная оценка содержания $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов в биопсийном материале пациентов с ДВКЛ при помощи иммуногистохимического и морфометрического методов. При подпороговом уровне $CD8^+$ Т-клеток ($\leq 13\%$) значительно чаще встречались очаги экстранодального поражения и отсутствие полной ремиссии заболевания. Выявлена тенденция к преобладанию низкого числа $CD8^+$ клеток у больных с III-IV стадиями болезни.

На основании данных однофакторного регрессионного анализа установлена статистически значимая связь риска наступления летального исхода и прогрес-

сии заболевания с уменьшением относительного количества CD8⁺ лимфоцитов в биопсийном материале.

Показатели 5-летней ОВ у больных ДВКЛ с подпороговым количеством цитотоксических лимфоцитов оказались значительно ниже (45,3%; медиана 40 мес.), чем у обследованных с надпороговым их уровнем (78,3%; $p=0,001$). Схожая закономерность выявлена при оценке БПВ: 45,3% в случаях с низким содержанием CD8⁺ (медиана 23 мес.) и 60% – с высоким (медиана не достигнута), $p=0,036$. Взаимосвязи между содержанием CD4⁺ лимфоцитов в гистологических срезах биоптатов и течением/прогнозом заболевания не установлено.

Полученные данные согласуются с результатами ряда исследований [13; 15]. Однако встречаются работы, в которых высокое число CD8⁺ лимфоцитов в биоптатах ассоциируется с низкой выживаемостью пациентов с ДВКЛ или вовсе не имеет прогностического значения [9; 12; 14]. Возможно, это объясняется тем, что инактивация Т-клеток возникает под влиянием сложного иммуносупрессивного воздействия самой опухоли на клетки воспаления и цитокиновый профиль. При этом Т-лимфоциты находятся в состоянии неполной активации или истощения, с потерей своих функций, высокой экспрессией ингибиторных антигенов, низкой продукцией эффекторных цитокинов [10; 11]. Другой распространенной причиной, связанной с уклонением опухоли от иммунного надзора, является отсутствие экспрессии на поверхности опухолевых клеток белков гистосовместимости класса 1 вследствие мутаций генов В2М и HLA-1. Данное явление наблюдается примерно в 50% случаев ДВКЛ и коррелирует с плохим прогнозом заболевания [6; 8; 19].

Вывод. Относительное количество CD8⁺ лимфоцитов в биопсийном материале $\leq 13\%$ ассоциировано с низкой ОВ и БПВ пациентов ДВКЛ, получавших стандартную химиотерапию 1 линии по протоколу R-CHOP.

Список литературы:

1. Бурместер, Г.Р. Наглядная иммунология/ Г.Р. Бурместер, А. Пецутто. - 8-е изд.; пер. с англ. Т.П. Мосоловой. – Москва: Лаборатория знаний, 2022. – С.320.
2. Зибирова, Р.Ф. Мозеров С.А. Характеристика клеточного микроокружения/ Р.Ф. Зибирова, С.А. Мозеров// Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. - 2018. – Т.7, №2. – С.67-72.

3. Immune cell constitution in the tumormicroenvironment predicts the outcome in diffuse large B-cell lymphoma/ M. Autio, S-K. Leivonen, O. Brück [et. al.]// *Haematologica*. - 2021. – Vol.106.3. – P. 718-729.
4. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms/ R. Alaggio, C. Amador, I. Anagnostopoulos [et al.]// *Leukemia*. - 2022. – Vol.36.7/ – P. 1720-1748.
5. The international consensus classification of mature lymphoid neoplasms: A report from the clinical advisory committee/ E. Campo, E. Jaffe, JR. Cook [et al.]// *Blood*. - 2022. - Vol.140. – P. 1229–1253.
6. MHC class I downregulation in cancer: Underlying mechanisms and potential targets for cancer immunotherapy/ A.M. Cornel, I.L. Mimpfen, S. Nierkens// *Cancers*. - 2020. - Vol.12. – P. 1760.
7. Tumor Microenvironment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Role and Prognosis /A. I. Cioroianu, P. I. Stinga, L. Sticlaru [at al.]// *Analytical Cellular Pathology*. - 2019.- P. 1-9.
8. Molecular and genetic characterization of MHC deficiency identifies EZH2 as therapeutic target for enhancing immune recognition/ D. Ennishi, K. Takata, W. Beguelin [at al.]// *Cancer Discov*. - 2019. - Vol.9.- P.546–563.
9. Influence of tumor location on the composition of immune infiltrate and its impact on patient survival. Lessons from DCBCL and animal models/ C. Galand, S. Donnou, T.J. Molina [at al.]// *Frontiers in immunology*. - 2012. - Vol.4.3. – P.98.
10. Strategies to reinvigorate exhausted CD8⁺ T cells in tumor microenvironment/ Q. Guan, M. Han, Q. Guo [at al.]// *Front. Immunol*. - 2023. - Vol.14. – P. 1204363.
11. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment/ Y. Jiang, Y. Li, B. Zhu// *Cell Death Dis*. - 2015. - Vol.6. – P.1792.
12. CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes are prognostic and independent of R-IPI in patients with DLBCL receiving R-CHOP chemo-immunotherapy/ C. Keane, D.Gill, F.Vari [at al.]// *Am J Hematol*. - 2013. - Vol.88.4. – P.273-276.
13. Correlation study of PD-L1, CD4, CD8, and PD-1 in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. Pathology/ B. Liu, Sh. Yan, S. Lid [at al.]// *Research and Practice*. - 2022. - Vol.8. - P.239.
14. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphoma/ JJF. Muris, CJ. Meijer, S. Cillessen [at al.]// *Leukemia*. - 2004. - Vol. 18. – P. 589–596.
15. The density of CD8⁺ T-cell infiltration and expression of BCL2 predicts outcome of primary diffuse large B-cell lymphoma of bone/ H. Rajnai, F.H. Heyning, L. Koens [at al.] // *Virchows*

Archiv. - 2014. - Vol. 464. – P. 229–239.

16. Sehn, L.H. Diffuse Large B-cell lymphoma/ L.H. Sehn, G. Salles// N Engl J Med. - 2021. - Vol. 384. – P.842–58.

17. The Immunology of DLBCL/ T. Takahara, Sh. Nakamura, T. Tsuzuki [at al.]// Cancers. - 2023. - Vol. 15.3. – P.835.

18. Low lymphocyte-to-monocyte ratio predicts poor outcome in high-risk aggressive large B-cell lymphoma/ H. Vajavaara, S-K. Leivonen, J. Jørgensen [at al.]// eJ Haem. - 2022. - Vol.3. – P. 681–687.

19. Wellenstein, M.D. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape/ M.D. Wellenstein, K.E. Visser// Immunity. - 2018. - Vol.48.3. – P. 399-416.

20. Lower PTEN may be associated with CD8+ T cell exhaustion in diffuse large B-cell lymphoma/ S. Zheng, J. Ma, J. Li [at al.]// Human Immunology. - 2023. - Vol.23. – P. 116-7.

УДК 616–155.194.7

ГРНТИ 76.29.33

М.А. Кокорева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач — гематолог клинко-диагностического отделения гематологии и
химиотерапии

М.А. Kokoreva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Hematologist of Clinical and Diagnostic Department of hematology and
chemotherapy

E-mail: mari_sh_a@mail.ru

А.С. Лучинин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, врач гематолог взрослого отделения гематологии и
химиотерапии

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

MD, PhD, Hematologist of Adult Department of hematology and chemotherapy

E-mail: glivec@mail.ru

**Прогнозирование побочных эффектов циклоспорина у больных
приобретенной апластической анемией при проведении
иммуносупрессивной терапии**

**Prediction of cyclosporin side effects in patients with acquired aplastic anemia
during immunosuppressive therapy**

Аннотация. Цель исследования – выявить критерии прогнозирования побочных эффектов циклоспорина у больных приобретённой апластической анемией при проведении комбинированной иммуносупрессивной терапии. Авторы считают жизнеугрожающим превышение содержания циклоспорина в цельной крови более 260-300 нг/мл при его применении в лечении больных апластической анемией. В случае достижения указанной концентрации необходим более тщательный лабораторный мониторинг и коррекция суточной дозы препарата.

Abstract. The aim of the study was to identify predictors of cyclosporine-induced side effects in patients with acquired aplastic anemia undergoing combined immunosuppressive therapy. The authors consider life-threatening to exceed whole blood cyclosporine concentrations of 260-300 ng/ml in the management of aplastic anemia patients. In such instances where these concentrations are attained, more rigorous laboratory monitoring and dosing adjustments are warranted.

Ключевые слова: циклоспорин; апластическая анемия; лечение; побочные эффекты.

Index terms: cyclosporine; aplastic anemia; treatment; adverse events.

Введение. Современная комбинированная иммуносупрессивная терапия (ИСТ) больных приобретённой апластической анемией (ПАА) предполагает обязательное применение циклоспорина (ЦС) [1, 2]. ЦС блокирует лимфоциты в состоянии покоя в фазе G0 или G1 клеточного цикла и подавляет антигензависимое высвобождение лимфокинов активированными Т-лимфоцитами [3, 4]. Препарат выводится преимущественно с желчью и только 6% принятой внутрь дозы выделяется с мочой.

К частым побочным эффектам применения ЦС относятся нарушения функции печени и почек, которые выражаются в повышении таких лабораторных параметров, как содержание общего билирубина, мочевины и креатинина в сыворотке крови [1, 5, 6]. Эти функциональные изменения обратимы и дозозависимы, нормализуются после отмены или снижения дозы препарата. При длительном лечении у некоторых больных возможно развитие в почках структурных изменений, например, интерстициального фиброза, циклоспориновой зависимости и/или рефрактерности к препарату [7, 8]. Существующие рекомендации по корректировке дозы ЦС при развитии побочных эффектов носят противоречивый характер. Кроме того, рекомендуемый уровень препарата при проведении комбинированной ИСТ ПАА, по данным литературы, значительно варьирует и составляет от 75 до 800 нг/мл [1, 5, 8, 9].

Определение уровня ЦС цельной крови в процессе лечения является необходимым условием коррекции дозы препарата и профилактики нежелательных явлений, связанных с его использованием. Для мониторингирования содержания ЦС в крови предпочтительно использовать специфические моноклональные антитела, которые позволяют измерять количество неизмененного препарата.

Цель исследования: определить критерии прогнозирования побочных эффектов ЦС в зависимости от его уровня в крови у больных ПАА при проведении комбинированной ИСТ.

Материалы и методы. В исследование вошли 23 пациента ПАА (8 мужчин и 15 женщин) в возрасте от 12 до 59 лет (медиана 21 год). Диагноз ПАА устанавливали на основании общепринятых международных критериев. Все больные получали комбинированную ИСТ с включением ЦС. Препарат назначали перорально в дозе 2,5 – 10 мг/кг/сутки. В процессе лечения проводили контроль уровня ЦС в цельной крови прямым радиоиммунным методом с использованием тест-систем фирмы «Immunotech». Одновременно осуществляли динамический контроль стандартных биохимических параметров сыворотки крови: уровень общего билирубина сыворотки (ОБС), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинина сыворотки (КС) и мочевины сыворотки (МС). По содержанию ОБС и аминотрансфераз оценивали функциональное состояние печени, а на основании концентрации КС и МС – функциональное состояние почек. В связи с тем, что одной из причин синдрома цитолиза у пациентов ПАА является вирусный гепатит, больных с положительными анализами на маркеры вирусных гепатитов В и С в исследование не включали. Также в ис-

следование не вошли пациенты, у которых биохимические показатели не соответствовали норме до начала терапии ЦС.

Результаты исследования. Провели оценку 227 исследований уровня ЦС цельной крови и такого же количества стандартных биохимических анализов сыворотки крови, выполненных в тот же, в предыдущий или на следующий день (таблица 1). Взятие проб осуществляли до приема очередной дозы препарата. Статистическую обработку результатов проводили с использованием методов ROC анализа, расчета относительного риска (ОР), критерия Стьюдента, непараметрического критерия χ^2 и корреляционного анализа в программе MedCalc v9.4.1.0.

Таблица 1 - Средние величины исследуемых лабораторных показателей

Параметр	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медиана (Med)	Среднее (M $\pm$ m)
ЦС (нг/мл)	42	1457	255	294,0 $\pm$ 14,4
АСТ (ЕД/л)	6	458	25	44,9 $\pm$ 3,9
АЛТ (ЕД/л)	5	1161	24	97,7 $\pm$ 13
ОБС (мкмоль/л)	4,1	172,6	16,4	20,8 $\pm$ 1,3
КС (мкмоль/л)	24	220	70,5	82,5 $\pm$ 2,7
МС (ммоль/л)	2,5	36,2	6,7	7,3 $\pm$ 0,25

С целью поиска корреляции между значениями концентрации ЦС и его побочными эффектами всех пациентов распределили на 4 квартиля. Квартиль 1 (Q1) – 25% больных с наименьшими значениями концентрации препарата. Квартили 2 и 3 (Q2 и Q3) – по 25% пациентов со значениями концентрации меньше или больше среднего значения. Квартиль 4 (Q4) – 25% больных с наибольшими значениями концентрации ЦС. Согласно полученным квартилям определили группы пациентов, внутри которых рассчитали частоту повышения уровня КС, МС, ОБС, АСТ и АЛТ выше верхней границы нормы (таблица 2).

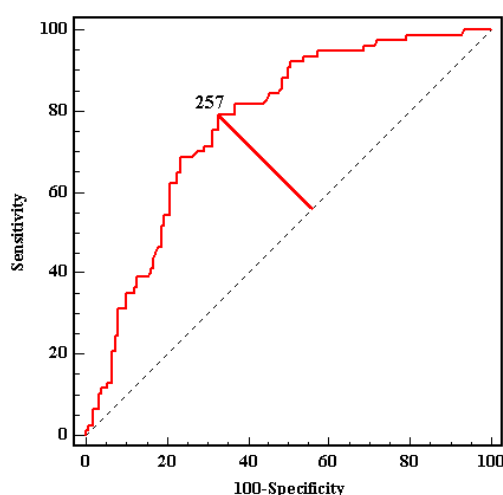
Таблица 2 - Частота повышения уровня биохимических параметров сыворотки крови (%)

Нежелательное явление	Q1 <134,3 нг/мл	Q2-3 134,3-395,5 нг/мл	Q4 >395,5 нг/мл
КС >110 мкмоль/л	3,6	19,8	37,7
МС >8 ммоль/л	16,4	24,3	47,2
ОБС >20 мкмоль/л	7	36,3	56,1
АЛТ >40 ЕД/л	28,1	38,1	40,3
АСТ >40 ЕД/л	12,3	25,7	33,3

Частота выявления биохимических маркеров почечной и печеночной дисфункции являлась максимальной в группе Q4 по сравнению с группой Q2-3 и, особенно, с группой Q1, что соответствовало более высокой концентрации ЦС. Для уровня печеночных аминотрансфераз различия внутри расчетных групп были менее выражены.

Содержание ЦС достоверно коррелировало с уровнем КС, МС и ОБС, однако степень корреляции была слабой. Для КС коэффициент корреляции R_{xy} равнялся 0,28 ($p < 0,0001$), для МС – $R_{xy} = 0,14$ ($p = 0,03$), для ОБС – $R_{xy} = 0,28$ ($p < 0,0001$).

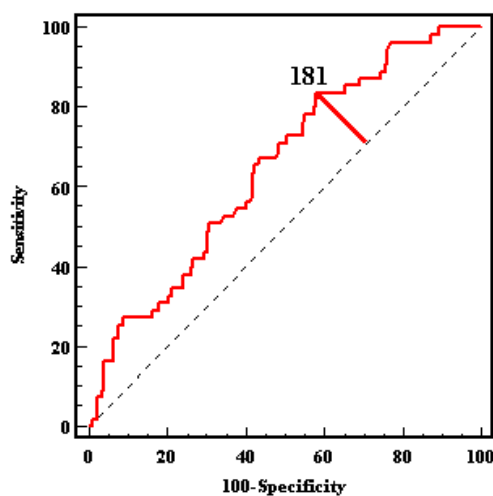
С целью получения порогового значения уровня ЦС использовали предсказательную модель, основанную на построении ROC-кривых, где в качестве классифицирующей варианты применили значение биохимических параметров выше верхней границы допустимой нормы. Необходимый уровень препарата определяли по графику в точке, где доля истинно положительных случаев (чувствительность) стремится к 100%, а доля ложно положительных (100%-специфичность) стремится к 0%. Нарушение функции печени диагностировали при уровне ОБС выше 20 мкмоль/л, а АСТ и/или АЛТ – выше 40 ЕД/л. Пороговое значение концентрации ЦС, позволяющее выделять пациентов ПАА с повышенным уровнем ОБС, при котором прогностическая способность построенной модели максимальна, составило 257 нг/мл ($p = 0,0001$) (рисунок 1).



По оси абсцисс – 100% - Специфичность; по оси ординат – Чувствительность.

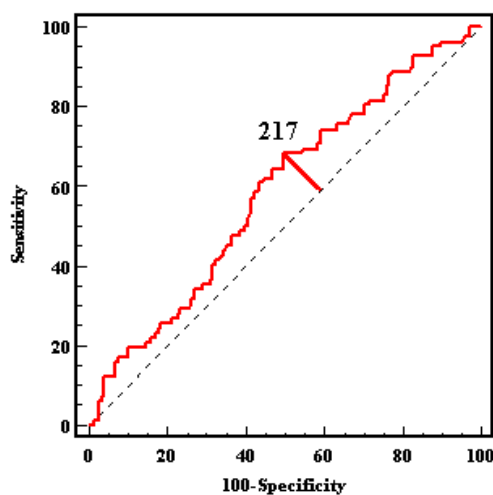
Рисунок 1 – ROC-кривая для определения порогового значения уровня ЦС, позволяющего выделять пациентов с повышенным уровнем ОБС

Аналогичный показатель, при котором в качестве классификаторов использовали уровни АСТ и АЛТ, равнялся 181 нг/мл ($p=0,0009$) и 217 нг/мл ($p=0,0328$) соответственно (рисунок 2, 3).



По оси абсцисс – 100% - Специфичность; по оси ординат – Чувствительность

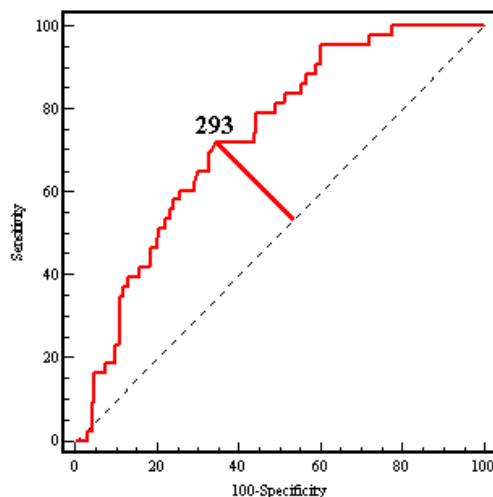
Рисунок 2 – ROC-кривая для определения порогового значения уровня ЦС, позволяющего выделять пациентов с повышенным уровнем АСТ



По оси абсцисс – 100% - Специфичность; по оси ординат – Чувствительность

Рисунок 3 – ROC-кривая для определения порогового значения уровня ЦС, позволяющего выделять пациентов с повышенным уровнем АЛТ

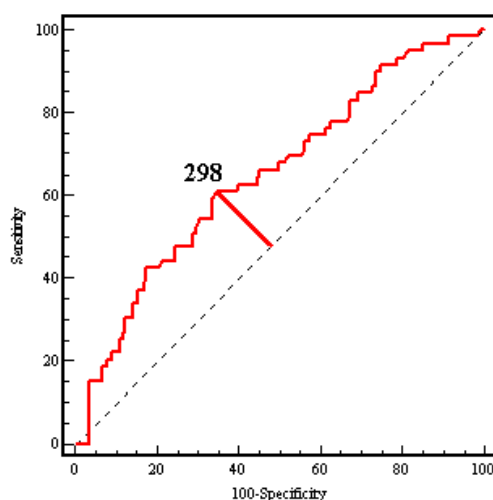
Нарушение функции почек устанавливали при уровне КС выше 110 мкмоль/л, уровне МС – выше 8 ммоль/л. Пороговое значение содержания ЦС, позволявшее выделить пациентов ПАА с повышенным уровнем КС, составило 293 нг/мл ($p=0,0001$) (рисунок 4).



По оси абсцисс – 100% - Специфичность; по оси ординат – Чувствительность

Рисунок 4 – ROC-кривая для определения порогового значения уровня ЦС, позволяющего выделять пациентов с повышенным уровнем КС

При использовании в качестве классифицирующей варианты концентрации МС выше нормы пороговое значение препарата составило 298 нг/мл ($p=0,002$) (рисунок 5).



По оси абсцисс – 100% - Специфичность; по оси ординат – Чувствительность

Рисунок 5 – ROC-кривая для определения порогового значения уровня ЦС, позволяющего выделять пациентов с повышенным уровнем МС

С целью прогнозирования отклонений различных биохимических параметров, в зависимости от пороговых значений уровня ЦС, рассчитали показатели ОР. Для удобства практического использования, полученные пороговые значения содержания ЦС округлили (таблица 3).

Таблица 3 – Относительный риск нарушения функции печени и почек в зависимости от уровня ЦС

Биохимический параметр	Округленный пороговый уровень ЦС	ОР	р
ОБС >20 мкмоль/л	≥ 260 нг/мл	5,66	<0,0001
АСТ >40 ЕД/л	≥ 200 нг/мл	2,76	0,0058
АЛТ >40 ЕД/л	≥ 200 нг/мл	1,86	0,06
КС >110 мкмоль/л	≥ 300 нг/мл	3,77	0,0002
МС >8 ммоль/л	≥ 300 нг/мл	3,3	0,0009

Наименее достоверные результаты расчета ОР получили при оценке изменения таких биохимических параметров, как АСТ и АЛТ. Вероятно, это связано с тем, что повышение уровня аминотрансфераз часто обусловлено другими причинами, в том числе побочными эффектами сопроводительной антибактериальной и противогрибковой терапии. Поэтому для определения критериев прогнозирования синдрома цитолиза в зависимости от концентрации ЦС в крови необходимы дальнейшие исследования.

В заключение рассчитали частоту повышения уровня ОБС, КС и МС выше верхней границы допустимой нормы в группах пациентов с уровнем ЦС больше или меньше полученного порогового значения. Для ОБС данный параметр составил 260 нг/мл, для КС и МС – 300 нг/мл (рисунок 6).

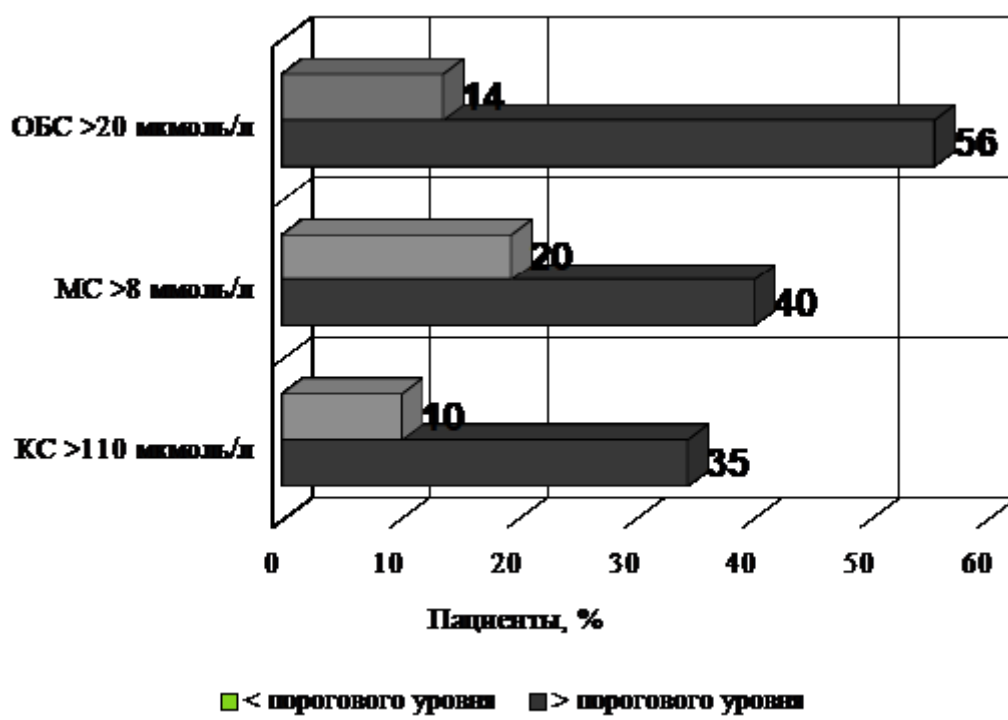


Рисунок 6 – Частота нарушений функций печени и почек в зависимости от порогового уровня ЦС

Полученные результаты оказались статистически значимыми. Частота повышения ОБС в группе пациентов с уровнем ЦС более 260 нг/мл была в 4 раза выше, чем среди больных ПАА с уровнем препарата менее 260 нг/мл ($\chi^2=47,4$, $p<0,0001$). Частота увеличения КС и МС у пациентов с уровнем ЦС более 300 нг/мл была в 3 раза ($\chi^2=17,4$, $p<0,0001$) и в 2 раза ($\chi^2=10$, $p=0,002$) соответственно больше, чем среди больных ПАА с уровнем ЦС менее 300 нг/мл.

Заключение. Таким образом, определение концентрации ЦС в крови у больных ПАА необходимо при проведении комбинированной ИСТ с целью прогнозирования побочных эффектов препарата. Повышение содержания ЦС более 260 нг/мл повышает риск гипербилирубинемии в 5,7 раза, а при содержании ЦС в крови более 300 нг/мл увеличивается риск повышения КС выше нормы в 3,7, а МС в 3,3 раза. Соответственно достоверно возрастает частота диагностики печеночной и почечной дисфункции согласно названным биохимическим маркерам. В связи с тем, что уровень ЦС прямо коррелирует с перечисленными биохимическими показателями, увеличение его концентрации в крови будет сопровождаться прогрессированием ухудшения функции печени и почек.

Считаем жизнеугрожающим состоянием превышение содержания ЦС в цельной крови более 260-300 нг/мл в ходе проведения комбинированной ИСТ у больных ПАА. При достижении указанной концентрации необходимы более частый мониторинг биохимических показателей крови и возможно коррекция суточной дозы препарата.

Список литературы

1. ATG plus cyclosporine reduces all-cause mortality in patients with severe aplastic anemia-systematic review and meta-analysis/A. Gafter-Gvili, R. Ram, R. [et al.]// *Acta Haematologica*. 2008;120(4):237-43.
2. Cyclosporine plus eltrombopag in the treatment of aplastic anemia with or without antithymocyte immunoglobulin: A multicenter real-world retrospective study/M. Chen, Q. Liu, Y. Gao [et al.]// *European Journal of Haematology*. 2023 Jun 4.
3. Impact of antithymocyte globulin on blood cyclosporin A levels in aplastic anemia patients/Y. Futagi, Y. Suga, T. Shimada, Y. Sai//*Annals of Hematology*. 2023 Feb;102(2):463-465.
4. S-J. Lin, M-L. Kuo. Effect of cyclosporin A on interleukin-15-activated umbilical cord blood natural killer cell function// *Cytotherapy* 2008;10(4):397-405.
5. N. Frickhofen, S.J. Rosenfeld. Immunosuppressive treatment of aplastic anemia with antithymocyte globulin and cyclosporine// *Seminars in Hematology*. 2000 Jan;37(1):56-68.
6. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification/D. Hasegawa, X. Chen, S. Hirabayashi[etal.] // *British Journal of Haematology*. 2014 Sep;166(5):758-66.
7. E. Furlong, T. Carter. Aplastic anaemia: Current concepts in diagnosis and management// *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2020 Jul;56(7):1023-1028.
8. P. Scheinberg. Novel therapeutic choices in immune aplastic anemia F1000Research/ 2020 Sep 10;9:F1000 Faculty Rev-1118.
9. Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of ATG and Cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the EBMT/ J. Marsh, H. Schrezenmeier, P. Marin [et al.] // *Blood*; 1999, Vol. 93, 2191-2195.

Е.А. Коновалова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови

E.A. Konovalova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Junior Researcher of Blood Products Laboratory

E-mail: konovalovaea@niigpk.ru

Е.В. Росина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови

E.V. Rosina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Junior Researcher of Blood Products Laboratory

E-mail: rosina@niigpk.ru

Е.Н. Калинина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории препаратов крови

E.N. Kalinina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Junior Researcher of Blood Products Laboratory

E-mail: kalininaen@niigpk.ru

С.Е. Зиганшина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
инженер-технолог лаборатории препаратов крови

S.E. Ziganshina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Engineer-technologist of Blood Products Laboratory

E-mail: ziganshina@niigpk.ru

Я.Д. Пивошенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории препаратов крови

J.D. Pivoshenko

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Laboratory assistant-researcher of Blood Products Laboratory

E-mail: pivoshenko@niigpk.ru

Е.С. Кормщикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией препаратов крови

Получение кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В

Obtaining candidates reference standard of human immunoglobulin against hepatitis B

Аннотация. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, при проведении контроля качества лекарственных средств, в том числе иммуноглобулина человека против гепатита В, необходимо применять фармакопейные стандартные образцы. Это обеспечивает точность тестирования. В рамках настоящего исследования получены кандидаты в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В разного компонентного состава.

Annotation. According to the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, when carrying out quality control of medicines, including human immunoglobulin against hepatitis B, it is necessary to use pharmacopoeial reference standards. This ensures the accuracy of the test. Within the framework of this study, candidates for a standard sample of human immunoglobulin against hepatitis B of different component compositions were obtained.

Ключевые слова: иммуноглобулин человека против гепатита В; кандидат в стандартный образец; глицин; l-пролин; трегалоза.

Index terms: human immunoglobulin against hepatitis B; candidate reference standard; glycine; l-proline; trehalose.

Введение. Препараты иммуноглобулина (ИГ) человека против гепатита В для внутривенного и внутримышечного введения, получаемые из иммуноспецифической донорской плазмы, широко используются для лечения и профилактики осложнений заболевания. Эффективность терапии зависит от концентрации антител в дозе вводимого лекарственного средства. Для повышения точности количественного определения специфических антител в препаратах ИГ рекомендовано использовать стандартные образцы (СО), аттестованные в международных единицах (МЕ) – фармакопейные СО [20].

До 2011 года на российском рынке был представлен отраслевой стандартный образец ОСО-42-2815488, аттестованный по содержанию антител к поверхностному антигену вируса гепатита В, который производился в ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России. В настоящее время его выпуск прекращен, и он недоступен. Всемирной Организацией Здравоохранения в 2008 году одобрен международный стандарт ИГ человека против гепатита В (The 2nd International Standard for Anti-HBs Immunoglobulin Human, NIBSC code: 07/164), который представляет собой лиофилизированный концентрат антител к поверхностному антигену вируса гепатита В с активностью 100 МЕ/ампула. Российские фармпроизводители зачастую не имеют возможности его приобретения из-за трудностей логистики. В связи с этим актуальна разработка национального СО ИГ человека против гепатита В, соответствующего современным требованиям к биологическим эталонам лекарственных средств.

Основным требованием, предъявляемым к СО, является стабильность заявленной специфической активности в течение всего срока хранения [1, 7]. Известно, что для обеспечения постоянства свойств биопрепаратов широко используется метод лиофилизации. Внесение в состав стабилизирующих добавок, обладающих свойствами лиопротекторов, позволяет полноценно сохранить структуру белковых молекул и их функциональную активность в процессе лиофилизации. Для этого применяют соединения углеводной и белковой природы. Считается, что окружение молекул ИГ низкомолекулярными веществами препятствует межбелковым контактам и возникновению нежелательных химических реакций [5, 21, 25]. Помимо низкомолекулярных соединений такие свойства присущи белку плазмы крови – альбумину [24].

Среди стабилизаторов углеводной природы выраженной протективной активностью обладает трегалоза, которая экранирует биомолекулы посредством образования водородных связей с функциональными группами ИГ [22]. В отличие от редуцирующих сахаров, трегалоза не вступает во взаимодействие с белками и не вызывает окрашивания препаратов в процессе хранения [6, 26, 27].

Опубликованы результаты, в которых установлен наилучший протективный эффект глицина в количестве 22,5 г/л при сравнении с другими наполнителями [19]. Такой состав защитной среды широко применяется для стабилизации иммуноглобулиновых препаратов, нормальных и специфических [16, 17]. Кроме того, глициновый буфер (глицин – 22,5 г/л) входит в состав международного СО ИГ

человека против гепатита В, применяемого за рубежом [4]. Указанный наполнитель использовался для стабилизации СО содержания ИГ человека к вирусу клещевого энцефалита. Кроме данной аминокислоты он содержал L-пролин (состав: глицин – 12,5 г/л, L-пролин – 12,5 г/л, рН 5,0). Это амфифильное соединение способно образовывать связи как с гидрофобными, так и с гидрофильными участками Fab-фрагментов молекулы IgG, способствуя лучшей сохранности специфической активности [18, 23].

Бычий сывороточный альбумин (БСА) также нашел широкое применение в качестве стабилизатора буферных систем и реагентов. БСА, являясь мишенью протеаз, эффективно защищает целевые белки от протеолиза [19].

На стабильность антител может влиять рН среды [18]. Для растворов ИГ человека против гепатита В показано, что образование агрегатов, появление желтоватого цвета и потеря специфической активности минимальны в нейтральных и слабокислых условиях [23].

Цель исследования – получить кандидаты в СО ИГ человека против гепатита В с использованием стабилизаторов разного компонентного состава и оценить их основные свойства.

Материалы и методы. Сырьем для получения кандидатов в СО являлась иммуноспецифическая плазма крови от 3 доноров. Концентраты противогепатитных антител получали методом этанольного фракционирования, взяв за основу Промышленный регламент на производство ИГ человека [5]. Разделение фракций осуществляли с использованием центрифуги RC3BP SORVALL (Thermo Scientific, США). Концентрировали противогепатитные антитела с помощью касетного модуля для ультрафильтрации «Vivaflow 200» (Sartorius, Германия). Стерилизующую фильтрацию проводили в асептических условиях на стандартном оборудовании фирмы «Millipore» (США) с использованием фильтр-капсул с размером пор 0,22 мкм (Sartopore® 2 Gamma MidiCaps, Германия).

Использовали 5 вариантов защитной среды следующего компонентного состава с соответствующими значениями показателя рН:

- Глицин 22,5 г/л, рН 6,8;
- Глицин 22,5 г/л, рН 4,8-5,3;
- L-пролин 28,78 г/л, рН 4,8-5,3;

- Трегалоза 40 г/л, БСА 2 г/л, рН 4,8-5,3;
- Трегалоза 40 г/л, рН 4,8-5,3.

Растворы концентратов противогепатитных антител разливали во флаконы для упаковки лекарственных средств (Shandong Pharmaceutical Glass Co., ltd, Китай) по 0,7 мл, замораживали в низкотемпературном морозильнике MDF-U53V (Panasonic Healthcare, Япония) при температуре минус $(80 \pm 2) ^\circ\text{C}$, размещали на полках камеры установки сублимационной сушки BT-SI-825-SS-Y3 (ООО «Биджет», Россия). По окончании процесса лиофилизации флаконы плотно закупоривали стерильными резиновыми пробками (Dätwyler Schweiz AG, Швейцария) и завальцовывали алюминиево-пластиковыми колпачками (Dätwyler Schweiz AG, Швейцария).

Свойства кандидатов в СО изучали в соответствии с положениями отчета Всемирной организации здравоохранения № 932 [28], ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» [7], ОФС.1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулины человека» [11], ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный» [13], ГОСТ 8.315–2019 «Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения» [2].

Внешний вид оценивали визуально. Остаточную влажность определяли методом высушивания под вакуумом точной навески испытуемого образца до постоянной массы с использованием вакуумного сушильного шкафа Binder VDL 53 (Binder, Германия) [10]. Время растворения фиксировали секундомером СОПр-2а-3-000 (ПАО «Златоустовский часовой завод», Россия) при растворении лиофилизата очищенной водой. Показатели прозрачности и цветности измеряли спектрофотометрически на колориметре фотоэлектрическом КФК-2УХЛ4.2 (АО «Загорский оптико-механический завод», Россия) в кюветах с толщиной оптического слоя 3 мм при длине волны 540 нм и 400 нм соответственно, концентрацию водородных ионов (рН) – потенциометрически с применением анализатора жидкости Эксперт-001-3 (НПП «Эконикс-Эксперт», Россия) [8, 9, 11]. Содержание белка оценивали колориметрическим методом с биуретовым реактивом [15]. Электрофоретическую однородность исследовали на мембранах из ацетатцеллюлозы на устройстве УЭФ-01-«АСТРА» (ООО «НПЦ «Астра», Россия), укомплектованного программой «Анализ фракций сыворотки крови» (ООО «НПЦ

«Астра», Россия), и набора реагентов «КлиниТест-ЭФ» (НПЦ «Эко-Сервис», Россия) [14]. Молекулярные параметры анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с помощью системы Agilent 1200 (Agilent Technologies Inc., США) и колонки BioSep-SEC-s4000 (Phenomenex, США) при следующих условиях: элюент – 0,02М фосфатный буферный раствор (рН 7,0), скорость элюции – 0,5 мл/мин, длина волны – 280 нм [12]. Хроматограммы обрабатывали в программе ChemStation (Agilent Technologies Inc., США). Специфическую активность определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов ВектоНВsAg-антитела (АО «Вектор-Бест», Россия) и комплекта оборудования фирмы BioRad Laboratories (Швейцария) в соответствии с инструкцией по применению тест-системы. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США).

Результаты и обсуждение. Проведено 2 цикла фракционирования противогепатитной плазмы, заготовленной методом автоматического плазмафереза. Средний объем пула плазмы был равен ($0,9 \pm 0,2$) л. Специфическая активность составила ($1,4 \pm 0,1$) МЕ/мл, значение рН – $7,7 \pm 0,4$, содержание белка – ($64 \pm 0,2$) г/л. Выход основных производственных фракций – осадок II+III, концентрат противогепатитных антител – представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Выход основных производственных фракций при получении кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В

Наименование фракции	Выход из 1 л плазмы, $\bar{X} \pm s$
Осадок II+III (масса, г / 1 л плазмы)	$71,3 \pm 13,5$
Концентрат противогепатитных антител (масса белка, г/ 1 л плазмы)	$2,8 \pm 0,4$

Согласно представленным данным из 1 л противогепатитной плазмы получено ($71,3 \pm 13,5$) г осадка II+III, из которого выделено ($2,8 \pm 0,4$) г целевого белка. Полученный раствор ИГ был сконцентрирован до содержания белка 45,0 г/л, при этом его объем составил 136 мл, а специфическая активность – 54,1 МЕ/мл. При определении молекулярных параметров выявлен один пик мономеров. При изучение электрофоретической однородности определена основная фракция гаммаглобулина 96,9 % и незначительная примесь альбумина – 3,1 %.

Раствор разделен на 5 равных частей, в которые внесены соответствующие наполнители и проведена коррекция показателя рН. Стабилизированные раство-

ры ИГ подвергнуты лиофилизации. Таким образом, получено 5 кандидатов в СО ИГ человека против гепатита В с разным компонентным составом защитной среды (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В

№ кандидата в стандартный образец	Компонентный состав	pH
1	Глицин 22,5 г/л	6,8
2	Глицин 22,5 г/л	5,3
3	L-пролин 28,78 г/л	5,2
4	Трегалоза 40 г/л, БСА 2 г/л	5,2
5	Трегалоза 40 г/л	5,1

Для оценки влияния лиофилизации на сохранность свойств кандидаты в СО исследованы по основным показателям качества иммуноглобулиновых препаратов. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты лабораторно-экспериментального изучения свойств кандидатов в стандартный образец иммуноглобулина человека против гепатита В

Показатель качества	№ кандидата в стандартный образец				
	1	2	3	4	5
Описание	Аморфная масса белого цвета в форме таблетки, плотно прилегающей к стенкам флакона, после растворения – прозрачная бесцветная жидкость				
Остаточная влажность, %	1,2	1,4	1,5	1,5	1,3
Время растворения, мин.	0,4	0,2	1,5	0,8	0,7
Прозрачность, ед. оптической плотности	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Показатель качества	№ кандидата в стандартный образец				
	1	2	3	4	5
Цветность, ед. оптической плотности	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Белок, г/л до / после лиофилизации	38,0 / 34,6	43,0 / 36,2	41,0 / 37,0	39,0 / 35,7	38,0 / 34,3

Электрофоретическая однородность, относительное содержание фракции γ -глобулинов, % до / после лиофилизации	99,8 / 99,8	100,0 / 100,0	100,0 / 98,4	96,0 / 96,0	100,0 / 99,7
Молекулярные параметры, относительное содержание фракций, %: мономеры и димеры, полимеры и агрегаты до / после лиофилизации	100,0 / 100,0 0,0 / 0,0	100,0 / 100,0 0,0 / 0,0	100,0 / 100,0 0,0 / 0,0	100,0 / 100,0 0,0 / 0,0	100,0 / 100,0 0,0 / 0,0
Специфическая активность, содержание антител к поверхностному антигену вируса гепатита В, МЕ/мл, до (n = 3) / после лиофилизации (n = 3) (значение p для t-критерия Стьюдента)	52,0 $\pm$ 0,8 / 44,2 $\pm$ 1,1 (p = 0,003)	51,6 $\pm$ 0,8 / 49,0 $\pm$ 0,4 (p = 0,008)	52,1 $\pm$ 0,3 / 45,8 $\pm$ 0,3 (p = 0,001)	52,0 $\pm$ 0,4 / 43,1 $\pm$ 0,1 (p = 0,0004)	54,0 $\pm$ 0,2 / 45,9 $\pm$ 0,3 (p = 0,0001)

Согласно данным, представленным в таблице 3, все полученные образцы соответствуют требованиям к основным показателям качества лекарственных препаратов ИГ человека. Во всех случаях лиофилизат представлял собой аморфную массу белого цвета в форме таблетки, плотно прилегающей к стенкам флакона. Остаточная влажность не превышала 1,5 %. Растворение высушенного материала занимало менее 2 минут. Регидратированные образцы были прозрачны и бесцветны. Концентрация белка варьировала от 34,3 до 37,0 г/л. Не зафиксировано фрагментации, полимеризации и агрегации ИГ. При изучении электрофоретической однородности содержание фракции гаммаглобулинов составило не менее 96,0 %. Специфическая активность полученных кандидатов в СО находилась в диапазоне от 43,0 до 49,4 МЕ/мл. Установлено, что лиофилизация не оказала влияния на электрофоретическую однородность и молекулярные параметры исследованных образцов. Обнаружена тенденция к снижению содержания белка (от 9 до 16 %) и специфической активности (от 5 до 17 %) после лиофильного высушивания. Однако корреляционной связи между изменением этих показателей не выявлено ($r_s = -0,021$). Для установления статистической значимости и причин снижения специфической активности требуются дальнейшие исследования. В целом, содержание антител к поверхностному антигену вируса гепатита В в образцах кандидатов в СО после лиофилизации сочли приемлемым. Для достижения специфической активности на уровне международного СО противогепатитного ИГ

человека (100 МЕ/мл) содержание антител в полученном кандидате может быть скорректировано объемом вносимого растворителя при регидратации лиофилизата.

Заключение. Получены 5 кандидатов в СО ИГ человека против гепатита В с разным компонентным составом в форме лиофилизата со специфической активностью от 43,0 до 49,4 МЕ/мл и остаточной влажностью, не превышающей 1,5 %. Показано их соответствие основным требованиям к качеству ИГ препаратов. Проведение ускоренных испытаний полученных образцов позволит выбрать оптимальный состав защитной среды для стабилизации СО ИГ человека против гепатита В.

Список литературы

1. ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. – М.: Стандартинформ, 2019. – 33 с.
2. ГОСТ 8.315–2019 Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. – М.: Изд-во стандартов, 2019. – 34 с.
3. Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита: Промышленный регламент на производство препарата № 01966992–04–05 [Текст]. – Утв. директором ФГУ «КНИИ-ГиПК Росздрава» 10.01.06.
4. Инструкция по применению WHO International Standard Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human NIBSC code: 07/164 Instructions for use (Version 1.0, Dated 22/10/2008) // Hertfordshire: NIBSC, 2008. – 2 p.
5. Котова А.Ю., Горобец С.В. Технология осветления трудно-фильтруемых биологических жидкостей // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2008. – N 3. – С.38-40.
6. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. – Харьков: Фармитэк, 2008. – 312 с.
7. ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. I. – М., 2018. С. 185-191.
8. ОФС.1.2.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд., Т. 1. – М., 2018. – С. 749-758.
9. ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд., Т. 1. – М., 2018. – С. 532-541.

10. ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд., Т. 1. – М., 2018. – С. 567-569.
11. ОФС 1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулин человека» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. II. – М., 2018. – С. 3084-3089.
12. ОФС.1.8.2.0006.15 «Определение молекулярных параметров иммуноглобулинов методом ВЭЖХ» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд., Т. 2. – М., 2018. – С. 3167-3170.
13. ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный» // Государственная Фармакопея Российской Федерации. – XIV изд. Т. 4. – М., 2018. – С. 5758-5763.
14. ОФС.1.8.2.0009.15 «Определение однородности лекарственных препаратов из сыворотки крови человека и животных методом электрофореза на плёнках из ацетата целлюлозы» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIII изд., Т. 2. – М., 2018. – С. 958-964.
15. ОФС.1.8.2.0010.18 «Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных» // Государственная фармакопея Российской Федерации. – XIV изд., Т. 2. – М., 2018. – С. 2951-2955.
16. Подольский М.В. Высушивание препаратов крови и кровезаменителей. – М.: Медицина, 1973. – 192 с.
17. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств / Абрамова Е.Г., Кочкалова Н.Н., Никифорова А.К. [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – N 2(108). – С.75-78.
18. Получение стабильной формы стандартного образца содержания антител IgG человека к вирусу клещевого энцефалита / Е.С. Кормищикова, Е.В. Росина, К.А. Воробьев [и др.] // Биотехнология. – 2021. – N 3(37). – С.42-52.
19. Разработка методов диагностики, прогноза и сопроводительной терапии при заболеваниях системы крови. Часть 9. Получение иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита для внутривенного введения сухого: отчет о НИР (заключительный) / Шарыгин С.Л., Дробкова А.В., Куноф В.К. [и др.] // ФГБУ «КНИИГиПК» ФМБА России. – Киров: ФГБУ «КНИИГиПК» ФМБА России, 2010. – 98 с.
20. Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применении / Корнилова О. Г., Кривых М. А., Волкова Р. А. [и др.] // Стандартные образцы. – 2018. – N 3–4. – С. 33–41.
21. Aracawa T., Kita Y., Carpenter J. F. Protein-solvent interactions in Pharmaceutical formulations // Pharm. Res. – 1991. – Vol. 8, N 3. – P.285-291.
22. Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying

- and storage in the dried solid / Kreilgaard L., Frokjaer S., Flink J. M. [et al.] // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – Vol. 360, N 1. – P.121-134.
23. L-Proline reduces IgG dimer content and enhances the stability of intravenous immunoglobulin (IVIg) solutions / Bolli R., Woodtli K., Bärtschi M. [et al.] // Biologicals. – 2010. – Vol. 38(1). – P. 150-157.
24. Mengmeng Jin, Songsong Zhu, and Yi Hou. Insight on Serum Albumin: From Structure and Biological Properties to Functional Biomaterials for Bone Repair // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2023. – Vol. 9, N 5. – P. 2235-2250.
25. Nezlin R. Interactions between immunoglobulin G molecules // Immunol. Lett. – 2010. – Vol. 132, N 1-2. – P.1-5.
26. Sola-Penna M., Meyer-Fernandes J. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – Vol. 360, N 1. – P.10-14.
27. Trehalose can be used as a parenteral saccharide source in rabbits / Sato S., Okamoto K., Minami R. [et al.] // J. Nutr. – 1999. – Vol. 129. – P. 158-164.
28. World Health Organization Technical Report Series / ecommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. – N. 932. – 2006. – 59 p.

УДК 616.155.392.8

ГРНТИ 76.03.55

С.О. Коробов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

S.O. Korobov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of cellular and molecular immunology
E-mail: korobov@niigpk.ru

Е.Л. Назарова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и
молекулярной иммунологии

E.L. Nazarova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the laboratory of cellular and molecular
immunology

E-mail: nazarova@niigpk.ru

И.А. Докшина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, врач - гематолог взрослого отделения гематологии
и химиотерапии

I.A. Dokshina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Hematologist of Adult Department of hematology
and chemotherapy

E-mail: dokshina@niigpk.ru

**Прогностическое моделирование тяжелых инфекционных осложнений у
пациентов с острым миелоидным лейкозом**

**Prognostic modeling of severe infectious complications in patients with acute
myeloid leukemia**

Аннотация. Тяжелые инфекционные осложнения являются актуальной проблемой при лечении пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Несмотря на то, что известны ос-

новые факторы, способствующие возникновению инфекций, инструменты для точного определения риска тяжелых инфекционных осложнений отсутствуют. Цель работы - оценить перспективы создания предиктивной модели развития тяжелых инфекционных осложнений у больных острым миелоидным лейкозом. Получена предварительная модель, обладающая точностью 78,8%, и определены методические подходы, способствующие улучшению качества новых моделей.

Abstract. Severe infectious complications are a pressing problem in the treatment of patients with acute myeloid leukemia (AML). Although the main factors contributing to the occurrence of infections are known, tools to accurately determine the risk of severe infectious complications are lacking. The purpose of the work is to evaluate the prospects for creating a predictive model for the development of severe infectious complications in patients with acute myeloid leukemia. A preliminary model with an accuracy of 78.8% was obtained and methodological approaches were identified that help improve the quality of new models.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз; инфекционные осложнения; Toll-подобные рецепторы; интерлейкины; полиморфизм; прогностическая модель.

Index terms: acute myeloid leukemia; infectious complications; Toll-like receptors; interleukins; polymorphism; prognostic model.

Введение. Пациенты с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) подвержены риску развития инфекционных осложнений (ИО) в связи с качественными и количественными изменениями в работе иммунной системы, ассоциированными как с самим заболеванием, так и с проведением химиотерапии (ХТ). Несмотря на совершенствование лечебно-профилактических подходов, тяжелые ИО являются значимым фактором смертности больных ОМЛ.

Большинство исследователей сходятся на том, что профилактические мероприятия наиболее эффективны у пациентов с высоким риском возникновения ИО [4, 8, 10, 11, 15]. Известно, что на восприимчивость к инфекциям могут влиять различные факторы, обусловленные заболеванием и лечением, а также индивидуальные особенности пациента [1, 7]. Несмотря на то, что определены основные факторы, способствующие развитию инфекций, формализованные методы определения риска возникновения ИО у пациентов с ОМЛ на данный момент отсутствуют и риск инфекций оценивается на основании знаний и опыта врача. В связи с этим существует необходимость в разработке способов прогнозирования риска ИО у больных ОМЛ на основании принципов доказательной медицины.

Иммунная система является основным фактором, предотвращающим развитие инфекций. Логично предположить, что эффективность реализации ее

функций определяет успех противoinфекционной защиты. Функционирование многих систем организма, в том числе иммунной, находится под генетическим контролем, ряд полиморфных локусов которой связан с развитием инфекций [3]. Использование маркеров, функционально задействованных в реализации иммунного ответа, позволяет определить пациентов генетически предрасположенных к возникновению ИО.

Цель работы — оценить возможности прогностического моделирования развития тяжелых ИО у пациентов с ОМЛ, получающих высокоинтенсивную ХТ, с учетом полиморфного статуса генов иммунной системы.

Материалы и методы. Ретроспективное исследование проведено у пациентов с ОМЛ, получавших лечение в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с 2019 по 2022 гг. Из них 43 (46,2%) — женщины, 50 (53,8%) — мужчины. Медиана возраста пациентов составила 58 (19-74) лет. Мониторинг тяжелых ИО проведен у 93 больных, получивших 263 курса ХТ: 110 (41,8%) индукционной и 76 (28,9%) консолидационной терапии, первых четырех курсов второй линии - 77 (29,3%). Пациентам проведены курсы ХТ по следующим протоколам: 7+3 — 97 (36,88%), AIDA/7+3+ATRA — 30 (11,41%), Aza-Ida-Ara-C — 29 (11,03%), азацитидин + венетоклакс — 29 (11,03%), малые дозы цитарабина — 47 (17,87%), другая высокодозная терапия — 31 (11,79%) Тяжелым ИО считались пневмония и сепсис.

Генотипированию подвергались образцы геномной ДНК, полученные из мононуклеаров периферической крови и аспиратов костного мозга. Выделение ДНК проводилось с использованием набора реактивов РИБО-Преп («АМПЛИ-Сенс», Россия). Определение однонуклеотидных замен в генах *TLR3* (L412F, rs3775291), *IL1 β* (T511C, rs16944), *IL4* (C-589T, rs2243250), *IL2* (T-330G, rs2069762), *TLR9* (G2848A, rs352140), *CD14* (T-159C, rs2569190) осуществлялось с помощью комплекта реагентов «SNP-Экспресс-ЭФ» (НПФ «Литех», Россия) в аллель-специфичной полимеразной цепной реакции. Продукты амплификации детектировались в 3% агарозном геле.

Статистическая обработка данных проводилась в среде программирования R (v4.3.1), с использованием пакетов *glmnet*, *e1071* и *pROC*, *missForest* [5, 6, 12, 13, 14]. Количественные характеристики представлены в виде медианы с минимальным и максимальным значениями, качественные — в виде частоты обнаружения признака. Пропущенные значения заполнялись методом «случайного леса». Категориальные переменные с большим количеством групп трансформиро-

лись с помощью таргетного кодирования, заключающегося в замене группы на частоту признака в ней. Для группировки пациентов на основании генотипа использовался кластерный анализ алгоритмом К-медоид с собственной функцией для расчета расстояния:

$$d_1(p, q) = l \sum_{i=1}^n (p_i - q_i), \text{ где } l \text{ — количество локусов, генотип которых отличается.}$$

Обучение модели осуществлялось с помощью метода логистической регрессии с применением эластичной сети (Elastic Net). Выборка разделялась на обучающую и тестовую в соотношении 80/20. Порог статистической значимости выявленных различий установлен на уровне $p < 0,05$.

Результаты. Диагностировано 57 случаев тяжелых ИО. Учитывая одновременный вклад множества генов в восприимчивость к развитию инфекций, пациентов объединили в 2 группы на основании схожести их генотипов в локусах *TLR3*-1234, *IL1 β* -511, *IL4*-589, *IL2*-330, *TLR9* 2848, *CD14*-159.

Для первой группы центром кластера являлось сочетание генотипов *TLR3* 1234CG x *IL1 β* -511TC x *IL4*-589CC x *IL2*-330TG x *TLR9* 2848AG x *CD14*-159CT, для второй группы — *TLR3* 1234CC x *IL1 β* -511TC x *IL4*-589CT x *IL2*-330TT x *TLR9* 2848AA x *CD14*-159CC. Во второй группе установлена более высокая частота развития тяжелых ИО при прохождении курсов ХТ (ОШ 0,95, $p = 0,001$, таблица 1).

Таблица 1 — Частота развития ИО при прохождении курсов ХТ в зависимости от принадлежности к группе генотипов

Группы пациентов	Отсутствие ИО	Развитие ИО
Группа 1	128 (85,3%)	22 (14,6%)
Группа 2	78 (69,0%)	35 (31,0%)

Выборка, использовавшаяся для обучения модели, состояла из 211 случайно выбранных курсов ХТ. В качестве потенциальных предикторов возникновения тяжелых инфекций использовали: принадлежность ко 2 генетической группе, мужской пол, возраст больного, ОМЛ с предшествующей трансформацией из миелодиспластического синдрома (МДС), проведение 2 линии терапии, частоту тяжелых ИО при выбранном режиме терапии, площади под кривыми (AUC) содержания лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов и эритроцитов

от поступления в стационар до первого дня терапии. В таблице 2 представлена характеристика потенциальных предикторов в тренировочной выборке (для категориальных предикторов указана частота, для количественных — медиана с минимальным и максимальным значением) и их ассоциация с ИО.

Таблица 2 — Характеристика предикторов в выборке

Показатель	Отсутствие ИО	Развитие ИО	ОШ (95% ДИ)	p
Мужской пол	77 (13,73%)	32 (29,36%)	1,645 (0,848 — 3,273)	0,147
Возраст	51,00 (18,00 - 75,00)	61,00 (19,00 - 72,00)	1,033 (1,009 — 1,060)	0,008
ОМЛ с трансформацией из МДС	32 (21,30%)	10 (23,81%)	1,032 (0,448 — 2,222)	0,938
Генетическая группа 2	61 (13,33%)	30 (32,97%)	2,160 (1,118 — 4,230)	0,023
Вторая линия терапии	45 (20,53%)	15 (25,00%)	1,714 (0,856 — 3,383)	0,123
AUC лимфоцитов	0,60 (0,09 - 1,10)	0,68 (0,18 - 1,08)	7,243 (1,494 — 37,461)	0,016
AUC нейтрофилов	1,00 (0,00 - 1,85)	0,43 (0,00 - 1,66)	0,289 (0,139 — 0,574)	0,001
AUC тромбоцитов	50,00 (4,87 - 93,75)	53,19 (16,50 - 90,00)	0,995 (0,980 — 1,011)	0,538
AUC эритроцитов	1,87 (1,18 - 3,41)	1,95 (0,99 - 2,84)	1,060 (0,565 — 1,940)	0,853
AUC лейкоцитов	2,00 (0,18 - 3,71)	2,63 (0,36 - 3,60)	1,272 (0,863 — 1,902)	0,230
Терапия (таргетная трансформация)	24,74 (3,33 - 31,03)	24,74 (3,33 - 31,03)	1,110 (1,045 — 1,198)	0,002

Предикторы, обладавшие слабой предиктивной способностью, удалялись с помощью эластической сети для получения оптимальной прогностической модели. Список предикторов с их коэффициентами, вошедших в итоговую модель, представлен в таблице 3. В состав модели вошло 4 предиктора, 3 из которых представлены числами и не требуют кодирования (непрерывные переменные), а один предиктор является категориальным с 2 вариантами (принадлежность ко 2 генетической группе) и при использовании модели кодируется как 1 при положительном ответе, 0 — при отрицательном. Финальная модель прогнозирования

возникновения ИО у больных ОМЛ имела следующий вид: $\ln(p / (1 - p)) = -1,537 + \text{Принадлежность ко 2 генетической группе} * 0,287 - \text{AUC нейтрофилов} * 0,853 + \text{AUC лейкоцитов} * 0,324 + \text{режим} * 0,005$.

Таблица 3 — Финальная модель и характеристика ее предикторов

Показатель	ОШ	Тип переменной
Перехват*	0,215	Непрерывная
Принадлежность ко 2 генетической группе	1,333	Категориальная (да/нет)
AUC нейтрофилов	0,426	Непрерывная
AUC лейкоцитов	1,382	Непрерывная
Терапия	1,005	Непрерывная
Примечание — * — перехват является коэффициентом модели, оценивающим шанс развития ИО у теоретического пациента, у которого величина всех предикторов равна 0, либо референсному значению для категориальных переменных		

Полученная модель обладает точностью 71,5%, чувствительностью 71,7% и специфичностью 71,5%, AUROC 0,78, ROC кривая изображена на рисунке 1.

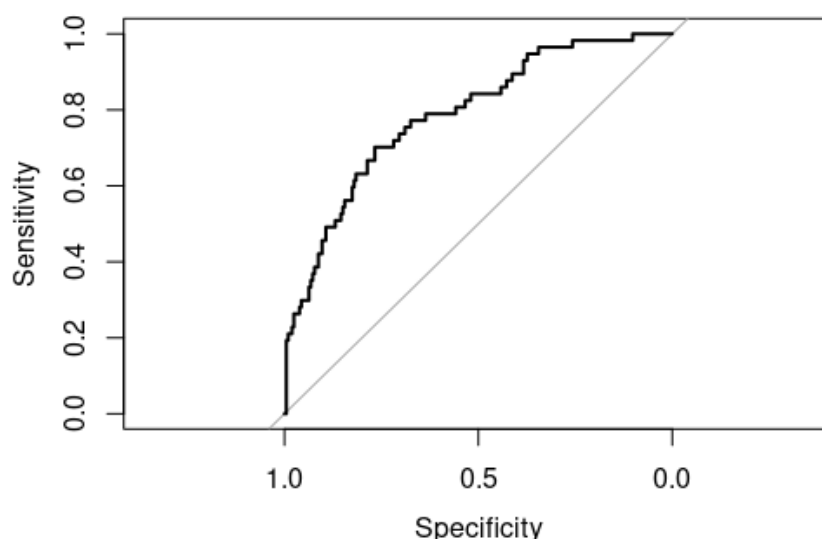


Рисунок 1 — ROC кривая модели на обучающей выборке

На основании ROC кривой выбран порог вероятности равный 0,21. В таблице 4 представлены данные о точности прогнозирования ИО на обучающих данных.

Таблица 4 — Точность классификации прогностической модели

Характеристика риска	Отсутствие ИО (n=165)	Развитие ИО (n=46)
Низкий	118	13
Высокий	47	33

Модель проверена на тестовом наборе данных (52 наблюдения, 11 с ИО), не использовавшихся для обучения с применением определенного ранее порога вероятности. Точность прогноза составила 78,8% с чувствительностью 81,8% и специфичностью 78,1%. Таким образом, разработанная модель позволяет прогнозировать возникновение тяжелых ИО у пациентов с ОМЛ учитывая клинические и генетические предикторы. В комбинации с ROC-анализом модель точно идентифицировала пациентов с ИО на независимой выборке.

Обсуждение. Согласно обновленной дорожной карте Европейского гематологического общества, одним из перспективных направлений исследований в области инфекций в гематологии является разработка клиничко-лабораторного подхода к антимикробной профилактике [4]. Вместе с этим известно, что оптимальной стратегией для профилактики ИО является риск-адаптированный подход [3]. На данный момент инструменты, позволяющие персонифицировано оценить необходимость и интенсивность профилактического подхода, отсутствуют. Прогностические шкалы MASCC и CISNE, использующиеся для прогнозирования течения фебрильной нейтропении, не предназначены для гематологических пациентов и не позволяют рассчитывать риск инфекций. Польскими исследователями предложена модель прогнозирования инфекций у больных ОМЛ, миелодиспластическим синдромом или хроническим миеломоноцитарным лейкозом, получающих терапию азацитидином [9]. Однако данная модель разработана на небольшой выборке пациентов с ОМЛ и не может применяться у больных, получающих другую терапию.

Одним из недостатков вышеописанных способов является опора только на фенотипические проявления заболевания и общеклинические лабораторные данные. Носительство полиморфных аллелей, изменяющих функцию или экспрессию задействованных в иммунном ответе белков, может влиять на эффективность противоинфекционной защиты организма и, следовательно, быть предиктором инфекций. Нами разработана прогностическая модель, учитывающая генетическую предрасположенность пациентов к развитию ИО, а также их клиничко-лабораторные данные.

Несмотря на высокие показатели точности, чувствительности и специфичности полученной модели, необходимо учесть ряд ее особенностей. Для обучения модели использовалась ретроспективная выборка одного гематологического центра, что может привести к наличию систематической ошибки в отборе пациентов. Относительно малый размер обучающих данных с небольшой частотой ИО также может быть причиной неточной оценки коэффициентов модели. Учитывая то, что часть рассмотренных предикторов относилась к маловариабельным характеристикам и при прохождении одним пациентом нескольких курсов ХТ не изменялась (например, пол) или менялась незначительно (возраст), их влияние на прогноз являлось слабым и из модели элиминировалось эластической сетью. В связи с этим целесообразным представляется добавление новых предикторов, имеющих большую вариативность у пациентов. Возможными кандидатами могут являться показатели иммунограммы, характеризующие состояние иммунной системы, такие как соотношение Т-лимфоцитов-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов (CD4/CD8), оценка фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови, концентрация цитокинов и т. д. Дискутабельным также является вопрос о корреляции вероятности возникновения ИО между несколькими курсами терапии, получаемыми одним пациентом. В случае наличия сильной корреляции, коэффициенты и их доверительные интервалы могут быть оценены слишком оптимистично, что может привести к низкой точности при использовании модели на практике.

Выводы. Определены основные методические подходы к прогнозированию тяжелых ИО у пациентов с ОМЛ. Разработана предварительная прогностическая модель, позволяющая персонифицировано оценивать риск тяжелых ИО перед проведением ХТ. Создание более точной предиктивной модели является выполнимой задачей, однако при ее разработке необходимо учитывать ряд дополнительных критериев. Применение проспективного дизайна, расширение выборки и числа предикторов может улучшить качество и точность.

Список литературы

1. Casadevall A., Pirofski L.A. What Is a Host? Attributes of Individual Susceptibility. // *Infect Immun.* - 2018. - Т86 №2. e00636-17.
2. Chantias I., Knecht P., Bonadies N. Efficacy of Primary Prophylaxis in Patients with MDS or AML Treated with Non-Intensive Agents: Systematic Review with Meta-Analysis. // *Blood.* -

2023. T.142. C. 6491.

3. Chapman S.J., Hill A.V. Human genetic susceptibility to infectious disease. // Nat Rev Genet. - 2012. T13. №3. - C. 175-188.

4. Cordonnier C., Ljungman P., Cesaro S., et al. The EHA Research Roadmap: Infections in Hematology. // Hemasphere. - 2021. - T5 №12. e662.

5. David Meyer, Evgenia Dimitriadou, Kurt Hornik, Andreas Weingessel and Friedrich Leisch (2019). e1071: Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien. R package version 1.7-2. <https://CRAN.R-project.org/package=e1071>

6. Friedman J., Tibshirani R., Hastie T. “Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent.” // Journal of Statistical Software. - 2010 – T.33 №1. -C. 1-22.

7. Hansen, B. A., Wendelbo, Ø., Bruserud, Ø., et al. Febrile Neutropenia in Acute Leukemia. Epidemiology, Etiology, Pathophysiology and Treatment. // Mediterranean journal of hematology and infectious diseases – 2020. – T. 12. – №1.

8. Hoffman T., Atamna A., Litchevsky V., et al. Fluoroquinolone Prophylaxis during Conventional Chemotherapy or Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Leukemia – Pros and Cons. // Acta Haematol – 2024. - T.147 №2. - C. 186–197.

9. Mądry K., Lis K., Biecek P., et al. Predictive Model for Infection Risk in Myelodysplastic Syndromes, Acute Myeloid Leukemia, and Chronic Myelomonocytic Leukemia Patients Treated With Azacitidine; Azacitidine Infection Risk Model: The Polish Adult Leukemia Group Study. // Clin Lymphoma Myeloma Leuk. - 2019. - T19 №5. - C. 264-274.e4.

10. McCarthy M.W., Walsh T.J. Prophylactic Measures During Induction for Acute Myeloid Leukemia. // Curr Oncol Rep. - 2017. - T.19 №3. - C. 18.

11. Nucci M., Anaissie E.J. Prevention of Infections in Patients with Hematological Malignancies. // Neoplastic Diseases of the Blood. - 2017. - C.1047-1062.

12. R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

13. Robin X., Turck N., Hainard A., Tiberti N., et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. // BMC Bioinformatics. - 2011 - T.12 - C. 77.

14. Stekhoven D. J., Bühlmann, P. MissForest - non-parametric missing value imputation for mixed-type data. // Bioinformatics. - 2012. - T.28 №1. - C. 112-118.

15. Taplitiz R.A., Kennedy E.B., Bow E.J., et al. Antimicrobial Prophylaxis for Adult Patients With Cancer-Related Immunosuppression: ASCO and IDSA Clinical Practice Guideline Update. // J Clin Oncol. - 2018. - T.36 №30 - C.3043-3054.

Т.Л. Кудрявцева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

T.L. Kudryavtseva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: tlkudryavtseva@gmail.com

Е.А. Попонина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

E.A. Poponina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

А.О. Пестрикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

A.O. Pestrikova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies

E-mail: pestrikova@niigpk.ru

Н.В. Исаева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории
клеточной и молекулярной иммунологии

N.V. Isaeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Cellular
and Molecular Immunology
E-mail: isaeva@niigpk.ru

М.Л. Морозова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

M.L. Morozova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: morozova@niigpk.ru

Ф.С. Шерстнев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и
процессинга гемопоэтических стволовых клеток

F.S. Sherstnev

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Transfusiology and Hematopoietic Stem Cell Processing
E-mail: sherstnev@niigpk.ru

Использование лейкоцитарных концентратов в качестве источника дендритных клеток

Use of leukocyte concentrates as a source of dendritic cells

Аннотация. Изучена возможность использования лейкоцитарных концентратов для получения дендритных клеток. В образцах доноров и онкогематологических больных выявлено высокое содержание моноцитов, а также интенсивная экспрессия основных маркеров миелоидной дифференцировки на них, что позволяет рассматривать лейкоконцентрат как приемлемый источник для выделения моноцитарных предшественников дендритных клеток.

Abstract. The possibility of using leukocyte concentrates to obtain dendritic cells has been studied. In samples from donors and oncohematological patients, a high content of monocytes was found, as well as intensive expression of the main markers of myeloid differentiation on them, which allows considering the leukocyte concentrate as an acceptable source for isolating monocytic precursors of dendritic cells.

Ключевые слова: дендритные клетки; лейкоцитарный концентрат; иммунофенотипирование; проточная цитометрия.

Index terms: dendritic cells; leukocyte concentrate; immunophenotyping; flow cytometry.

Введение. Дендритные клетки (ДК) – гетерогенная популяция клеток, относящихся к классу антигенпрезентирующих макрофагов. Незрелые ДК локализуются в дерме, слизистых оболочках, строме органов, после созревания перемещаются во вторичные лимфоидные органы, где заселяются в Т-зависимые зоны [3; 11]. Основной функцией ДК является захват антигенов, процессинг и представление их Т-лимфоцитам в ассоциации с молекулами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) [3; 10; 14]. В сравнении с другими антигенпрезентирующими клетками – В-лимфоцитами – ДК активнее в 1000 раз [3]. Это обусловлено высокой экспрессией на поверхности клеток мо-

лекул МНС, особенно МНС II класса, костимулирующих молекул (CD80, CD86, CD40), хемокиновых рецепторов, а также секрецией цитокинов. В результате ДК эффективно активируют наивные Т-лимфоциты, что позволяет рассматривать их как главные «профессиональные» антигенпрезентирующие клетки [3; 15; 16].

Создание вакцин на основе полученных *ex vivo* ДК является перспективным направлением противоопухолевой терапии, нацеленным на уничтожение злокачественных клеток через активирование иммунной системы с одновременным формированием иммунной памяти для предотвращения рецидивов заболевания. Способы изготовления дендритноклеточных вакцин могут существенно отличаться в зависимости от источников ДК, опухолевых антигенов, методов нагрузки и агентов, стимулирующих созревание клеток [2; 13].

Для получения ДК применяются различные подходы. В качестве их источника могут использоваться CD34⁺ клетки-предшественницы гемопоэза, содержащиеся в костном мозге, пуповинной крови и периферической крови. Кроме этого, возможно выделение моноцитов периферической крови, которые являются предшественниками ДК, с последующей цитокиновой стимуляцией их созревания в процессе культивирования [5; 8; 17; 21]. Искусственная дифференцировка позволяет получить существенно большие объемы клеточного материала. Сообщается, что качество ДК не зависит от того, кто являлся донором крови – здоровый человек или онкологический больной [4-7].

Наиболее часто моноциты получают из моноклеарной фракции периферической крови как наиболее доступного материала для выделения клеток иммунной системы человека [5; 7]. Для этого используют различные методы: центрифугирование в градиенте плотности, выделение клеток крови, обладающих повышенной адгезией к поверхности культурального пластика, магнитную селекцию CD14⁺ клеток, флотационные методы [8; 9; 19; 20]. Количество и чистота моноцитов зависит от способа выделения, однако Dohnal с соавторами [18] показали, что статистически значимых различий в фенотипе и функциональной активности ДК, полученных разными методами, не обнаружено [8]. Недостатком применения периферической крови является очень небольшое количество выделяемых ДК, причем выделение этой группы клеток сопровождается значительными потерями их численности [5; 12; 13].

Помимо указанных, в качестве источника моноцитов возможно использование лейкоцитарного концентрата, который заготавливается из крови доноров и больных при проведении мобилизации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из костного мозга в периферическую кровь с помощью гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) и применяется в терапии онкогематологических заболеваний. Мобилизованные ГСК концентрируют и собирают с помощью процедуры лейкоцитафереза. Лейкоконтрат, являясь продуктом клеточной сепарации, содержит большое количество лимфоцитов и моноцитов, что позволяет увеличить количество получаемых из него ДК [1].

Цель – оценить возможность использования лейкоцитарных концентратов доноров и онкогематологических больных в качестве источника дендритных клеток.

Материалы и методы. В исследование включены образцы лейкоконцентратов, полученные в 2023 году методом лейкоцитафереза из периферической крови доноров (n=9) и онкогематологических больных (n=20) клиники ФГБУН КНИИ-ГиПК ФМБА России с диагнозами множественная миелома (70%), нодулярный склероз при болезни Ходжкина (15%), плазмочитома экстрамедуллярная (10%), ангиоиммунобластическая Т-клеточная лимфома (5%). В группу доноров вошли 4 женщины и 5 мужчин в возрасте от 20 до 58 лет (медиана возраста – 34 года). Из общего числа больных 5 – мужчины, 15 – женщины, медиана возраста – 55 лет (от 30 до 65 лет). Иммунофенотипический анализ образцов проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США) с использованием антител к CD45, CD14, CD33, CD123^{low}, CD11c, CD13, CD80. Моноцитарный гейт локализовали по средней экспрессии антигена CD45 и среднему значению «гранулярности» мононуклеарных элементов.

Для статистического анализа результатов использовали программы STATISTICA v.10.0 и Microsoft Excel. Данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (Q25; Q75). С помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни оценивали связь между иммунофенотипическими характеристиками доноров и больных. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Содержание моноцитов в лейкоконцентратах доноров составило 33,1% (28,9; 40,4), у больных – 35,9% (30,0; 45,8). Для сравнения доля моно-

цитов среди основных популяций лейкоцитов в периферической крови доноров была на уровне 6,6% (6,1; 7,8), больных – 8,9% (7,0; 11,3). Результаты иммунофенотипирования моноцитарного гейта представлены в таблице.

Таблица – Иммунофенотипическая характеристика моноцитарного гейта

Маркеры	Доноры (n=9), %	Онкогематологические больные (n=20), %	p
CD14	93,5 (91,3; 94,9)	89,6 (85,3; 93,0)	0,005
CD33	98,4 (97,2; 99,0)	93,2 (87,6; 97,0)	0,001
CD123 ^{low}	98,2 (97,0; 99,4)	98,7 (97,2; 99,4)	0,681
CD11c	98,1 (93,0; 99,3)	97,5 (94,6; 98,2)	0,418
CD13	98,5 (93,6; 99,4)	97,9 (96,4; 98,9)	0,594
CD80	0,5 (0,2; 4,3)	1,6 (0,7; 4,4)	0,155

Характерным маркером для моноцитарных предшественников ДК является CD14 (у доноров CD14 составил от 88,7 до 97,1%, у пациентов – от 58,1 до 97,3%), представляющий собой рецептор для обнаружения бактериального липополисахарида. Высокая экспрессия CD14 – характеристика незрелости ДК, процесс дифференцировки моноцитов в ДК сопровождается утратой данного маркера. Можно утверждать, что лейкоконцентраты, заготовленные из мобилизованной крови, могут быть источником моноцитов для получения ДК.

Высокая экспрессия CD11c (интегрин), CD123^{low} (α-цепь рецептора к IL-3), а также CD13 (аминопептидаза) и CD33 (семейство иммуноглобулинов) подтверждает миелоидное происхождение клеток.

Важным показателем зрелости ДК считается появление костимуляторных молекул, играющих роль активаторов Т-лимфоцитов. CD80 представляет собой высокогликозилированный одноцепочечный белок, лигандами для которого служат молекулы, экспрессируемые на Т-лимфоцитах (CD28 и CD152). Контакт CD80 с лигандами обеспечивает проведение костимуляторных сигналов, которое приводит к активации, пролиферации и дифференцировке Т-клеток [3]. Низкий уровень данного маркера свидетельствует о том, что клетки не достигли зрелости.

Полученные значения экспрессии маркеров CD123^{low}, CD11c, CD13, CD80 в лейкоконcentратах доноров оказались сопоставимы со значениями экспрессии в лейкоконcentратах больных ($p>0,05$). Различие маркеров CD14 и CD33 между группами статистически значимо ($p=0,005$ и $p=0,001$ соответственно).

Заключение. Лейкоцитарные концентраты характеризуются высоким содержанием моноцитов, интенсивной экспрессией маркеров миелоидной дифференцировки CD14, CD33, CD123^{low}, CD11c, CD13, а также низким уровнем CD80, что свидетельствует об отсутствии зрелых ДК в моноцитарном пуле. Статистически значимых различий в иммунофенотипе клеточного продукта, полученного от доноров или онкогематологических больных, не выявлено, за исключением маркеров CD14 и CD33. Таким образом, лейкоконцентрат как источник моноцитов можно считать приемлемым для оптимизации технологии получения ДК и их культивирования.

Список литературы

1. Абсолютное количество гемопоэтических стволовых клеток CD34+ в периферической крови перед процедурой лейкафереза как параметр, прогнозирующий эффективность сбора стволовых клеток / И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Т.В. Гапонова [и др.]. – DOI 10.17116/terarkh201789718-24 // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89, № 7. – С. 18-24.
2. Грибкова И.В. Множественная миелома и вакцины на основе дендритных клеток / И.В. Грибкова, А.А. Завьялов. – DOI 10.21320/2500-2139-2021-14-3-370-377 // Клиническая онкогематология. – 2021. – Т. 14, № 3. – С. 370-377.
3. Грищенко Е.А. Дендритные клетки: основные представления // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2015. – № 2 (41). – С. 9-17.
4. Дендритноклеточные вакцины в иммунотерапии больных солидными опухолями : учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования / И.А. Балдуева, Т.Л. Нехаева, С.А. Проценко [и др.]. – СПб.: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. – 128 с. – ISBN 978-5-6042210-8-2.
5. Зависимость экспрессии дендритными клетками рецептора CCR7 от способа стимуляции созревания / С.В. Сазонов, Ф.А. Фадеев, А.Д. Никанорова, А.В. Замятин – DOI 10.22138/25000918-2022-19-1-14-22 // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2022. – Т. 19, № 1. – С. 14-22.
6. Криоконсервация дендритных клеток человека для клинического применения / Г.З. Чкадуа, А.А. Борунова, И.Б. Шоуа [и др.]. – DOI 10.17650/1726-9784-2019-18-4-65-75 // Российский биотерапевтический журнал. – 2019. – Т. 18. – С. 65-75.

7. Методы исследования дендритных клеток человека, применимые для оценки действия вакцин / В.Ю. Талаев, М.В. Светлова, И.Е. Заиченко [и др.]. – DOI 10.35627/2219-5238/2021-337-4-87-94 // Здоровье населения и среда обитания. – 2021. – № 4 (337). – С. 87-94.
8. Назаркина Ж.К. Получение дендритных клеток для иммунотерапии раковых заболеваний / Ж.К. Назаркина, П. П. Лактионов. – DOI 10.18097/PBMC20156101030 // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 30-40.
9. Нехаева Т.Л. Оптимизация технологии и стандартизация получения противоопухолевых вакцин на основе аутологичных дендритных клеток : специальность 14.01.12 «Онкология», 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Нехаева Татьяна Леонидовна ; ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова». – Санкт-Петербург, 2014. – 174 с.
10. Нечаева А.С. Достижения и перспективы дальнейшего развития дендритно-клеточной вакцинотерапии пациентов со злокачественными глиальными опухолями / А.С. Нечаева, К.К. Куканов. – DOI 10.18705/2782-3806-2023-3-3-79-90 // Российский журнал персонализированной медицины. – 2023. – Т. 3, № 3. – С. 79-90.
11. Павленко В.И. Клетки и органы иммунной системы : учебное пособие / В.И. Павленко, И.Ю. Саяпина. – Благовещенск, 2017. – 124 с.
12. Патент № 2392946 Российская Федерация, МПК А61К 35/00 (2006.01), А61Р 35/00 (2006.01). Аутологичная вакцина для лечения онкологических заболеваний и способ ее получения : № 2008131594/15 : заявл. 30.07.2008 : опубл. 27.06.2010 / Волгушев С.А., Богдашин И.В., Теплова Н.В. [и др.]; заявитель ЗАО «Клеточные технологии». – 12 с.
13. Получение дендритных клеток для терапии онкологических заболеваний / Ф.А. Фадеев, А.В. Замятин, Д.В. Седнева-Луговец [и др.]. – DOI 10.22138/2500-0918-2020-17-4-347353 // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 347-353.
14. Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток: от экспериментов на животных моделях до клинических испытаний / О.В. Марков, Н.Л. Миронова, В.В. Власов, М.А. Зенкова. – DOI 10.32607/20758251-2017-9-3-27-38 // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, № 3. – С. 27-38.
15. Тыринова Т.В. Цитотоксическая активность дендритных клеток против клеток глиобластомы: медиаторы, механизмы регуляции и возможности направленной коррекции : специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Тыринова Тамара Викторовна ;

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии». – Новосибирск, 2019. – 229 с.

16. Фалалеева С.А. Фенотипическая и функциональная характеристика миелоидных и плазмцитоидных дендритных клеток больных ревматоидным артритом : специальность 14.03.09 «Клиническая иммунология, аллергология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Фалалеева Светлана Алексеевна ; ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии». – Новосибирск, 2016. – 112 с.

17. A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cells from adult CD34+ progenitor cells / T. Luft, K.C. Pang, E. Thomas [et al.] // Exp Hematol. – 1998. – Vol. 26, N 6. – P. 489-500.

18. Comparative evaluation of techniques for the manufacturing of dendritic cell-based cancer vaccines / A.M. Dohnal, S. Graffi, V. Witt [et al.]. – DOI 10.1111/j.1582-4934.2008.00304.x // J Cell Mol Med. – 2009. – Vol. 13, N 1. – P. 125-135.

19. Development of a HIV-1 lipopeptide antigen pulsed therapeutic dendritic cell vaccine / A. Cobb, L.K. Roberts, A.K. Palucka [et al.]. – DOI 10.1016/j.jim.2010.11.002 // J Immunol Methods. – 2011. – Vol. 365, N 1-2. – P. 27-37.

20. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories / T.G. Berger, B. Feuerstein, E. Strasser [et al.]. – DOI 10.1016/s0022-1759(02)00189-8 // J Immunol Methods. – 2002. – Vol. 268, N 2. – P. 131-140.

21. Lim F.T. Characterization of the human CD34+ hematopoietic progenitor cell compartment during the second trimester of pregnancy / F.T. Lim, H.H. Kanhai, J.H. Falkenburg // Haematologica. – 2005. – Vol. 90, N 2. – P. 173-179.

УДК 616.419

ГРНТИ 76.29.33

М.В. Лагунова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

M.V. Lagunova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Hematologist of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation
E-mail: lagunovamv@niigpk.ru

Н.А. Зорина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук
заведующая отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга

N.A. Zorina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Candidate of medical sciences
Head of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation
E-mail: zorina@niigpk.ru

Н.В. Минаева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук
заместитель директора по лечебной работе

N.V. Minaeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Candidate of medical sciences

Deputy Director for Medical Work

E-mail: mnvgem@gmail.com

М.Н. Хоробрых

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач-гематолог отделения химиотерапии и трансплантации костного мозга

M.N. Khorobrykh

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov

Hematologist of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation

E-mail: horobryh@niigpk.ru

Ранние осложнения ауто-ТГСК у пожилых больных с множественной миеломой

Early complications of auto-HSCT in elderly patients with multiple myeloma

Аннотация. В статье представлены результаты сравнительного анализа частоты возникновения ранних посттрансплантационных осложнений у 126 пациентов с множественной миеломой, получивших аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток в ФБГУН КНИИГиПК ФМБА России с 2020 по 2023 гг. Установлено, что у больных 60 лет и старше чаще развивалась фебрильная нейтропения и кардиологическая токсичность, но частота жизнеугрожающих осложнений не различалась.

Abstract. The article presents the results of a comparative analysis of the incidence of early posttransplant complications in 126 patients with multiple myeloma who received autologous hematopoietic stem cell transplantation in our center from 2020 to 2023. It was found that febrile neutropenia and cardiologic toxicity were more common in patients 60 years of age and older, but the frequency of life-threatening complications did not differ.

Ключевые слова: множественная миелома; пожилые пациенты; аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; посттрансплантационные осложнения.

Index terms: multiple myeloma; elderly patients; autologous hematopoietic cells transplantation; post-transplant complications.

Введение. Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) при множественной миеломе (ММ) является эффективным методом консолидации ответа на терапию. Соответственно росту проводимых ТГСК увеличивается и количество исследований, направленных на изучение их безопасности, в том числе, на оценку эффективности шкал риска трансплантационной летальности. Согласно действующим клиническим рекомендациям, кандидатами на ауто-ТГСК являются пациенты до 65 лет, или 65-70 лет с хорошим соматическим статусом [1]. Эпидемиологическая особенность ММ заключается в том, что медиана возраста больных — 70 лет, поэтому актуален вопрос о безопасности и эффективности ауто-ТГСК у пожилых.

Sanchez L. et al. сравнили данные 2209 пациентов с ММ, разделенных на 2 группы: молодые (в возрасте до 65 лет; медиана 59 лет) (n=1650) и пожилые (в возрасте 65 лет и старше; медиана 68 лет) (n=559 чел) [4]. У пациентов старшей возрастной группы чаще встречались инфекционные и неинфекционные осложнения, в том числе жизнеугрожающие: тяжелый сепсис, септический шок, пневмония, острая дыхательная недостаточность, острая почечная недостаточность, аритмии, более высокая потребность в ИВЛ, чем у более молодых пациентов. У больных старшей возрастной категории больше длительность госпитализации (18,6 vs 16,8 дней) и выше стоимость лечения, чем у молодых пациентов. Мукозит, в том числе 3-4 степени чаще развивался у больных в возрасте до 65 лет. Не было значимой разницы между когортами по частоте и тяжести гематологической токсичности, ранней трансплантационной летальности.

Isabel Sanchez-Ortega et al. проанализировали 21390 ауто-ТГСК, 17531 из которых были проведены пациентам в возрасте 65-69 лет (группа 1) и 3859 – в возрасте 70 лет и старше (группа 2) [3]. Основным ранним осложнением после ауто-ТГСК был мукозит (67,5%). Частота посттрансплантационных осложнений в разных возрастных группах не различалась. Исследователи отметили, что пациенты старше 65 лет тщательно отбираются при подготовке к трансплантации с учетом их коморбидного статуса, что влияет на качество анализа.

Цель. Провести сравнительный анализ частоты осложнений ауто-ТГСК у больных ММ разных возрастных категорий.

Материалы и методы. Проанализированы данные 126 пациентов с ММ, которым проведена высокодозная химиотерапия (ВДХТ) с последующей ауто-ТГСК в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с 2020 по 2023 гг..

Выполнено сравнение групп больных разного возраста по частоте развития инфекционных и неинфекционных ранних посттрансплантационных осложнений. Пациенты разделены на 2 группы. В первую группу выделены пациенты моложе 60 лет (n=76), во вторую – от 60 до 69 лет (n=50). Пациенты старше 60 лет проходили более тщательный отбор в качестве кандидатов для ауто-ТГСК, заключающийся в исключении из исследования наиболее коморбидных больных. Основные демографические характеристики обследуемых, статус заболевания представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристика пациентов

Характеристика пациентов	Возраст, лет		P-value
	<60	60-69	
Общее количество	76	50	-
Мужчины	39 (51,3%)	20 (40%)	0,213
Женщины	37 (48,7%)	30 (60%)	
Медиана возраста, лет	52±6,6	62±2,5	-
Риск (HCT-CI)			
Низкий	52 (68,4%)	31 (62%)	0,009
Средний	24 (31,6%)	13 (26%)	
Высокий	0 (0%)	6 (12%)	
Риск (R-MCI)			
Низкий	76 (100%)	36 (72%)	<0,001
Средний	0	12 (24%)	
Высокий	0	2 (4%)	
Предлеченность (более 2 линий терапии до аутоТГСК)	15 (19,7%)	3 (6%)	0,032
Первичная резистентность	16 (21,1%)	10 (20%)	0,887
Статус до ауто-ТГСК			
ОХЧР и ПР	63 (82,9%)	48 (96%)	0,027
ЧР	13 (17,1%)	2 (4%)	

Примечания:

1 ОХЧР — очень хорошая частичная ремиссия

2 ПР – полная ремиссия

3 ЧР — частичная ремиссия

Наименьший возраст пациента 1 группы был 34 года, наибольший – 59 лет, медиана возраста – $52 \pm 6,6$ лет. Соотношение мужчин и женщин составило 1:1. В этой группе наибольшая предлеченность отмечена у 15 пациентов (19,7%), первичная резистентность – у 16 (21,1%). Статус заболевания перед проведением ауто-ТГСК: ОХЧР и ПР констатированы у 63 (82,9%) пациентов, ЧР — у 13 (17,1%). При оценке коморбидного статуса по шкале НСТ-СІ к группе низкого риска отнесены 52 пациента (68,4%), к группе среднего риска – 24 (31,6%), больных высокого риска не выявлено. По шкале R-MCI к группе низкого риска относятся все 76 пациентов (100%).

Возраст больных 2 группы был от 60 до 69 лет, 6 пациентов (12%) старше 65 лет. Медиана возраста $62 \pm 2,5$ года. Женщины составляли 60% ($n=30$). ОХЧР и ПР перед проведением ВДХТ констатированы у 48 пациентов (96%), ЧР – у 2 (4%). Трое больных (6%) получили две и более линии терапии до ауто-ТГСК, первичная резистентность зафиксирована у 10 человек (20%). Пациенты данной группы ожидаемо имели менее благоприятный коморбидный статус, чем в 1 группе: по шкале НСТ-СІ 13 больных (62%) отнесены к низкому риску, 13 (26%) – к среднему и 6 (12%) – к высокому. По шкале R-MCI к группе низкого риска отнесены 36 пациентов (72%), к группе среднего – 12 (24%), к группе высокого – 2 (4%). Статистическая значимость различий определялась по методу Хи-квадрат, уровень значимости $p=0,05$.

Результаты и обсуждение. В таблице 2 представлены ранние посттрансплантационные осложнения у больных разных возрастных групп. У пациентов 60 лет и старше чаще развивалась фебрильная нейтропения ($p=0,01$) по сравнению с больными моложе 60 лет. У пациентов молодого возраста прослеживалась тенденция к более частой встречаемости сепсиса, синусита и токсического гепатита, чем у пожилых больных.

У пациентов 2 группы чаще развивалась кардиологическая токсичность ($p=0,005$), чем у больных 1 группы. Других статистически значимых различий по частоте встречаемости посттрансплантационных осложнений между 2 группами не выявлено.

Таблица 2 — Частота ранних инфекционных и неинфекционных осложнений ауто-ТГСК

Посттрансплантационные осложнения	Возраст, лет		P-value
	<60	60-69	
Инфекционные осложнения			
Фебрильная нейтропения	37 (48,7%)	36 (72%)	0,01
Сепсис	6 (7,9%)	1 (2%)	0,158
Синусит	3 (3,9%)	0	0,156
Пневмония	4 (5,3%)	2 (4%)	0,745
Инфекция мягких тканей	2 (2,6%)	0	0,248
Катетер-ассоциированная инфекция	1 (1,3%)	0	0,416
Клостридиальный колит	4 (5,3%)	4 (8%)	0,538
Вирусная инфекция	3 (3,9%)	3 (6%)	0,597
Использование системных антибиотиков	75 (98,6%)	46 (92%)	0,061
Использование антибиотиков резерва	19 (25%)	10 (20%)	0,515
Введение Г-КСФ	75 (98,7%)	47 (94%)	0,143
Неинфекционные осложнения			
Мукозит	73 (96%)	49 (98%)	0,542
>= 2 степени	14 (19,2%)	7 (14,3%)	0,483
Энтеропатия	38 (50%)	24 (48%)	0,827
>= 2 степени	10 (26,3%)	5 (20,8%)	0,624
Токсический дерматит	0	2 (4%)	0,079
Токсический гепатит	10 (13,2%)	2 (4%)	0,087
Токсическая нефропатия	0	1 (2%)	0,216
Токсический панкреатит	15 (19,7%)	6 (12%)	0,255
Кардиологическая токсичность (неконтролируемая АГ*, ухудшение ХСН**, аритмия)	0	5 (10%)	0,005
Ранняя трансплантационная летальность	1 (1,3%)	0	0,416

Примечания

1 АГ – артериальная гипертензия

2 ХСН – хроническая сердечная недостаточность

Заключение. Установлено, что у больных 60 лет и старше чаще развивается фебрильная нейтропения ($p=0,01$), кардиологическая токсичность ($p=0,005$), но частота нежелательных явлений 3-4 степени (СТСАЕ 5.0) не увеличивалась по сравнению с частотой этих осложнений у больных моложе 60 лет. Посттрансплантационная летальность была низкой и сопоставима во всех группах.

У пациентов молодого возраста отмечена тенденция к более частой встречаемости сепсиса, синусита и токсического гепатита, чем у пожилых, что, вероятнее, обусловлено более высокой интенсивностью режимов кондиционирования. У пожилых больных зафиксирована тенденция к более частой встречаемости токсического дерматита, чем у пожилых.

Список литературы

1. Множественная миелома: клинические рекомендации от 2020 // Рубрикатор клинических рекомендаций: [сайт]. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/144_1 (дата обращения: 15.05.2024).
2. Autologous Stem Cell Transplantation in Elderly Patients is Safe and is not associated with a Higher Frequency of Readmission Compared to Younger Patients. A Single Center Experience / M. Farina, C. Crippa, E. Cerqui, R. Daffini, G. Soverini, D. Dalceggio [et al.]. - DOI 10.26420/annhematoloncol.2018.1222 // Annals of Hematology & Oncology. - 2018. - Vol. 5, №8.
3. Autologous Hematopoietic Cell Transplantation in Elderly Patients Aged 65 and Older: A Retrospective Analysis By the Complications and Quality of Life Working Party of the EBMT / I. Sánchez-Ortega, G. W. Basak, E. Beohou [et al.] // Blood. - 2016. - Vol. 128, №22.
4. In-Hospital Mortality and Post-Transplantation Complications in Elderly Multiple Myeloma Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Population-Based Study / L. Sanchez, M. Sylvester, R. Parrondo, V. Mariotti [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. - 2017. - Vol.23, №7.

УДК: 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

А. А. Ларионова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач-онколог клинико-диагностического отделения гематологии и
химиотерапии

A. A. Larionova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Oncologist of the Clinical Diagnostic Department of Hematology and Chemotherapy
E-mail: babikovaa97@yandex.ru

С. В. Самарина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий клинико-диагностического отделения
гематологии и химиотерапии

S. V. Samarina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Clinical Diagnostic Department of
Hematology and Chemotherapy
E-mail: samarinasv2010@mail.ru

Обинутузумаб в сравнении с ритуксимабом в иммунохимиотерапии первой линии при фолликулярной лимфоме

Obinutuzumab versus rituximab in first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma

Аннотация. Проведен анализ терапии первой линии при фолликулярной лимфоме, включающей ритуксимаб/обинутузумаб содержащие схемы (RB/R-CHOP и GB/G-CHOP), у 51 пациента, наблюдавшегося в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» с января 2021 г. по апрель 2024 г.

Abstract. The analysis of first-line therapy for follicular lymphoma, including rituximab/obinutuzumab containing regimens (RB/R-CHOP and GB/G-CHOP), in 51 patients observed at the Federal State Budgetary Institution of Science «Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of the Federal Medical and Biological Agency» from January 2021 to April 2024.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома; анти-CD20 моноклональные антитела; ритуксимаб; обинутузумаб.

Index terms: follicular lymphoma; anti-CD20 monoclonal antibodies; rituximab; obinutuzumab.

Введение. Фолликулярная лимфома (ФЛ) является наиболее распространенным типом вялотекущих неходжкинских лимфом. Чаще всего она встречается у людей среднего возраста [2]. На момент постановки диагноза средний возраст больных ФЛ в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России составлял 50 лет.

Лечение фолликулярной лимфомы зависит от стадии заболевания на момент постановки диагноза. Спонтанные регрессии возникают примерно в 5–10% случаев [3,4]. Пациенты могут изначально находиться под наблюдением, при этом большинству из них потребуется терапия в среднем через три-четыре года после постановки диагноза [5]. При распространенных стадиях и прогрессировании ФЛ наиболее часто применяют режимы терапии с использованием анти-CD моноклональных антител - ритуксимаба или обинутузумаба. Выбор схемы лечения в зависимости от различных цитологических, клинических и лабораторных характеристик пациентов остается предметом дискуссий [2, 6].

Перед началом терапии проводится клиническая оценка больных, их общий соматический статус, наличие или отсутствие сопутствующей патологии. При выборе схемы химиотерапии в сочетании с ритуксимабом или обинутузумабом принято ориентироваться на особенности пациента и характеристики опухоли,

например, большая опухолевая масса (bulky), является предиктором неблагоприятного прогноза ФЛ [7].

Несмотря на то, что иммунохимиотерапия на основе ритуксимаба значительно улучшила результаты лечения больных с ранее не леченной ФЛ, у большинства из них наблюдаются рецидивы и более короткая продолжительность ремиссии при последующих курсах лечения [8,9]. У 20% пациентов прогрессирование заболевания происходит в течение 2 лет после начала лечения с помощью терапии первой линии (POD24), причем раннее прогрессирование связано с низкой общей выживаемостью (ОВ) [10].

Обинутузумаб - это гликоинженерное моноклональное антитело II типа против CD20, обладающее меньшей зависимой от комплемента цитотоксичностью, но большей зависимой от антител клеточной цитотоксичностью, фагоцитозом и прямым уничтожением В-клеток, чем ритуксимаб [11].

В рандомизированном исследовании GALLIUM [2] показано, что в лечении первой линии при ФЛ индукция и поддерживающая терапия на основе обинутузумаба продлевает продолжительность безрецидивной выживаемости по сравнению со схемами на основе ритуксимаба.

Цель. Проанализировать эффективность обинутузумаба в сравнении с ритуксимабом в иммунохимиотерапии первой линии при фолликулярной лимфоме.

Материалы и методы. В исследование включен 51 пациент с ФЛ за период с января 2021 г. по апрель 2024 г. Курсы иммунохимиотерапии проводились во взрослом отделении гематологии и химиотерапии и клинико-диагностическом отделении гематологии и химиотерапии с дневным стационаром ФГБУН КНИИ-ГиПК ФМБА России.

Пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа - получающие лечение в первой линии терапии при ФЛ по ритуксимаб-содержащим схемам RB (ритуксимаб, бендамустин)/ R-CHOP (ритуксимаб, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, преднизолон); вторая группа - получающие лечение в первой линии терапии при ФЛ по обинутузумаб-содержащим схемам GB (обинутузумаб, бендамустин)/ G-CHOP (обинутузумаб, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, преднизолон).

Характеристика групп больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика пациентов

Клинико-лабораторные параметры	1 группа	2 группа
Медиана возраста, годы	55	44
Мужчины, абс	13	4
Женщины, абс	27	7
Стадии Ann Arbor		
I-II, абс	10	1
III, абс	13	4
IV, абс	17	6
FLIPi группы риска		
низкий (0-1), абс	16	2
промежуточный (2), абс	11	4
высокий (3 и более), абс	13	5

Оценка ответа на лечение проводилась в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по лимфомам в 2007 году. Для оценки безрецидивной выживаемости (БРВ) использовался статистический метод Каплайн – Майера [1]. Сравнивали две кривые с помощью логарифмического рангового теста.

Результаты и обсуждение. Из 40 пациентов, получивших иммунохимиотерапию в первой линии терапии ФЛ с использованием ритуксимаба, полная ремиссия достигнута у 37 больных, у двоих выявлено прогрессирование заболевания после 6 курсов индукционной терапии, у одной была установлена стабилизация процесса. У шести пациентов в дальнейшем развился рецидив заболевания, из них 3 в течение 2 лет после начала иммунохимиотерапии, у 3 выявлен поздний рецидив.

Терапию по схемам GB и G-CHOP получили 11 больных, из них полного ответа достигли 11 (100%). Выполнен анализ БРВ пациентов в обеих группах. Использован статистический метод Каплайн – Майера (рисунок 1).

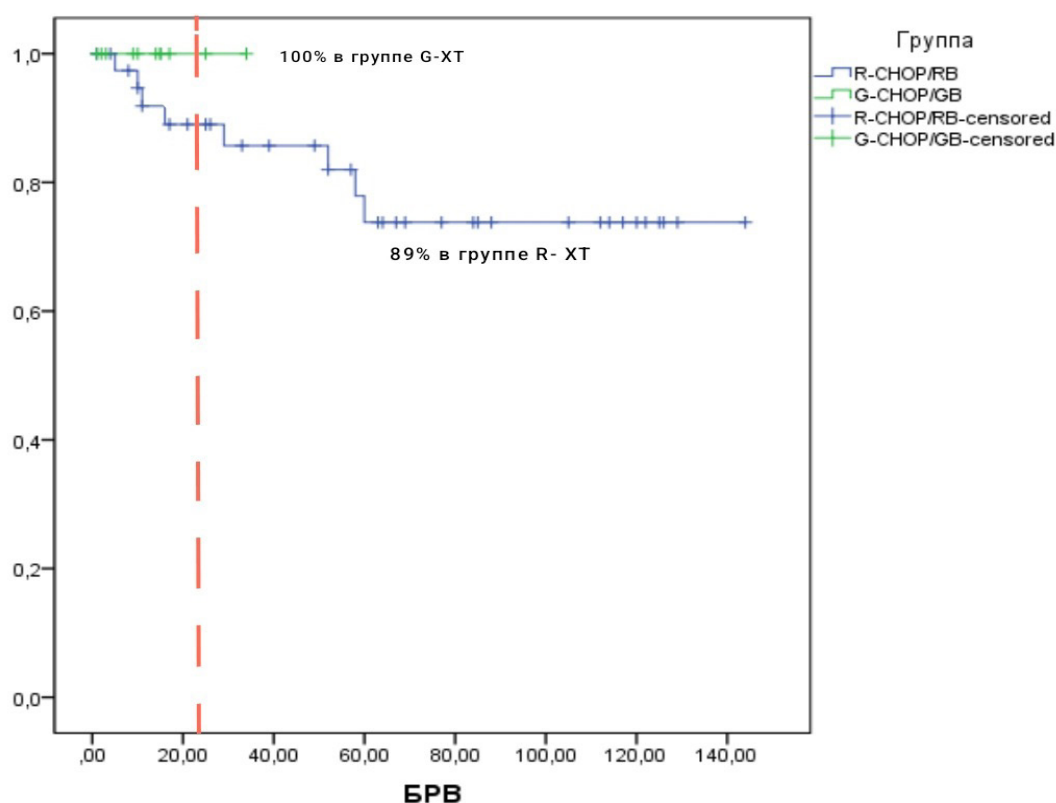


Рисунок 1 - БРВ пациентов ФЛ на терапии RB/R-CHOP и GB/CHOP

Статистической значимости не выявлено ($p=0,399$). Двухлетняя БРВ в 1 группе (с ритуксимабом) составила 89% ($n=35$), во 2 группе (с обинутузумабом) -100% ($n=11$).

Выводы

1. Пациенты, получившие индукционную иммуннохимиотерапию с применением обинутузумаба в 100% случаев достигли полного ответа и находятся в процессе поддерживающей терапии обинутузумабом.

2. Обинутузумаб в составе иммуннохимиотерапии с дальнейшей поддерживающей терапией обинутузумабом в 1 линии терапии ФЛ позволяет достигать более быстрых и глубоких ответов по сравнению с ритуксимабом, а также с тенденцией к увеличению БРВ и времени до следующей линии терапии.

Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. // Пер. с англ., М: Практика 1999; 380 с.
2. Townsend W., Hiddemann W., Buske C. Obinutuzumab Versus Rituximab Immunotherapy in Previously Untreated iNHL: Final Results From the GALLIUM Study// Hemasphere.- 2023/- Jul; 7(7): e919.
3. Gattiker H.H., Wiltshaw E., Galton D.A. Spontaneous regression in non-Hodgkin's lymphoma// Cancer.- 1980.- 45:2627.
4. The natural history of low grade non-Hodgkin's lymphoma and the impact of a no initial treatment policy on survival/ O'Brien M.E., Easterbrook P., Powell J. [et al.] //Q.J. Med. 1991; 80:651.
5. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial/ Ardeshta KM, Smith P, Norton A. [et al.]// Lancet.- 2003; 362:516.
6. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up/ Dreyling M, Ghielmini M, Rule S. [et al.]// Ann Oncol.- 2021; 32:298.
7. Malignant lymphoma. 1. The histology and staging of 473 patients at the National Cancer Institute/ Anderson T., Chabner B.A., Young R.C. [et al.]// Cancer.- 1982; 50:2699.
8. Sustained Progression-Free Survival Benefit of Rituximab Maintenance in Patients With Follicular Lymphoma: Long-Term Results of the PRIMA Study/ Bachy E., Seymour J.F., Feugier P. [et al.]// J. Clin. Oncol.- 2019; 37:2815.
9. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group/ Hiddemann W., Kneba M., Dreyling M. [et al.]// Blood.- 2005; 106:3725.
10. Seymour J. F., Marcus R., Davies A. Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression// Haematologica.- 2019.- Jun; 104(6): 1202–1208.
11. Association of early disease progression and very poor survival in the GALLIUM study in follicular lymphoma: benefit of obinutuzumab in reducing the rate of early progression/ Seymour J.F., Marcus R., Davies A. [et al.]// Haematologica.- 2019; 104:1202.

УДК 616.411-006.441

ГРНТИ 76.29.33

М.С. Минаев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

M.S. Minaev

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Junior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: minaev@niigpk.ru

Е.В. Ванеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патоморфологии

E.V. Vaneeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: vaneeva@niigpk.ru

Н.В. Глубоковских

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови

Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии

N.V. Glubkovskikh

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Laboratory Research Assistant of the Laboratory of Pathomorphology

mazda_n@mail.ru

Д.А. Дьяконов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии

D.A. Dyakonov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: dyakonov@niigpk.ru

Роль опухолевого микроокружения в прогнозе течения нодулярного склероза классической лимфомы Ходжкина

The Role of the Tumor Microenvironment in Predicting the Course of Nodular Sclerosis Classical Hodgkin Lymphoma

Аннотация. Классическая лимфома Ходжкина – клональное В-клеточное онкогематологическое заболевание, развивающееся преимущественно в молодом возрасте. Изучение роли опухоли-ассоциированного микроокружения при данном заболевании является важной задачей. В работе представлены данные о гистопатологических характеристиках и прогностическом значении макрофагально-гистиоцитарных и гранулоцитарных элементов, В- и Т-клеток опухолевого микроокружения при нодулярном склерозе классической лимфомы Ходжкина.

Abstract. Classical Hodgkin lymphoma is a clonal B-cell hematologic malignancy that primarily develops in young adults. Investigating the role of the tumor-associated microenvironment in this disease is a critical task. This study presents data on the histopathological characteristics and prognostic significance of macrophage-histiocytic cells and granulocytes, as well as B- and T-cells in the tumor microenvironment of nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma.

Ключевые слова: нодулярный склероз; прогноз; макрофаги; гранулоциты; В-лимфоциты; Т-клетки.

Index terms: nodular sclerosis; prognosis; macrophages; granulocytes; B-lymphocytes; T-cells.

Введение. Нодулярный склероз (НС кЛХ) – самый распространенный гистологический подтип классической лимфомы Ходжкина, на долю которого приходится до 70% от всех случаев [4,7]. Он характеризуется своеобразной гистоархитектоникой за счет выраженных фиброзных процессов, которые формируют характерный только для этого гистологического варианта нодулярный паттерн [1,2]. Морфологический субстрат в подавляющем большинстве представлен полиморфным клеточным микроокружением, относительное содержание опухолевых клеток Ходжкина и Березовского-Рид-Штернберга (ХБРШ) составляет не более 10% от всего клеточного объема (рисунок 1).

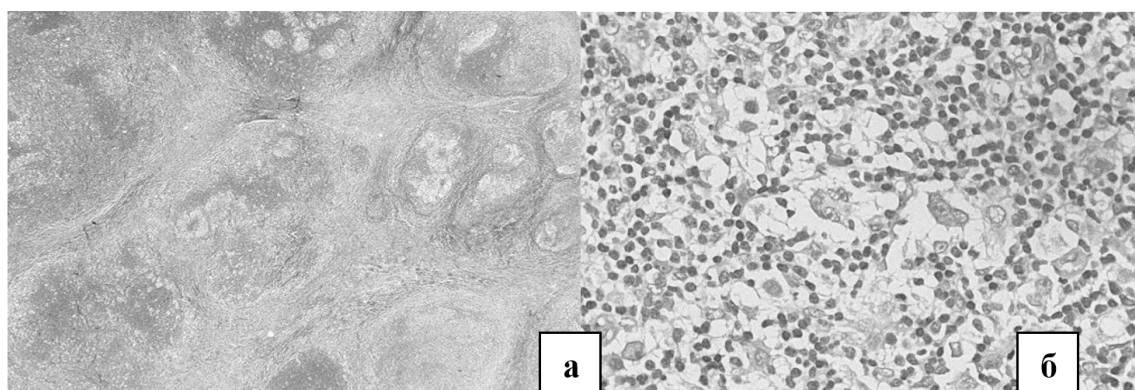


Рисунок 1 – Морфологический паттерн нодулярного склероза классической лимфомы Ходжкина, окраска: гематоксилин-эозин, х50 (а); клеточное микроокружение и клетки Ходжкина и Березовского-Рид-Штернберга, окраска: гематоксилин-эозин, х400 (б)

На сегодняшний день существуют эффективные терапевтические решения, позволяющие достичь хороших показателей выживаемости и качества жизни при данном заболевании [3,6]. Но несмотря на это, довольно часто регистрируются резистентные/рецидивирующие (р/р) формы, на долю которых приходится до 30% случаев. Многие исследователи отмечают, что фенотипическая и функциональная пластичность, а также количественные и качественные характеристики реактивного опухолевого микроокружения могут служить основой для стратификации пациентов в дебюте заболевания, способствовать разработке новых, персонализированных подходов к терапии кЛХ [5,8]. Поэтому поиск новых прогностических критериев и определение дополнительных терапевтических мишеней с целью достижения еще более высоких показателей успешного лечения и качества жизни – перспективная и важная задача.

Цель. Оценить прогностическое значение опухоль-ассоциированного клеточного микроокружения у больных при НС кЛХ.

Материалы и методы. При выполнении работы использовались: ретроспективный анализ первичной медицинской документации, морфометрические, статистические и клинико-лабораторные методы. Объект исследования – гистологические препараты (парафиновые блоки/кассеты) лимфатических узлов 70 совершеннолетних пациентов с впервые диагностированной кЛХ, гистологический подтип – нодулярный склероз, проходивших лечение в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России по стандартным протоколам химиотерапии I линии ABVD и интенсивным программам лечения BEACOPP-14 (или его модификации - EACOPP-14 и BEACOPP-escalated) в период с 2006 по 2020 гг. Изучаемые явления – патоморфологические, морфометрические и иммуногистохимические (ИГХ) параметры клеток опухоль-ассоциированного микроокружения в лимфатических узлах, экспрессирующих антигены CD163, CD68, CD15, CD20, CD4, CD8 при НС кЛХ.

Результаты. Установлен ряд закономерностей, которые были связаны с особенностями экспрессии маркеров макрофагально-гистиоцитарных элементов (CD163, CD68). Считается, что CD163 является одним из наиболее надежных биомаркеров опухоль-ассоциированных макрофагов. Выявлено, что экспрессия CD163 у больных НС кЛХ характеризовалась мембранно-цитоплазматическим окрашиванием макрофагов. Содержание данной популяции клеток в образцах варьировало от 4,0% до 25,6%, медиана (*Me*) соответствовала 7,7% [Q_1 - Q_3 : 6,0-16,0].

В гистологических срезах выявлены два гистопатологических варианта распределения изучаемой клеточной популяции. Первый вариант характеризовался интерстициальной локализацией клеток, в удалении от фиброзных тяжей и неравномерным распределением в нодулях. Клетки при данном варианте, как правило, располагались дискретно либо имели тенденцию к образованию небольших или умеренных скоплений, локализованных эксцентрично по отношению к резидуальным лимфоидным фолликулам. Второй вариант характеризовался расположением макрофагально-гистиоцитарных элементов вдоль фиброзных тяжей или на границе между фиброзными тяжами и нодулями, образуя своеобразный контур. Однако гистотопографическая характеристика CD163⁺ макрофагов при НС кЛХ не коррелировала с клиническими особенностями и течением заболевания ($p > 0,05$).

Пороговый уровень относительного содержания CD163-экспрессирующих кариоцитов составил 7,9%. Согласно установленному порогу всех обследованных разделили на две группы: с высоким (надпороговым; $\geq 7,9\%$; $n=34$) и низким (подпороговым; $< 7,9\%$; $n=36$) уровнем экспрессии маркера по числу клеток. Установлено статистически значимое повышение частоты достижения полного ответа на I линию терапии у больных с подпороговой экспрессией маркера по сравнению с пациентами с надпороговым уровнем CD163⁺ макрофагов в пораженных лимфатических узлах ($p=0,001$; OR $>10,0$; 95% CI=8,15–116,79). При анализе 5-летней общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) у пациентов с низкой выживаемостью наблюдалось преобладание надпорогового уровня CD163⁺ клеток (рисунок 2).

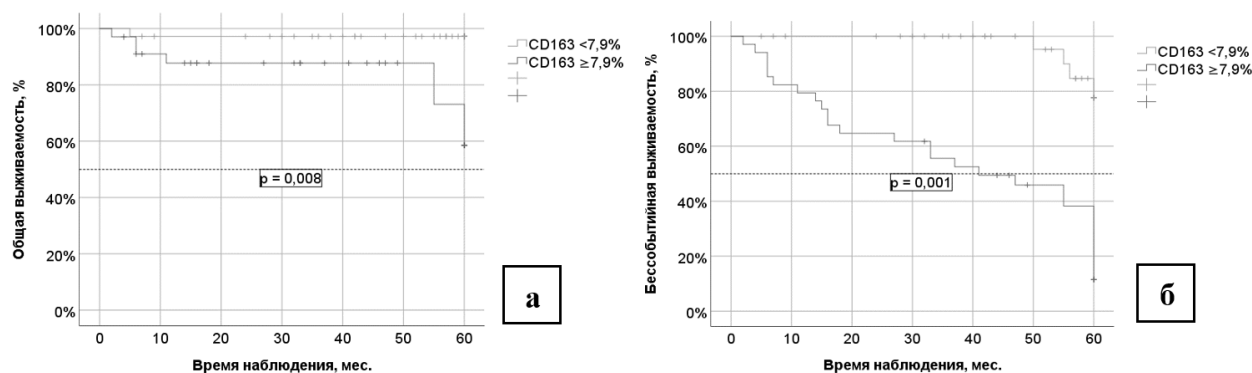


Рисунок 2 – ОВ (а) и БСВ (б) больных в зависимости от порогового уровня CD163-позитивных макрофагов

Экспрессия маркера CD68 в макрофагально-гистиоцитарных/моноцитарных элементах опухолевого микроокружения выявлена в 66 из 70 образцов (94,3%). При ИГХ исследовании наблюдалось окрашивание цитоплазмы исследуемых клеток. В гистологических срезах пораженных лимфатических узлов относительное количество CD68⁺ экспрессирующих кариоцитов варьировало в пределах от 4,8% до 24,4%, *Me* соответствовала 11,3% [Q1-Q3: 9,5-14,3].

Гистопатологические варианты локализации CD68-положительных элементов в препарате оказались более вариабельны по отношению к паттернам CD163-позитивных макрофагов что, вероятно, объясняется меньшей специфичностью маркера. Первый тип характеризовался неравномерным интерстициальным распределением CD68-экспрессирующих кариоцитов в остаточных лимфоидных нодулях, в виде скоплений различных размеров (от мелких до крупных) либо дискретно или эксцентрично расположенных единичных клеток в некоторых по-

лях зрения по отношению к резидуальным лимфоидным фолликулам. Второй гистопатологический вариант отличался локализацией изучаемой популяции вдоль фиброзных тяжей или на границе между фиброзными тяжами и нодулями, формируя кольцевидные структуры. Однако в выбранной когорте больных НС кЛХ гистотопографические характеристики не демонстрировали какой-либо взаимосвязи с клиническими особенностями и течением заболевания ($p>0,05$).

При проведении ROC-анализа установлен порог, составляющий 12,1% CD68⁺ кариоцитов опухолевого микроокружения. Пациентов разделили на две группы: с высоким (надпороговым; $\geq 12,1\%$; $n=24$) и низким (подпороговым; $<12,1\%$; $n=42$) относительным содержанием CD68-позитивных клеток. Достоверно значимое снижение частоты достижения полного ответа на терапию I линии отмечено при надпороговом показателе CD68-положительных элементов ($p=0,01$; OR=4,5; 95% CI=1,5–13,0). Зависимости количества изучаемой популяции клеток микроокружения от полового признака, В-симптомов и стадии заболевания не выявлено. При анализе 5-летней ОВ и БСВ статистически значимых различий не наблюдалось (рисунок 3).

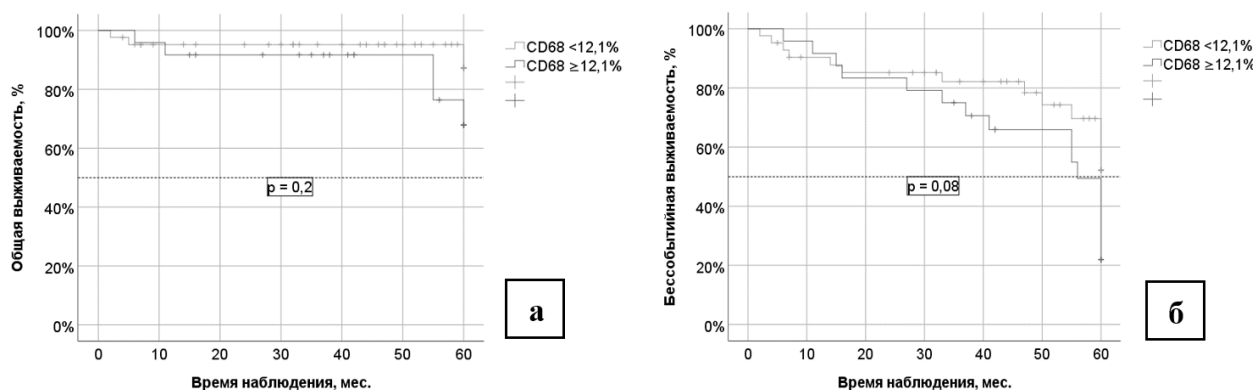


Рисунок 3 – ОВ (а) и БСВ (б) больных в зависимости от относительного содержания CD68-позитивных макрофагально-гистиоцитарных/моноцитарных элементов

Таким образом, установлена взаимосвязь между надпороговым содержанием CD163⁺ ($\geq 7,9\%$) и CD68⁺ ($\geq 12,1\%$) макрофагально-гистиоцитарных элементов опухолевого микроокружения с неблагоприятными клиническими параметрами НС кЛХ. Надпороговое значение CD163⁺ макрофагов ассоциировано с распространенной стадией заболевания, неудачами химиотерапии I линии, низкими показателями 5-летней ОВ и БСВ, увеличением риска развития р/р форм заболевания более чем в 10 раз. В свою очередь, увеличение количества CD68⁺ клеток

взаимосвязано только с низкой частотой полного ответа на лечение I линии. Количественный подсчет с применением порогового уровня CD163⁺ и CD68⁺ экспрессирующих клеток может быть использован в качестве дополнительного к существующим моделям прогностическим критериям течения заболевания.

Известно, что опухоль-ассоциированные гранулоциты за счет своей фенотипической и функциональной гетерогенности принимают участие в каждом из этапов развития неоплазии. Согласно современным литературным источникам, данная популяция реактивного микроокружения способна влиять на прогноз течения злокачественных новообразований, оказывая одновременно как проонкогенный, так и противоопухолевый эффекты.

В ходе исследования CD15⁺ гранулоцитов при НС кЛХ было обнаружено, что клетки, положительные в реакциях с соответствующими антителами, выявлены в 98,6% исследуемых образцов (n=69). В данной популяции наблюдался мембранно-цитоплазматический характер окрашивания. В гистологических срезах доля CD15-позитивных кариоцитов варьировала в пределах от 0,5% до 26,6%, *Me* экспрессии соответствовала 8,4% [Q1-Q3: 7,2-21,8]. В гистологических срезах лимфатического узла гранулоциты, экспрессирующие CD15⁺, располагались преимущественно интерстициально, гистотопографических особенностей не установлено.

В зависимости от порогового уровня содержания изучаемой популяции всех больных разделили на две группы: с высоким (надпороговым; $\geq 8,5\%$; n=34) и низким (подпороговым; $< 8,5\%$; n=35) количеством CD15⁺ гранулоцитов. Надпороговое значение CD15-позитивных клеток преобладало среди больных с В-симптомами ($p=0,012$; OR=3,5; 95% CI=1,3–9,5) и в 3,6 раз чаще встречалась при распространенных стадиях НС кЛХ по отношению к обследуемым с локализованными стадиями заболевания ($p=0,02$; OR=3,6; 95% CI=1,26–10,54). Установлено достоверное повышение частоты достижения полного ответа на I линию терапии у больных с подпороговой экспрессией маркера ($p=0,001$; OR>10,0; 95% CI=6,8–93,2). При анализе 5-летней БСВ в группе пациентов с низкой выживаемостью наблюдалась статистически значимое преобладание надпорогового уровня CD15⁺ клеток (рисунок 4а). При оценке 5-летней ОВ достоверные различия между группами не установлены (рисунок 4б).

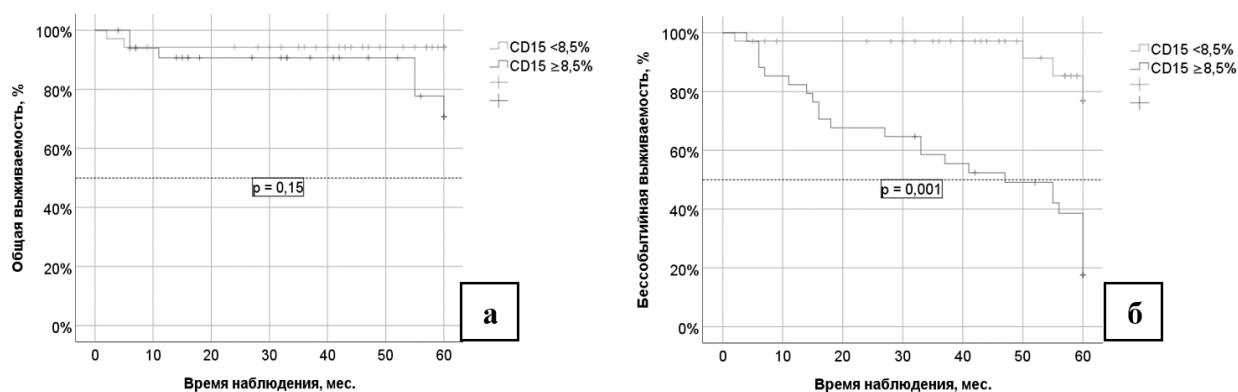


Рисунок 4 – ОБ (а) и БСВ (б) больных в зависимости от относительного содержания CD15-позитивных гранулоцитов

Таким образом, определена взаимосвязь надпорогового содержания CD15⁺ гранулоцитов опухолевого микроокружения с неблагоприятным прогнозом НС кЛХ. Установление порогового уровня числа опухоль-ассоциированных клеток, экспрессирующих биомаркер CD15, может быть использовано в качестве дополнительного к существующим моделям прогностического критерия течения НС кЛХ.

Определение потенциальной прогностической роли относительного числа CD20-положительных В-лимфоцитов, как одного из компонентов опухолевого микроокружения при НС кЛХ, становится в последнее время все более актуальным. С помощью ROC-анализа установлено прогностически значимое пороговое значение CD20⁺ В-клеток в пораженных лимфатических узлах, равное 17,2%. С учетом указанного показателя проведен анализ дифференцированной экспрессии маркера в зависимости от клинических проявлений заболевания. Определена взаимосвязь низкой экспрессии количества В-лимфоцитов в микроокружении с такими неблагоприятными факторами, как распространенная стадия болезни, наличие В-симптомов, отсутствие ПР. Сниженное относительное содержание CD20-позитивных В-клеток характерно для обследованных с рецидивами и рефрактерностью к химиотерапии, и связано с низкой БСВ (рисунок 5). Риск развития нежелательного события у больных с подпороговой экспрессией маркера (<17,2%) увеличивался в 4,2 раза по сравнению с пациентами, имевшими более высокие значения CD20⁺ экспрессирующих кариоцитов (HR=0,24; 95% CI: 0,09-0,62, $p=0,003$).

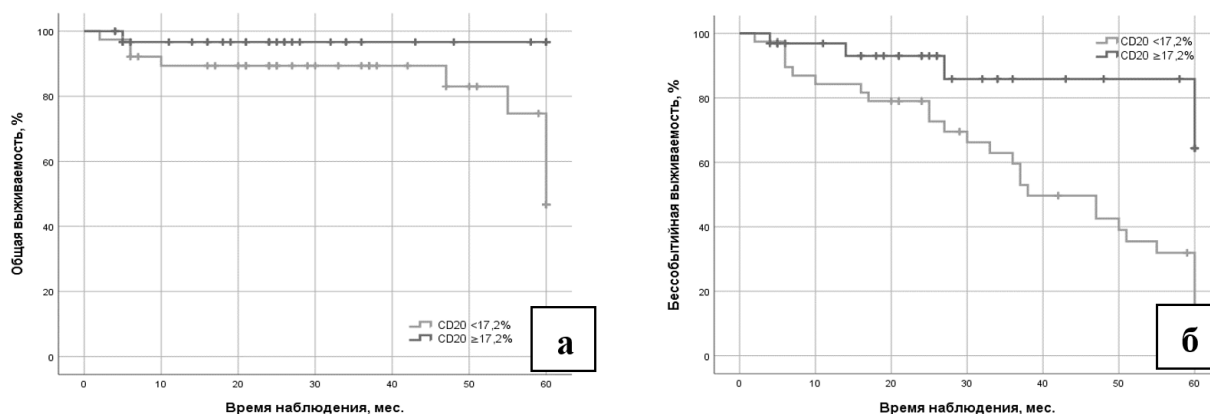


Рисунок 5 – ОВ (а) и БСВ (б) больных в зависимости от порогового значения CD20-позитивных лимфоцитов

Установленные в ходе исследования данные согласуются с имеющимися в доступной литературе работами, в которых отмечена связь низкого числа CD20-позитивных клеток с неблагоприятным течением кЛХ и низкой выживаемостью больных после I линии терапии. Наиболее вероятно, полученные нами результаты обусловлены тем, что уменьшение количества реактивных В-лимфоцитов микроокружения приводит к сниженной их способности поддерживать противоопухолевый иммунитет на должном уровне, который они обеспечивают в нормальных условиях за счет антителозависимой цитотоксичности. Повышение же количества CD20-положительных В-лимфоцитов, ассоциированное с лучшими показателями БСВ, вероятно, характеризует степень иммунной защиты организма у больных НС кЛХ. В целом, полученные данные по морфометрической оценке CD20⁺ В-клеток реактивного опухолевого микроокружения с применением иммуногистохимического анализа указывают на целесообразность включения данного маркера в качестве дополнительного прогностического при НС кЛХ.

К самой большой по численности популяции иммунных клеток опухоль-ассоциированного микроокружения относятся Т-клетки. Основными их субпопуляциями, представленными при НС кЛХ, являются CD4- и CD8-антигенпозитивные Т-лимфоциты, роль которых в патогенезе заболевания детерминирована. Однако предметом многочисленных дискуссий продолжает оставаться определение прогностически значимого порогового содержания этих субпопуляций в лимфатических узлах, вовлеченных в патологический процесс.

В ходе исследования отмечены определенные закономерности, которые были связаны с особенностями экспрессии CD4 и CD8 маркеров Т-клеточной популяции у больных НС кЛХ. В гистологических срезах лимфатических узлов доля CD4-позитивных клеток варьировала в пределах от 0,5% до 21,6%, *Me* соответствовала 9,9% [Q1-Q3: 8,3-12,3]. Гистотопографических особенностей при этом не выявлено. При чувствительности - 0,862 (86,2%) и специфичности - 0,559 (44,1%), AUC под ROC-кривой составила $0,613 \pm 0,073$, (95% CI: 0,470-0,756), однако модель не подтвердила свою значимость в данной когорте больных ($p=0,123$). Взаимосвязи относительного содержания регуляторных CD4-позитивных Т-клеток с ответом на I линию терапии не установлено ($p>0,05$). Таким образом, гистотопические характеристики, так же, как и пороговое значение Т-хелперов реактивного опухолевого микроокружения не связаны с клинико-лабораторными параметрами и характером течения заболевания.

Количество CD8-положительных цитотоксических клеток варьировало в пределах от 3,4% до 26,7%. *Me* экспрессии соответствовала 10,6 % [Q1-Q3: 7,8-14,3]. Изучаемая популяция Т-лимфоцитов встречалась в гистологических срезах пораженных лимфатических узлов в виде скоплений разной величины и формы, либо в виде дискретно лежащих по всему срезу клеток. В отдельных случаях обнаруживались гистологические паттерны по типу розеткообразных структур вокруг опухолевых клеток, однако выявленные особенности локализации CD8⁺ лимфоцитов не ассоциировались с клинико-лабораторными параметрами и характером течения НС кЛХ. При чувствительности - 0,6 (60,0%) и специфичности - 0,445 (54,5%) AUC под ROC-кривой составила $0,511 \pm 0,074$, (95% CI: 0,470-0,756), тем не менее модель не подтвердила свою значимость в данной когорте больных ($p=0,885$). Следовательно, пороговое значение цитотоксических Т-клеток опухолевого микроокружения не связано с характером течения и клинико-лабораторными особенностями заболевания. Гистотопографические особенности CD8⁺ Т-лимфоцитов реактивного опухолевого микроокружения также не имеют ассоциации с прогнозом течения НС кЛХ.

Отсутствие достоверности в полученных результатах можно объяснить тем, что опухолевый субстрат при НС кЛХ в процессе своего развития приобретает ряд свойств, позволяющих ему избегать иммунного надзора. Вероятно, это связано с недостаточностью иммунных реакций, направленных на распознавание чужеродных продуктов генов клеток ХБРШ Т-клеточным звеном иммунитета.

Для уточнения зависимости пороговых показателей исследованных маркеров с БСВ пациентов проведен однофакторный регрессионный анализ Кокса. Проанализирована степень влияния на риск возникновения неблагоприятного события при БСВ каждого предиктора в отдельности. С учетом того, что пороговые показатели для Т-клеточных популяций ($CD4^+$, $CD8^+$) не установлены, они были исключены из дальнейшего анализа.

Факторами, значимо влияющими на снижение продолжительности БСВ больных НС кЛХ в течение 5 лет, стали: распространенная стадия заболевания, наличие В-симптомов, пороговые уровни $CD163^+$ ($\geq 7,9\%$), $CD15^+$ ($\geq 8,5\%$) и $CD20^+$ ($< 17,2\%$) клеток реактивного опухолевого микроокружения ($p < 0,05$). Достоверных различий по остальным параметрам не установлено (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты однофакторного регрессионного анализа Кокса предикторов БСВ

Параметр	БСВ	
	95% CI	p
Пол (муж.)	0,711 (0,348-1,451)	0,348
Распространенная стадия заболевания	6,278 (1,906-20,678)	0,003*
Наличие В-симптомов	2,581 (1,249-5,335)	0,010*
Морфологический тип по BNLI (NS II)	1,297 (0,621-2,711)	0,489
Количество $CD163^+$ ($\geq 7,9\%$)	8,868 (3,100-25,372)	$< 0,001^*$
Количество $CD68^+$ ($\geq 12,1\%$)	1,841 (0,885-3,831)	0,102
Количество $CD15^+$ ($\geq 8,5\%$)	7,063 (2,463-20,256)	$< 0,001^*$
Количество $CD20^+$ ($< 17,2\%$)	0,180 (0,069-0,469)	$< 0,001^*$

Примечание – « * » – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

В результате многофакторного анализа выявлено, что фактором, независимо влияющим на риск возникновения неблагоприятного события при БСВ, является надпороговый уровень $CD163^+$ экспрессирующих макрофагов в биоптатах лимфатических узлов, вовлеченных в патологический процесс. Таким образом, содержание $CD163^+$ макрофагов $\geq 7,9\%$ в опухолевом микроокружении является независимым фактором неблагоприятного прогноза течения НС кЛХ. Наличие В-симптомов, распространенная стадия заболевания, а также пороговый уровень реактивных $CD20^+$ В-лимфоцитов ($< 17,2\%$) не подтвердили своего независимого (самостоятельного) значения в качестве дополнительного прогностического параметра в выбранной когорте больных (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты многофакторного регрессионного анализа Кокса (с учетом анализа корреляционной матрицы коэффициентов регрессии)

Параметр	BCV	
	95% CI	p
Распространенная стадия заболевания	3,777 (0,991-14,395)	0,052
Наличие В-симптомов	0,850 (0,381-1,894)	0,691
Количество CD163+ ($\geq 7,9\%$)	5,389 (1,466-19,800)	0,011*
Количество CD20+ ($< 17,2\%$)	0,689 (0,205-2,309)	0,546

Примечание – « * » – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Таким образом, надпороговые значения CD163⁺, CD68⁺, CD15⁺ и подпороговый уровень CD20⁺ клеток ассоциированы с неблагоприятными клинико-лабораторными показателями НС кЛХ, снижением частоты полного ответа на терапию I линии и БСВ больных вне зависимости от характера их локализации в пораженных лимфатических узлах. Определение количества популяций кариоцитов, экспрессирующие указанные маркеры, может быть использовано в качестве дополнительных прогностических факторов течения заболевания, а также включено в существующие прогностические модели с целью усовершенствования персонализированного подхода в лечении заболевания и улучшения показателей выживаемости для данной категории пациентов. С помощью многофакторного анализа установлено, что биомаркер CD163 является независимым фактором прогноза НС кЛХ.

Несмотря на варьирование относительного количества CD4⁺, CD8⁺ Т-клеточных субпопуляций у различных больных, в целом ассоциации гистологических характеристик и особенностей их содержания с течением НС кЛХ не установлено. Возможно, это обусловлено тем, что основные механизмы клеточного иммунитета при данной патологии более сложны и протекают различно в каждом индивидуальном случае. Следовательно, межклеточные взаимодействия с участием Т-лимфоцитов не определяются данными маркерами и использованными высокотехнологичными методами. Также не исключается влияние белка контрольных точек – лиганда запрограммированной клеточной смерти PD-L1, распознающегося и связывающегося с PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов, что приводит к инактивации сигналов Т-клеточного рецептора, снижению аутоиммунной агрессии и угнетению иммунного ответа.

Выводы. Определены прогностически значимые пороговые уровни содержания CD163⁺ и CD68⁺ макрофагально-гистиоцитарных кариоцитов, CD15⁺ гранулоцитов, CD20⁺ В-лимфоцитов в лимфатических узлах больных НС кЛХ вне зависимости от гистотопографических особенностей распределения клеток. Надпороговое значение CD163⁺ макрофагов $\geq 7,9\%$ ассоциировано с распространенной стадией заболевания, неудачами химиотерапии 1 линии, низкими показателями 5-летней ОВ и БСВ, увеличением риска развития р/р форм заболевания более, чем в 10 раз. Биомаркер CD163⁺ является независимым фактором прогноза течения НС кЛХ. Увеличение количества CD68⁺ клеток $>12,1\%$ взаимосвязано с низкой частотой полного ответа на лечение НС кЛХ. Надпороговый уровень CD15⁺ гранулоцитов $\geq 8,5\%$ связан с наличием В-симптомов, распространенной стадией НС кЛХ, высоким риском не достижения полного ответа на терапию I линии, снижением 5-летней ОВ и БСВ пациентов. Подпороговое значение CD20⁺ В-лимфоцитов $<17,2\%$ в опухолевом микроокружении ассоциировано с В-симптомами, распространенностью патологического процесса, низкой 5-летней БСВ больных. Взаимосвязи особенностей распределения и содержания CD4⁺, CD8⁺ субпопуляций Т-клеток реактивного опухолевого фона с характером течения НС кЛХ не выявлено.

Список литературы

1. А.С.Артемяева, Дифференциальная диагностика В-клеточных лимфом средостения из крупных клеток: специальность 14.01.12 «Онкология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Артемяева Анна Сергеевна ; Научно-исследовательский институт онкологии имени Н.Н. Петрова. – Санкт-Петербург, 2017. – 123 с.
Классическая лимфома Ходжкина: структура опухоли и прогностическое значение иммунного микроокружения / А.А.Гусак, К.В.Лепик, Л.В.Федорова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2023. – Т. 16, № 3. – С. 242-262.
2. Advances in the treatment of Hodgkin lymphoma: Current and future approaches / U. Fauzia, D. Danai, O. Najiullah [и др.] // Frontiers in oncology. – 2023. – № 13. – DOI 10.3389/fonc.2023.1067289.
3. J.M. Connors. Hodgkin Lymphoma / J.M. Connors, W. Cozen, C. Steidl [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. – 2020. – № 6. – P. 61.
4. Kaseb H, Babiker HM. Hodgkin Lymphoma. [Updated 2022 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499969/> - -

5. Novel Agents For Relapsed and Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Review / J. Zhang, Y. Xing, Z. Li [и др.] // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – № 12. – 9 с.
6. Takahara T. и др. Hodgkin Lymphoma: Biology and Differential Diagnostic Problem // *Diagnostics*. 2022. Т. 12. № 6. С. 1507.
7. The Hodgkin Lymphoma Immune Microenvironment: Turning Bad News into Good / V. Menéndez, J. L. Solórzano, S. Fernández [и др.] // *Cancers (Basel)*. – 2022. – № 14(5).

УДК 616.155.32

ГРНТИ 62.33.31

М.Л. Морозова

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

M.L. Morozova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: morozova@niigpk.ru

Н.В. Исаева

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории
клеточной и молекулярной иммунологии

N.V. Isaeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: isaeva@niigpk.ru

Е.Л. Назарова

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии

E.L. Nazarova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology,
E-mail: nazarova@niigpk.ru

Е.А. Попонина

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

E.A. Poponina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

А.О. Пестрикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

A.O. Pestrikova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: pestrikova@niigpk.ru

С.В. Попова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории
клеточных технологий

S.V. Popova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory of Cellular
Technologies
E-mail: popova@niigpk.ru

К.А. Воробьев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе

K.A. Vorobiev

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for research
E-mail: vorobiev@niigpk.ru

Изменение состава Т-лимфоцитов в процессе получения CAR Т- клеток

Changes in the subsets of T-lymphocytes during the production of CAR T-cells

Аннотация. Клеточная терапия с использованием лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (chimeric antigen receptor, CAR) лежит в основе перспективных лечебных опций при иммунотерапии онкогематологических заболеваний и солидных опухолей. Качество конечного клеточного продукта в процессе производства зависит от различных факторов. В настоящей статье представлены данные об изменении субпопуляционного состава Т-лимфоцитов при получении CAR Т-клеток.

Abstract. Cell therapy using lymphocytes with a chimeric antigen receptor (CAR) is the basis for new promising therapeutic options in the immunotherapy of oncohematological diseases and solid tumors. The quality of the final cellular product during the manufacturing process depends on various factors. This article presents data on changes in the subpopulation of T lymphocytes during the production of CAR T cells.

Ключевые слова: Т-лимфоциты; CAR Т-клетки; Т-клетки с химерным антигенным рецептором; продукция клеток; проточная цитометрия.

Index terms: T-lymphocytes; CAR T-cells; Chimeric Antigen Receptor T-cells; cell production; flow cytometry.

Введение. Появление адоптивной терапии генно-модифицированными Т-лимфоцитами с химерными антигенными рецепторами (chimeric antigen receptor, CAR) произвело революцию в лечении онкогематологических заболеваний. В основе этого способа лежит создание пула опухоль-специфичных цитотоксических лимфоцитов путем модификации их трансгеном, кодирующим химерный антигенный рецептор (CAR Т-клетки) [1, 2].

Получение CAR Т-клеток включает в себя ряд сложных этапов, начиная с выделения Т-лимфоцитов из крови пациента и заканчивая их генетической модификацией и размножением перед инфузией [3,5]. Эффективность CAR-Т терапии может быть ограничена недостаточной функциональной стабильностью клеток. Поэтому важно понимать механизмы, регулирующие активацию и дифференцировку Т-лимфоцитов, чтобы оптимизировать технологию их производства и, в конечном итоге, повысить эффективность лечения [8].

Т-лимфоциты (Т-клетки) занимают особое место в иммунной системе играя решающую роль в реализации механизмов клеточного иммунного ответа. Число субпопуляций Т-лимфоцитов значительно больше, чем В-лимфоцитов. Общим маркером для всех разновидностей Т-клеток является молекулярный комплекс TCR-CD3 [2]. Среди Т-лимфоцитов выделяют 4 субпопуляции: Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, естественные регуляторные Т-клетки (Treg) и естественные киллерные Т-клетки (NKT-клетки).

В процессе дифференцировки тимоцитов на их поверхности экспрессируются одновременно маркеры CD4⁺ и CD8⁺. Однако в последующем маркер CD4⁺ исчезает с части клеток и сохраняется только на субпопуляции, переставшей экспрессировать антиген CD8⁺. Зрелые CD4⁺ клетки являются Т-хелперами, а CD8⁺ — цитотоксическими Т-клетками.

Термином наивные Т-лимфоциты (T_N) описывают популяции цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов, которые прошли антиген-независимую дифференцировку в тимусе, покинули тимус, но еще не подверглись антиген-зависимой дифференцировке во вторичных лимфоидных органах. Эти лимфоциты с током крови и лимфы мигрируют по Т-зависимым зонам вторичных лимфоидных органов до момента контакта с антиген-презентирующей клеткой, представляющей на своей поверхности в комплексе с молекулой МНС пептид, который будет распознан Т-клеточным рецептором T_N . Отличительной особенностью данной популяции Т-клеток является наличие на клеточной мембране таких поверхностных маркеров как $CD45RA^+CD45RO^-$ [6, 7].

Одним из ключевых событий жизни наивных Т-клеток является их дифференцировка. Циркулирующие стволовые клетки памяти (T_{SCM}) превращаются в клетки центральной памяти (T_{CM}), потом в эффекторные клетки памяти (T_{EM}), затем окончательно дифференцируются в эффекторные Т-клетки (T_{eff}) [4, 5]. Последние характеризуются высокой цитотоксической активностью и выработкой провоспалительных цитокинов.

Т-клетки памяти, как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-лимфоциты, идентифицируются на основании экспрессии мембранных антигенов $CD45RA^-CD45RO^+$ и подразделяются на клетки центральной памяти (T_{CM}), которые мигрируют в лимфоидные ткани, и эффекторные клетки памяти (T_{EM}), которые перемещаются в различные периферические ткани. Т-клетки центральной памяти обладают длительной способностью к самовоспроизведению, способствуя устойчивому иммунному надзору. Дифференцировка T_{CM} в T_{EM} приводит к снижению экспрессии маркеров $CCR7^+$ и $CD62L^+$ и потере способности к миграции клеток в лимфоидные ткани, хотя T_{EM} обладают самой высокой цитотоксичностью среди всех подтипов клеток памяти [6]. Принципиальным отличием этих клеток от T_N является то, что они уже прошли антиген-зависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. [7, 8].

Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов (эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти), используемых при производстве CAR Т-клеток, существенно влияет на их эффективность и стабильность *in vivo*. Исследования показали, что увеличение доли Т-клеток памяти в конечном продукте CAR Т-клеток коррелирует с их устойчивой персистенцией, пролиферацией и высокой противоопухо-

левой активностью после инфузии пациентам. И наоборот, преобладание эффекторных Т-клеток приводит к быстрому первоначальному ответу, но к раннему истощению и к отсутствию долгосрочной эффективности. Таким образом, оценка иммунофенотипа Т-лимфоцитов при производстве CAR Т-клеток позволит определять потенциально более эффективный клеточный продукт, содержащий Т-клетки памяти [4].

Следовательно, анализ субпопуляционного состава Т-клеток после трансдукции имеет важное значение для получения качественного эффективного продукта с низкой токсичностью, способного, в целом, улучшить результаты лечения онкогематологических заболеваний.

Цель: изучить динамику состава Т-лимфоцитов в процессе получения CAR Т-клеток.

Материалы и методы. Материал — Т-лимфоциты периферической крови 25 условно здоровых лиц (доноры крови и ее компонентов). Из них 17 мужчин и 8 женщин, в возрасте от 30 до 45 (медиана 40) лет. Процесс получения CAR Т-лимфоцитов включал в себя ряд этапов. Сначала выделяли моноклеарные клетки периферической крови на градиенте плотности Lympholyte - H («Cedarlane», Канада). Затем осуществляли отбор Т-клеток из суспензии моноклеаров периферической крови путем отрицательной селекции с использованием набора EasySep Human T Cell Isolation Kit («StemCell», Канада). Т-лимфоциты помещали в среду для размножения ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium («StemCell», Канада), с добавлением IL-2 и ципрофлоксацина, активируя Т-клетки посредством контактной стимуляции рецепторов CD3/CD28 с использованием набора активаторов ImmunoCult Human («StemCell», Канада) CD3/CD28/CD2. Культуру Т-лимфоцитов инкубировали в контролируемых условиях при температуре 37°C в атмосфере с 5%-ной концентрацией CO₂. Через 24 часа питательную среду заменяли и осуществляли трансдукцию Т-клеток лентивирусными частицами методом спинфекции (центрифугирование при 1200 g в течение 90 мин при температуре 32 °C) с добавлением полибрена (5 мкл/мл). Далее проводили наращивание CAR Т-клеток в биореакторе с газопроницаемой мембраной.

Анализ иммунофенотипа Т-лимфоцитов осуществляли методом проточной лазерной цитофлуориметрии после выделения Т-клеток и на 5-6 сутки. Образ-

цы окрашивали флуорохром-меченными моноклональными антителами к антигенам человека: анти-CD45-PerCP-Cy5.5, анти-CD3-APC, анти-CD4-APC-Cy7, анти-CD8-Рe-Cy7, анти-CD45RA-FITC, анти-CD45RO-PE, анти-CD25-PE, анти-HLA-DR-FITC («Becton Coulter», США). Клетки инкубировали 15 мин. без доступа света при комнатной температуре. Исследования проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II («BD Biosciences», США) с использованием программного обеспечения “BD FACS Diva” версии 7.0 («BD Biosciences», США). Гистограммы результатов проточной цитофлуориметрии показаны в логарифмическом масштабе. Пример полученных цитометрических данных и схема гейтирования представлены на рисунке 1.

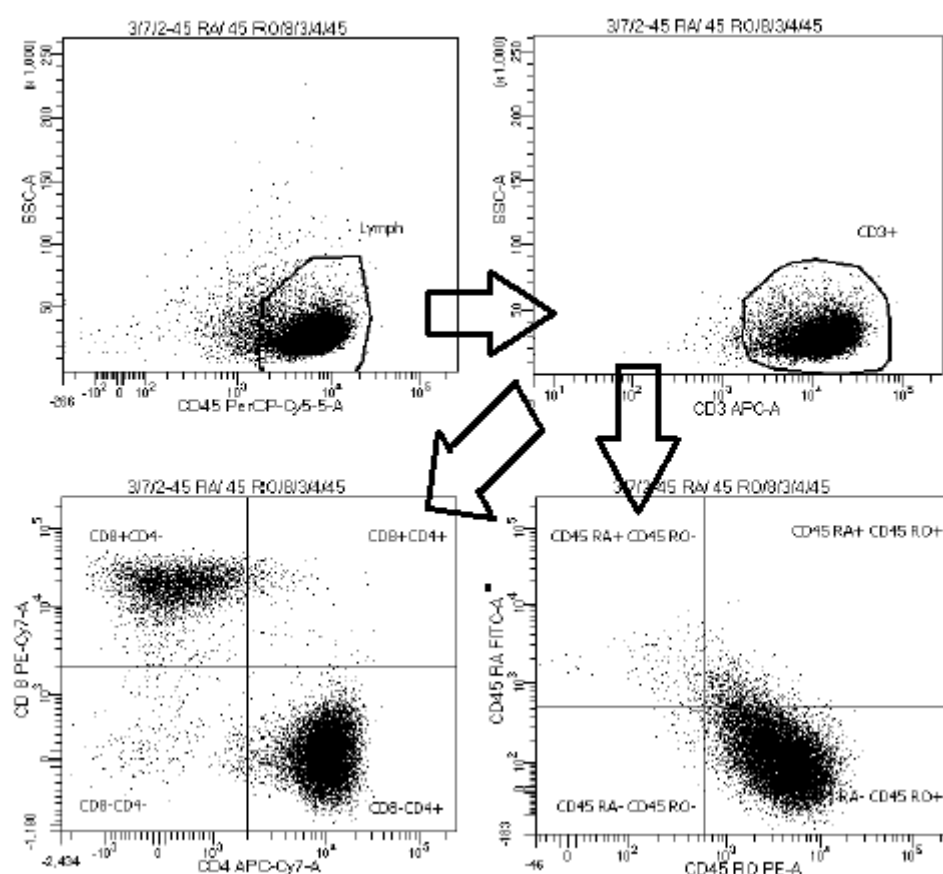


Рисунок 1 — Схема гейтирования при оценке иммунофенотипа Т-лимфоцитов

На основе иммунофенотипа Т-лимфоцитов выделили их субпопуляции в соответствии с экспрессией ими поверхностных маркеров (таблица 1).

Таблица 1 - Иммунофенотипическая характеристика субпопуляций Т-лимфоцитов

Наименование	Иммунофенотип
Т-лимфоциты	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺
Т-хелперы	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺
Цитотоксические Т-лимфоциты	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺
Наивные Т-лимфоциты (T _N)	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻
Т-лимфоциты центральной памяти (T _{cm})	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺
Активированные Т-лимфоциты	CD45(high) ⁺ CD3 ⁺ CD25 ⁺ HLA-DR ⁺

Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 23 («SPSS: An IBM Company», США) и представляли в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₁-Q₃). При сравнении использовали методы непараметрической статистики для зависимых выборок: Т-критерия Вилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования оценено содержание CD45(high)⁺CD3⁺ лимфоцитов на разных этапах получения CAR Т-клеток: 1 этап – число Т-лимфоцитов после их селекции из моноклеарной фракции клеток; 2 этап – оценка количества Т-клеток на 5 – 6 сутки после их трансдукции на фазе экспансии и добавления цитокинов.

Относительное содержание Т-лимфоцитов в исходной взвеси и в конечном клеточном продукте не имело статистически значимых различий, медиана составляла 99,3% (Q₁-Q₃: 98,9 – 99,4) и 97,9% (Q₁-Q₃: 97,6 -98,8) соответственно ($p=0,560$). Анализ не выявил существенных изменений в количестве цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-лимфоцитов-хелперов и соотношении CD4/CD8 в процессе получения CAR Т-клеток ($p=0,950$, $0,110$ и $0,090$). Это свидетельствует о стабильности клеточной культуры на разных этапах получения CAR Т-лимфоцитов (таблица 2).

Таблица 2 - Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов

Показатель	Исходная взвесь	Конечный продукт	p
Т-лимфоциты, %	99,3 (98,9 – 99,4)	97,9 (97,6 -98,8)	0,560
Т-хелперы, %	66,4 (60,6 – 73,1)	62,8 (40,2 – 71,8)	0,950
Цитотоксические Т-лимфоциты, %	30,6 (25,7 – 34,9)	31,1 (23,2 – 35,5)	0,110
Соотношение (CD4/CD8)	2,2 (1,9 – 3,0)	1,8 (1,2 – 2,7)	0,090
Наивные Т-лимфоциты (T _N),%	36,4 (27,7 -49,9)	4,3 (1,3 – 6,7)	0,001
Т-лимфоциты центральной па- мяти (T _{cm}), %	56,2 (39,2 – 66,3)	91,6 (85,9 – 97,8)	0,001
Активированные Т-лимфоциты, %	0,8 (0,6 – 1,4)	53,1 (34,7 – 75,9)	0,001

*Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q₁-Q₃)

При изучении Т-лимфоцитов центральной памяти обнаружили статистически значимые различия: относительное количество клеток возросло с 56,2% (Q₁-Q₃: 39,2 – 66,3) до 91,6% (Q₁-Q₃: 85,9 – 97,8) в конечном клеточном продукте соответственно ($p < 0,001$). Содержание наивных Т-клеток в исходной взвеси составило 36,4 % (Q₁-Q₃: 27,7 — 49,9). После проведения трансдукции и экспансии CAR Т-лимфоцитов в биореакторе наблюдалось значительное снижение T_N клеток до 4,3% (Q₁-Q₃: 1,3 – 6,7) ($p < 0,001$), что свидетельствует об дифференцировке наивных Т-лимфоцитов в Т-клетки центральной памяти.

Анализ экспрессии маркеров активации показал, что доля CD45(high)⁺CD3⁺CD25⁺HLA-DR⁺-клеток увеличилась в процессе культивирования. На 1 этапе медиана содержания активированных Т-лимфоцитов составила 0,8% (Q₁-Q₃: 0,6 - 1,4), в то время как на 2 до 53,1% (Q₁-Q₃: 34,7 – 75,9) ($p < 0,001$).

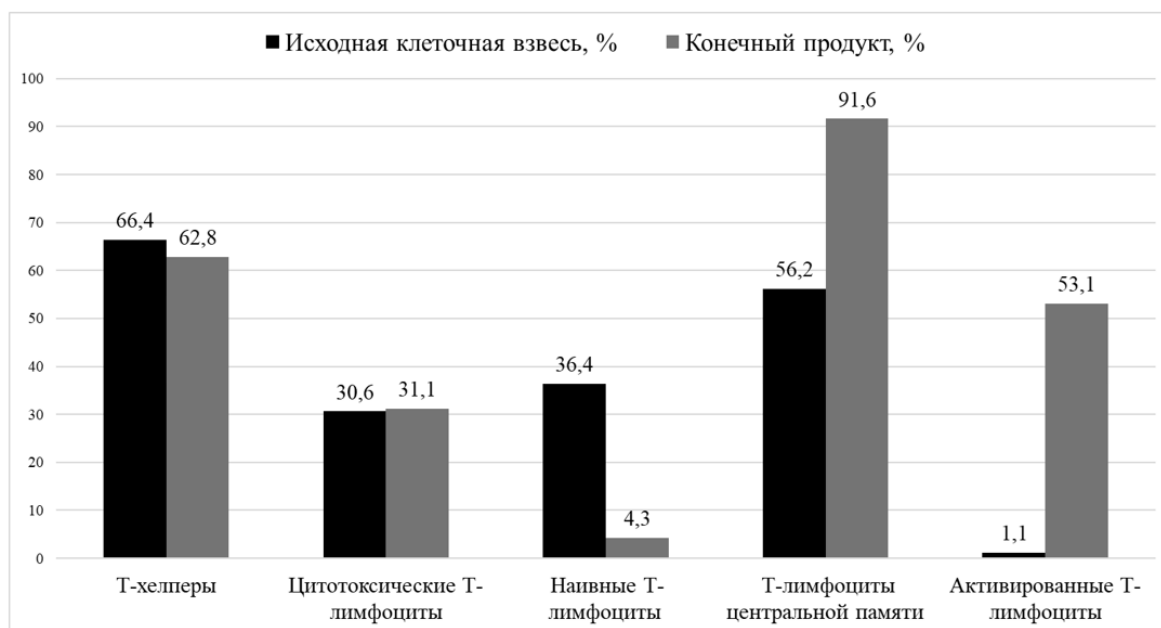


Рисунок 2 — Распределение субпопуляционного состава Т-лимфоцитов

Таким образом, процесс получения CAR Т-лимфоцитов сопровождается выраженным изменением состава Т-клеток, в частности, приводит к сдвигу количественного соотношения субпопуляций T_N клеток в сторону более дифференцированных T_{cm} , а также к увеличению экспрессии маркеров активации.

Вывод. После проведения трансдукции и экспансии в биореакторе с газопроницаемой мембраной, при добавлении цитокинов и набора контактной активации рецепторов Т-клеток, происходит значительное снижение доли наивных Т-лимфоцитов, увеличение - дифференцированных центральных Т-клеток памяти среди трансдуцированных Т-лимфоцитов, возрастание числа клеток в состоянии активации, что относится к факторам, увеличивающим эффективность противоопухолевой терапии. При этом доля Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов остается практически без изменений. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации процесса получения CAR Т-клеток и, в конечном итоге, повышения эффективности лечения онкологических заболеваний.

Список литературы

1. Кузнецова М.С. Фенотипические и функциональные особенности генерированных *in vitro* TCR-T-клеток, специфичных к опухоль-ассоциированному антигену NY-ESO-1 / М.С. Кузнецова, В.П. Терещенко, Ю.А. Шевченко, М.С. Фишер, В.В. Курилин и др. // Иммунология. - 2022. — №5. - С. 536-547.
2. Терещенко В.П. Характеристика лимфоцитов с MAGE-A4-специфичным TCR-подобным CAR-рецептором *in vitro* / В.П. Терещенко, М.С. Кузнецова, Ю.А. Шевченко, М.С. Фишер, В.В. Курилин и др.// Иммунология. - 2022. — №4. - С. 401-411.
3. Филиппова Ю.Г. Фенотип и эффекторные функции GD2-специфичных CAR-T-клеток *in vitro* /Ю.Г. Филиппова, М.С. Кузнецова, В.П. Терещенко, Ю.А. Шевченко, М.С. Фишер, В.В. Курилин и др. // Иммунология. - 2022. — №5. - С. 525-535.
4. Advanced Flow Cytometry Assays for Immune Monitoring of CAR-T Cell Applications / U. Blache, R. Weiss, A. Boldt, et al. // Front Immunol. - 2021. - Vol.12. - P. 658 - 674.
5. Characterization of HLH-like manifestations as a CRS variant in patients receiving CD22 CAR T cells / DA. Lichtenstein, F. Schischlik, L. Shao, et al. // Blood. - 2021. - Vol.138 (24). - P. 2469 - 2484.
6. Differences in Expansion Potential of Naive Chimeric Antigen Receptor T Cells from Healthy Donors and Untreated Chronic Lymphocytic Leukemia Patients / JM. Hoffmann, ML. Schubert, L. Wang, A. Hückelhoven, et al. // Front Immunol. - 2019. - Vol.8. — P. 425 - 436.
7. de Azevedo JTC. Immunophenotypic Analysis of CAR-T Cells / J.T.C. de Azevedo, A. Mizukami, P.D. Moço, K.C.R. Malmegrim // Methods Mol Biol. - 2020. - Vol.2086. - P. 195 - 201.
8. McLellan A.D. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation / A.D. McLellan, S.M. Ali Hosseini Rad // Immunol Cell Biol — 2019. - Vol.97. - P. 664 - 674.

УДК 616.71-018.46-006.448

ГРНТИ 76.29.33

Е. С. Осипова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА
России), Киров
врач-гематолог клинико-диагностического отделения гематологии и
химиотерапии

E.S.Osipova

The Federal State -Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Hematologist of Clinical Diagnostic Department of Hematology and Chemotherapy
E-mail: elena.osipova93@bk.ru

С.В.Самарина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА
России), Киров
кандидат медицинских наук, заведующий клинико-диагностического отделения
гематологии и химиотерапии

S.V. Samarina

The Federal State -Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
PhD, MD, Head of the Department of
of Clinical Diagnostic Department of Hematology and Chemotherapy
E-mail: samarinasv2010@mail.ru

Д.А.Дьяконов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН КНИИГ и ПК ФМБА
России), Киров
Кандидат медицинских наук, руководитель лаборатории патоморфологии

The Federal State -Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov

PhD, MD, Head of Laboratory of Pathomorfology

E-mail: dyakonov@niigpk.ru

Эффективность индукционных схем терапии при лечении пациентов с фолликулярной лимфомой в зависимости от химиотерапевтического агента

Efficacy of induction therapy regimens in the treatment of patients with follicular lymphoma depending on the chemotherapy agent

Аннотация. Оценка эффективности и профиля токсичности терапии первой линии, включающая схемы ритуксимаб/обинутузумаб-бендамустин (R/G-B) и ритуксимаб/обинутузумаб-CHOP (R/G-CHOP), у 50 пациентов, наблюдавшихся в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» с января 2020 г. по январь 2024 г.

Abstract. Assessment of the effectiveness and toxicity profile of first-line therapy, including the regimens rituximab/Obinutuzumab-bendamustine (R/G-B) and rituximab/Obinutuzumab-CHOP (R/G-CHOP), for 50 patients observed at the Federal State Budgetary Institution of Science “Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of Federal Medical and Biological Agency” from January 2020 to January 2024.

Ключевые слова: фолликулярная лимфома, первая линия терапии, ритуксимаб, обинутузумаб, бендамустин.

Index terms: follicular lymphoma, first line of therapy, rituximab, obinutuzumab, bendamustine.

Введение. Фолликулярная лимфома (ФЛ) наиболее распространенный тип индолентных неходжкинских лимфом. Опухоль происходит из В-клеток центра фолликула (герминального центра), представленная центроцитами и центробластами (крупными трансформированными лимфоидными клетками), с фолликулярным типом роста [2].

Фолликулярная лимфома встречается в основном у пациентов старшей возрастной группы, редко дебютирует у больных в возрасте младше 18 лет. На момент постановки диагноза средний возраст обследовавшихся составлял 65 лет. Во всем мире ФЛ является вторым по распространенности типом неходжкинских лимфом (НХЛ) после диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДБККЛ), что составляет 35% всех НХЛ и 70% низкодифференцированных НХЛ. Гистологическая трансформация ФЛ в ДБККЛ происходит у 2-3% пациентов в год [2,3].

При выборе тактики и проведении терапии следует учитывать, что у пациента могут быть атипичные проявления болезни, а также сочетание ФЛ с другими патологиями [1]. Пациентам с верифицированным диагнозом ФЛ рекомендовано начало терапии только при наличии как минимум одного из следующих признаков: поражение ≥ 3 лимфатических зон с размерами лимфатических узлов ≥ 3 см в диаметре; любые нодальные или экстранодальные вовлечения более 7 см в диаметре (bulky); наличие В-симптомов; спленомегалия; плеврит и/или асцит; цитопения (лейкоциты $1,0 \times 10^9$ /л). При отсутствии перечисленных выше показаний к началу терапии подробное клиническое обследование должно проводиться 1 раз в 3 месяца, инструментальная визуализация очагов поражения – 1 раз в 6 месяцев. В случае отсутствия признаков активности заболевания в течение 2 лет интервал может быть увеличен до 6 и 12 месяцев соответственно [1,5,7].

Улучшение БРВ и ОВ достигнуто комбинацией ритуксимаба с другими химиотерапевтическими препаратами. Rummel и соавт. в своем исследовании сравнили R-СНОР с режимом ритуксимаб-бендамустин. Показатели БРВ составили 69,5 и 31,2 месяца в группах ритуксимаб-бендамустин и R-СНОР ($P < 0,001$), соответственно, и последнее не показало улучшения ОВ. Важно отметить, что в когорту пациентов были включены не только больные ФЛ, но и другие индолентные лимфомы [6,7].

Пациентам с ФЛ, достигшим полной или частичной ремиссии после первой линии терапии с применением монотерапии ритуксимабом или полихимиотерапии с включением ритуксимаба, рекомендовано поддерживающее лечение ритуксимабом 1 раз в 2 месяца в течение 2 лет. При появлении признаков прогрессирования поддерживающую терапию следует прекратить. Пациентам с ФЛ, достигшим полной или частичной ремиссии после первой линии терапии с применением полихимиотерапии с включением обинутумаба, рекомендовано под-

держивающее лечение обинутизумабом 1 раз в 2 месяца в течение 2 лет, всего 12 введений [1,4].

СНОР и бендамустин остаются наиболее широко используемыми схемами химиотерапии в сочетании с анти-CD20 антителами. Последние данные показали возможное преимущество GA101 в сочетании с терапией СНОР, а также возможность получения аналогичных результатов при использовании схем без химиотерапии [6].

Цель исследования. Провести анализ общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) пациентов ФЛ по результатам терапии первой линии в зависимости от химиотерапевтического агента R/G-СНОР против R/G-B. Оценить степень токсичности индукционной терапии R/G-СНОР и R/G-B.

Материалы и методы. В исследование включены 50 пациентов, получавших индукционную терапию в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России с января 2020 по январь 2024. Мужчин – 14/50 (28%), женщин – 36/50 (72%). Возраст больных 35–75 лет. Медиана возраста составила 57 лет. Всем больным верифицирован диагноз фолликулярная лимфома (ФЛ).

У 30/50 (60%) пациентов наблюдались экстранодальные очаги: у 2/30 (6%) – поражение орбиты и слезного аппарата, в 6/30 (20%) случаях – ротоглотка, в 1/30 (3%) – слизистая носа, в 2/30 (6%) – ткань легкого, в 2/30 (6%) – околоушная слюнная железа, в 1/30 (3%) – почки, в 3/30 (10%) – мягкие ткани, в 2/30 (6%) – подвздошная кишка, в 1/30 (3%) – щитовидная железа, у 10/30 (33%) – позвонки. У 20/30 (66%) пациентов наблюдалась генерализованная лимфоаденопатия. В 4/50 (8%) случаях диагностировано локализованное поражение лимфатических узлов, у 16/50 (32%) – печени, селезенки.

В зависимости от клеточного состава гистологического материала опухоли был определен цитологический тип ФЛ. 1-й цитологический тип – 16/50 (32%), 2-й цитологический тип – 15/50 (30%), 3-й цитологический тип – 19/50 (38%).

Для определения стадии заболевания применялся метод компьютерной томографии (КТ) или позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ-КТ). Согласно классификации Ann Arbor у 9/50 (18%) верифицирована I-II стадии заболевания, III стадия- 15/50 (30%), IV стадия-26/50 (52%). Соответствие стадии заболевания и цитологического типа ФЛ представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика стадии заболевания и цитологического типа у пациентов с ФЛ

Стадия заболевания по Ann Arbor	1 цитологический тип	2 цитологический тип	3 цитологический тип
I-II	4/50 (8%)	1/50 (2%)	4/50 (8%)
III	5/50 (10%)	6/50 (12%)	4/50 (8%)
IV	7/50 (14%)	8/50 (16%)	11/50 (22%)

По критериям FLIP были выделены следующие группы пациентов: низкая группа риска - 9/50 (18%), промежуточная - 33/50 (66%), высокая – 8/50 (16%).

Методом флуорисцентной гибридизации (FISH) определены молекулярно – генетические aberrации, результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Характеристика молекулярно – генетических aberrаций у больных ФЛ

Молекулярно-генетические aberrации	Частота генетических aberrаций у больных ФЛ
t(14;18)	9/50 (18%)
экспрессия BCL2(18q21)	2/50 (4%)
нормальный кариотип	8/50 (16%)
не проводилось исследование	31/50 (62%)

Показатели общего анализа крови (ОАК) были удовлетворительными перед началом проведения индукционной терапии. Уровень нейтрофилов у 50/50 (100%) составлял не менее $1,0 \times 10^9$ /л. Количество тромбоцитов менее 100×10^9 /л – 2/50 (4%).

Результаты. Выполнен анализ ОВ всех пациентов в обеих группах. Использован статистический метод Каплайн – Майера (рисунок 1). По данным анализа 3-х летняя ОВ составляет 98%, 5-летняя ОВ – 80%.

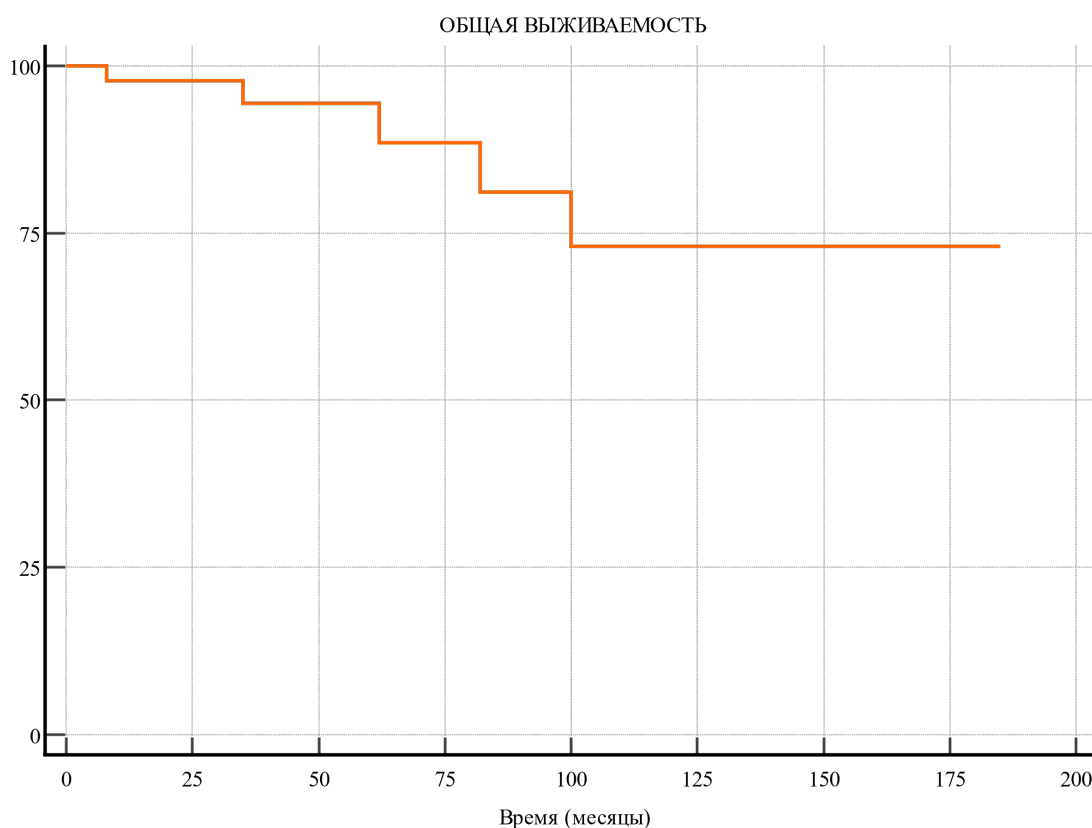


Рисунок 1 - ОВ больных ФЛ (n=50) на терапии RB/GV и R-CHOP/G-CHOP

Ответ после лечения определялся методом КТ или ПЭТ-КТ. Индукционная терапия по схеме бендамустин в комбинации с ритуксимабом или обинутузумабом (R/G – В) применялась у 13 человек – 26%. У 11 пациентов достигнут полный ответ – 85%, частичный ответ после лечения – у 1/13 (7,5%). Рецидив заболевания, после окончания терапии, возник у 1 пациента – 7,5%. У пациента была диагностирована IV стадия по Ann Arbor и 3a цитологический тип ФЛ. У 2/13 – (15,3%) пациентов в ходе лечения развилась нейтропения 3-4 степени, что являлось показанием к назначению колониестимулирующих факторов (КСФ). Исходный уровень нейтрофилов до начала лечения был не менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$.

Трехлетняя ОВ пациентов в группе, получающих терапию R/G – В, составила 73%, 5 – летняя ОВ не достигнута. Использован статистический метод Каплайн-Майера (рисунок 2).

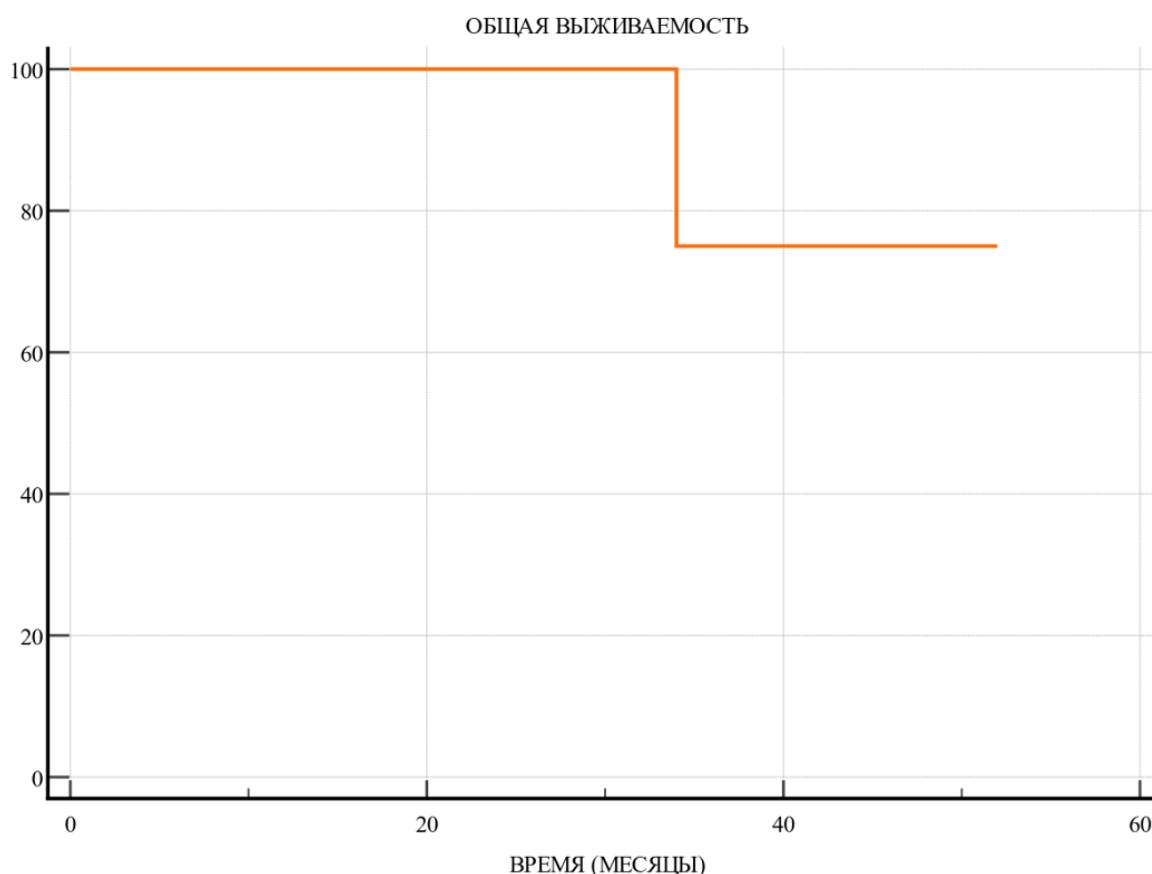


Рисунок 2 - ОВ больных ФЛ (n=13) на терапии RB/GV

Схема СНОР в комбинации с ритуксимабом или обинутузумабом в качестве первой линии применялась у 37 пациентов – 72%. Полный ответ достигнут у 26 больных – 70%. Частичная ремиссия получена у 1/37 – 3%. Рецидив заболевания зафиксирован в 10/37 случаях – 27%. В 4/10 случаях рецидивов (40%) диагностирован 3a/b цитологический тип ФЛ и IV стадия по Ann Arbor. Спектр нежелательных явлений включал в себя: аллопецию – у 37/37(100%), реактивацию вируса герпеса 6 типа – у 1/37 (3%), нейтропению менее $1,0 \times 10^9/\text{л}$ – 1/37 (3%), токсический гепатит – у 1/37 (3%).

Сравнение нежелательных явлений в зависимости от химиотерапевтического агента приведено в таблице 3.

Таблица 3 - Нежелательные явления, возникшие у пациентов в группе R/G-B и R/G-CHOP

Нежелательные явления	Частота нежелательных явлений в группе R/G-B	Частота нежелательных явлений в группе R/G-CHOP
Нейтропения 3-4 степени	2/13 (15%)	1/37 (3%)
Аллоpecia	-	37/37 (100%)
Реактивация вируса герпеса 6 типа	-	1/37 (3%)
Токсический гепатит	-	1/37 (3%)

В данной группе пациентов 3-х летняя ОВ составляет 95%, 5-летняя ОВ –78%. 3-х летняя БРВ– 70%,5 – летняя 47% (рисунок 3,4).

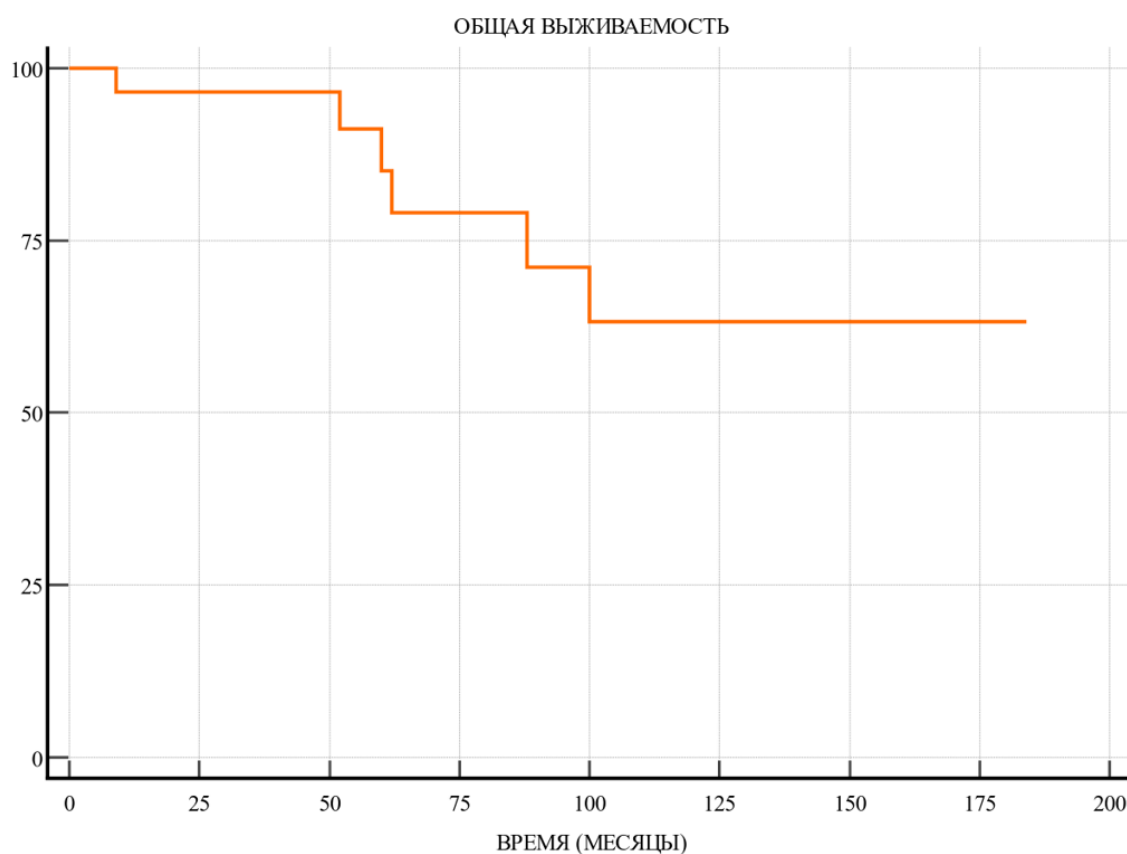


Рисунок 3 - ОВ больных ФЛ (n=37) на терапии R-CHOP/G-CHOP

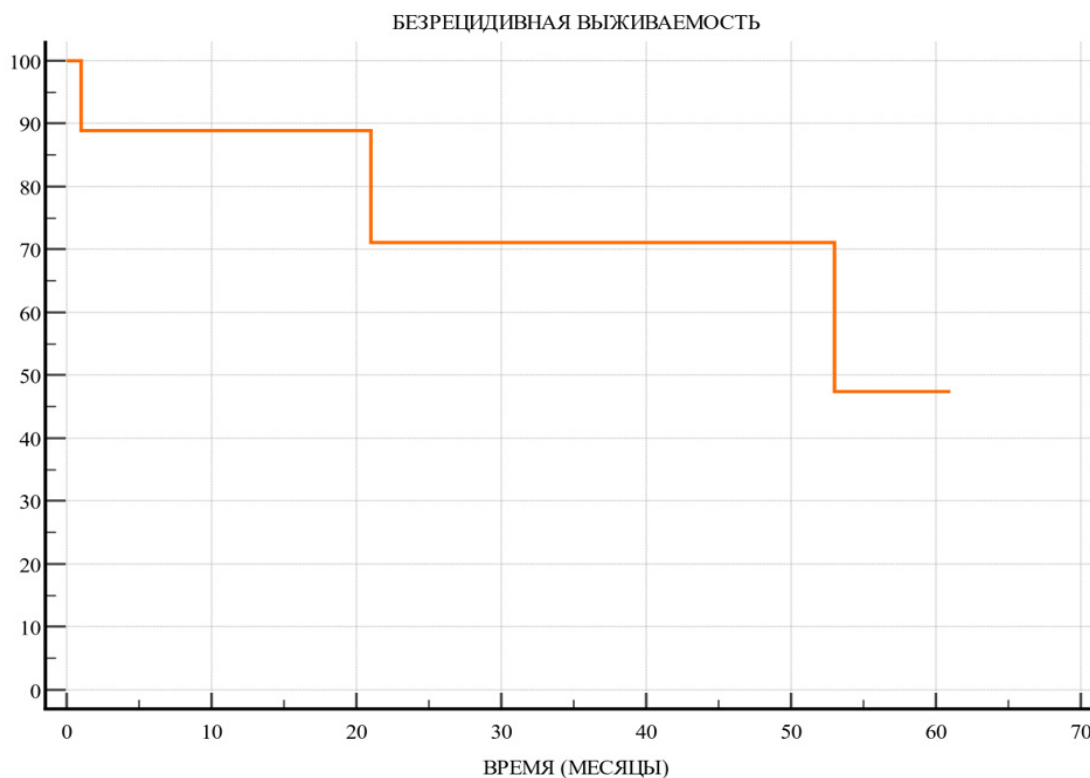


Рисунок 4 - БРВ пациентов ФЛ (n=37) на терапии R-CHOP/G-CHOP

Выполнена стратификация ОВ больных в зависимости от схемы индукционной терапии (рисунок 5). 3-х – летняя ОВ выше в группе пациентов, получавших индукционную терапию R/G-CHOP и составляет 95%.

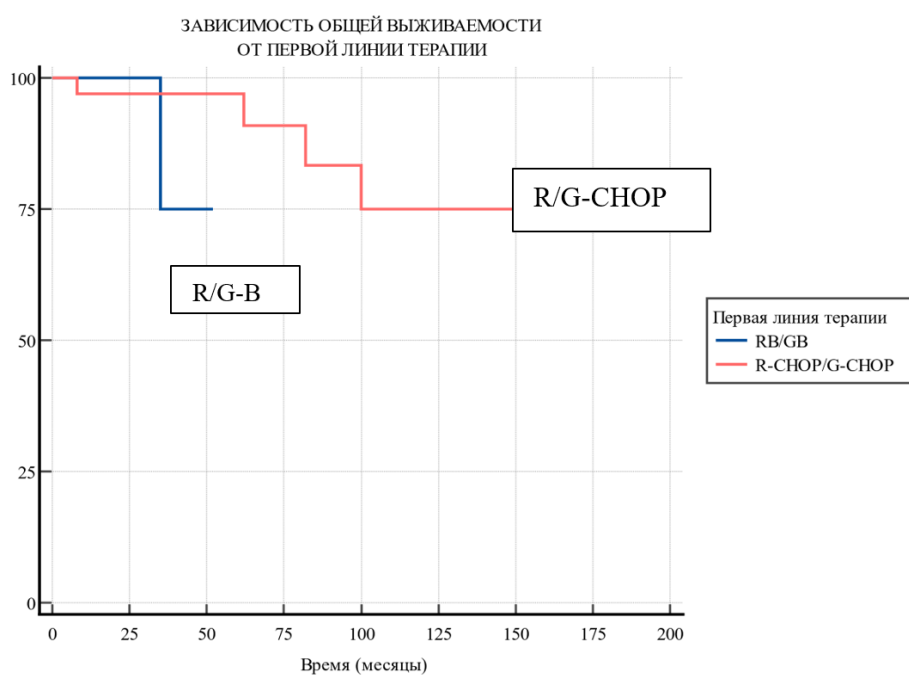


Рисунок 5 - Зависимость ОВ больных ФЛ от схемы индукционной терапии

Всем пациентам, достигшим полной или частичной ремиссии, проводилась поддерживающая терапия моноклональными антителами: ритуксимабом или обинутузумабом по схеме 1 раз в 2 месяца в течение 2 лет.

Выводы. Выбор тактики терапии зависит от стадии заболевания, цитологического типа ФЛ, коморбидности пациента.

Комбинация ритуксимаба/обинутузумаба с химиотерапией показала высокую эффективность в лечении больных ФЛ. В группе пациентов, получающих терапию R/G-B и R/G-CHOP, частота наступления полного ответа составила 85% и 70% соответственно. Однако показатели 3-х – летней ОВ оказались выше в группе больных, которым назначалась терапия R/G-CHOP и составила 95%.

Наименьшую гематологическую и негематологическую токсичность показала терапия R/G-B. Данная терапевтическая опция позволяет проводить лечение у пациентов с наличием сопутствующей патологией.

Характерная для ФЛ хромосомная aberrация t (14;18) обследовалась и подтвердилась в 18% случаев. У 62% пациентов исследование не проводилось, у 20%- нормальный кариотип.

Выполнение кариотипирования и FISH-исследования перед началом терапии необходимо для определения патогномоничной для ФЛ t (14;18) и дополнительных неблагоприятных генетических aberrаций, включенных в диагностический поиск (реаранжировка гена *MYC*/гиперэкспрессия белка MYC, мутация в генах *TP53* и *IRF8*).

Список литературы

1. Бабичева Л.Г., Тумян Г.С., Кравченко С.К. Фолликулярная лимфома // Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению злокачественных лимфопролиферативных заболеваний; под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. 2018. Р. 43–52.
2. Eur J Haematol. 2019 Sep;103(3):152-163.Diagnosis and management of follicular lymphoma: A comprehensive review.
3. Reid Merryman, Özgür Mehtap, Ann LaCasce . Turk J Hematol 2024;41:69-82 .Advancements in the Management of Follicular Lymphoma: A Comprehensive Review.

4. Zelenetz A.D. et al. B-cell lymphomas. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 5.201
5. Dreyling M. et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // Ann. Oncol. 2016. Vol. 27, № Supp. 5. P. v83–v90.
6. Pierre Feugier. Recent advances in the first-line treatment of follicular non-Hodgkin lymphoma. 2019 Mar 15;8:F1000 Faculty Rev-294.
7. Tamar Berger, Tzippy Shocha, Shlomzion Aumann, Boaz Nachmias, Neta Goldschmidt, Nurit Horesh, Reut Harel, Ariel Aviv, Ella Shmerts, Uri Abadi, Shai Shimony, Pia Raanani, Anat Gafter-Gvili, Ronit Gurion. Rituximab versus obinutuzumab-based first-line chemoimmunotherapy for follicular lymphoma-a real-world multicenter retrospective cohort study. Ann Hematol. 2023 Aug;102(8):2127-2136.

УДК 57.084.1

ГРНТИ 34.15.27

А.О. Пестрикова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

A.O. Pestrikova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: pestrikova@niigpk.ru

Е.А. Попонина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточных технологий

E.A. Poponina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: poponinaea@niigpk.ru

С.В. Попова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий

S.V. Popova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences, Junior Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: popova@niigpk.ru

Т.Л. Кудрявцева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь лаборатории клеточных технологий

T.L. Kudryavtseva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Laboratory Assistant Researcher of the Laboratory of Cellular Technologies
E-mail: tlkudryavtseva@gmail.com

Е.Л. Назарова

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и
молекулярной иммунологии

E.L. Nazarova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular
Immunology,
E-mail: nazarova@niigpk.ru

H.B. Исаева

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и
переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории
клеточной и молекулярной иммунологии

N.V. Isaeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under
the Federal Medical and Biological Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: isaeva@niigpk.ru

М.Л. Морозова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

M. L. Morozova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov
Junior Researcher Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: morozova@niigpk.ru

К.А. Воробьев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе

К.А. Vorobiev

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Doctor of Biological Sciences, Deputy Director for research

E-mail: vorobiev@niigpk.ru

Оценка цитотоксической активности лимфоцитов, несущих универсальный химерный антигенный рецептор

Evaluation of the cytotoxic activity of lymphocytes carrying a universal chimeric antigen receptor

Аннотация. CAR-T клеточная терапия — передовой метод лечения онкогематологических новообразований. В предлагаемой новой модульной системе CAR-T с универсальным химерным антигенным рецептором (UCART) нацеливание на антиген-мишень происходит через молекулу-посредник, в которой анти-CD20-моноклональное антитело связано с белком барназой. В состав UCAR входит белок барстар, обладающий высоким сродством взаимодействия с барназой. Модульная система позволяет регулировать уровень цитотоксической активности путем изменения концентрации молекулы-посредника.

Abstract. CAR-T cell therapy is an advanced method for the treatment of hematological malignancies. In the proposed new modular universal chimeric antigen receptor (UCART) CAR-T system, targeting of a target antigen occurs through a messenger molecule in which an anti-CD20 monoclonal antibody is linked to a barnase protein. UCAR contains the barstar protein, which has a high affinity for interaction with barnase. The modular system allows you to regulate the level of cytotoxic activity by changing the concentration of the mediator molecule.

Ключевые слова: универсальный химерный антигенный рецептор; цитотоксичность; барназа; барстар; конъюгат.

Index terms: universal chimeric antigen receptor; cytotoxicity; barnase; barstar; conjugate.

Введение. Адоптивная клеточная терапия с использованием Т-лимфоцитов, несущих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR) демонстрирует высокую клиническую эффективность при лечении В - клеточных онкогематологических заболеваний [4,5]. CAR способен взаимодействовать с целевым опухоль-ассоциированным антигеном без участия молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I. Контакт антигена с модифицированной Т-клеткой и дополнительное влияние костимулирующих доменов в составе CAR обуславливает развитие цитотоксической реакции [2].

На данный момент существует шесть зарегистрированных FDA коммерческих препаратов CAR-Т-клеток, а также ведутся многочисленные исследования по поиску новых модификаций CAR с целью повышения клинической эффективности и безопасности терапии [6]. Одним из таких направлений является создание модульных CAR, в которых взаимодействие CAR-Т клетки и опухолевой мишени осуществляется через молекулу-посредника [1].

Разрабатываемая в рамках плановой НИР модульная система включает в себя универсальный химерный антигенный рецептор (UCAR) Т-клеток с распознающим внеклеточным доменом белком барстар и молекулу-посредник, представляющую собой конъюгат анти-CD20 моноклонального антитела (МКАТ) и белка барназа, который обладает способностью образовывать прочный молекулярный комплекс с белком барстар. Регуляция цитотоксической активности UCART возможна за счет изменения концентрации молекулы-посредника (конъюгата).

Для оценки эффективности полученных UCART-лимфоцитов используется цитотоксический тест с клеточной линией, экспрессирующей целевой опухолевый антиген. Кроме этого, возможна количественная оценка уровня секреции биологически активных молекул гранзима, интерферона гамма (ИФН- γ), фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) в кондиционной среде при сокультивировании, обеспечивающих развитие цитотоксического эффекта [6].

Цель — оценить цитотоксическую активность UCART-лимфоцитов.

Материалы и методы. Для получения UCART-клеток была проведена трансдукция Т-лимфоцитов с использованием лентивирусного вектора третьего поколения, несущего ген UCAR — LvCAR-Bs-IgG4.

Трансдукция Т-лимфоцитов. Из периферической крови доноров выделяли фракцию моноклеаров, с использованием градиента плотности Lympholyte - Н («Cedarlane», Канада) путем центрифугирования при 400g, в течение 20 мин, $t=22\pm1^{\circ}\text{C}$ с последующим однократным отмыванием фосфатным буферным раствором («StemCell», Канада) при режиме 100g, 10 мин. Из полученной взвеси методом негативной селекции на магнитных частицах изолировали Т-лимфоциты с использованием набора EasySep Human T Cell Isolation Kit (StemCell, Канада). Т-клетки ресуспендировали в среде ImmunoCult-XF T Cell Expansion Medium («StemCell», Канада), интерлейкин-2 (ИЛ-2) (10 нг/мл) («Scistore», Россия), ципрофлоксацин (10 нг/мл) (Синтез, Россия). Активацию Т-лимфоцитов проводили с использованием набора ImmunoCult Human CD3/CD28/CD2 T Cell Activator («StemCell», Канада) путем контактного костимулирования рецепторов CD3/CD28/CD2. Культуру Т-клеток инкубировали при 37°C и 5% концентрации CO_2 . Через 24 ч заменяли питательную среду и проводили трансдукцию Т-клеток методом спинфекции с внесением полибрена (5 мкг/мл). При каждой замене питательной среды в процессе культивирования Т-лимфоцитов добавляли ИЛ-2 (10 нг/мл).

Эффективность трансдукции донорских Т-лимфоцитов оценивали через 4-6 суток методом проточной цитофлуориметрии (FACS Canto II, «BD Bioscience», США) по детекции шарнирной внеклеточной области IgG4, входящей в состав UCAR. Также регистрировали процент нежизнеспособных клеток, позитивных в отношении ДНК-тропного красителя 7-актинономицина D.

Цитотоксический тест. Клетки UCART и Raji (иммортиализованные В-лимфобласты CD20+) совместно культивировали в среде RPMI-1640 с глутамином («Биолот», Россия), содержащей богатую тромбоцитами плазму (4%), гепарин («Сигма», США, 2 Ед/мл), L-глутамин («StemCells», Канада, 2 мМ) в соотношении 1:1 при 37°C и 5% CO_2 с внесением конъюгата в различных количествах: 0,1 мкг на 100 тыс. клеток опухоли (далее – $C_k = 0,33$ мкг/мл среды); 1 мкг на 100 тыс. клеток опухоли (далее – $C_k = 3,33$ мкг/мл среды); 5 мкг на 100 тыс. клеток опухоли (далее – $C_k = 16,67$ мкг/мл среды). Эксперимент проводили с конъюгатами №1 (Газива-сахар-Hidr-sSIAB-BaQcSH) и №2 (Газива- NH_2 -SMCC-BaQcSH). В качестве контрольных проб отдельно исследовали UCART, опухолевую клеточную линию, а также смесь UCART и Raji без внесения конъюгата.

Оценку результатов проводили через 24 ч сокультивирования. Определяли изменение количественного соотношения популяций CD3+ UCART клеток и CD20+ опухолевых клеток Raji методом проточной цитофлуориметрии. В кондиционной питательной среде иммуоферментным анализом (ИФА) дополнительно определяли содержание гранзима В («Cloud-Clone Corp.», США), фактора некроза опухоли-альфа (ФНО- α , «Вектор-Бест», Россия) и интерферона-гамма (ИФН- γ , «Вектор-Бест», Россия), с использованием ИФА-анализатора Infite F50 («Тесан», Австрия).

Результаты. При культивировании клеток Raji в течение 24 ч отмечено увеличение их количества в 1,2 раза при сохранении жизнеспособности на уровне 97,2%. Доля клеток, экспрессирующих CD20, составила 99,4%.

Численность UCART лимфоцитов за сутки практически не изменялась, количество живых клеток – 97,4%, доля CD3+ клеток – 99,2%, при этом количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих UCAR составляло 29,8% (Рисунок 1).

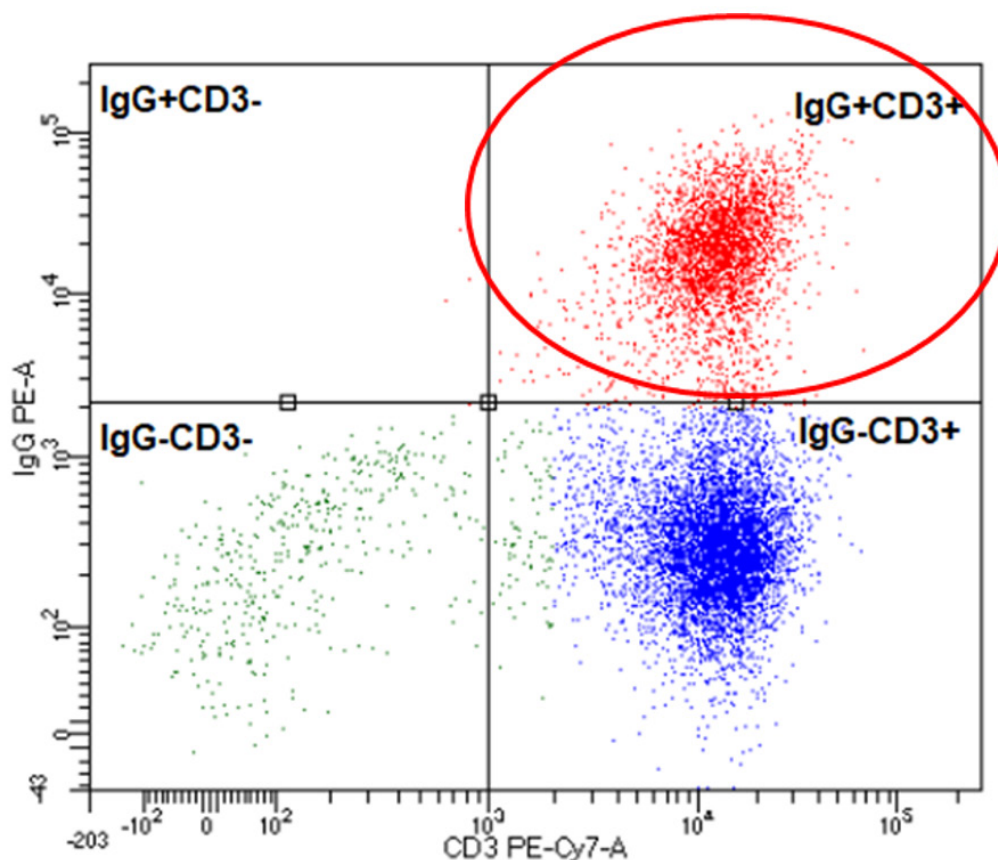


Рисунок 1- График распределения популяций Т-лимфоцитов после трансдукции

Совместное культивирование UCART и Raji без молекулы-посредника не приводило к существенному изменению их количественного соотношения (46,2% CD3+ и 47,7% CD20+ клеток).

При использовании обоих типов конъюгата в $C_k=0,33$ мкг/мл через 24 часа количество опухолевых клеток при совместном культивировании практически не менялось, что может свидетельствовать о недостаточном количестве молекул-посредников для возникновения цитотоксического эффекта.

При повышении дозы конъюгата до $C_k=3,33$ мкг/мл наблюдалось проявление цитотоксической активности UCART лимфоцитов. При этом количество CD20+ клеток сократилось в 2,2 раза (до 22,7%) при внесении конъюгата №1 и в 1,7 раз (до 29,2%) для конъюгата №2. Количество UCART при использовании молекул-посредников №1 и №2 увеличивалось в 1,3 (до 68,3%) и в 1,2 (до 58,2%) раза соответственно.

Максимальная концентрация $C_k=16,67$ мкг/мл обуславливала наиболее выраженный цитотоксический эффект для всех исследуемых конъюгатов. Внесение конъюгата №1 сопровождалось снижением доли опухолевых клеток в 4,3 раза (до 11,5%), при росте количества UCART в 1,4 раза (до 69,5%). Использование конъюгата №2 привело к сокращению CD20+ клеток в 2,6 раз (до 19,4%), тогда как численность Т-лимфоцитов возросла в 1,3 раза (до 63,4%).

Результаты анализа кондиционной среды при проведении цитотоксического теста представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Секретция биологически активных молекул

Проба	Определяемые молекулы		
	Гранзим, пг/мл	ИФН- γ , пг/мл	ФНО- α , пг/мл
Raji	0,00	29,95	2,06
UCART	111,32	715,02	7,94
Raji + UCART	150,79	1865,48	39,80
Конъюгат №1			
Raji + UCART + $C_k=0,33$ мкг/мл	252,76	2764,91	56,78
Raji + UCART + $C_k=3,33$ мкг/мл	348,71	2188,26	45,11

Проба	Определяемые молекулы		
	Гранзим, пг/мл	ИФН- γ , пг/мл	ФНО- α , пг/мл
Raji + UCART + Cк=16,67 мкг/мл	268,96	2355,09	43,36
Конъюгат №2			
Raji + UCART + Cк=0,33 мкг/мл	106,28	1523,61	102,63
Raji + UCART + Cк=3,33 мкг/мл	164,71	1495,68	96,75
Raji + UCART + Cк=16,67 мкг/мл	196,78	1433,00	77,44

Выявлено увеличение уровня продукции гранзима, ИФН- γ и ФНО- α при со-культивировании модельных опухолевых клеток и UCART в присутствии молекулы-посредника — конъюгата №1. При добавлении конъюгата №2 увеличения концентрации ИФН- γ не было зарегистрировано, что может быть связано с особенностями его получения.

Заключение. Таким образом, полученные UCART-клетки проявляли выраженную цитотоксическую активность в отношении мишени, несущей целевой антиген CD20 при добавлении конъюгата «барназа-моноклональное анти-CD20-антитело». Уровень цитотоксического эффекта зависел от количества вносимых молекул-посредников при сокультивировании клеток. Так, концентрация конъюгата 0,33 мкг/мл не позволяла реализовать функциональную активность UCART. Содержание конъюгата 3,33 мкг/мл и 16,67 мкг/мл являлось достаточным для индуцирования цитотоксической реакции и сокращения популяции опухолевых клеток в среднем в 2,0 и 3,1 раза соответственно через сутки сокультивирования в смешанной культуре.

Список литературы

1. Калинин Р.С. Комбинаторные подходы к созданию специфических химерных антигенных рецепторов Т-клеток и методы регулирования их активности: дис. к.б.н. Москва; 2022. 139 с.
2. Abbasi S, Totmaj MA, Abbasi M, Hajazimian S, Goleij P, Behroozi J, Shademan B, Isazadeh A, Baradaran B. Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells: Novel cell therapy for hematolog-

- ical malignancies. Cancer Med. 2023 Apr;12(7):7844-7858. doi: 10.1002/cam4.5551.
3. Gee AP. GMP CAR-T cell production. Best Pract Res Clin Haematol. 2018 Jun;31(2):126-134. doi: 10.1016/j.beha.2018.01.002. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29909913.
4. Geyer MB, Brentjens RJ (2016) Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. Cytotherapy 18:1393–1409
5. Jurgens B, Clarke NS (2019) Evolution of CAR T-cell immunotherapy in terms of patenting activity. Nat Biotechnol 37(4):370–375. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0083-5>
6. Labanieh, L., Mackall, C.L. CAR immune cells: design principles, resistance and the next generation//Nature. 2023; 614, 635–648.

УДК 616.411-006.44

ГРНТИ 76.29.33

А. Д. Поликарпов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач-гематолог Клинико-диагностического отделения гематологии и
химиотерапии

A. D. Polikarpov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Hematologist of the Clinical Diagnostic Department of Hematology and
Chemotherapy

E-mail: polikarpovmd@yandex.ru

Самарина С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
Заведующий клинико-диагностическим отделением гематологии и
химиотерапии

S.V. Samarina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Head of the Clinical and Diagnostic Department of Haematology and Chemotherapy
E-mail: samarina@niigpk.ru

В.А. Росин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории
патоморфологии

V.A. Rosin

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of
Pathomorphology
E-mail: rosin@niigpk.ru

Д.А. Дьяконов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патоморфологии

D.A. Dyakonov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology
E-mail: dyakonov@niigpk.ru

Оценка эффективности первой линии терапии у пациентов с диагнозом лимфома из клеток мантии

Evaluation of the effectiveness of first-line therapy in mantle cell lymphoma patients

Аннотация. В статье обсуждаются особенности лимфомы из клеток мантии (ЛКМ), включая иммунофенотипические маркеры, цитологические подтипы и прогностические факторы. Основное внимание уделено режимам лечения, включая химиотерапию на основе ритуксимаба и перспективные таргетные препараты. Оценена эффективность первой линии терапии ЛКМ в клинической практике.

Abstract. This article discusses the features of mantle cell lymphoma (MCL), including immunophenotypic markers, cytologic subtypes, and prognostic factors. The focus is on treatment regimens, including rituximab-based chemotherapy and promising targeted agents. The effectiveness of the first line of treatment for paint and varnish in clinical practice.

Ключевые слова: лимфома из клеток мантии; выживаемость; химиотерапия; таргетная терапия.

Index terms: mantle cell lymphoma; survivals; chemotherapy, targeted therapy.

Введение. Лимфома из клеток мантии (ЛКМ) – это зрелоклеточная В-клеточная лимфома из мелкого и среднего размера лимфоидных клеток с неправильным контуром ядер. Большинство случаев ЛКМ характеризует агрессивное течение, но описаны и индолентные варианты [1].

ЛКМ составляет около 3-10% случаев неходжкинских лимфом у взрослых в западных странах [6]. Частота случаев увеличивается с возрастом. Более высокая встречаемость отмечается у представителей европейской расы [6]. В азиатских странах инцидентность ЛКМ варьирует (1%–6% от всех случаев лимфом) при среднем возрасте 60 лет [6]. Заболеваемость у мужчин гораздо выше, чем у женщин (2:1), что, возможно, связано с частыми потерями хромосомы Y и делециями в *PAR1* [2]. Гетерогенность клинического течения и прогноза у пациентов с ЛКМ в значительной степени обусловлена рядом таких факторов, как молекулярные aberrации, дисрегуляция клеточного цикла SOX-11, геномная нестабильность, особенности экспрессии генов, изменение микроокружения и эпигенетические нарушения.

ЛКМ, согласно классификации ВОЗ от 2017 года, разделяется на две принципиально разных категории по патогенетическому пути. Первый, классический вариант, который развивается из наивных В-лимфоцитов, без мутаций генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (*IGHV*), и экспрессирующих транскрипционный фактор SOX-11, высокую геномную сложность, характеризующийся агрессивным течением. Второй подтип ЛКМ происходит из SOX-11-негативных В-лимфоцитов с мутированными генами *IGHV*, которые обуславливают индолентное клиническое течение [6]. Гиперэкспрессия Циклина D1 с транслокацией t(11;14) (q13;q32) является наиболее распространенным маркером и выявляется практически во всех случаях заболевания.

Классический иммунофенотип ЛКМ характеризуется экспрессией поверхностных IgM/IgD, CD5, FMC7, CD43, BCL2, при этом клетки CD10, BCL6, CD23 — негативные или слабо позитивные. В ряде случаев наблюдается aberrантный иммунофенотип [2].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выделяет 4 основных цитологических подтипа ЛКМ:

- классический вариант (мономорфная инфильтрация centroцитоподобных лимфоидных клеток малого и среднего размера с округлыми или расщепленными ядрами и узким ободком цитоплазмы);
- бластоидный (опухолевые клетки типа лимфобластов с дисперсным расположением хроматина и множеством митозов);
- плеоморфный (гетерогенная популяция с овальной и/или неправильной формой ядер и светлой цитоплазмой);
- мелкоклеточный (мелкие лимфоидные клетки с глыбчатым хроматином, напоминающие субстрат лимфомы из малых лимфоцитов) [3].

С целью определения прогноза по общей выживаемости (ОВ) у больных классической формой ЛКМ, была разработана шкала MIP1b, которая включает в себя 5 независимых прогностических факторов, таких как возраст, концентрацию лактатдегидрогеназы (ЛДГ) крови, количество лейкоцитов в крови ($\times 10^9/\text{л}$), ECOG статус и уровень Ki-67. Согласно данной шкале выделяют низкую (44% больных, медиана ОВ не достигнута), промежуточную (35% больных, медиана ОВ 51 месяц) и высокую группу риска (21%, медиана ОВ 29 мес.) [5].

Факторы риска при ЛКМ – неоднородны. Заболевание биологически гетерогенно, и стратификация риска включает множество биологических факторов. Также в клинической практике выделяют такие прогностические факторы, как: стадия заболевания, поражение ЦНС при первичной диагностике, морфологический тип (бластоидный и плеоморфный вариант), уровень В2-микроглобулина, структура заболевания (узловая или неузловая), Ki-67 (>30%), статус IGHV, комплексный кариотип [2].

Рабочей группой по ЛКМ от 2022 года выделены следующие потенциально значимые прогностические маркеры: экспрессия SOX11, мутация/делеция *TP53*, мутации *CDKN2A*, *NOTCH1*, *MYC*, *CCND1*, *CARD11*, *SMARCA4*, *BIRC3*, оценка минимальной остаточной болезни (методом оценки свободно циркулирующей ДНК) [3].

Выбор терапевтической опции проводится индивидуально и основывается на возрасте, коморбидном статусе, распространенности и выраженности опухолевого процесса, биологических особенностях опухоли.

Согласно рекомендациям NCCN, а также российским клиническим рекомендациям по лечению ЛКМ, химиотерапевтические режимы на основе ритуксимаба с последующей высокодозной полихимиотерапией с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ВДХТ/ауто-ТГСК) являются стандартом терапии для молодых пациентов без коморбидности и с агрессивными вариантами заболевания.

К списку предпочтительных схем, рекомендованных пациентам, которым показана агрессивная индукционная терапия, относятся: RDHA, RCHOP, RBAC. Больным, которым в силу возраста, коморбидности, прогностических факторов, не показано проведение агрессивной полихимиотерапии (ПХТ), рекомендованы следующие схемы: RB, RCHOP.

Однако в виду выраженной токсичности (мультиростковые цитопении, склонность к инфекционным осложнениям, риск вторичных опухолей), продолжают поиски новых таргетных опций. Свою эффективность в лечении ЛКМ показали ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ибрутиниб, акалабрутиниб, занубрутиниб) [4]. В данный момент исследуется эффективность антагонистов BCL-2 (венетоклакс) в лечении рефрактерных вариантов ЛКМ [7].

Цель. Оценить эффективность первой линии терапии у пациентов с диагнозом лимфома из клеток мантии в клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включено 57 пациентов в возрасте от 44 до 82 лет с верифицированным диагнозом ЛКМ, медиана возраста 65 лет, (Q_1 - Q_3 : 56.0-70.0), из них в категории старше 60 лет ($n=37$) и моложе ($n=20$). Заболевание чаще встречалось у мужчин ($n=42$). В 14 случаях (26%) был установлен бластоидный вариант заболевания. 2 пациента находились на этапе первичного обследования и не были включены в дальнейший анализ. Определение прогноза по выживаемости осуществляли в соответствии с международной прогностической шкалой MIPiB, согласно которой основное количество пациентов относится к группам промежуточного и высокого риска (рисунок 1) [5].

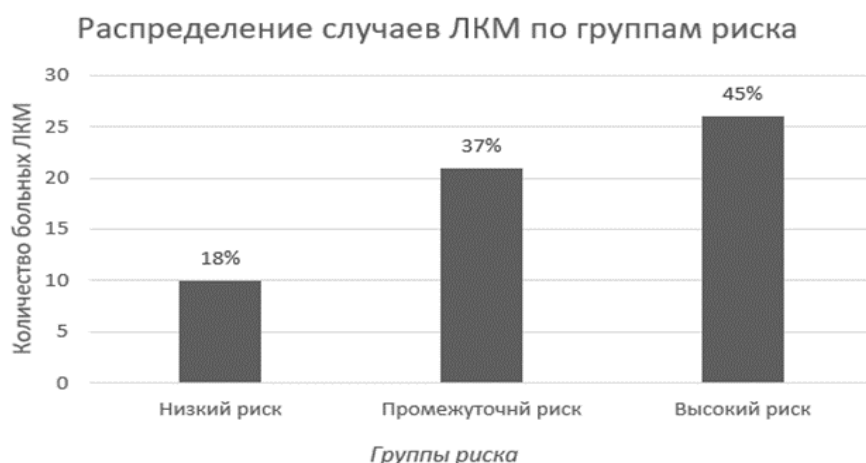


Рисунок 1 – Распределение частоты встречаемости ЛКМ по группам риска

Уровень пролиферативного индекса (Ki-67) варьировался от 3% до 95%, медиана 15% (Q_1 - Q_3 : 10.0-30.0) Количество Ki-67-позитивных клеток выше 30% наблюдался у 15 больных (26%).

Основная часть больных получила ритуксимаб-содержащие схемы в рамках 1 линии терапии ($n=51$), 2-м пациентам назначена таргетная терапия ингибиторами тирозинкиназы Брутона (иБТК) и 2 пациента определены на паллиативные режимы СР (циклофосфан, преднизолон) (рисунок 2). Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения R (версия 4.1.2; <https://www.Rproject.org>) и RStudio.

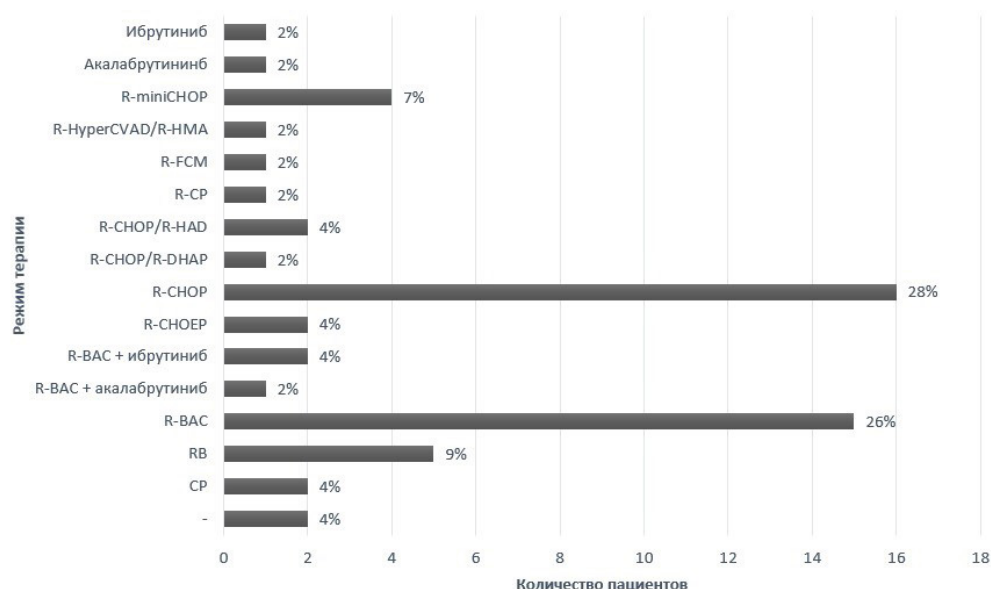


Рисунок 2 – Режимы терапии пациентов

Пациенты были поделены на 3 основные группы:

1. CHOP-подобный режим получили 22 больных (39%), медиана возраста 65 лет (Q_1 - Q_3 : 54.25 – 70.75), из них мужчин 15, женщин 7. Индекс МРІb варьировался от низкого до высокого, чаще наблюдался высокий риск ($n=12$). Бластоидный вариант у пациентов, получивших CHOP подобные режимы, встретился в 6 случаях. Ki-67 варьировался от 5% до 90%, медиана 15%, (Q_1 - Q_3 : 10.0 – 28.75). Частота достижения полного ответа (ПО) составила 14 случаев, частичный ответ (ЧО) 7 случаев, стабилизация заболевания (СЗ) 1 случай.

2. Агрессивные курсы (R-BAC, R-HyperCVAD/R-HMA, R-CHOP/R-DHAP) получили 23 больных (40%), медиана возраста составила 60 лет (Q_1 - Q_3 : 53.5–60.0), из них 20 мужчин, 3 женщины. Индекс МРІ варьировался от низкого до высокого, преобладал промежуточный риск ($n=12$). Бластоидный вариант у пациентов, получивших агрессивные курсы, встретился также в 6 случаях. Ki-67 варьировался от 3 до 95, медиана 20, (Q_1 - Q_3 : 10.0 – 27.5). Частота достижения ПО составила 17 случаев, ЧО составил 3 случая, прогрессия заболевания 1 случай, у 2 пациентов оценка ответа не проводилась.

3. Курсы со сниженной токсичностью (RB, CP, R-CP, иБТК) получили 10 больных (21%), медиана возраста 70 лет (Q_1 - Q_3 : 68.0 – 73.0), из них мужчин 7, женщин 3. Индекс МРІ от низкого до высокого, преобладал промежуточный риск. Бластоидный вариант у пациентов, получивших курсы со сниженной токсичностью, наблюдался в 2 случаях. Ki-67 варьировался от 5 до 90, медиана 15

(Q_1 - Q_3 : 11.25 – 18.75). Частота достижения ПО составила 4 случая, ЧО 3 случая, прогрессия заболевания 2 случая, стабилизация 1 случай (Таблица 1). Пациенты, получающие иБТК ($n=2$), продолжают наблюдаться с достигнутым ПО.

Достижение полного ответа после 1 линии терапии наблюдалось в 35 случаях (61%), частичный ответ – у 13 пациентов (23%). Стабилизация процесса установлена у 2 больных (4%), отсутствие ответа – в 7 случаях (12%).

Всего за период наблюдения 8 (15%) пациентов оказались подходящими для проведения ауто-ТГСК. Из них ауто-ТГСК после первой линии терапии было проведено только 4 обследованным.

При сравнении общей выживаемости (ОВ) в вышеописанных группах: медиана выживаемости в группе пациентов, получивших СНОР-подобные режимы ПХТ, составила 121 месяц, медианы в группах с агрессивными режимами ПХТ и сниженной токсичности невозможно достоверно вычислить в силу малого количества наступлений исследуемого события. Статистически значимой разницы в ОВ между исследуемыми группами не выявлено (p -value = 0.63) (рисунок 3). Также не выявлено статистически значимой разницы при сравнениях безрецидивной выживаемости (БРВ) в данных группах (p -value = 0.69) (рисунок 4).

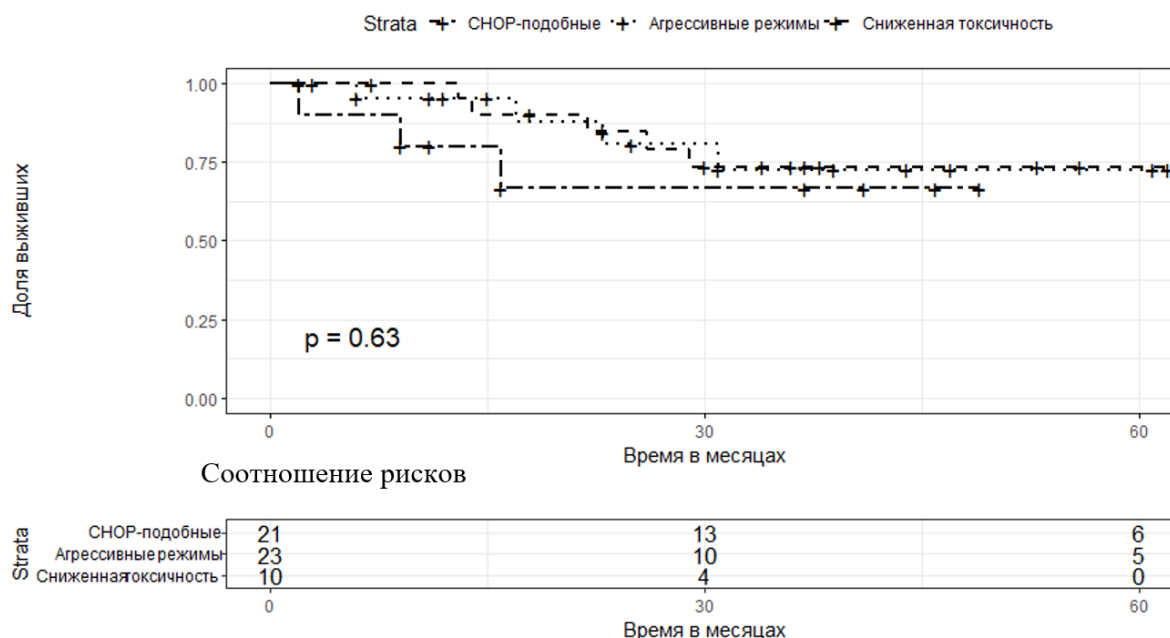


Рисунок 3 – Общая выживаемость в зависимости от режима терапии

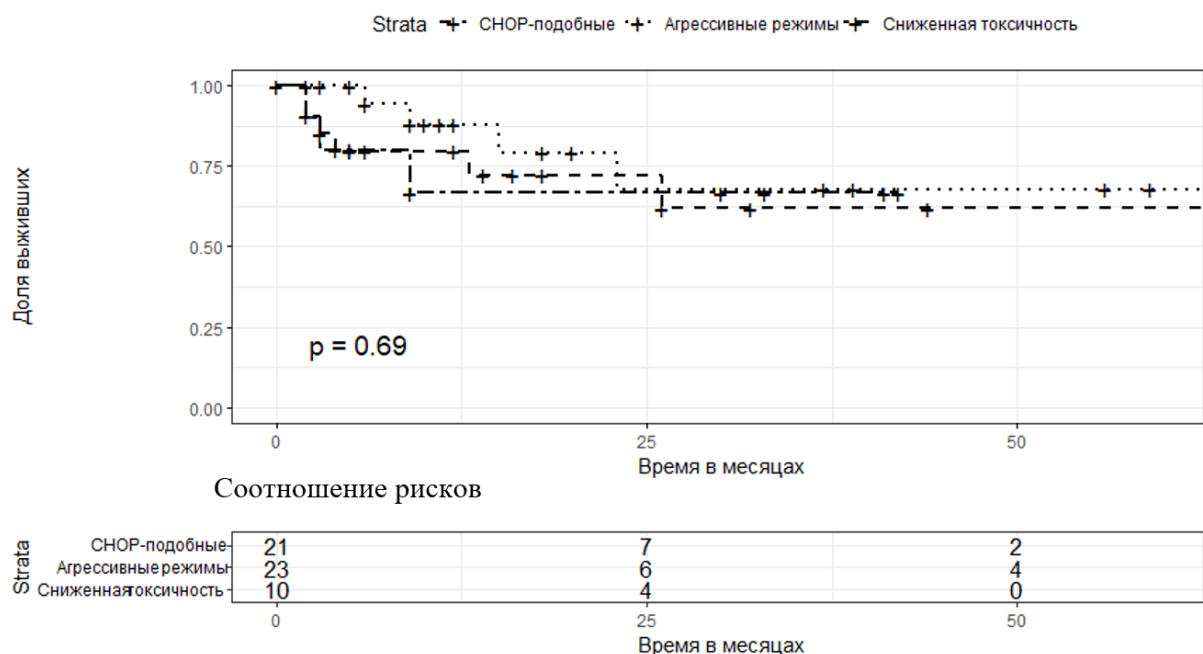


Рисунок 4 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от режима полихимиотерапии

Важным фактором в выборе схемы терапии является возможность проведения ВДХТ с последующей ауто-ТГСК. Учитывая, что СНОР-подобные режимы и режимы со сниженной токсичностью назначаются пациентам, не кандидатам для проведения трансплантации, мы объединили эти группы и сравнили выживаемость с группой, получившей агрессивные режимы ПХТ.

Таким образом 2-летняя ОВ в исследуемых группах статистически значимо не отличалась ($p\text{-value} = 0.76$) (рисунок 5). Также не было выявлено значимой разницы в сравнении БРВ ($p\text{-value} = 0.39$). Однако стоит отметить лучшие показатели у пациентов, получивших агрессивные курсы ПХТ на промежутке от 0 до 25 месяцев, но на дальнейшем отрезке времени эта разница нивелировалась (рисунок 6).

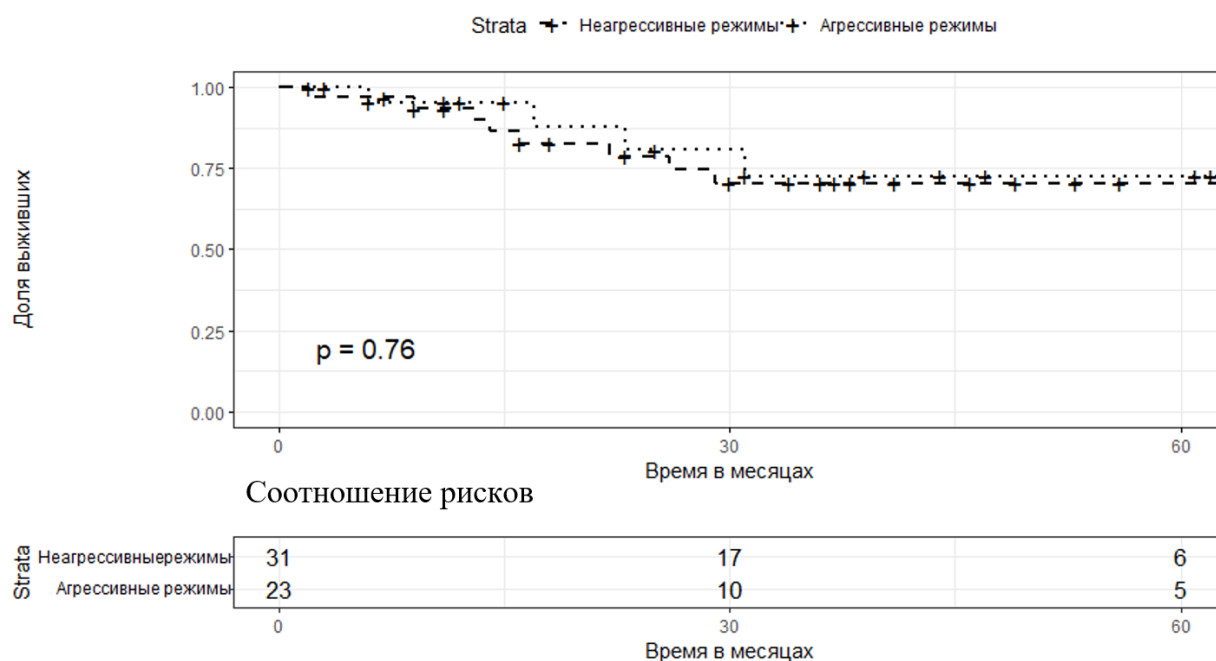


Рисунок 5 – Общая выживаемость в зависимости от агрессивности режима полихимиотерапии

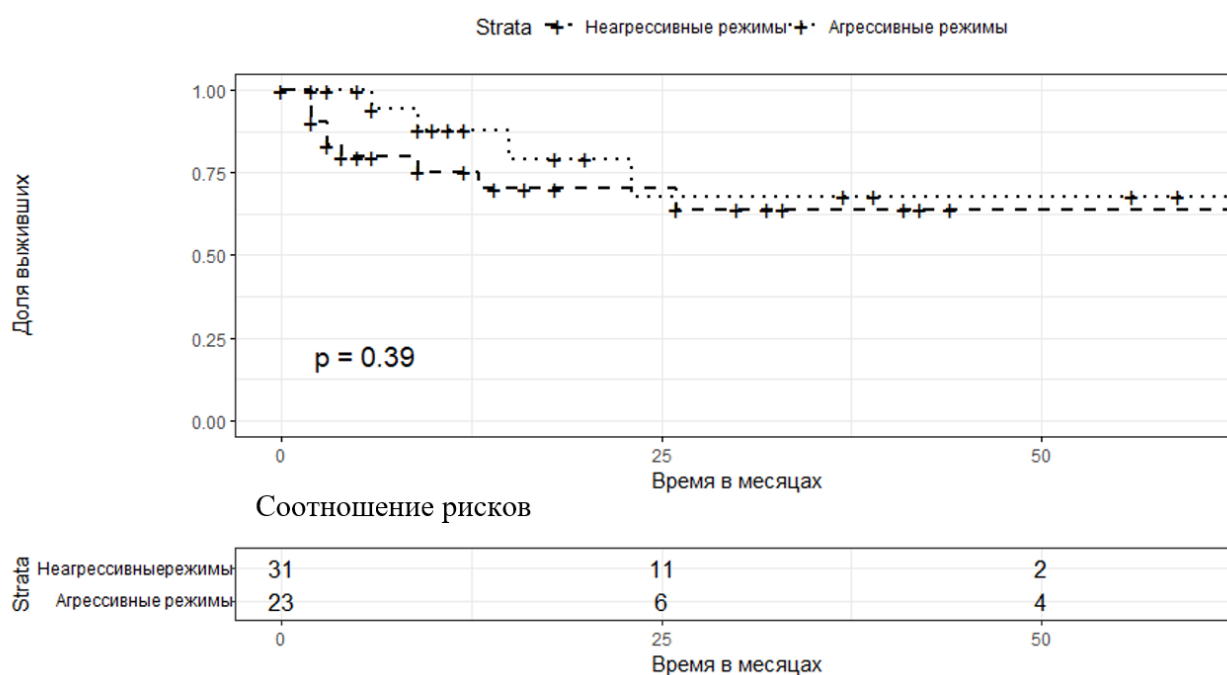


Рисунок 6 – Безрецидивная выживаемость в зависимости от агрессивности режима полихимиотерапии

Заключение. Частота достижения полных ответов сопоставима во всех группах. При этом медиана общей выживаемости в группе с СНОР-подобными режимами составила 121 месяц. Медианы в других группах достоверно вычис-

литель не удалось, что указывает на то, что в большинстве случаев получается достигнуть длительных и стойких ремиссий. Данный факт свидетельствует о правильном подходе в выборе схем терапии. Показатели 2-летней безрецидивной выживаемости при агрессивных схемах лечения в первой линии обладают преимуществом перед другими опциями, однако после 24 месяцев кривые выживаемости выравниваются. Пациентам, кандидатам на ауто-ТГСК, показано проведение более агрессивных курсов ПХТ с последующей трансплантацией [1]. В нашем исследовании ауто-ТГСК получили только 50% пациентов из возможных в группе пациентов, получивших агрессивные схемы ПХТ. Своевременное проведение ВДХТ с ауто-ТГСК у пациентов с ЛКМ может способствовать увеличению количества достижения ПО и стойких ремиссий.

Частота достижения ПО и ЧО в группах, где проведены терапия по схеме RCHOP и агрессивные курсы лечения, сопоставима, что говорит о достаточной эффективности «классических» CHOP-подобных схем терапии у пациентов, не кандидатов на трансплантацию.

Пациенты, которым в силу возраста, высокой коморбидности, были показаны курсы с редуцированной токсичностью (RB, CP, R-CP), показали наименьшее достижение ПО (n=4). Таким больным показана таргетная терапия в индукционных курсах лечения. В настоящее время активно исследуются новые таргетные препараты, такие как ингибиторы тирозинкиназы Брутона и антагонисты BCL-2, которые могут стать перспективным направлением в лечении ЛКМ [6; 7].

Исследование имеет ряд ограничений, таких как ретроспективный дизайн, небольшое количество пациентов, отсутствие данных о молекулярных особенностях опухоли. Целесообразно проведение дальнейших исследований с большим количеством пациентов, включающих анализ молекулярных характеристик опухоли, для более точной оценки эффективности различных режимов терапии ЛКМ.

Вывод. Установлено, что CHOP-подобные и агрессивные схемы терапии ЛКМ могут приводить к схожим показателям общей и безрецидивной выживаемости. Для достижения максимального ответа у пациентов с ЛКМ необходим индивидуальный терапевтический подход с учетом возраста и соматического статуса.

Список литературы

1. Лимфома из клеток мантии. Клинические рекомендации / В.И. Воробьев, Г.С. Тумян, Н.А. Фалалеева, В.В. Птушкин [и др.] // Современная Онкология- 2020 – Т. 22, №3. – С.6–23.
2. Тумян, Г.С. Мантийноклеточная лимфома: история, современные принципы диагностики, лечение (обзор литературы) // Клиническая онкогематология – 2020. - Т.13, №4. – С.366–81.
3. Mantle cell lymphoma in 2022 – A comprehensive update on molecular pathogenesis, risk stratification, clinical approach, and current and novel treatments / P. Jain, ML. Wang // Am. J. Hematol. – 2022 – Vol.97, No5. – P.638-656. DOI: 10.1002/ajh.26523.
4. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy / LA. Honigberg, AM. Smith, M. Sirisawad [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci U S A – 2010. – Vol.107, No29. – P.13075-13080.
5. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma / E. Hoster, M. Dreyling, W Klapper [et al.] // Blood. – 2008. – Vol.111, No2. – P.558–65.
6. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms/ R. Alaggio, C. Amador, I. Anagnostopoulos [et al.] // Leukemia. - 2022. – Vol.36.7 – P. 1720-1748.
7. Efficacy of venetoclax in high risk relapsed mantle cell lymphoma (MCL) – outcomes and mutation profile from venetoclax resistant MCL patients / S. Zhao, R. Kanagal-Shamanna, L. Navsaria [et al.] // Am. J. Hematol. – 2020 – Vol.95, No6. – P.623-629.

УДК 616-006.448

ГРНТИ 76.29.33

Т.Н. Рыболовлева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

T.N. Rybolovleva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and
Biological Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: rybolovleva@niigpk.ru

Е.В. Трезубова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

E.V. Tregubova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and
Biological Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
E-mail: tregubova@niigpk.ru

Е.Л. Назарова

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.м.н., заведующий лабораторией клеточной и молекулярной иммунологии

E.L. Nazarova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and
Biological Agency, Kirov
candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular
Immunology
E-mail: nazarova@niigpk.ru

M.B. Сарнова

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
научный сотрудник лаборатории патоморфологии

M.V. Sarpova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and
Biological Agency, Kirov
Researcher of the Laboratory of Pathomorphology
E-mail: sarpova@niigpk.ru

И.А. Докшина

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.м.н., врач-гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии

I.A. Dokshina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and
Biological Agency, Kirov
candidate of Medical Sciences, Hematologist of Adult Department of Hematology
and Chemotherapy
E-mail: dokshina@niigpk.ru

Прогностическая значимость мутаций генов *KRAS* и *NRAS*

у пациентов с множественной миеломой

The prognostic significance of *KRAS* and *NRAS* mutations in patients with multiple myeloma

Аннотация. Мутации генов *KRAS* и *NRAS* приводят к непрерывной активации сигнального пути RAS-MAPK, инициации и прогрессированию опухолевых процессов. Проанализирована частота встречаемости этих aberrаций, оценена их прогностическая значимость у пациентов с множественной миеломой. Показано снижение показателя трехлетней беспрогрессивной выживаемости у больных с мутациями *KRAS* в группе стандартного цитогенетического риска.

Abstract. Mutations of the *KRAS* and *NRAS* lead to continuous activation of the RAS-MAPK signaling pathway, initiation and progression of tumor processes. The frequency of occurrence of these aberrations was analyzed and their prognostic significance in patients with multiple myeloma was assessed. A shorter three-year progression-free survival was shown in patients with *KRAS* mutations in the standard cytogenetic risk group.

Ключевые слова: множественная миелома; мутации генов *KRAS* и *NRAS*; беспрогрессивная выживаемость.

Index terms: multiple myeloma; *KRAS* and *NRAS* mutations; progression-free survival.

Введение. Ведущую роль в патогенезе множественной миеломы (ММ) играет нестабильность генома, включающая транслокации, изменения числа хромосом, а также многочисленные соматические мутации. При этом заболевании наиболее часто мутируют гены семейства *RAS* (*NRAS*, *KRAS*), частота встречаемости которых составляет до 30 % [7, 8]. Эти гены кодируют белки различных путей передачи сигнала, из которых наиболее изучен RAS-MAP-киназный каскад.

Функционирование мутированных генов семейства *RAS* заключается в том, что кодируемые ими белки теряют ГТФазную активность, вследствие чего нарушается их нормальная регуляция цитокинами при передаче митоген-активирующего сигнала к ядру и усиливается пролиферация клеток. Генетические аномалии *NRAS* обычно выявляют в 12,13 и 61 кодонах, *KRAS* — в 12 и 13 кодонах [4, 9, 11]. Несмотря на то, что обнаружение этих мутаций при ММ является достаточно частым событием, информация о прогностической значимости этих генетических aberrаций в настоящий момент неоднозначна [6, 9, 12].

Цель исследования. Установить частоту встречаемости мутаций генов *KRAS* и *NRAS*, оценить их прогностическую значимость при ММ.

Материалы и методы. Обследован 51 пациент с ММ (41 — при постановке диагноза, 10 — на момент установления рецидива), наблюдавшийся в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в 2021-2023 гг. Медиана возраста больных составила 63 (Q_1 - Q_3 : 56-70) года, соотношение мужчин и женщин — 1:1,2. Выделение геномной ДНК костного мозга выполняли с использованием комплекта реагентов «РИБО-преп» (Россия). Мутации генов *NRAS* (12, 13, 61 кодоны) и *KRAS* (12, 13 кодоны) исследовали методом ПЦР в реальном времени с применением аллель-специфичных праймеров. Выявление транслокаций $t(4;14)(p16;q32)$, $t(14;16)(q32;q23)$ и делеции *17p13/TP53* осуществляли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием программы STADIA. При поиске различий номинальных переменных использовали критерии Пирсона или Фишера (в случае ожидаемого явления менее 10). Трехлетнюю беспрогрессивную выживаемость (БПВ) рассчитывали по методу Каплана-Мейера. Различия между показателями устанавливали с применением long-rank теста.

Результаты и обсуждение. Мутации генов *RAS* обнаружены у 23,5% ($n=12$) из всех обследованных пациентов. Частота генетических изменений *NRAS* составила 17,6% ($n=9$). Наиболее распространенным событием являлась миссенс-мутация p.61Q — в 13,7% ($n=7$) случаях. У 3,9% ($n=2$) пациентов выявлены аберрации p.G12/13. Точечные замены гена *KRAS* (p.G12) обнаружены у 5,9% ($n=3$) наблюдавшихся.

Полученные данные подтверждают высокую распространенность этих генетических событий RAS-MAP-киназного сигнального пути при ММ [8, 10]. Одновременное присутствие мутаций *NRAS* и *KRAS* у больных не встретилось, что указывает на единую направленность участия генов *RAS*, отвечающую за нормальную регуляцию передачи митоген-активирующего сигнала к ядру и пролиферацию клеток [7].

Среди первичных пациентов ($n=41$) мутации генов *NRAS* и *KRAS* выявлены в 9 (21,9%) случаях, при прогрессировании ($n=10$) — у 3 (30%) больных, $p=0,432$ (рисунок 1). Некоторое увеличение выявления мутаций семейства *RAS* при рецидиве заболевания согласуется с литературными данными [4]. Возможно, обнаружение этих aberrаций в случае прогрессии патологического процесса связано не только с их возникновением, как вторичных генетических событий, но и с большей способностью к выживанию отдельных минорных опухолевых клонов (недетектируемых ранее) при проведении индукционной терапии [10].



Рисунок 1 - Частота встречаемости мутаций генов *RAS* у больных ММ на разных стадиях заболевания

Цитогенетические нарушения ($del17p$ и/или $t(4;14)$ и/или $t(14;16)$) в костном мозге обнаружены у 19,1% (9 из 47) пациентов: в 14,9 % ($n=7$) случаев — в дебюте заболевания, в 4,2% ($n=2$) — на момент установления рецидива. Данные аномалии, согласно Российским клиническим рекомендациям, посвященным диагностике и лечению множественной миеломы, входят в группу высокого риска. В остальных случаях (80,8%) больные отнесены к группе стандартного цитогенетического риска: 66,0% ($n=31$) — *de novo*, 14,9% ($n=7$) — в рецидиве. При сопоставлении результатов молекулярно- и цитогенетических исследований установлено, что пациенты с мутациями *KRAS* и *NRAS* в 91,7% (11/12) случаев не имели цитогенетических аномалий высокого риска (рисунок 2).

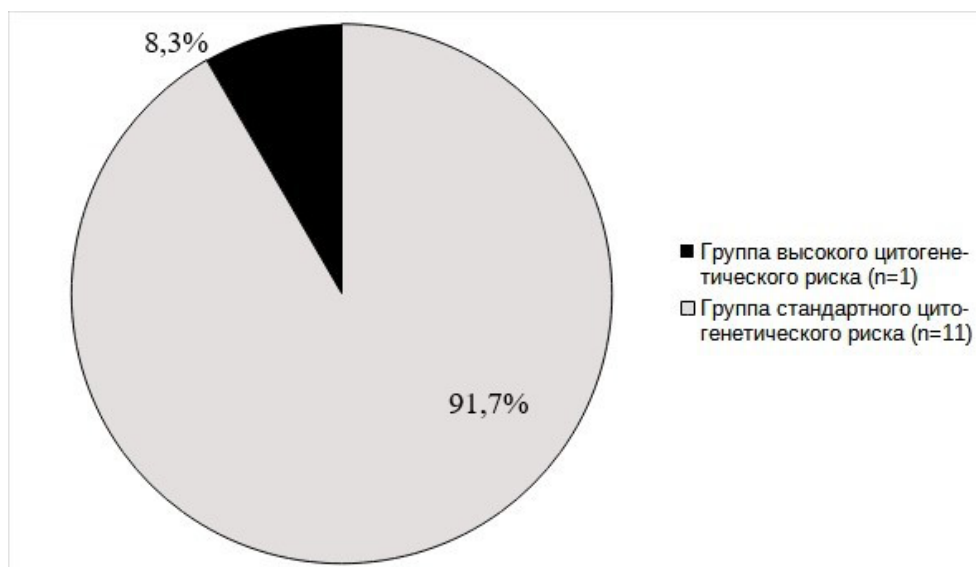


Рисунок 2 - Распределение цитогенетических групп аномалий высокого и стандартного риска у больных ММ с мутациями генов *RAS*

Большинство работ, связанных с изучением генетического профиля ММ, основывается на выявлении новых молекулярных aberrаций и установлении частоты их встречаемости [1, 9]. Публикаций, посвященных параметрам БПВ или общей выживаемости (ОВ) в зависимости от мутационного ландшафта, немного. Некоторые авторы [3, 5, 10] описывают негативное влияние мутаций генов семейства *RAS* на БПВ и ОВ при ММ. Однако в представленных работах эти молекулярные критерии оценивались у пациентов вне зависимости от группы риска и/или не учитывалось наличие неблагоприятных цитогенетических поломок, которые могли повлиять на полученные результаты.

При оценке влияния *KRAS* и *NRAS* мутаций у первичных больных ММ стандартной группы цитогенетического риска на трехлетнюю БПВ выявлены статистически значимые различия, $p < 0,001$ (рисунок 3). У пациентов без мутаций генов *RAS* показатель трехлетней БПВ составил 76,2% (медиана не достигнута). По сравнению с больными этой группы показатель БПВ у наблюдавшихся с мутациями *NRAS* определен на уровне 42,9% (медиана 17 мес., $p = 0,168$), с мутациями *KRAS* — 0% (медиана 2 мес., $p < 0,001$).

Таким образом, наличие мутаций гена *KRAS* отрицательно влияет на выживаемость без прогрессии в группе больных ММ стандартного цитогенетического риска. Оценку ОБ у больных с мутациями генов *KRAS* и *NRAS* не осуществляли в связи с отсутствием летальных исходов пациентов.

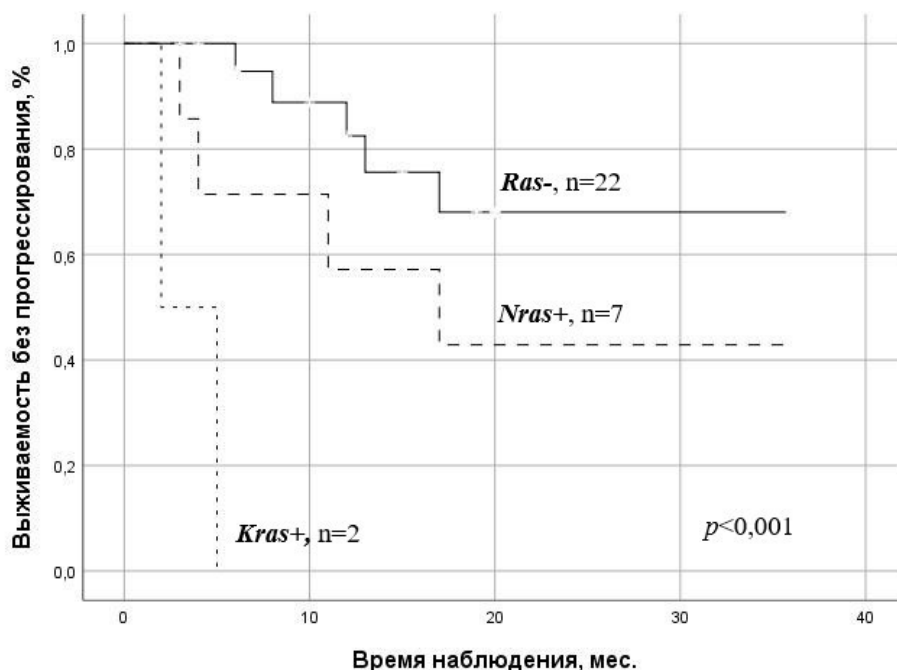


Рисунок 3 - БПВ больных ММ в группе стандартного генетического риска в зависимости от присутствия мутаций генов *NRAS* и *KRAS*

Выводы. Частота обнаружения мутаций генов *RAS* у пациентов с ММ составила 23,5%. При выявлении aberrаций *KRAS* и *NRAS* 91,7% обследованных не имели цитогенетических аномалий высокого риска. При наличии мутаций гена *KRAS* установлено снижение медианы трехлетней БПВ у больных ММ группы стандартного генетического риска ($p<0,001$).

Список литературы

1. Блау, О. Генетические аномалии при множественной миеломе / О. Блау, Л. Буллингер, И.В. Блау. – // Вестник гематологии. – № 2, 2021. – С. 4-12 (дата обращения 04.06.2024)
2. Множественная миелома. Клинические рекомендации. Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России». – Текст электронный – 217 с. – URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2022/04/mnozhestvennaya-mieloma.pdf> (дата обращения 03.06.2024).

3. KRAS/NRAS/BRAF Mutations as Potential Targets in Multiple Myeloma / S. Pasca, C. Tomuleasa, P. Teodorescu [et al]. – DOI: 10.3389/fonc.2019.01137. – Текст: электронный // Front Oncol. – 2019. – V.9 (дата обращения 05.06.2024).
4. Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications / S. Manier, K.Z. Salem, J. Park. [et al]. – DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.122. – Текст: электронный // Nature Reviews Clinical Oncology. – 2017. – V.14. – P.100–113 (дата обращения 05.03.2024).
5. Spatially divergent clonal evolution in multiple myeloma: overcoming resistance to BRAF inhibition / M.S. Raab, N. Lehners, J. Xu et al. – DOI: 10.1182/blood-2015-12-686782. – Текст: электронный // Blood. – 2016. – P. 2155–2157 (дата обращения 11.03.2024).
6. Circulating tumour DNA analysis demonstrates spatial mutational heterogeneity that coincides with disease relapse in myeloma / S Mithraprabhu, T Khong, M Ramachandran [et al]. – doi:10.1038/leu.2016.366. – Текст: электронный // Leukemia. – 2017. – V.31. – P.1695–1705 (дата обращения 21.05.2024).
7. Mutational spectrum, copy number changes, and outcome: results of a sequencing study of patients with newly diagnosed myeloma / B.A. Walker, E.M. Boyle, C.P. Wardell [et al]. – doi: 10.1200/JCO.2014.59.1503. – Текст: электронный // J Clin Oncol. – 2015. – V.33. – P.3911–3920 (дата обращения 24.01.2024).
8. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy / J.G. Lohr, P. Stojanov, S.L. Carter et al. [et al]. – doi: 10.1016/j.ccr.2013.12.015. – Текст: электронный // Cancer Cell. – 2014. – V.25(1). – P.91–101 (дата обращения 04.06.2024).
9. Comprehensive characterization of the mutational landscape in multiple myeloma cell lines reveals potential drivers and pathways associated with tumor progression and drug resistance / V. Vikova, M. Jourdan, N. Robert et al. – DOI: 10.7150/thno.28374. – Текст: электронный // Theranostics. – 2019. – V.9. – P.540–553 (дата обращения 06.06.2024).
10. Mutation of NRAS but not KRAS significantly reduces myeloma sensitivity to single-agent bortezomib therapy / G. Mulligan D.I. Lichter, A.Di Bacco [et al]. – doi: 10.1182/blood-2013-05-504340. – Текст: электронный // Clinical Trial. – 2014. – V.123(5). – P.632–9 (дата обращения 05.06.2024).
11. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma / W.J. Chng, N. Gonzalez-Paz, T. Price-Troska et al. – doi: 10.1038/leu.2008.142. – Текст: электронный // Leukemia. – 2008. – V.22(12). – P. 2280–2284 (дата обращения 01.04.2024).
12. Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III trial / P. Liu, T. Leong, L. Quam et al. – doi.org/10.1182/blood.V88.7.2699.bloodjournal8872699 – Текст: электронный // Trial. Blood. – 1996. – V.88(7). – P. 2699–2706 (дата обращения 12.03.2024).

УДК 616-006.441

ГРНТИ 76.29.33

М.В. Сарпова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
научный сотрудник лаборатории патоморфологии

M.V. Sarpova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: sarpova@niigpk.ru

Д.А. Дьяконов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.м.н., заведующий лабораторией патоморфологии

D.A. Diakonov

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: dyakonov@niigpk.ru

Е.В. Ванеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.б.н., научный сотрудник лаборатории патоморфологии

E.V. Vaneeva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Biological Sciences, Researcher of the Laboratory of Pathomorphology

E-mail: vaneeva@niigpk.ru

В.А. Росин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.м.н, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

V.A. Rosin

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of
Pathomorphology
E-mail: rosin@niigpk.ru

С.В. Самарина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
к.м.н., заведующая клинико-диагностическим отделением гематологии и
химиотерапии с дневным стационаром

S.V. Samarina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of Medical Sciences, Head of the Clinical Diagnostic Department of
Hematology and Chemotherapy with Day Hospital
E-mail: samarina@niigpk.ru

А.Н. Соколова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник лаборатории патоморфологии

A.N. Sokolova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Junior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology
E-mail: turubanova@niigpk.ru

О.В. Карпачева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
Лаборант-исследователь лаборатории патоморфологии

O.V. Karpacheva

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Laboratory Assistant-Researcher of the Laboratory of Pathomorphology
E-mail: karpacheva@niigpk.ru

**Взаимосвязь делеции хромосомного региона 9p21 и экспрессии
протеинов p16INKa, p14ARF, p53 с выживаемостью больных диффузной
В-крупноклеточной лимфомой**

**The Relationship between 9p21 Chromosomal Region Deletion and the
Expression of p16INKa, p14ARF, p53 Proteins with the Survival of Patients with
Diffuse Large B-cell Lymphoma**

Аннотация. Исследована взаимосвязь делеции 9p21, а также экспрессии белков p16INKa, p14ARF, p53 с выживаемостью больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Обнаружено, что делеция 9p21 и увеличение количества p53-экспрессирующих ядер в биопсийном материале связаны с высоким риском прогрессии неоплазии, а повышение содержания p14ARF-положительных клеток – с высоким риском летального исхода.

Abstract. The relationship between 9p21 deletion and the expression of p16INKa, p14ARF, p53 proteins with the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma was studied. It was found that 9p21 deletion and an increased number of p53-expressing nuclei in biopsy samples are associated with an high risk of neoplasia progression, while an increased number of p14ARF-positive tumor cells is associated with a high risk of fatal outcomes.

Ключевые слова: 9p21, p14ARF, p53; иммуногистохимия; ДВКЛ; выживаемость.

Index terms: 9p21, p14ARF, p53; immunohistochemistry; diffuse large B-cell lymphoma, survival.

Введение. Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ), неспецифицированная – наиболее распространенное злокачественное лимфопролиферативное новообразование из зрелых В-клеток с диффузным характером роста и от-

существованием критериев, определяющих специфические диагностические категории других лимфом из крупных В-клеток. Несмотря на то, что ДВКЛ выделена в отдельную нозологическую группу, заболевание характеризуется вариабельностью клинических, морфологических, иммунофенотипических, генетических проявлений, неодинаковым ответом на терапию и прогнозом выживаемости [18]. В настоящее время простым и воспроизводимым методом оценки индивидуального риска раннего прогрессирования заболевания является расчет международного прогностического индекса (МПИ). Однако, по мнению ряда авторов, его использование в практике не всегда позволяет точно оценить индивидуальный риск неудач терапии, поскольку МПИ базируется на клинических характеристиках больных, не учитывая биологические особенности опухоли [1]. В связи с этим востребован поиск дополнительных генетических и молекулярных маркеров, ассоциированных с неблагоприятным течением заболевания.

Гены-супрессоры опухолевого роста *CDKN2A* и *TP53* часто подвергаются абберациям при многих злокачественных новообразованиях. Их белковые продукты (p14ARF, p16INK4a, p53) являются значимыми компонентами сигнальных путей апоптоза и клеточного цикла. Делеции хромосомного региона 9p21, в котором локализован ген *CDKN2A*, встречаются в 20-30% случаев ДВКЛ и, по мнению ряда авторов, могут выступать в качестве неблагоприятных прогностических маркеров [5, 7, 15]. По данным F. Jardin и соавт., наличие указанных генетических нарушений связано с низкими показателями выживаемости пациентов [5]. C.R. Volen и соавт. определили, что утрата *CDKN2A* ассоциирована с неблагоприятными клиническими характеристиками заболевания и низкой беспрогрессивной выживаемостью (БПВ) при однофакторном анализе. Однако при многофакторном анализе значимой ассоциации не обнаружено [15]. A. Intlekofer и соавт. не получили доказательств связи между наличием аббераций *CDKN2A* и прогнозом течения ДВКЛ [9]. K. Karube и соавт. установили, что делеция *CDKN2A* в сочетании с мутациями гена *TP53* напрямую коррелирует с плохим ответом на стандартную терапию независимо от МПИ [10].

В работе E. Laharanne и соавт. установлено, что иммуногистохимический (ИГХ) анализ с антителами к p16INK4a не способен предопределить структурные нарушения *CDKN2A*, поскольку в большинстве образцов без делеции гена также было обнаружено отсутствие иммунореактивности [2]. Напротив, при некоторых лимфопролиферативных неоплазиях зарегистрировано избыточное накопление

протеина p16INK4a в опухолевых клетках, а также обнаружена его ассоциация с неблагоприятным прогнозом заболеваний [4, 8]. В отдельных источниках показано, что сверхэкспрессия p14ARF, выявленная при различных В-клеточных лимфомах, связана с агрессивным течением патологического процесса [16]. По данным литературы, высокое накопление белка в клетках может служить маркером структурных aberrаций гена *TP53* [6, 11].

Мутации *TP53* обнаруживаются в 20-22% случаев ДВКЛ и определены независимыми предикторами рефрактерности к терапии и развития раннего рецидива заболевания [12, 14]. Нарушения в большинстве случаев происходят в 4-8 экзонах, кодирующих центральный ДНК-связывающий домен белкового продукта p53. Вопрос о прогностической роли ИГХ экспрессии протеина p53 продолжает обсуждаться [3, 13, 14, 17]. В исследованиях Z.Y. Xu-Monette и соавт., Y. Xie и соавт. показано, что указанный маркер является предиктором неблагоприятного прогноза у пациентов, получавших R-CHOP [14, 17]. В исследованиях P. Peroja и соавт., L. Zlamalikova и соавт. не определено связи p53 с клиническими характеристиками больных ДВКЛ и их выживаемостью [3, 13]. Авторы указывают, что анализ экспрессии белка p53 с помощью ИГХ имеет ограничение, поскольку зависит от используемых пороговых значений [3, 14].

Сведения о прогностическом значении делеции гена *CDKN2A*, локализованного в регионе 9p21, противоречивы, данные о роли экспрессии его белковых продуктов p16INK4a и p14ARF в опухолевых клетках при ДВКЛ немногочисленны. В этой связи актуальность исследования взаимосвязи генетических нарушений 9p21, а также маркеров биологических путей апоптоза и клеточного цикла с характером течения неоплазии не вызывает сомнений.

Цель исследования. Определить взаимосвязь делеции хромосомного региона 9p21, а также экспрессии протеинов p16INK4a, p14ARF, p53 с выживаемостью больных ДВКЛ.

Материалы и методы. Для анализа использованы биопсийные образцы опухолевой ткани (парафиновые блоки/кассеты) 103 пациентов с впервые установленной ДВКЛ. Из них 49,5% (n=51) – мужчин, 51,5% (n=52) – женщин. Медиана возраста – 59 лет [Q_1 - Q_3 :49-67]. Все обследованные получали первую линию терапии по схеме R-CHOP.

Делецию хромосомного региона 9p21 определяли с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Экспрессию p16INK4a, p14ARF, p53 изучали ИГХ и морфометрическими методами. Статистическую обработку данных выполняли, используя программное обеспечение SPSS Statistic 26. Оценку нормальности распределения количественной переменной осуществляли критерием Шапиро-Уилка. Различия в содержании количественных переменных в зависимости от бинарных показателей определяли с использованием U-критерия Манна-Уитни. Сравнение частоты встречаемости номинальных независимых переменных в группах обследованных, разделенных по изучаемым признакам, определяли с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) Пирсона. Пятилетнюю ОВ и БПВ рассчитывали по методу Каплана-Мейера с графическим построением кривых. Различия между показателями выживаемости в группах больных определяли с применением log-rank теста. Риск наступления события (прогрессии и летального исхода) вычисляли с использованием регрессионного анализа Кокса с расчетом отношения рисков (ОР) и 95% доверительного интервала (ДИ), отбор переменных осуществляли методом обратного исключения (Вальд). Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Делеция локуса 9p21 обнаружена у 16,5% ($n=17$) больных ДВКЛ. Относительное количество опухолевых клеток, позитивных в реакциях с антителами к p16INK4a, p14ARF, p53, варьировало в диапазонах от 0 до 89% (Me – 2% [Q_1 - Q_3 :0-6]), от 0 до 96% (Me – 76% [Q_1 - Q_3 :26-84]), от 0 до 91% (Me – 35% [Q_1 - Q_3 :13-59]) соответственно. Распределение переменных отличалось от нормального (Критерий Шапиро-Уилка $p < 0,001$), в связи с чем для анализа применяли непараметрические методы статистики.

Проведен анализ взаимосвязи между наличием/отсутствием делеции 9p21, а также количеством p16INK4a-, p14ARF-, p53-позитивных клеток и характеристиками пациентов (возрастом < 60 и ≥ 60 лет, наличием/отсутствием В-симптомов, локальными/распространенными стадиями заболевания, наличием/отсутствием более одного очага экстранодального поражения, нормальной/высокой концентрацией ЛДГ в сыворотке крови, GCB и non-GCB ИГХ-подтипом, МПИ ≤ 2 и > 2). В результате обнаружено, что количество p14ARF-экспрессирующих опухолевых клеток существенно выше у больных с высоким/высоким-промежуточным риском, согласно МПИ, чем у обследованных с низким/низким промежуточным риском (медианы (Me) – 79,0% [62,0-86,5] и 60,0% [3,5-80,0] соответственно; $p=0,009$; таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение количества p14ARF-положительных опухолевых клеток в группах больных с различными характеристиками

Характеристики		Количество p14ARF- позитивных опухолевых клеток, %	p
		Me [Q1-Q3]	
Возраст	<60	72,0 [26,0-83,0]	0,730
	≥60	77,0 [28,0-85,0]	
В-симптомы	Нет	65,0 [10,0-80,0]	0,046*
	Есть	79,0 [55,0-86,0]	
Стадия	1-2	59,0 [10,0-82,5]	0,069
	3-4	78,0 [56,0-85,0]	
Экстранодальные очаги	0-1	75,5 [22,0-84,5]	0,797
	>1	72,0 [52,0-83,0]	
ЛДГ	Норма	73,5 [7,0-82,0]	0,478
	Выше нормы	75,5 [36,4-84,0]	
ИГХ-подтип	GCB	65,0 [2,0-85,0]	0,482
	non-GCB	76,0 [47,0-83,0]	
МПИ	≤2	60,0 [3,5-80,0]	0,009*
	>2	79,0 [62,0-86,5]	

Примечание: * – различия показателей статистически значимы ($p < 0,05$)

Количество p14ARF-позитивных ядер больше у пациентов с наличием В-симптомов, чем у больных с их отсутствием (Me – 79% [55,0-86,0] и 65% [10,0-80,0] соответственно; $p=0,046$). Обнаружена тенденция к увеличению числа p14ARF-положительных опухолевых клеток у лиц с распространенными (3-4) стадиями заболевания по отношению к обследованным с локальными (1-2) (Me равны 78% [56,0-85,0] и 59% [10,0-82,5] соответственно; $p=0,069$). Статистически значимых ассоциаций между наличием делеций 9p21, а также количеством p16INK4a-, p53-экспрессирующих опухолевых клеток и клинико-лабораторными характеристиками пациентов не выявлено.

Проведен анализ отдаленных результатов терапии по протоколу R-CHOP. Пятилетняя общая выживаемость (ОВ) в группе обследованных пациентов составила 64,1%, пятилетняя БПВ – 56,3%. Медиана наблюдения – 56 мес. [Q₁-Q₃:20-60]. Пятилетняя ОВ больных с делецией хромосомного региона 9p21 в би-

опсийном материале была ниже (52,9%, Ме не достигнута), чем аналогичный показатель у лиц без цитогенетической аберрации (66,3%, Ме не достигнута), однако статистически значимой связи не обнаружено ($p=0,221$; рисунок 1 а).

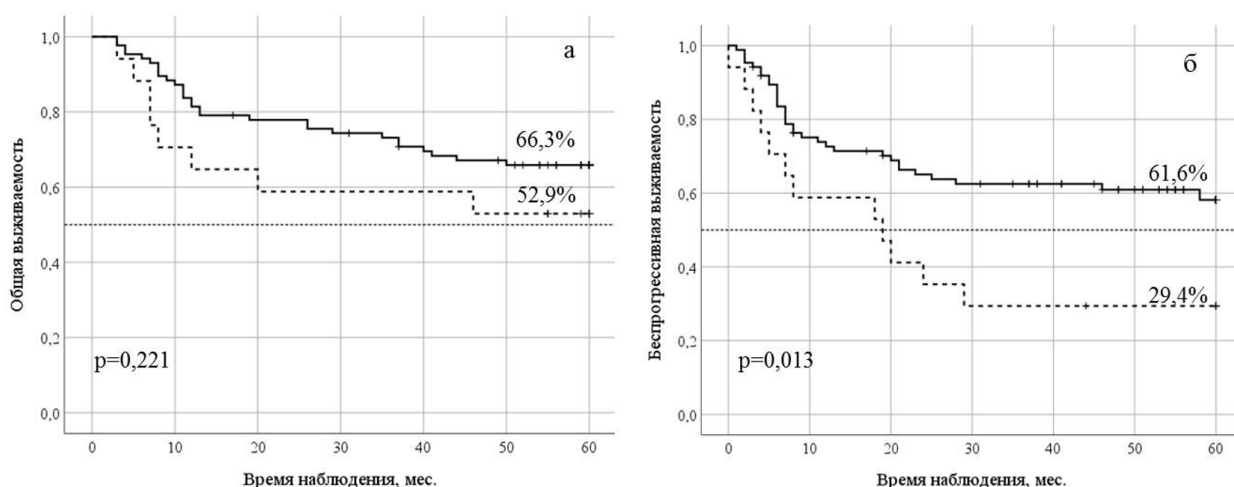


Рисунок 1 – Общая (а) и беспрогрессивная (б) выживаемость в группах **пациентов** с наличием ($n=17$, пунктирная линия) и отсутствием ($n=86$, сплошная линия) делеции хромосомного региона 9p21

Пятилетняя БПВ значимо ниже у пациентов с $del9p21$, чем у обследованных без данной аберрации: 29,4% (Ме 19 мес.) против 61,6% (Ме не достигнута) соответственно ($p=0,013$; рисунок 1 б). Риск прогрессии заболевания у обследованных с утратой хромосомного региона 9p21 в опухолевых клетках в 2,25 раза выше, чем у лиц без генетической аберрации ($OR=2,25$; 95% ДИ=1,16-4,36).

Проанализирована ассоциация между содержанием протеин-экспрессирующих опухолевых клеток в биоптатах и выживаемостью больных ДВКЛ. Согласно однофакторному анализу Кокса, значимой взаимосвязи между увеличением количества p16INK4a-положительных ядер и прогрессией заболевания, летальным исходом не обнаружено. При увеличении количества p14ARF-положительных опухолевых клеток на каждые 10% в биопсийных образцах пациентов с ДВКЛ риск летального исхода возрастал на 19% ($p=0,003$; $OR=1,019$; 95% ДИ=1,006-1,033), риск прогрессии заболевания – на 14% ($p=0,009$; $OR=1,014$, 95% ДИ=1,003-1,025). Показано, что повышение доли p53-экспрессирующих клеток на каждые 10% ассоциировано с увеличением риска прогрессии заболевания на 11%, а риска летального исхода – на 12%, однако, статистическая значимость этой закономерности

сти не достигнута ($p=0,053$; $OR=1,011$; 95% ДИ=1,01-1,02 и $p=0,063$; $OR=1,012$; 95% ДИ=0,99-1,02, соответственно).

Для оценки независимого влияния предикторов на риск прогрессии заболевания и летального исхода проведен многофакторный анализ Кокса. В него вошли показатели, прошедшие отбор по уровню значимости, а также МПИ>2 и ИГХ non-GCB-подтип (таблица 2).

Таблица 2 – Анализ Кокса предикторов общей и беспрогрессивной выживаемости пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Параметр	Общая выживаемость			Беспрогрессивная выживаемость		
	ОР	95% ДИ	p	ОР	95% ДИ	p
Однофакторный анализ						
МПИ>2	4,58	2,15-9,75	<0,001	6,39	3,13-13,03	<0,001
non-GCB-подтип	1,65	0,75-3,62	0,210	2,18	1,02-4,70	0,046
del 9p21	1,62	0,74-3,54	0,229	2,25	1,16-4,36	0,016
p16INK4A	1,007	0,991-1,023	0,393	1,004	0,989-1,019	0,630
p14ARF	1,019	1,006-1,033	0,003	1,014	1,003-1,025	0,009
p53	1,011	0,999-1,024	0,071	1,011	1,001-1,023	0,053
Многофакторный анализ						
МПИ>2	4,08	1,81-9,20	0,001	6,69	3,25-13,76	<0,001
p14ARF	1,015	1,002-1,028	0,028	-	-	-
p53	1,011	0,999-1,023	0,082	1,016	1,005-1,028	0,006
non-GCB-подтип	-	-	-	2,00	0,91-4,37	0,084
del 9p21	-	-	-	2,12	1,07-4,19	0,030

В многофакторном анализе установлено, что число p14ARF-положительных клеток является независимым предиктором, ассоциированным с повышением риска летального исхода ($p=0,028$; $OR=1,015$; 95% ДИ=1,002-1,028) наряду с МПИ. Полученные результаты согласуются с данными А. Sánchez-Aguilera и соавт., которые обнаружили, что «аномальная» экспрессия протеина p14ARF связана с высоким индексом пролиферации и низкой ОВ пациентов с агрессивными В-клеточными лимфомами [16]. Вероятно, сверхэкспрессия данного маркера является индикатором нарушения основных путей регуляции клеточного цикла и, следовательно, агрессивности опухоли.

Делеция хромосомного региона 9p21 установлена независимым предиктором прогрессии ДВКЛ наряду с экспрессией протеина p53 и МПИ. Риск неблагоприятного течения неоплазии более чем в два раза выше у больных, в биологических образцах которых обнаружена делеция 9p21 ($p=0,030$; ОР=2,12; 95% ДИ=1,07-4,19). Полученные результаты согласуются с данными F. Jardin и соавт., обнаруживших, что показатели выживаемости обследованных с поломками *CDKN2A* и/или *CDKN2B* хуже по сравнению с показателями выживаемости пациентов с нормальным статусом 9p21 [5]. В нашей работе различий в пятилетней ОВ в зависимости от наличия/отсутствия поломок в хромосомном регионе 9p21 не выявлено.

Независимым предиктором снижения БПВ выявлен уровень p53-положительных клеток. При его увеличении на каждые 10% риск прогрессии заболевания возрастал на 16% ($p=0,006$; ОР=1,016; 95% ДИ=1,005-1,028). Это согласуется с данными Z.Y. Xu-Monette и соавт. и Y. Xie и соавт., установившими, что высокая экспрессия маркера p53 (пороговые доли экспрессирующих клеток 50% и 30% соответственно) связана со снижением показателей выживаемости больных ДВКЛ и может быть использована в качестве дополнительного критерия для стратификации пациентов на группы риска [14, 17].

Заключение. Делеция хромосомного региона 9p21 и высокое содержание p53-экспрессирующих клеток в биопсийном материале являются независимыми прогностическими факторами, ассоциированными с высоким риском прогрессии ДВКЛ, а увеличение уровня p14ARF-положительных опухолевых клеток – с высоким риском летального исхода.

Список литературы

1. Клинико-гематологические показатели прогноза ответа на терапию первой линии у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой / С.В. Самарина, Е.Л. Назарова, Н.В. Минаева [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – № 12. – С.68–72.
2. CDKN2A-CDKN2B deletion defines an aggressive subset of cutaneous T-cell lymphoma / E. Laharanne, E. Chevret, Y. Idrissi [et al.] // Modern Pathology. – 2010. – Vol. 23, I. 4. – P. 547–558.
3. Complex analysis of the TP53 tumor suppressor in mantle cell and diffuse large B-cell lymphomas / L. Zlamalikova, M. Moulis, B. Ravcukova [et al.] // Oncology Reports. – 2017. – Vol. 4. – P. 2535–2542.

4. Correlations between p16 Protein Expression and Genomic Profile in Mantle Cell Lymphoma and Impact on Survival, a Lyma-Genomic Project Conducted on Behalf of the Lysa Group / Y. Bris, D. Canioni, B. Burroni [et al.]. / *Blood*. – 2018. – № 132. – P. – 2846.
5. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study / F. Jardin, J. P. Jais, T. J. Molina [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, I. 7. - P. 1092-1104.
6. Dual Role of the Alternative Reading Frame ARF Protein in Cancer / R. Fontana, M. Ranieri, G. La Mantia, M. Vivo. // *Biomolecules*. – 2019. – Vol.9, I.3. – P. 87.
7. Genetic and functional drivers of diffuse large B-cell lymphoma / A. Reddy, J. Zhang, N. S. Davis [et al.] // *Cell*. – 2017. – Vol. 171, I. 2. – P. 481-494.
8. Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome / A. Alhejaily, A. G. Day, H. E. Feilotter [et al.] // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 20, I. 6. – P. 1676-86.
9. Integrated DNA/RNA targeted genomic profiling of diffuse large B-cell lymphoma using a clinical assay / A. M. Intlekofer, E. Joffe, C. L. Batlevi [et al.] // *Blood cancer journal*. – 2018. – Vol. 8. - № 60.
10. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets *Leukemia* / K. Karube, A. Enjuanes, I. Dlouhy [et al.] // *Leukemia*. - 2018. – Vol. 32. – P. 675–684.
11. Kung C.P. It's Getting Complicated-A Fresh Look at p53-MDM2-ARF Triangle in Tumorigenesis and Cancer Therapy / C. P. Kung, J. D. Weber // *Front Cell Dev Biol*. – 2022. – № 10. – P. 818744.
12. Molecular genetics of relapsed diffuse large B-cell lymphoma: insight into mechanisms of therapy resistance / M. R. Berendsen, W. B. C. Stevens, M. van den Brand [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, I. 12. – P. 3553.
13. Mutation of TP53, translocation analysis and immunohistochemical expression of MYC, BCL-2 and BCL-6 in patients with DLBCL treated with R-CHOP / P. Peroja, M. Pedersen, T. Mantere [et al.] // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8. – P. 14814.
14. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study / Z.Y. Xu-Monette, L. Wu, C. Visco [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, I. 19. –P. 3986–3996.
15. Prognostic impact of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma and relationship to cell-of-origin: data from the phase III GOYA study / C. R. Bolen, M. Klanova, M. Trnény [et al.] // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105, I. 12. – P. 2298–2307.

16. p14ARF nuclear overexpression in aggressive B-cell lymphomas is a sensor of malfunction of the common tumor suppressor pathways / A. Sánchez-Aguilera, M. Sánchez-Beato, J.F. García [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99, I. 4. – P.1411-1418.
17. p53 Expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study /Y. Xie, M. A. Bulbul, L. Ji [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. – 2014. – Vol. 141, I. 4. – P. 593–604.
18. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms / R. Alaggio, C. Amador, I. Anagnostopoulos [et al.] // Leukemia. – 2022. –Vol. 36. – P. 1720–1748.

УДК 616.419

ГРНТИ 76.03.39

Д.Н. Смирнова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательской
лаборатории прикладной иммуногенетики

D.N. Smirnova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of biology sciences, researcher of the research laboratory of applied
immunogenetics

E-mail: smirnovadn@niigpk.ru

М.А. Логинова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор биологических наук, заведующий научно-исследовательской
лабораторией прикладной иммуногенетики

M.A. Loginova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Doctor of Sciences in Biology, Head of the research laboratory of applied
immunogenetics
E-mail: loginova@niigpk.ru

O.A. Махова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории
прикладной иммуногенетики

O.A. Makhova

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Research assistant of the research laboratory of applied immunogenetics
E-mail: mahova@niigpk.ru

И.П. Обухов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
лаборант-исследователь научно-исследовательской лаборатории прикладной
иммуногенетики

I.P. Obukhov

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Research technician of the research laboratory of applied immunogenetics
E-mail: obuhov@niigpk.ru

Н.А. Зорина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук
заведующий отделением химиотерапии и трансплантации костного мозга

N.A. Zorina

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Candidate of medical sciences
Head of the Department of Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation
E-mail: zorina@niigpk.ru

И.В. Парамонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания
крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
доктор медицинских наук, директор института

I.V. Paramonov

The Federal State-Financed Scientific Institution
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
under the Federal Medical Biological Agency, Kirov
Doctor of Sciences in Medicine, Head of the Institute
E-mail: paramonov@niigpk.ru

**Анализ результатов аллогенной трансплантации гемопоэтических
стволовых клеток в зависимости от степени HLA-совместимости донора и
реципиента в аллельном разрешении**

**Analysis of the results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
depending on the degree of HLA compatibility of the donor and recipient in
allelic resolution**

Аннотация. Проведен ретроспективный анализ влияния совместимости 28 пар донор-пациент по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 в аллельном разрешении на исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от неродственных доноров. Выявлено снижение общей выживаемости при наличии расхождений.

Abstract. A retrospective analysis of the effect of the compatibility of 28 donor-patient pairs at the HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 loci in allelic resolution on the outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors was carried out. A decrease in overall survival was revealed in the presence of discrepancies.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки; HLA-совместимость; аллельное разрешение; NGS.

Index terms: hematopoietic stem cells; HLA-compatibility; allele resolution; NGS.

Введение. На сегодняшний день эталоном подбора неродственного донора является совпадение пары донор-реципиент по 10 аллелям следующих локусов: *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* на уровне высокого разрешения (2-fields), то есть группы аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность пептидсвязывающих доменов молекул HLA [1,2,6,7]. Внедрение технологии NGS (next generation sequencing) в рутинную практику позволяет проводить HLA-типирование не только в высоком, но и в аллельном разрешении. Существуют литературные данные о положительном влиянии совместимости пар донор-пациент по локусам *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* на уровне аллельного разрешения на выживаемость после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [5,8]. Аллельное разрешение подразумевает HLA-типирование на уровне 4-fields, позволяющее определить конкретный аллель HLA-гена с нуклеотидными заменами не только в кодирующих, но и в некодирующих регионах генов HLA [4].

Цель работы – проанализировать влияние несовместимости по локусам HLA в аллельном разрешении между пациентом и донором на исход аллогенной неродственной ТГСК путем оценки общей трехлетней выживаемости и клинической картины в посттрансплантационный период.

Материалы и методы. В исследование включено 28 пар донор-реципиент клиники ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России. Среди пациентов 46% (n=13) мужчин и 54% (n=15) женщин. Медиана возраста пациентов составила 37 лет (диапазон от 3 до 55). Алло-ТГСК от неродственных доноров проведены пациентам со следующи-

ми заболеваниями: острый миелоидный лейкоз – 50% (n=14), хронический миелоидный лейкоз – 11% (n=3), миелодиспластический синдром – 7% (n=2), острый лимфобластный лейкоз – 11% (n=3), хронический лимфолейкоз – 7% (n=2), неходжскинская лимфома – 4% (n=1), остеомиелифброз – 4% (n=1), лимфома Ходжкина – 4% (n=1), идеопатическая апластическая анемия – 4% (n=1).

Препараты ДНК для проведения HLA-типирования получены из образцов цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА) методом сепарации на магнитных частицах с использованием набора реагентов MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Швейцария). Концентрация препаратов ДНК, определенная на спектрофотометре TECAN Infinite 200 («TECAN», Швейцария), составляла в среднем 30-70 нг/мкл при соотношении A260/A280=1,7÷1,9.

HLA-типирование в высоком разрешении пар донор-реципиент перед проведением алло-ТГСК проводили по технологии SBT (sequence-based typing) с использованием набора реагентов PROTRANS S4, S3 (Protrans, Германия). Ретроспективно все исследуемые пары донор-реципиент типировались по технологии NGS с использованием набора реагентов AllType NGS II Loci Amplification Kit (One Lambda, США).

Общую выживаемость оценивали с использованием метода Каплан-Мейера [3]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения StatTech 4.1.4 (разработчик - ООО «Статтех», Россия).

Результаты и обсуждение. Подбор пар донор-реципиент перед проведением алло-ТГСК выполнен по 5 HLA-локусам (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*) в высоком разрешении. Всем пациентам была выполнена неродственная алло-ТГСК от доноров, совместимых 10/10 в высоком разрешении.

В ходе ретроспективного исследования по технологии NGS для этих пар получены результаты в аллельном разрешении. Из 28 обследованных пар – 20 оказались полностью совместимыми по 10 аллелям, 6 пар имели несовпадение по 1 локусу и 2 пары – несовпадение по 2 локусам. Характеристика выявленных несовпадений представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Аллельная HLA-совместимость пар донор-реципиент

HLA-совместимость	Значение, % (n)
10/10 аллелей	71,4 (20)
9/10 аллелей	
несоответствие в локусе HLA-B	7,1 (2)
несоответствие в локусе HLA-C	3,6 (1)
несоответствие в локусе HLA-DRB1	10,7 (3)
8/10 аллелей	7,2 (2)

При оценке общей выживаемости пациенты были разделены на две группы – полностью совместимые и имеющие несовпадения в результатах генотипирования в аллельном разрешении. В качестве точки начала наблюдения выбрано количество дней, прошедших с алло-ТГСК, точкой окончания наблюдения является количество дней до наступления смерти пациента или последнего визита в клинику Учреждения для сдачи анализа на уровень посттрансплантационного химеризма.

Общая трехлетняя выживаемость при степени совместимости 10/10 в аллельном разрешении составила 60,0%, при степени совместимости 9/10 и менее – 50,0% (рисунок 1). Однако установленные различия оказались статистически незначимы ($p = 0,691$).

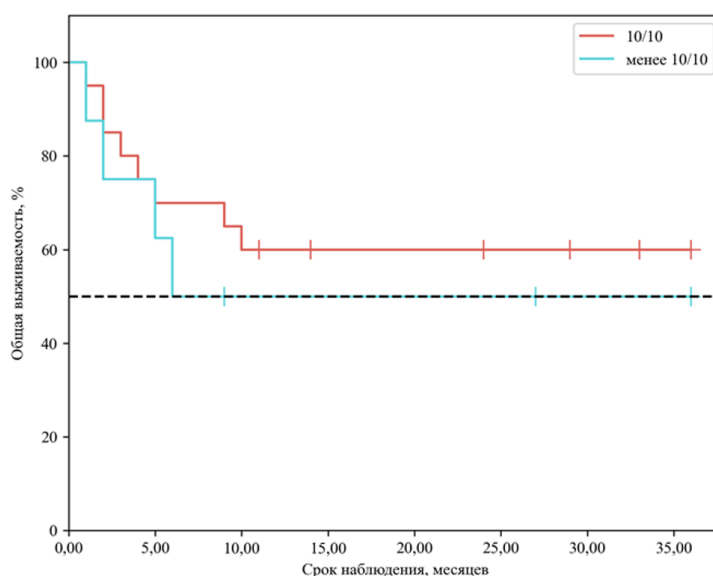


Рисунок 1 – График общей трехлетней выживаемости пациентов в зависимости от степени совместимости по пяти HLA-локусам в аллельном разрешении

Инфекции после ТГСК часто являются причиной смерти реципиентов. Причиной смерти для 20% (n=4) пациентов полностью совместимых со своими донорами явились инфекционные осложнения, к которым относится инфекция, вызванная вирусом COVID-19, 10% (n=2) пациентов погибли от рецидива, еще 10% (n=2) от тяжелой «реакции трансплантат против хозяина». При оценке причин гибели пациентов, совместимых со своими донорами по 9 и менее аллелям HLA, 25% (n=2) пациентов погибли от инфекционных осложнений, 25% (n=2) от тяжелой «реакции трансплантат против хозяина».

Клиническая картина острой реакции «трансплантат против хозяина» (оРТПХ) выявлена у 65% (n=13), перенесших трансплантацию от донора совместимого по 10 аллелям из 10 в аллельном разрешении, у половины (n=3) пациентов, совместимых со своим донором по 9 аллелям, и у всех пациентов (n=2), совместимым лишь по 8 из 10 аллелей.

Частота первичного неприживления трансплантата в группах пациентов, перенесших алло-ТГСК от доноров, подобранных по 10/10 и 9/10 HLA-аллелям в аллельном разрешении составила 5,0 % и 16,7 %, соответственно. В группе пациентов, совместимым по 8 из 10 HLA-аллелей первичного неприживления трансплантата не выявлено, однако один пациент умер от оРТПХ на +62 день после ТГСК, у второй пациентки наблюдалась в ранний посттрансплантационный период оРТПХ, на +24 сутки выявлен смешанный химеризм (30% клеток пациента), на момент последнего визита пациентки в клинику (+259 дней) уровень посттрансплантационного химеризма составлял 0,4 % клеток пациента.

Заключение. Степень совместимости пары донор-реципиент остается важнейшим фактором, влияющим на успешность проведения алло-ТГСК. При подборе неродственного донора для алло-ТГСК «золотым стандартом» остается совместимость пары донор-реципиент в высоком разрешении по 5 основным локусам (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1*). В ходе исследования не выявлено достоверных различий при оценке общей трёхлетней выживаемости пар донор-реципиент в зависимости от степени совпадения результатов HLA-типирования в аллельном разрешении, поскольку на исход трансплантации влияет и множество других факторов: возраст донора на момент донации, возраст пациента, стадия и нозология основного заболевания на момент проведения алло-ТГСК, наличие инфекционных осложнений и сопутствующих заболеваний.

Дальнейшие исследования будут направлены на расширение выборки пар донор-реципиент.

Список литературы

1. Dehn J., Spellman S., Hurley C.K., et al. Selection of unrelated donor and cord blood units for hematopoietic cell transplantation: Guidelines from the NMDP/ CIBMTR. *Blood*. 2019; 134(12): 924-934.
2. Howard C.A., Fernandez-Vina M.A., Appelbaum F.R., et al. Recommendations for donor human leukocyte antigen assessment and matching for allogenic stem cell transplantation: Consensus opinion of the Blood and Marrow Marrow Transplant Clinical Trials Network (BMT CTN). *Biol Blood Transplant*. 2015; 21 (1): 4-7.
3. Kaplan E.L., Meier P. Non-parametric estimation for incomplete observations // *J Am Stat Assoc*. 1958. N. 53. P. 457–481.
4. Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., et al. Nomenclature for factors of the HLA system 2010. *Tissue Antigens*. 2010; 75(4): 91-455.
5. Mayor N.P., Hayhrs J.D., Turner T.R., et al. Recipients receiving better HLA-matched hematopoietic cell transplantation grafts, uncovered by a novel HLA typing method, have superior survival: A retrospective study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(1): 443-450.
- Standards for histocompatibility testing: <http://www.efiweb.org/standards.html> (доступ 01.06.2024).
6. Tiercy J.M. How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells? *Hematologica*. 2016; 101(6): 680-687.
7. Vazirabad I., Chhabra S., Nytes J., et al. Direct HLA genetic comparisons identify highly matched unrelated donor-recipient pairs with improved transplantation outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(1):921-31.

УДК 616-097

ГРНТИ 76.29.33

М.В. Смольникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров
младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики

M. V. Smolnikova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Junior researcher of the research laboratory of applied immunogenetics

E-mail: smolnikova@niigpk.ru

A.B. Йовдий

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник научно-
исследовательской лаборатории прикладной иммуногенетики

A. V. Yovdiy

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological
Agency, Kirov

Candidate of Medical Science, Senior researcher of the research laboratory of applied
immunogenetics

E-mail: yovdiy@niigpk.ru

Ф.С. Шерстнёв

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии и
процессинга гемопоэтических стволовых клеток

F. S. Sherstnev

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological
Agency, Kirov

Candidate of Medical Science, Head of the Department of Transfusiology and
Processing of Hematopoietic Stem Cells

E-mail: sherstnyov_phil@mail.ru

Специфичность антител к антигенам эритроцитов у пациентов с заболеваниями системы крови

Specificity of antibodies to red blood cell antigens in patients with diseases of the blood system

Аннотация. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов лежит в основе развития посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. Велика вероятность осложнений у пациентов с полиспецифическими антителами и антителами, реагирующими с «эффектом дозы». Антиэритроцитарные антитела диагностированы у 7,9% больных с заболеваниями системы крови.

Abstract. Alloimmunization to red blood cell antigens underlies the development of post-transfusion complications of the hemolytic type. There is a high probability of complications in patients with polyspecific antibodies and antibodies that react with a “dose effect”. Antibodies to red blood cell antigens were diagnosed in 7.9% of patients with diseases of the blood system.

Ключевые слова: аллоиммунизация; скрининг антител; антигены; антитела.

Index terms: alloimmunization; antibody screening; antigens; antibodies.

Введение. Важную роль в профилактике посттрансфузионных осложнений гемолитического типа играет иммуногематологическое исследование крови пациентов. С целью обеспечения безопасности гемотрансфузий при каждом поступлении больного в клинику выполняется скрининг антиэритроцитарных антител [1, 3]. Велика вероятность возникновения посттрансфузионных осложнений у пациентов с аллоантителами, реагирующими с «эффектом дозы», и больных с полиспецифическими антителами, которые могут экранировать клинически значимые аллоантитела и затруднять индивидуальный подбор совместимых доноров «вслепую» или делать его невозможным [4]. Высокий уровень аллоиммунизации у онкогематологических больных связан с патогенезом заболевания, с особенностями трансфузионной терапии, с проводимой таргетной терапией [2, 5].

Цель – оценить специфичность антител к антигенам эритроцитов у пациентов гематологической клиники.

Материалы и методы. Обследовано 2130 пациентов, находившихся на лечении в гематологической клинике ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в 2017–2022 гг. Из них мужчин - 1102 (51,7%), женщин - 1028 (48,3%). Возраст – от 2 до 82 лет (медиана 58 лет). Антитела к антигенам эритроцитов больных определялись с помощью оборудования и реактивов производства Bio-Rad, США в непрямом антиглобулиновом тесте.

Результаты и их обсуждение. У 168 (7,9%) больных выявлены антиэритроцитарные антитела. Иммунизация к антигенам эритроцитов чаще наблюдалась у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями 4,5% (2,2% - множественная миелома, 1,0% - хронический лимфолейкоз, 1,0% - неходжкинская лимфома, 0,3% - лимфома Ходжкина), острым лейкозом 0,9% (0,6% - острый лимфобластный лейкоз, 0,3% - острый миелобластный лейкоз). Частота выявления антиэритроцитарных антител в зависимости от диагноза представлена в рисунке 1.



Рисунок 1 – Распространение частоты выявления антиэритроцитарных антител в зависимости от диагноза

Антитела к антигенам эритроцитов установлены у 100 (4,7%) пациентов, впервые поступивших в гематологическую клинику и у 68 (3,2%) больных, госпитализированных многократно и не имевших антиэритроцитарных антител при первичном поступлении. При анализе результатов скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у больных диагностировано 203 (9,5%) случая обнаружения антител различной специфичности. Частота выявления антиэритроцитарных антител представлена в таблице 1. У некоторых пациентов идентифицировано сразу несколько антител различной специфичности. Таким образом,

у больных, поступивших впервые в клинику, зафиксировано 111 (5,2%) случаев установления антител, у госпитализированных многократно - 92 (4,3%).

В результате иммуногематологического обследования установлено преобладание полиспецифических антител (4,2% от числа всех обследованных), из которых 2,8% взаимодействовали с антигенами собственных эритроцитов больных. Такие антитела характерны для пациентов с аутоиммунной гемолитической анемией и больных, получавших препараты на основе моноклональных анти-CD38 антител. У 2,5% пациентов, иммунизированных к антигенам эритроцитов, установлены специфические антитела, что может быть обусловлено беременностями, предыдущими трансфузиями эритроцитов, введением иммуноглобулинов. Анти-D антитела определялись в 0,6% случаев. У 5 больных причиной выявления анти-D антител стало введение препаратов иммуноглобулина. Появление антител к антигену D у 2 пациентов было обусловлено проведением резус-несовместимой аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (резус-положительный реципиент, резус-отрицательный донор). Иммунизация к антигену E выявлена в 0,5% наблюдений, к антигену M - 0,4%. Причинами появления анти-M аллоантител у гематологических больных могут быть перенесенные бактериальные инфекции или трансфузии эритроцитов. Аллоантитела неустановленной специфичности составили 2,8% случаев.

Таблица 1 – Частота выявления антиэритроцитарных антител

Специфичность антител	Пациенты, абс.
Полиспецифические	89 (4,2%)
Специфические антитела	54 (2,5%)
- анти-D	13 (0,6%)
- анти-E	11 (0,5%)
- анти-C	6 (0,3%)
- анти-K	3 (0,1%)
- анти-Cw	2 (0,1%)
- анти-M	8 (0,4%)
- анти-Kra	2 (0,1%)
- анти-Lea	1 (0,05%)
- анти-Lua	1 (0,05%)

Продолжение таблицы

Специфичность антител	Пациенты, абс.
- анти-Jка	2 (0,1%)
- ауто анти-D	1 (0,05%)
- ауто анти-C	2 (0,1%)
- ауто анти-e	2 (0,1%)
Аллоантитела неустановленной специфичности	60 (2,8%)
Всего	203

Заключение

Иммуногематологический скрининг пациентов, поступающих в гематологическую клинику, является мерой профилактики посттрансфузионных осложнений. Его необходимо включить в протокол обследования больных в отделениях, применяющих заместительную гемокомпонентную терапию. Антиэритроцитарные антитела диагностированы у 7,9% больных заболеваниями системы крови. С высокой частотой обнаруживались полиспецифические антитела (4,2% случаев), затруднявшие индивидуальный подбор эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте. Аллоантитела неустановленной специфичности установлены у 2,9% больных. Доля обследованных со специфическими антителами составила 2,5%. Наиболее часто определялись анти-D (0,6%), анти-E (0,5%), анти-M (0,4%) аллоантитела.

Список литературы

1. Бутина, Е. В. Алгоритм подбора доноров эритроцитов / Е. В. Бутина, Е. А. Попонина, А. В. Йовдий, Ф. С. Шерстнев, И. В. Парамонов // Трансфузиология. — 2021. — Т.22 №3. — С.235-242.
2. Бутина, Е. В. Аллоиммунизация к антигенам эритроцитов у пациентов с гематологическими и онкогематологическими заболеваниями / Е. В. Бутина, Н. В. Минеева, Г. А. Зайцева, Е. А. Попонина, А. В. Йовдий // Трансфузиология. — 2019. — Т.20, №2. — С. 107-114.
3. Бутина, Е. В. Результаты скрининга и идентификации антиэритроцитарных антител у пациентов гематологической клиники / Е. В. Бутина, Т. А. Коряковцева, О. Д. Максимов, Ф. С. Шерстнев, А. В. Караваева, Г. А. Зайцева // Трансфузиология. — 2018. — №1. — С. 57-66.

4. Минеева, Н. В. Группы крови человека. Основы иммуногематологии. / Н. В. Минеева. — 2-е изд., переработанное и дополненное. СПб: Гангут; 2020. 978-5-85875-600-2.
5. Минеева, Н. В. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов (обзор литературы) / Н. В. Минеева, И. А. Пашкова, И. И. Кробинец, Е. А. Сысоева // Онкогематология. — 2015. — Т. 10. — № 4. — С. 60–65.
6. Минеева, Н. В. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, анти-тромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями / Н. В. Минеева, С. В. Гавровская, И. И. Кробинец, И. А. Пашкова, Н. Н. Бодрова, Е. А. Сысоева // Онкогематология. — 2013. — Т. 4 — С. 13-17.

УДК 616-006.446.2

ГРНТИ 76.29.33

Трегубова Е.В.

младший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

E.V. Tregubova

Junior Researcher of Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

E-mail: tregubova@niigpk.ru

Исаева Н.В.

старший научный сотрудник лаборатории клеточной и молекулярной
иммунологии

Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

N.V. Isaeva

PhD, Researcher of Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

E-mail: isaeva@niigpk.ru

Назарова Е.Л.

кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией клеточной и
молекулярной иммунологии
Федеральное государственное учреждение науки «Кировский научно-
исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального
медико-биологического агентства», Киров

E.L. Nazarova

PhD, MD, Head of the Laboratory of Cellular and Molecular Immunology
The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

E-mail: nazarova@niigpk.ru

Взаимосвязь молекулярно-генетических и иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток при хроническом лимфолейкозе

The relationship of molecular genetic and immunophenotypic features of tumor cells in chronic lymphocytic leukemia

Аннотация. Проведена оценка молекулярно-генетических и иммунофенотипических особенностей В-клеток у больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Установлено, что у пациентов с ХЛЛ, имеющих мутации гена TP53, наблюдается более высокая экспрессия антигена CD25 и kappa-легких цепей иммуноглобулинов, чем у пациентов без aberrаций данного гена ($p=0,034$ и $p=0,002$ соответственно). При уровне экспрессии $CD25 \geq 14,3\%$ и при мутированном статусе TP53 период до начала терапии значительно короче ($Me=5$ мес.), чем в случаях без TP53-мутаций ($Me=18$ мес.).

Abstract. The assessment of the molecular genetic and immunophenotypic features of B cells in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) was carried out. It was found that patients with TP53 gene mutations had higher expression of CD25 antigen and kappa-light chains of immunoglobulins than patients without aberrations of this gene ($p=0.034$ and $p=0.002$, respectively). At the expression

level CD25 $\geq$ 14.3% and with mutated TP53 status, the period before the start of therapy is significantly shorter (Me=5 months) than in cases without TP53 mutations (Me=18 months).

Ключевые слова: мутации; иммунофенотип; ген; хронический лимфолейкоз.

Keywords: mutations; immunophenotype; gene; chronic lymphocytic leukemia.

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – наиболее распространенный лейкоз у взрослых, характеризующийся крайне гетерогенным клиническим течением [1]. Диагноз устанавливают на основании показателей анализа крови, В-симптомов, иммунофенотипирования циркулирующих В-лимфоцитов методом проточной цитометрии и морфологии опухолевых клеток [2].

Несмотря на то, что основные классификации по K.R. Rai, 1975 и J.L. Binet, 1981 остаются актуальными при стадировании ХЛЛ, по ним невозможно предсказать прогноз на ранних стадиях [3]. Для дополнительной стратификации пациентов на группы риска многими исследователями все чаще используются генетические маркеры с предиктивным значением [1]. На сегодняшний день ключевыми биомаркерами, определяющими тактику лечения ХЛЛ, являются нарушения в гене TP53, а именно хромосомная делеция 17p13, захватывающая локус TP53, и мутации TP53. Данные aberrации связаны с неблагоприятным исходом заболевания, с резистентностью к иммунохимиотерапии (ИХТ) [1, 4]. Еще одним важнейшим прогностическим фактором при ХЛЛ является мутационный статус генов варибельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (immunoglobulin heavy chain variable region, IGHV). В международной клинической практике это исследование является обязательным при данном заболевании [5].

Среди прогностических иммунофенотипических показателей при ХЛЛ хорошо изученными являются: CD23, CD38, CD49d и ZAP70. Неблагоприятный прогноз имеют пациенты, если на более чем 30 % лимфоидных клеток экспрессируются CD38 и/или CD49d, либо на более чем 20 % – ZAP70 [6]. Кроме того, поверхностный антиген CD38 является независимым прогностическим маркером, экспрессия которого ассоциирована с более короткой общей выживаемостью и выживаемостью без лечения у больных ХЛЛ [6].

Поиск взаимосвязи между молекулярно-генетическими и иммунофенотипическими характеристиками клеток ХЛЛ в настоящее время представляет большой интерес. Показано, что del17p/мутации *TP53*, del11q, трисомия 12 и немутированный статус *IGHV*-генов ассоциируются с высокой экспрессией маркеров ZAP-70 и CD38 и, соответственно, связаны с неблагоприятными клиническими исходами [7, 8]. Однако, несмотря на имеющиеся данные, дальнейшие исследования подобных ассоциаций считаются перспективными для усовершенствования дифференциальной диагностики ХЛЛ с другими лимфоидными новообразованиями и для прогнозирования характера течения в дебюте патологического процесса.

Цель. Оценить взаимосвязь молекулярно-генетических и иммунофенотипических особенностей опухолевых клеток у больных хроническим лимфолейкозом.

Материалы и методы. Проанализировано 119 образцов биологического материала (периферической крови и костного мозга) больных ХЛЛ, наблюдавшихся в ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России в период с 2018 по 2024 гг. Из них 69 (58,0 %) мужчин и 50 (42,0 %) женщин. Медиана возраста в дебюте заболевания составила 65 (min-max: 40-95) лет.

Анализ мутационного статуса генов *TP53* и *IGHV* проводился методом прямого секвенирования по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500Xl (США) в соответствии с рекомендациями Европейской исследовательской инициативы по изучению ХЛЛ (ERIC) [4, 9-11].

Иммунофенотипирование лимфоидных клеток выполнялось методом проточной лазерной цитофлуориметрии с применением 6-цветного проточного цитофлюориметра BD FACSCanto™II (BD Biosciences, США). Панель моноклональных антител подобрана в соответствии с требованиями Международной рабочей группы по ХЛЛ (International Working Group on CLL – IwCLL) и отечественных клинических рекомендаций [12, 13]. Пробоподготовка проводилась согласно протоколам фирм-производителей.

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась в программе STADIA с использованием непараметрических методов анализа. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения. При сопоставлении иммунофенотипических показателей клеток опухолевого клона с мутационным статусом гена *TP53* выявлена его ассоциация с уровнями экспрессии маркеров CD25+ и k-(каппа-) легких цепей иммуноглобулинов (Ig) (таблица 1).

Таблица 1 – Взаимосвязь иммунофенотипа опухолевых клеток ХЛЛ с мутационным статусом гена *TP53*

Показатель	Мутационный статус гена TP53				p
	норма		мутация		
	Me (n)	Q1-Q3	Me (n)	Q1-Q3	
CD25, % (n = 98)	1,6(84)	0,2-15,8	25,5 (14)	7,9-37,0	0,034
κ-цепь, % (n = 82)	4,6 (71)	0,8-46,8	82,3 (11)	29,5-97,5	0,002

Установлено, что при наличии у больных ХЛЛ патогенных мутаций гена *TP53* экспрессия антигена CD25 статистически значимо выше, чем при отсутствии aberrаций (Me:25,5 % vs. 1,6 % соответственно). Также отмечена более высокая экспрессия κ-легких цепей Ig у пациентов с мутированным статусом *TP53* (Me=82,3 %, 11/82). Медиана уровня экспрессии данного показателя без мутаций гена составила 4,6 %.

Для определения пороговых значений экспрессии исследуемых маркеров в зависимости от мутационного статуса гена *TP53* проведен ROC-анализ. В результате для CD25-показателя порог экспрессии, при котором прогнозируется обнаружение *TP53*-мутаций, равен 14,3 % (AUC: $0,676 \pm 0,095$; 95 % ДИ: 0,490-0,863, $p = 0,036$), а для экспрессии κ-цепи Ig – 12,8 % (AUC: $0,782 \pm 0,066$; 95 % ДИ: 0,652-0,911, $p = 0,003$) (рисунок 1).

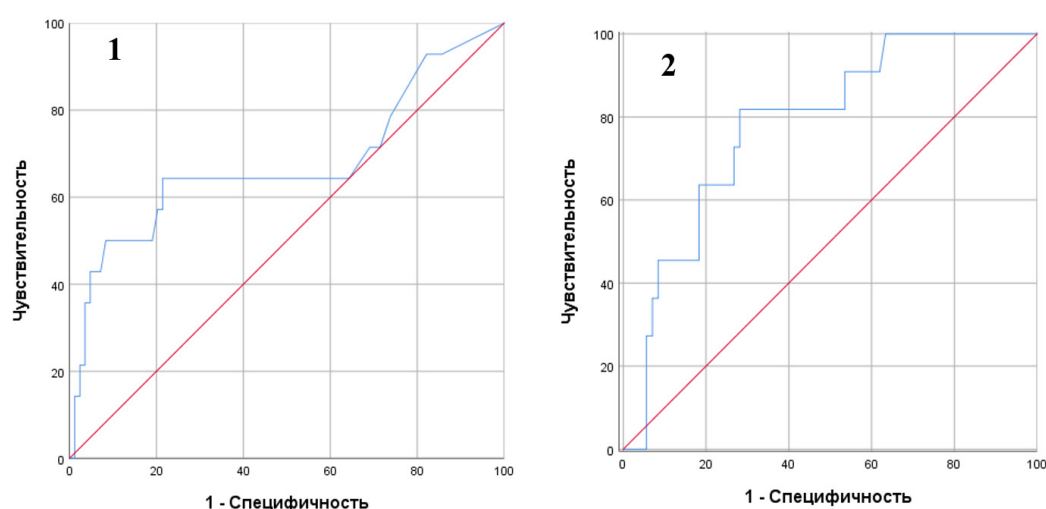


Рисунок 1 – ROC-кривые для экспрессии CD25 (1) и κ-легкой цепи иммуноглобулинов (2) в зависимости от мутационного статуса гена *TP53*

Исходя из полученных пороговых значений проведено разделение пациентов на группы: с низкой и высокой экспрессией каждого из изучаемых маркеров (таблица 2).

Таблица 2– Взаимосвязь экспрессии CD25, к-цепи иммуноглобулинов с мутационным статусом гена *TP53*

Показатель		Мутационный статус гена TP53 (n)				p	ОШ (95 % ДИ)
		норма		мутация			
		Абс.	%	Абс.	%		
CD25 (n=98)	<14,3 %	66	67,4	5	5,1	0,002	6,60 (1,97-22,16)
	≥ 14,3 %	18	18,4	9	9,1		
к-цепь Ig (n=82)	< 12,8 %	51	62,2	2	2,4	0,001	11,48 (2,28-57,82)
	≥ 12,8 %	20	24,4	9	11,0		

В результате статистической оценки установлено, что у пациентов в группах с высокими экспрессиями CD25 и к-цепи Ig ($\geq 14,3\%$ и $\geq 12,8\%$ соответственно) шанс обнаружения патогенных мутаций гена *TP53* в 6 и 11 раз выше, чем в группах с низкими пороговыми значениями исследуемых маркеров.

При оценке временных характеристик течения заболевания, в частности времени до начала терапии, в зависимости от полученных пороговых значений статистически значимых различий не обнаружено. Однако отмечена тенденция к сокращению периода до инициации терапии у пациентов с экспрессией CD25 $\geq 14,3\%$ и *TP53*-мутациями (Me = 5 мес.), по сравнению с больными без aberrаций гена *TP53* и с экспрессией CD25 $\geq 14,3\%$ (Me = 18 мес.) ($p = 0,081$) (рисунок 2).

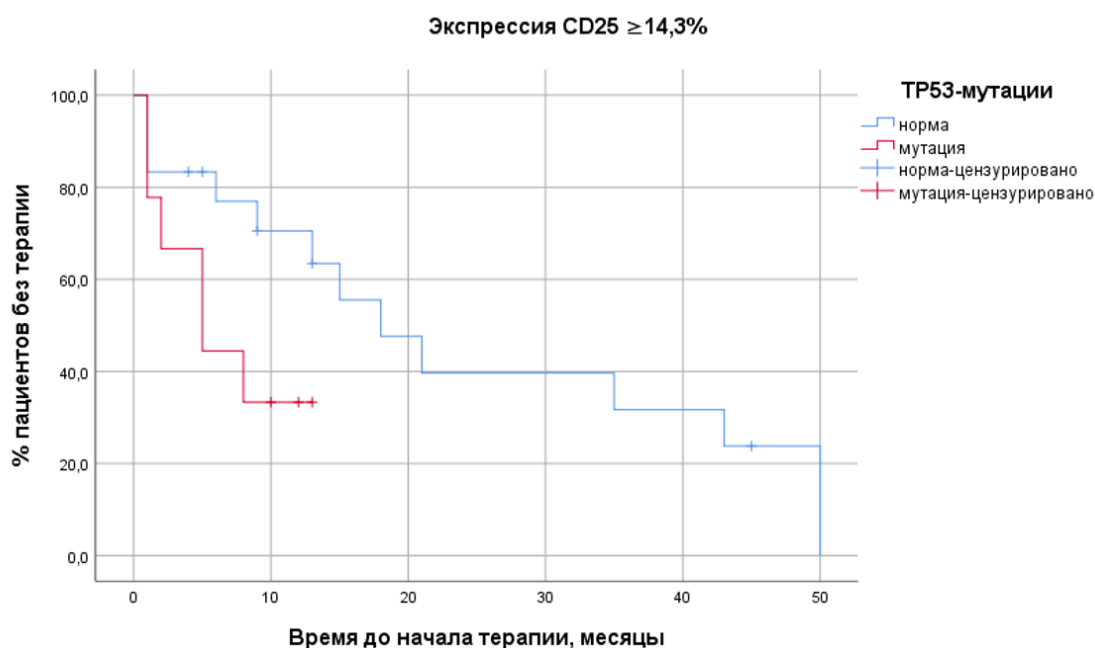


Рисунок 2 – Зависимость времени до начала терапии с мутационным статусом гена *TP53* в группе пациентов с экспрессией CD25 $\geq 14,3\%$

При сопоставлении уровней экспрессии иммунофенотипических показателей и других молекулярно-генетических маркеров, в частности мутационного статуса *IGHV*-генов, статистически значимых различий не выявлено ($p > 0,05$).

Как было сказано выше, рядом авторов показана ассоциация уровня экспрессии специфических иммунофенотипических маркеров (CD23, CD38, CD25, ZAP70) с генетическими aberrациями [7, 8, 14]. Полученные нами результаты согласуются с ними лишь отчасти. Так, высокий уровень экспрессии антигена CD25 и наличие мутаций гена *TP53* действительно связаны с агрессивным течением ХЛЛ и более коротким периодом до начала терапии, в то время как ассоциации мутаций *IGHV* с экспрессией CD38 в нашем исследовании не выявлено ($p = 0,289$). Это может объясняться особенностями выборки пациентов в пределах одного клинического центра или популяционной принадлежностью больных ХЛЛ.

Работ, посвященных взаимосвязи экспрессии легких цепей иммуноглобулинов с молекулярно-генетическими характеристиками опухолевых клеток не найдено. Известно, что клональность по κ - либо λ -цепям иммуноглобулинов связана непосредственно с объемом опухолевой массы [15]. В свою очередь нарушения в гене *TP53* также могут влиять на объем опухолевых клеток. При наличии у больных *TP53*-aberrаций происходит неконтролируемая пролиферация и клональная экспансия опухолевых клеток [7].

Выводы. Высокая экспрессия иммунофенотипических маркеров CD25 (более 14,3 %) и κ -легких цепей Ig (более 12,8 %) обнаружены у больных ХЛЛ, имеющих патогенные мутации гена *TP53*. В случаях с уровнем экспрессии $CD25 \geq 14,3$ % и с aberrациями *TP53* период до инициации терапии имел тенденцию к значительному сокращению (Me=5 мес.), в сравнении с таковым у больных без мутаций данного гена (Me=18 мес.).

Таким образом, выявление иммунофенотипических особенностей у больных ХЛЛ, имеющих конкретные генетические аномалии, позволит стратифицировать пациентов на группы риска уже на ранних стадиях и может способствовать совершенствованию дифференциальной диагностики заболевания, оценке прогноза его течения и персонализации терапии.

Список литературы

1. Современная диагностика и лечение хронического лимфолейкоза [Текст] / под. ред. Е.А. Никитина // М.: «Буки Веди». – 2021. – 436 с.
2. Salem, D., Stetler-Stevenson, M. Clinical Flow-Cytometric Testing in Chronic Lymphocytic Leukemia / D. Salem, M. Stetler-Stevenson. – doi:10.1007/978-1-4939-9650-6_17 // *Methods Mol Biol.* – 2019. – V.2032. – P.311–321.
3. Северина, Н.А. Анализ мутаций в генах TP53, NOTCH1, SF3B1 и BIRC3 у больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом : специальность 14.01.21 «Гематология и переливание крови» : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Северина Наталия Александровна ; ФГБУ Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ. – Москва, 2014. – 26с. : ил. – Библиогр. – С. 25-26. – Место защиты: ФГБУ ГНЦ МЗ РФ.
4. Pospilova, S., Gonzalez, D. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia / S. Pospilova, D. Gonzalez, J. Malcikova, M. Trbusek [et al.]. – doi.: 10.1038/leu.2012.25 // *Leukemia.* – 2012. – V.26. – P.1458–1461.
5. Бидерман, Б.В., Судариков, А.Б. Гены иммуноглобулинов и стереотипные антигенные рецепторы при хроническом лимфолейкозе и других лимфопролиферативных заболеваниях / *Гематология и трансфузиология.* – 2023. – Т.68(1). – С.70-79.
6. Marrero, Y.T., Suárez, V.M., Pérez, Y.D. Immunophenotypic Characterization by Flow Cytometry of Chronic Lymphoid Leukemia / Y.T. Marrero, V.M. Suárez, Y.D. Pérez [et al.] // *J. Cancer Immunol.* – 2021. – V.3(4). – P.196-205.
7. Лебедева Т.В., Смольникова В.В. Современные подходы к стратификации рисков хронического лимфолейкоза / Т.В. Лебедева, В.В. Смольникова [и др.]. – УДК 616.155.392.2-036.12:614.8.026.1-044.965 // *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа.* – 2019. – Т.5. – № 4. – С.412-421.
8. Сухина, И.А., Никитин, В.Ю. Взаимосвязь вариабельности иммунофенотипа хронического лимфоцитарного лейкоза с прогнозом и молекулярно-генетическими аномалиями / И.А. Сухина, В.Ю. Никитин [и др.] // Спецвыпуск ЛАБОРАТОРИЯ ЛПУ. – 2014. – № 5. – С.33-37.
9. Rosenquist, R., Ghia, P., Hadzidimitriou, A. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations / R. Rosenquist, P. Ghia, A. Hadzidimitriou, L-A Sutton [et al.]. – doi.: 10.1038/leu.2017.125 // *Leukemia.* – 2017. – V.31(7). – P.1477-1481.
10. Bouaoun L., Sonkin D. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data / L. Bouaoun, D. Sonkin [et al.] // *Human Mutation.* – 2016. – V.61(1). – S.15

11. Agathangelidis, A., Sutton, L-A., Hadzidimitriou, A. Immunoglobulin Gene Sequence Analysis In Chronic Lymphocytic Leukemia: From Patient Material To Sequence Interpretation / A. Agathangelidis, L-A Sutton, A. Hadzidimitriou [et al.] // J. Vis. Exp. – 2018. – V.141, e57787.
12. Hallek, M., Cheson, B., Catovsky, D. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL / M. Hallek, B. Cheson, D. Catovsky // Blood. – 2018. – V.131(25). – P.2745-2760.
13. Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России». – 2020. – 64с.
14. Bagheri, M. Evaluation of immunophenotypic markers and clinico-hematological profile in chronic lymphocytic leukemia: implications for prognosis// M. Bagheri [et al.] // BMC Research Notes. – 2020. – V.13(412).
15. Гуськова, Н.К., Селютина, О.Н. Морфологические и иммунофенотипические особенности моноклональной популяции В-лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе / Н.К. Гуськова, О.Н. Селютина [и др.] 3 // Южно-российский онкологический журнал. – 2020. –Т.1(3).–С.27-35.

УДК 616.71-018.46-006.448

ГРНТИ: 76.29.33

А.И. Эндакова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
врач — гематолог взрослого отделения гематологии и химиотерапии

A.I. Endakova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov

Hematologist of Adult Department of hematology and chemotherapy

E-mail: endakova@niigpk.ru

И.А. Докишина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, врач — гематолог взрослого отделения
гематологии и химиотерапии

I.A. Dokshina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
PhD, MD, Hematologist of Adult Department of hematology and chemotherapy
E-mail: dokshina@niigpk.ru

О.Р.Лагунова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
заведующий взрослым отделением гематологии и химиотерапии

O.R. Lagunova

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
Head of the Adult Department of hematology and chemotherapy
E-mail: lagunova@niigpk.ru

Е.С.Фокина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский
научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», Киров
кандидат медицинских наук, врач — гематолог взрослого отделения
гематологии и химиотерапии

E.S. Fokina

The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of
Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency,
Kirov
PhD, MD, Hematologist of Adult Department of hematology and chemotherapy
E-mail: fokina@niigpk.ru

Эффективность терапии ингибитором BCL-2 при лечении пациентов с острым миелоидным лейкозом

Efficacy of the BCL-2 inhibitor in the treatment of patients with acute myeloid leukemia

Аннотация. В исследовании проанализированы результаты лечения 48 пациентов с первичным, рецидивирующим и/или рефрактерным острым миелоидным лейкозом, получивших комбинированную схему терапии ингибитором BCL-2 венетоклакс в сочетании с гипометилирующими агентами или низкими дозами цитарабина, наблюдавшихся в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Кировском научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» с июня 2020 г. по июнь 2024 г.

Abstract. To assess treatment outcomes of 48 patients with primary, relapsed and/or refractory acute myeloid leukemia, treated in The Federal State-Financed Scientific Institution Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical Biological Agency who received a combination therapy regimen with the BCL-2 inhibitor venetoclax in combination with hypomethylating agents or low doses of cytarabine, over the period from June, 2020, till June, 2024.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз; венетоклакс; таргетная терапия; эффективность терапии.

Index terms: acute myeloid leukemia; venetoclax; targeted therapy; efficacy in the treatment.

Введение. Опыт терапии острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) насчитывает более полувековой период. За это время достигнуты большие успехи в лечении пациентов с ОМЛ, благодаря лучшему пониманию патогенеза заболевания, выявлению прогностически благоприятных и неблагоприятных цитогенетических, молекулярно-биологических факторов, широкому использованию программ системной химиотерапии с включением новых таргетных препаратов [1]. Лечение ОМЛ представляет собой сложный выбор между стратегиями интенсивной химиотерапии и неинтенсивными подходами лечения с применением новых вариантов таргетного воздействия, которые по своей эффективности сопоставимы со стандартной химиотерапией [2].

Комбинации ингибитора BCL-2 венетоклакс и гипометилирующих агентов (ГА) или низких доз цитарабина (НДЦ) изменили подход в лечении пожилых пациентов с ОМЛ, и в большинстве случаев стали стандартом терапии. В то же

время использование данных схем расширило возможности лечения для молодых пациентов с тяжелой сопутствующей патологией [3].

Венетоклакс – таргетный противоопухолевый агент, относящийся к классу ВНЗ-миметиков. Препараты этой категории ингибируют антиапоптотические молекулы, такие, как BCL-2, BCL-w и BCL-XL. Специфически связываясь с мишенью, венетоклакс копирует действие физиологических антагонистов BCL-2, что приводит к включению механизмов программируемой клеточной смерти через активацию проапоптотических белков (таких как BIM) и каспазного каскада [4]. Экспрессия BCL-2 при ОМЛ ассоциируется с неблагоприятным исходом и, наряду с другими механизмами, может свидетельствовать о химиорезистентности [5].

Результаты клинических исследований по оценке эффективности комбинации венетоклакс с НДЦ или с ГА у пожилых пациентов с ОМЛ *de novo* продемонстрировали высокую частоту достижения полной ремиссии (ПР) и более длительную общую выживаемость (ОВ) в сравнении с таковыми показателями при стандартной терапии НДЦ или ГА в монорежиме: так ОВ в группе пациентов, получавших терапию венетоклакс с ГА, составила 14,7 мес, а в группе моно ГА – 9,6 мес (медиана наблюдения 20,5 мес), в группе венетоклакс с НДЦ - 8,4 мес и 7,2 мес соответственно (медиана наблюдения 12 мес) [6]. По результатам III фазы клинического исследования VIALE-A у ранее не леченных пожилых пациентов, которые не подходили для интенсивной химиотерапии, венетоклакс в комбинации с азацитидином не только значительно повышал общую выживаемость и частоту достижения ремиссий в сравнении с монотерапией азацитидином, но и продемонстрировал умеренную гематологическую токсичность [7].

Эффективность комбинации венетоклакс с ГА или НДЦ оценивали для молодых пациентов при рецидивирующем/рефрактерном (р/р) ОМЛ, и, несмотря на весьма скромные показатели ПР и ОВ, была доказана безопасность, хорошая переносимость предложенных схем терапии, что является приемлемой альтернативой для пациентов всех возрастов с р/р ОМЛ, особенно с высоким цитогенетическим риском [8].

Цель исследования. Оценить эффективность комбинированной терапии ингибитором BCL-2 венетоклакс в сочетании с гипометилирующими агентами или низкими дозами цитарабина в группах пациентов с впервые выявленным и/или рецидивирующим/рефрактерным ОМЛ.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включены 48 пациентов старше 18 лет с диагнозом ОМЛ, госпитализированных во взрослое отделение гематологии и химиотерапии ФГБУН КНИИГиПК ФМБА России. Для дальнейшего анализа пациентов разделили на две группы: первая – *de novo* ОМЛ, вторая – *p/p* ОМЛ. Диагноз ОМЛ устанавливался на основании цитологического, иммунофенотипического, цитогенетического и молекулярно-генетического исследований аспирата костного мозга.

В первой линии терапии венетоклакс в сочетании с ГА или НДЦ назначался пациентам старше 60 лет с высоким цитогенетическим риском, а также молодым пациентам с тяжелой сопутствующей патологией. Во второй и третьей линиях — всем пациентам при подтверждении прогрессии или рецидива заболевания вне зависимости от возраста и группы риска.

Программа лечения включала себя пероральный прием венетоклакса 1 раз в сутки в дозе 100 мг в 1-й день, 200 мг – во 2-й день, 400 мг с 3 по 28 день в 1 цикле и во всех последующих 28-дневных циклах. Терапия венетоклаксом сочеталась с применением подкожного введения цитарабина в дозе 10 мг/м² 2 раза в день с 1-го по 10-й день каждого 28-дневного цикла или подкожного введения азацитидина в дозе 75 мг/м² с 1-го по 7-й день каждого 28-дневного цикла.

Эффективность терапии оценивалась на основании цитологического исследования аспирата костного мозга, после восстановления лейкоцитов до $1,0 \cdot 10^9/\text{л}$ и более. Терапию венетоклаксом продолжали до проявления симптомов прогрессирования заболевания.

В цели исследования входила оценка эффективности лечения (частота достижения ремиссии заболевания, частота возникновения рецидивов заболевания, расчёт общей выживаемости). При статистической обработке данных использовали анализ выживаемости по методу Каплана – Мейера с применением программы Statistica 6.0.

Результаты. В период с июня 2020 по июнь 2024 терапию ингибитором BCL-2 венетоклакс в сочетании с низкими дозами цитарабина или гипометилирующими агентами получали 48 пациентов с ОМЛ: 21 (44%) мужчин и 27 (56%) женщин, с медианой возраста 57 лет. В 38% случаев (n=18) терапия применялась в качестве индукционной терапии у пациентов ОМЛ *de novo* и в 62% случаев (n=30) при рецидивах/рефрактерных ОМЛ.

В группе первичных ОМЛ в 67% (n=12) случаев терапия венетоклакс назначена в сочетании с гипометилирующими агентами, в 33% (n=6) – с низкими дозами цитарабина. Согласно классификации ELN-2022 группу промежуточного риска составили 34% (n=6), группу высокого риска – 50% (n=9) больных, у 4 (22%) пациентов выявлена мутация TP53. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Общая характеристика группы пациентов с ОМЛ de novo

Характеристика	Количество случаев (частота, %)
Мужчины/женщины (n)	7 (38%)/11 (62%)
Медиана возраста, лет (диапазон)	61 (30-69)
молодой возраст (18-44)	5 (28%)
средний возраст (45-59)	2 (11%)
пожилые (60 и более)	11 (61%)
Количество лейкоцитов в дебюте заболевания	
менее 1х10 ⁹ /л	4 (22%)
менее 10-100х10 ⁹ /л	12 (67%)
более 100х10 ⁹ /л	2 (11%)
Предшествующий МДС	7 (39%)
Статус ECOG	
0-2	8 (44%)
3-4	10 (56%)
Группы риска по ELN (n)	
низкий	3 (17%)
промежуточный	6 (34%)
высокий	9 (49%)
Мутация TP53	4 (22%)

В группе ОМЛ de novo полная ремиссия достигнута у 67% (n=12) пациентов, у 6 (33%) больных установлена резистентность к терапии. Ранняя летальность составила 17% (n=3) случаев. За время наблюдения развитие рецидива заболевания констатировано у 3 (25%) больных. В настоящее время 8 (44%) пациентов продолжают получать данную терапию. Медиана общей выживаемости составила 15 месяцев, общая двухлетняя выживаемость – 32%. Медиана безрецидивной выживаемости (БРВ) – 11 мес (рисунок 1). Медиана наблюдения составила 8,5 мес (диапазон 1-21 мес).

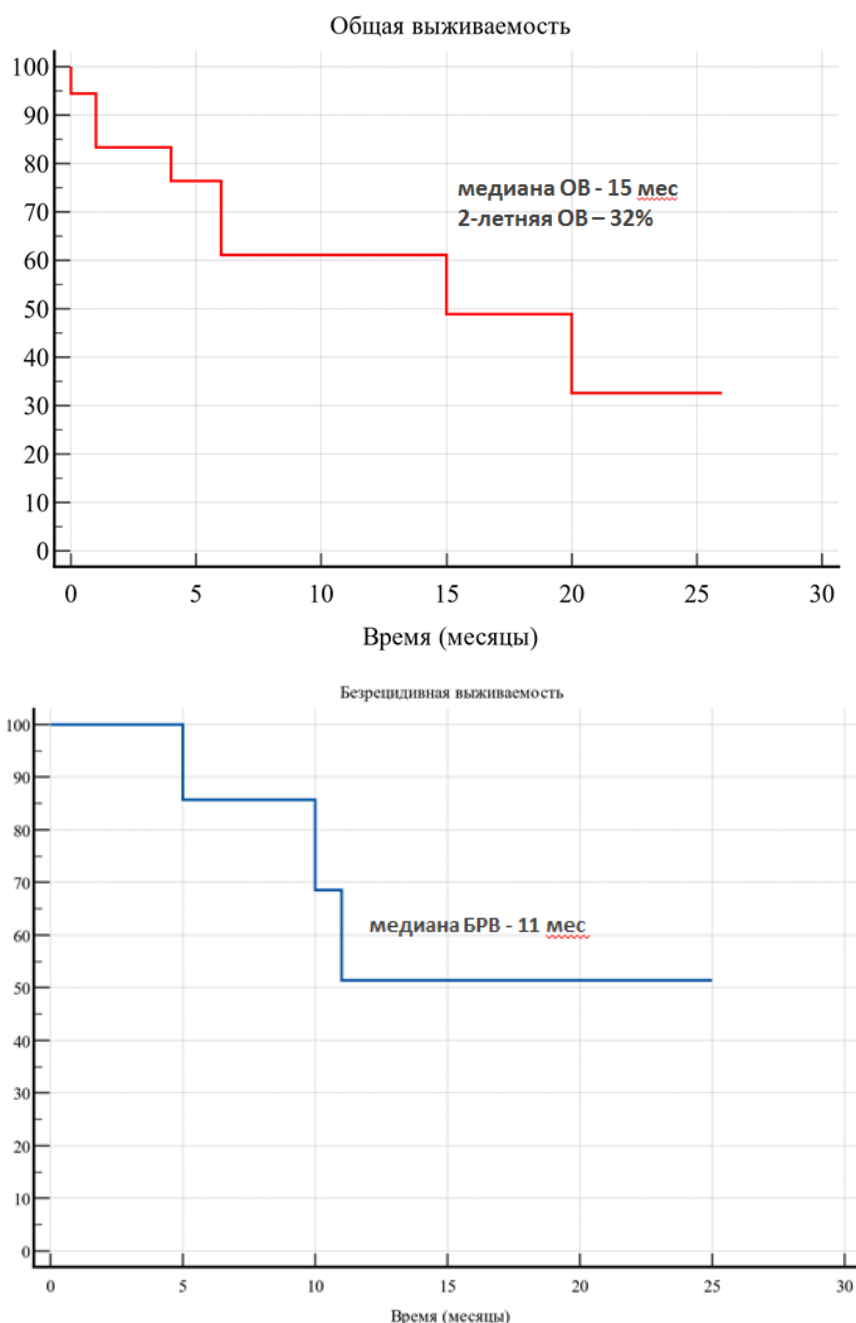


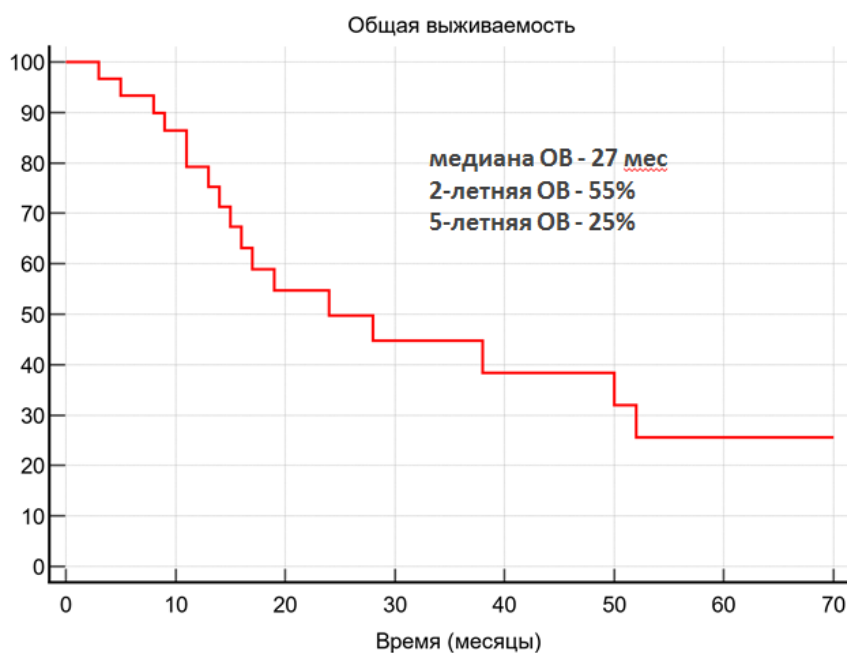
Рисунок 1 — Общая и безрецидивная выживаемость группы пациентов с ОМЛ de novo

В группе р/р ОМЛ комбинированная терапия венетоклакс в сочетании с ГА или НДЦ назначена во 2-й линии терапии 19 (63%) пациентам (комбинация венетоклакс с ГА — 12, с НДЦ — 7), в 3-й линии терапии — 11 (37%) больным (комбинация венетоклакс с ГА — 7, с НДЦ — 4). У 37% (n=11) пациентов терапия применялась при резистентном течении ОМЛ, у 63% (n=19) — при диагностике раннего или позднего рецидива заболевания. Высокий цитогенетический риск по критериям ELN-2022 установлен в 37% (n=10) случаев. Общая характеристика пациентов представлена в таблице 2.

Таблица 2 — Общая характеристика группы пациентов р/р ОМЛ

Характеристика	Количество случаев (частота, %)
Мужчины/женщины (n)	14 (47%)/16 (53%)
Медиана возраста (диапазон)	53 (18-82)
молодой возраст (18-44)	11 (37%)
средний возраст (45-59)	8 (26%)
пожилые (60 и более)	11 (37%)
Статус ECOG	
0-2	18 (60%)
3-4	12 (40%)
Группы риска по ELN (n)	
низкий	9 (30%)
промежуточный	11(37%)
высокий	10 (33%)
Резистентное течение ОМЛ	11(37%)
Рецидив ОМЛ	19(63%)

Полная ремиссия в группе р/р ОМЛ достигнута в 67% (n=20) случаев. Развитие рецидива зафиксировано у 33% пациентов (n=10). В настоящий момент живы 12 (40%) больных. Медиана ОВ составила 27 месяцев, общая двухлетняя выживаемость – 55 %, пятилетняя общая выживаемость – 25%. Медиана безрецидивной выживаемости (БРВ) – 10 мес (рисунок 2). Медиана наблюдения составила 16,5 месяцев (диапазон 3-108 мес).



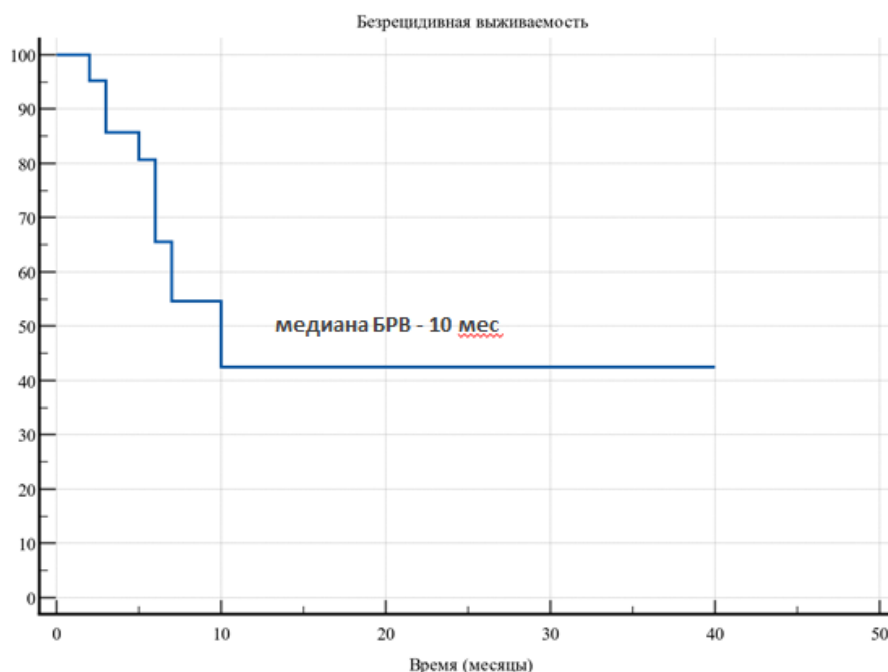


Рисунок 2 – Общая и безрецидивная выживаемость группы пациентов

В данной группе аллогенная трансплантация костного мозга (алло–ТГСК) выполнена 11 пациентам. В посттрансплантационном периоде 2 больных погибли от инфекционных осложнений, у 2 - зафиксирована прогрессия заболевания, от которой в дальнейшем наступил летальный исход. Медианы ОВ и БРВ в группе где пациентам выполнена алло-ТГСК в настоящий момент не достигнуты, ОВ двухлетняя выживаемость составила 58%, БРВ двухлетняя выживаемость – 68% (рисунок 3).

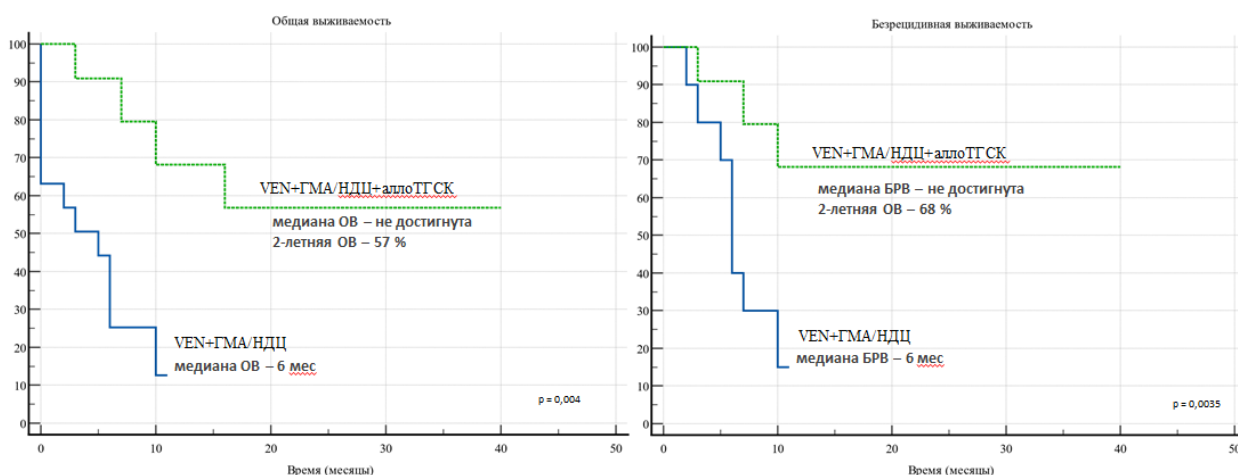


Рисунок 3 – Общая и безрецидивная выживаемость в зависимости от проведения аллоТГСК в группе пациентов р/р ОМЛ

В группе р/р ОМЛ у 4 пациентов диагностированы экстрамедуллярные поражения. По данным ПЭТ-КТ полный ответ на терапию был достигнут у 100% пациентов, у 2 больных ответ сохраняется по настоящее время в течение 14 и 17 месяцев соответственно, у 2 - установлен ранний рецидив заболевания через 10 и 11 месяцев после констатации ремиссии заболевания. Результаты лечения в обеих группах представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты лечения пациентов с de novo и р/р ОМЛ

Характеристика	ОМЛ de novo (n=18)	р/р ОМЛ (n=30)
1 линия	18 (100%)	-
2 линия	-	19(63%)
3 линия	-	11 (37%)
Полный ответ	12 (67%)	20(67%)
Резистентность	6 (33%)	10 (33%)
Рецидив	3 (17%)	10 (33%)
Алло-ТГСК	-	11 (36%)
Живы	10 (55%)	12 (40%)
Летальность	8 (45%)	18 (60%)
Ранняя летальность	3 (17%)	-
Медиана ОВ	15 мес	27 мес
Двухлетняя ОВ	32%	55%
Пятилетняя ОВ	-	25%
Медина БРВ	11 мес	10 мес

Заключение. Терапевтический подход с применением комбинированной терапии ингибитором BCL-2 венетоклакс в сочетании с гипометилирующими агентами или низкими дозами цитарабина продемонстрировали высокую эффективность в лечении ОМЛ de novo и неблагоприятного течения заболевания, что позволяет персонифицировать лечебную тактику в зависимости от статуса пациентов. Так, в группе ОМЛ de novo, где комбинация с венетоклакс назначалась у пожилых коморбидных больных с высоким цитогенетическим риском и у молодых пациентов с тяжелой соматической патологией, позволила увеличить двухлетнюю ОВ до 32%, при медиане наблюдения 8,5 мес. Высокие показатели двухлетней ОВ – 58%, БРВ – 68%, а также отсутствие плато на кривой ОВ и БРВ, при применении комбинированной терапии на основе ингибитора BCL-2 венетоклакс с последующим выполнением аллоТГСК, дают возможность рассмотреть

данный метод терапии как оптимальный вариант лечения при p/p ОМЛ. Также данная схема лечения может рассматриваться в качестве клинической опции у больных ОМЛ с экстрамедуллярным поражением.

Список литературы

1. Juárez-Salcedo L.M., Desai V., Dalia S. Venetoclax: evidence to date and clinical potential. *Drugs Context* 2019;8:212574. doi:10.7573/dic.212574.
2. Баранова О.Ю., Антипова А.С., Захаров О.Д., Фалалеева Н.А., Калетин Г.И., Ширин А.Д., Аракелян Г.Р., Тупицын Н.Н., Френкель М.А., Купрышина Н.А., Обухова Т.Н., Домрачева Е.В., Ларионова В.Б., Огородникова Е.В., Османов Е.А. Острые миелоидные лейкозы: 10 лет терапии. *Клин. онкогематол.* 2015; 8(3): 287–301.
3. Tenold M., Moskoff B., Benjamin D., Jonas B.A. Retrospective Analysis of Adults with Acute Myeloid Leukemia Treated with Venetoclax Plus Hypomethylating Agents at a Comprehensive Cancer Center. *Blood*. 2018;132(Suppl 1):1424 LP – 1424. doi:/10.1182/blood-2018-99-119593
4. Wei A., Strickland S. A, Hou J-Z., et al. Venetoclax with Low-Dose Cytarabine Induces Rapid, Deep, and Durable Responses in Previously Untreated Older Adults with AML Ineligible for Intensive Chemotherapy. *Blood*. 2018;132(Suppl 1):284LP – 284. doi:10.1182/blood-2018-99-118729
5. Del Poeta G., Venditti A., del Principe M.I. et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2003;101(6):2125–31. doi:10.1182/blood-2002-06-1714
6. Vachhani P, Wolach O, Garcia JS et al Acute myeloid leukemias commercially available therapies, excluding transplantation and cellular immunotherapies. *ASH 2021. Abstract 1271.* doi: 10.1182/blood-2021-15158
7. DiNardo C.D., Jonas B.A., Pullarkat V., et al.. Azacitidine and venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617–629. doi:10.1056/NEJMoa2012971
8. Pan R., Hogdal L.J., Benito J.M. et al. Selective BCL-2 inhibition by ABT-199 causes on-target cell death in acute myeloid leukemia. *Cancer Discov* 2019;4(3):362–75. doi:10.1158/2159-8290.CD13-0609

Сборник подготовлен к печати и издан
при финансовой поддержке
компании Конкордика
и инжинирингового центра
Геборгенхайт Медичинтехник