

ЦЗЯО ЧЭН

**КЛИНИЧЕСКАЯ И ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ
ЛИМФОМЫ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) (ректор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор **Петр Витальевич Глыбочко**) и федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Стилиди Иван Сократович**).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Зейналова Первин Айдыновна

Официальные оппоненты:

Саржевский Владислав Олегович, доктор медицинских наук, профессор кафедры гематологии и клеточной терапии института усовершенствования врачей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Гривцова Людмила Юрьевна, доктор биологических наук, руководитель отдела лабораторной медицины Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущее учреждение: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «16» мая 2019 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе д.23.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России по адресу 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.24 и на сайте www.ronc.ru.

Автореферат разослан «.....» 2019 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) - это одна из наиболее частых высокоагрессивных лимфом. Это самый частый вариант агрессивных лимфом у взрослых, составляет 25-30% неходжкинских лимфом. В основе диагностики ДВКЛ лежит гистопатологическая классификация ВОЗ 2017 года, которая пришла на смену классификации ВОЗ 2008 года.

ДВКЛ относится к разряду излечимых лимфом, однако, это достигается не более чем у 70% больных. Существующие подходы к предсказанию результатов лечения, то есть факторы Международного прогностического индекса (МПИ) далеко не всегда позволяют адекватно оценить степень риска прогрессирования у больных, что диктует необходимость поиска новых прогностических критериев ДВКЛ.

В последние годы наряду с исследованием первичной опухоли важное место среди диагностических процедур занимает изучение костного мозга. Иммунологический анализ костного мозга при лимфомах устанавливает поражение даже в случаях, когда морфологически опухолевые клетки диффузной В-крупноклеточной лимфомы не выявляются. Анализ иммунологических маркеров, которые позволяют установить минимальное поражение костного мозга при ДВКЛ, представляет актуальную задачу. Интересным аспектом исследования костного мозга при ДВКЛ является эритроидный росток гемопоэза. Изменения этого ростка при опухоли и, в частности, при ДВКЛ заключаются в большинстве случаев в нарастании пропорции оксифильных нормобластов, количество которых повышено и превышает относительное содержание полихроматофильных нормобластов. В литературе отсутствуют сведения о возможности дифференциации клеток эритроидного ряда иммунологическими методами, и это представляет актуальную задачу.

Исследование клинических факторов прогноза ДВКЛ, поиск критериев минимального поражения костного мозга, а также иммунологической оценки гемопоэза при ДВКЛ является актуальной задачей, решение которой поможет адекватному стадированию лимфомы, пониманию взаимоотношений опухоль-организм на примере гемопоэтической ткани.

Цель исследования

Клиническое и иммуногематологическое изучение ДВКЛ с позиций поиска новых критериев диагностики и прогноза заболевания.

Задачи исследования:

1. Оценка влияния на прогноз факторов МПИ (пожилой возраст, поздние стадии, наличие более двух внеузловых зон, повышенных уровней ЛДГ, ECOG), а также адаптированного к возрасту МПИ (авМПИ).

2. Изучить особенности эритропоэза при ДВКЛ и их прогностическую значимость.
3. Оценить возможности иммунологической проточно-цитометрической характеристики эритропоэза при ДВКЛ на основе установления степени зрелости эритрокариоцитов.
4. Дать гематологические характеристики костного мозга как обоснование необходимости изучения минимальной остаточной болезни (МОБ) при ДВКЛ.
5. Разработать диагностические критерии установления минимального поражения костного мозга при ДВКЛ на основе степени зрелости В-лимфоцитов, особенностей их иммунофенотипа и моноклональности по каппа и лямбда полипептидным цепям мембранных иммуноглобулинов.

Научная новизна

Установлено, что главными неблагоприятными факторами прогноза в условиях программного лечения с применением ритуксимаба (R-СНОР) является диагностика ДВКЛ на поздних стадиях заболевания, повышенный уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также показатель активности больных по ECOG.

Выделение прогностических групп на основании МПИ играет важную роль в формировании групп риска ДВКЛ. Наиболее достоверные различия по прогнозу отмечены при использовании в качестве порогового уровня двух факторов риска, то есть групп более низкого риска (0-2 факторов) и более высокого риска (3-5 факторов), $p=0,008$.

Адаптированный для возраста международный прогностический индекс (авМПИ) также имел важное прогностическое значение в целом по группе больных ($p=0,013$), что было обусловлено важной ролью данного индекса у больных более молодого возраста (до 60 лет), $p=0,000$. У больных в возрасте 60 лет и старше выделение групп риска в соответствие с авМПИ не имело прогностического значения, $p=0,93$.

При тщательном анализе миелограмм 60 больных ДВКЛ выявлены наиболее типичные отклонения от нормы. В их числе повышение относительного количества бластных клеток (выше 1%) у 73,3% пациентов, снижение уровней базофильных и полихроматофильных нормобластов наряду с нарастанием оксифильных нормобластов в 83,3% случаев.

Поскольку одной из причин увеличения процента бластов в миелограмме может быть диссеминация единичных клеток ДВКЛ, в работе предпринята попытка более детальной характеристики В-клеток костного мозга. Установлено, что характеристика всего пула В-лимфоцитов на предмет клональности мало информативна из-за присутствующих В-линейных предшественников. Характеристику целесообразно проводить в пределах зрелых В-лимфоцитов (CD45++ CD20+), желательна – CD5-негативных. В этом случае удастся выявить больных с клональными В-клетками в костном мозге. Другим подходом к совершенствованию диагностики минимального поражения костного мозга при ДВКЛ является выявление фракции

зрелых В-клеток с типичным для ДВКЛ CD21-негативным иммунофенотипом. Оба эти подхода позволяют идентифицировать крупные аберрантные или клональные В-клетки при их содержании вплоть до 0,01%.

Ряд отклонений от нормы в показателях миелограммы имел прогностическое значение. Неблагоприятное влияние на прогноз оказывало снижение относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов костного мозга ($p=0,015$). Вместе с тем, этот фактор не имел самостоятельного значения и наблюдался достоверно чаще при распространенных стадиях ДВКЛ. Такой прогностический признак как повышение относительного уровня оксифильных нормобластов реализовался в сравнительно поздние сроки наблюдения (более 24 мес), где его неблагоприятная роль становилась высоко достоверной, $p=0,044$.

Важная прогностическая роль изменений в миелограмме у больных ДВКЛ послужила основанием для разработки иммунологических критериев дифференцировки ядродержащих клеток эритроидного ряда с целью дальнейшей объективизации полученных данных.

При проведении детального иммунофенотипирования эритроидного ростка гемопоэза у больных ДВКЛ было установлено, что в случаях резкого повышения процента оксифильных нормобластов всегда отчетливо виден пик эритрокариоцитов с экспрессией антигена CD105. Дальнейшие исследования показали, что данный пик наблюдается у всех больных ДВКЛ и ассоциирован с максимумом экспрессии CD71 и CD36. Выделение фракции эритрокариоцитов со снижением уровней этих трех антигенов (CD105, CD71, CD36) согласно нормальной дифференцировке эритроидных клеток наблюдается на более поздних стадиях (то есть может соответствовать оксифильным формам). Действительно, пропорция эритрокариоцитов, выделяемая на основании снижения CD105, CD71, CD36, наиболее коррелировала с содержанием оксифильных эритрокариоцитов. Таким образом, иммунологические исследования эритроидной дифференцировки клеток костного мозга больных ДВКЛ позволили нам дополнить морфологическую и тинкториальную характеристику клеток эритроидного ряда иммунофенотипическими данными.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость работы состоит в том, что нами подвергнуты переоценке существующие международные прогностические индексы (МПИ, авМПИ), используемые для выделения групп риска прогрессирования при ДВКЛ. Из числа клинических в условиях современной терапии играют наибольшую неблагоприятную роль поздние стадии заболевания (III, IV), активность по ECOG и повышенные уровни ЛДГ. Вместе с тем целый ряд факторов прогноза утратил свое значение. Выделение групп риска в соответствии с МПИ является высоко значимым, в особенности при подразделении на группы высокого риска и низкого риска. Индекс авМПИ имеет значение только в группе больных моложе 60 лет и полностью

утрачивает свое значение у больных в возрасте 60 лет и старше. Эти данные имеют важное практическое значение, так как позволяют стратифицировать больных на группы риска, используя наиболее информативные клинико-лабораторные параметры.

В нашей работе установлены новые факторы прогноза, основанные на анализе наиболее типичных отклонений от нормы в миелограмме больных. Наиболее значимыми из них явились нарушения в миелоидном ряду дифференцировки и ускорение созревания эритрокариоцитов. Снижение уровня нейтрофильных гранулоцитов явилось важным прогностическим признаком у больных ДВКЛ. Однако роль этого показателя пока еще не совсем ясна, так он имеет существенную связь со стадией болезни.

Повышение уровня оксифильных нормобластов выше нормы наблюдалось у 83,3% больных ДВКЛ. При оценке роли данного признака в прогнозе на всем протяжении болезни установлена близкая к достоверной неблагоприятная роль. Анализ кривых выживаемости показал, что прогностическая роль данного признака реализуется в сроки наблюдения 24 мес и более. Действительно, при проведении сравнения в эти сроки неблагоприятная роль повышения пропорции оксифильных нормобластов приобретает достоверный характер ($p=0,044$). Таким образом, к числу существующих клинико-лабораторных факторов прогноза ДВКЛ нами дополнен иммуногематологический признак – увеличение пропорции оксифильных нормобластов в миелограмме.

Учитывая важную прогностическую роль данного признака, нами предложены иммунофенотипические критерии идентификации популяции оксифильных нормобластов у больных ДВКЛ. Эти критерии основаны на идентификации эритрокариоцитов как CD36+SSC_{low} клеток среди эритрокариоцитов с последующим выделением фракции со снижением показателей экспрессии CD105, CD71, CD36. Эти данные позволят более точно характеризовать эритроидный росток гемопоэза у больных ДВКЛ.

В целом в проведенном исследовании подтверждено, что клинические и лабораторные факторы могут иметь важное прогностическое значение при ДВКЛ. Их роль должна учитываться при проведении комплексного исследования, включающего характеристику показателей костно-мозгового кроветворения у больных ДВКЛ.

Методология и методы диссертационного исследования

Диссертация выполнена в отделении химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга (заведующая отделением д.м.н. Зейналова П.А.) НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе использованы клинические, морфологические и иммунологические методы исследования.

Клинические данные характеризуют основные параметры опухоли при диагностике:

локализацию, степень распространенности процесса, наличие экстранодальных проявлений, показатель активности по ECOG, группы риска, выделяемые в соответствии с прогностическими индексами МПИ и авМПИ.

Иммуноморфологическое подтверждение диагноза диффузной В-крупноклеточной лимфомы во всех случаях проведено в соответствии с классификацией ВОЗ (2008).

Морфологическое исследование костного мозга проведено на основании подсчета миелограммы и исследования материала трепанобиопсии костного мозга.

30 больным проведено детальное иммунофенотипическое исследование костного мозга методом многоцветной проточной цитометрии на приборе FACS Canto II:

1. Исследование особенностей эритроидного ростка на основании экспрессии дифференцировочных антигенов гликофорина А, CD36, CD105, CD34, CD71, HLA-DR, CD117, CD33, ядерных красителей SYTO 16 и SYTO 41.

2. Исследование особенностей В-клеточной дифференцировки на основании экспрессии CD45, CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD5, каппа и лямбда цепей мембранных иммуноглобулинов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Клинические и лабораторные факторы прогноза, представленные в международных индексах МПИ и авМПИ, частично утратили свое значение. Главными факторами неблагоприятного прогноза являются поздние (III, IV) стадии заболевания, показатель активности по ECOG, повышенные уровни ЛДГ. В дополнение к клинико-лабораторным данным могут быть рекомендованы иммуноморфологические параметры, характеризующие костно-мозговое кроветворение у больных ДВКЛ, в первую очередь, показатели эритробластограммы.

2. Наиболее зрелая фракция эритрокариоцитов, соответствующая оксифильным нормобластам, может быть идентифицирована иммунологически методом многоцветной проточной цитометрии на основании экспрессии CD45, CD36, CD105, CD71; при этом оценка традиционного маркера эритроидных клеток – Гликофорина А - не является обязательной.

3. Оценку минимального поражения костного мозга при ДВКЛ целесообразно проводить на основе детального анализа зрелых В-лимфоцитов костного мозга (CD45++) с использованием маркеров CD20, CD21, CD5, а также клональности В-лимфоцитов по каппа и лямбда полипептидным цепям мембранных иммуноглобулинов.

Личный вклад

Обследование больных с ДВКЛ, получающих программное лечение, сбор информации о больных, анализ историй болезни, участие в анализе иммунологических данных, систематизация, математическая и статистическая обработка данных, изучение литературных

сведений, изложение результатов в печатном виде.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – онкология, конкретно пункту 3 «Разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики».

Степень достоверности и апробация результатов

Апробация результатов работы состоялась 21 ноября 2018 г. на совместной научной конференции кафедры онкологии лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), отделения химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга, лаборатории иммунологии гемопоэза централизованного клиничко-лабораторного отдела, патологоанатомического отделения отдела патологической анатомии опухолей человека НИИ клинической онкологии им. академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России отделения химиотерапии гемобластозов отдела химиотерапии НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

Данные, представленные в работе, получены с использованием современных методов исследования – иммуногистохимии, проточной цитометрии и т.д., - подвергнуты полноценной статистической обработке. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура работы

Работа изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, трех глав собственных результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 15 отечественных и 78 иностранных источников. Работа иллюстрирована 7 таблицами, 72 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Характеристика материалов и методов исследования

Исследование выполнено у 105 больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (директор член-корр. РАН, профессор И.С. Стилиди).

В анализируемой группе ДВКЛ было несколько больше мужчин – 57 больных (54%), чем женщин – 48 (46%). Возраст пациентов – 15 – 86 лет.

Больные проходили обследование и лечение в объеме, необходимом для установления диагноза, определения стадии ДВКЛ, показаний и противопоказаний к химиоиммунотерапии.

Диагноз диффузной В-крупноклеточной лимфомы был установлен на основании критериев классификации Всемирной Организации Здравоохранения иммуноморфологическим методом. Диагностика проводилась профессором Н.А. Пробатовой, ведущим научным сотрудником А.И. Павловской в отделе патологической анатомии (рук. – к.м.н. Н.А. Козлов).

Всем больным проведено морфологическое исследование костного мозга. Гистологическое исследование по материалу трепанобиопсии костного мозга проводилось в отделе патологической анатомии опухолей «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ. Гемоцитологическое исследование проводилось в лаборатории иммунологии гемопоэза (рук. профессор Н.Н. Тупицын) в морфоцитохимической группе под руководством профессора М.А. Френкель. Подсчет миелограммы осуществлялся двумя опытными гемоцитологами, оценивалось не менее 500 клеток (по 250 каждым из гемоцитологов). В качестве нормы использовали данные Соколова В.В. и Грибовой И.А.

30 больным проведено иммунофенотипирование миелокариоцитов методом многоцветной проточной цитофлуориметрии:

1. Была проведена детальная иммунологическая характеристика эритропоэза с использованием следующих моноклональных антител: Гликофорин А, CD36, CD105, CD34, CD71, HLA-DR, CD117, CD33, ядерных красителей SYTO 16 и SYTO 41.

2. Исследовали содержание В-клеток на предмет установления минимальной резидуальной болезни; панель моноклональных антител включала: CD45, CD19, CD20, CD21, CD23, CD24, CD5, каппа и лямбда цепей мембранных иммуноглобулинов. Детали гейтирования В-клеток представлены в соответствующем разделе.

Стадию ДВКЛ устанавливали на основании общепринятых критериев (таблица 1), преобладали поздние (III-IV) стадии.

Таблица 1. — Распределение больных по стадиям заболевания

Стадия ДВКЛ	Количество больных	
	Число	Процент
I	10	9.5
II	31	29.5
III	12	11.4
IV	52	49.6

В соответствии с МПИ у больных ДВКЛ выделяли группы низкого риска (наличие не более одного фактора риска по МПИ), низкого промежуточного риска (два фактора риска), высокого промежуточного риска (три фактора риска) и высокого риска (4 или 5 факторов риска).

Использовали также адаптированный к возрасту МПИ, отличающийся от МПИ тем, что не учитываются возраст старше 60 лет и наличие более одной экстранодальной локализации.

Общее состояние больных оценивали в соответствии со шкалой международной кооперативной прогностической группы (ECOG).

Статистическую обработку полученных данных проводили на основании обчета результатов - SPSS 20.0 для Windows. Кумулятивную выживаемость рассчитывали по методике Kaplan-Meier (1958).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значение критериев международного прогностического индекса на современном этапе диагностики и лечения ДВКЛ.

Возраст больных. В соответствии с МПИ пожилой возраст больных (60 лет и старше) является прогностически неблагоприятным признаком. Мы изучили выживаемость больных в зависимости от возраста, используя в качестве порогового уровня 60 лет. Из 105 больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой 56 были моложе 60 лет, остальные – более старшего возраста. Кумулятивная общая выживаемость была практически идентична для больных пожилого возраста и больных моложе 60 лет, не установлено прогностической значимости пожилого возраста больных ($p=0,418$).

Стадия заболевания. Фактором неблагоприятного прогноза согласно МПИ являются поздние (III и IV) стадии. В анализируемой группе таких пациентов было 64. Сравнение кривых кумулятивной выживаемости с показателями у 41 больного с начальными стадиями представлено на рисунке 1. Различия высоко достоверны ($p=0,028-0,037$ в зависимости от примененного статистического теста).

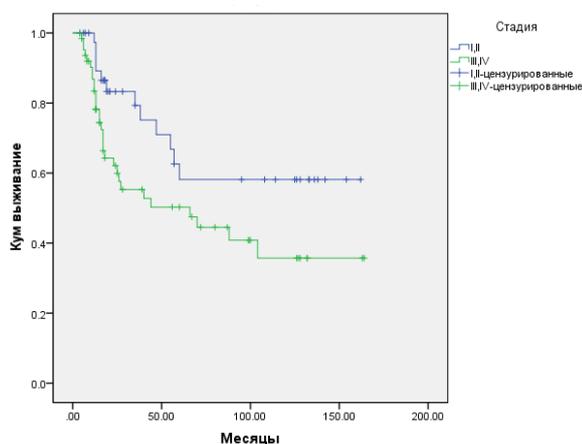


Рисунок 1. —Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от стадии лимфомы (синяя линия – стадии I-II; зеленая линия –стадии III-IV).

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Изучение значения этого фермента в прогнозе заболевания нами проанализировано у 105 больных ДВКЛ. Нормальный диапазон значений фермента установлен у 36 больных (34,3%), повышенные – у 69 пациентов (65,7%). В целом по группе уровни ЛДГ были в диапазоне 231,0 – 2044,0, при медиане 535. При сравнении кумулятивных кривых общей выживаемости в этих двух группах нами установлено, что повышение концентрации лактат дегидрогеназы было ассоциировано с плохим прогнозом ($p=0,016$), рисунок 2.

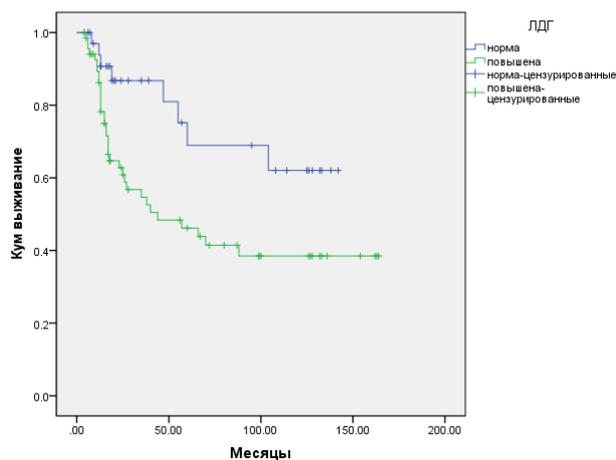


Рисунок 2. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от уровней фермента ЛДГ в сыворотке крови (синяя линия – нормальные уровни фермента; зеленая линия – повышенные уровни фермента).

Активность больных по шкале ECOG. Общая активность пациентов, оцениваемая по шкале ECOG, высоко достоверно влияла на прогноз ДВКЛ. Выживаемость оценена у 105 больных. У 68 больных с наличием ECOG ≥ 2 прогноз был достоверно хуже ($p=0,015$) в сравнении с больными с ECOG < 2 (37 больных), рисунок 3.

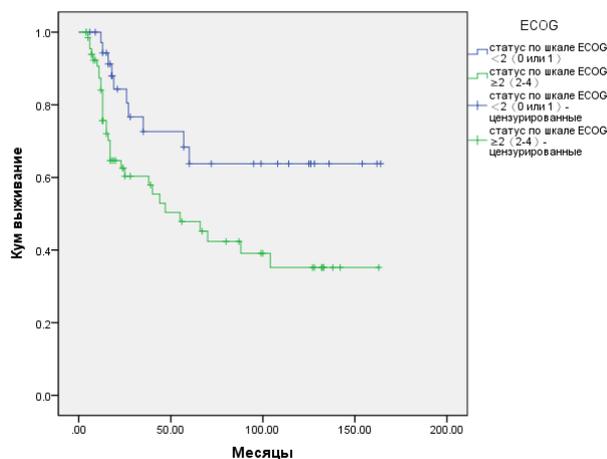


Рисунок 3. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от ECOG. (синяя линия – ECOG менее 2; зеленая линия – ECOG ≥ 2).

Наличие экстранодальной опухоли. У 78 пациентов с ДВКЛ, которые имели внеодальную опухоль, кривые кумулятивной выживаемости практически не отличались от таковых у больных ДВКЛ с поражением только ткани лимфатических узлов ($p=0,679$). В Международном прогностическом индексе МПИ наличие 2 и более внеодальных поражений считается признаком плохого прогноза. В нашей выборке больных ДВКЛ таких пациентов было 44. Они, действительно, имели более низкую выживаемость, чем в группе сравнения (различия не достоверны, $p=0,123-0,139$).

Роль прогностического индекса МПИ. В нашей выборке было 6 градаций данного индекса: 0 баллов – 8 больных, 1 – 17, 2 – 18, 3 – 21, 4 – 25, 5 – 16. С возрастанием неблагоприятных признаков МПИ показатели жизни больных были более короткими ($p = 0,06-0,054$ в зависимости от метода статистической оценки). Следует отметить, что данный признак стандартизован и классифицирует 4 группы риска прогрессирования: низкий риск (0-1 признак) – 25 больных; низкий промежуточный риск (2 фактора) – 18 больных, промежуточный высокий риск (3 фактора) – 21 больной, высокий риск (4-5 факторов) – 41 пациент. Эти группы риска различались по прогнозу ($p=0,023$).

Поскольку выживаемость в группах низкого и низкого промежуточного риска практически не различалась, эти группы были объединены. Аналогичным образом поступили с группами промежуточного высокого и высокого риска. Таким образом, в группе условно низкого риска (не более 2 неблагоприятных факторов) было 42 больных, в группе условно высокого риска (более 2 факторов) было 63 больных. Различия в выживаемости между этими группами были высоко достоверны ($p=0,008$), рисунок 4.

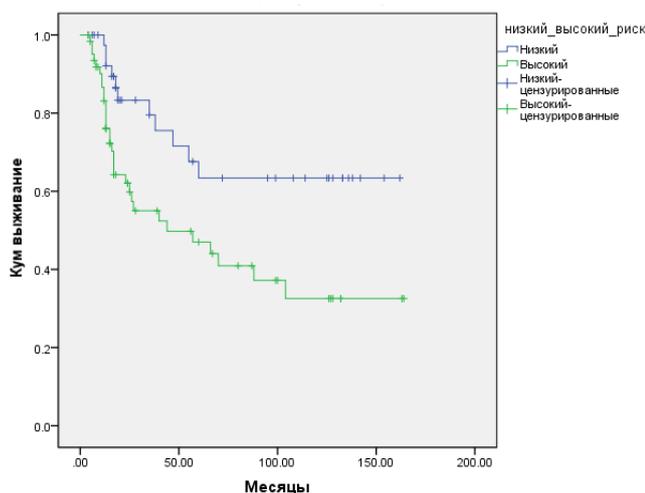


Рисунок 4. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от риска прогрессирования по МПИ (синяя линия – условно низкий риск; зеленая линия – условно высокий риск)

На основании полученных данных можно заключить, что наиболее важным фактором неблагоприятного прогноза из числа включенных в МПИ являются наличие у больного III или IV стадий ДВКЛ ($p = 0,037$), повышенные уровни ЛДГ ($p = 0,016$) и ECOG ≥ 2 ($p=0,015$).

Прогностический индекс, адаптированный к возрасту (авМПИ), включает стадию, уровень ЛДГ и активность по ECOG. Этот индекс является наиболее широко используемым в клинической практике показателем, позволяющим стратифицировать больных моложе 60 лет и старшей возрастной группы.

Анализ выживаемости в зависимости от авМПИ проведен у 105 больных (низкий риск – 17, промежуточный низкий – 21, промежуточный высокий – 21, высокий – 46). Отмечена высоко достоверная связь ухудшения выживаемости с группой риска ($p=0,013$).

Поскольку стратификация лечения в зависимости от скорректированного для возраста показателя МПИ (авМПИ) проводится в различных возрастных группах, мы оценили значение выделения групп риска на основании авМПИ у больных более молодого (до 60 лет) и пожилого (60 лет и старше) возраста. У больных молодого возраста группы риска авМПИ имели прогностическое значение, $p=0,000$ (низкий риск – 10, низкий/промежуточный – 10, промежуточный/высокий – 13, высокий – 23), рисунок 5.

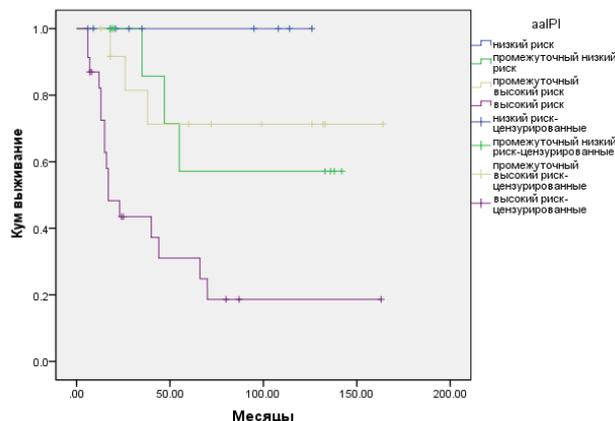


Рисунок 5. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ молодого возраста (до 60 лет) в группах риска по авМПИ (синяя линия – низкий риск, зеленая линия – низкий промежуточный риск, кофейная линия – промежуточный высокий риск, фиолетовая линия – высокий риск).

У больных 60 лет и старше сравниваемые группы риска авМПИ не имели прогностического значения, $p=0,926$.

Таким образом, в условиях современной терапии ДВКЛ градация на группы риска в соответствии с международным прогностическим индексом (МПИ) сохраняет свое значение и взаимосвязана с прогнозом ДВКЛ. Вместе с тем, такие признаки неблагоприятного прогноза как пожилой возраст больных (60 лет и старше) утратили свое значение. Наиболее важное

неблагоприятное прогностическое значение имеет диагностика ДВКЛ на поздних (III-IV) стадиях. Повышенный уровень ЛДГ также имел достоверную связь с выживаемостью больных ДВКЛ. Важным неблагоприятным влиянием на прогноз характеризовался показатель активности по шкале ECOG не менее 2. По существу, главным клиническим фактором неблагоприятного прогноза ДВКЛ явились поздние стадии опухоли. Выделение групп риска прогрессирования на основании международного прогностического индекса (МПИ) сохраняет важное прогностическое значение. Особенно достоверные данные получены при сравнении выживаемости в группах условно «низкого» риска (объединение групп низкого и промежуточного низкого риска) и условно «высокого» риска (объединение групп высокого и промежуточно высокого риска).

Международный прогностический индекс, адаптированный для возраста больных, сохраняет свое значение в целом по группе больных ДВКЛ и у больных в возрасте моложе 60 лет. У больных пожилого возраста индекс авМПИ прогностического значения не имеет.

К дальнейшему совершенствованию изучения клеток эритроидного роста в костном мозге больных ДВКЛ.

Эритрокарициты костного мозга представляют интерес при изучении лимфом и некоторых форм рака. Это связано с изменением эритробластограммы, соотношений клеточных элементов эритрокарицитов, возрастанием количества наиболее зрелых морфологически распознаваемых форм ядросодержащих эритроидных клеток – оксифильных нормобластов.

Особый интерес представляет тот факт, что изменение эритробластограммы достоверно связано с прогнозом ДВКЛ. Поиск подобных маркеров чрезвычайно важен, так как позволяет характеризовать не только собственно опухолевый субстрат ДВКЛ, но и взаимосвязь опухоли с гемопоэзом, что может быть проявлением системного проявления взаимоотношений организм-опухоль.

Нами изучен эритроидный росток костного мозга у 60 больных ДВКЛ. По данным гемоцитологического исследования (миелограммы) во всех этих случаях специфическое поражение отсутствовало.

Образцы костного мозга характеризовались в основном нормальной клеточностью, большинство остальных показателей также было в пределах нормальных значений. Эритроидный росток был в большинстве случаев изменен, и при сравнении показателей с данными нормы содержание базофильных и полихроматофильных форм было снижено (в 62 и 50% случаев соответственно), а оксифильные нормобласты были повышены в 83,3% случаев (50 из 60). В то же время суммарное содержание клеток эритроидного роста в большинстве случаев было в пределах нормы, а отклонения в сторону снижения или повышения были в примерно равных пропорциях. При оценке этих изменений не выявлено их связи с прогнозом

ДВКЛ. Отсутствием влияния на выживаемость характеризовались как изменения со стороны эритроидного ростка в целом ($p=0,095$), базофильных нормобластов ($p=0,1$), полихроматофилов ($p=0,188$), так и оксифильных форм ($p=0,084$).

При анализе кривых выживаемости в зависимости от уровней оксифильных нормобластов установлено, что через 2 года от момента диагностики больные с нормальным содержанием оксифильных нормобластов выходят на плато, в то время как значительная пропорция больных с повышением оксифильных нормобластов умирает.

Мы проанализировали выживаемость в сроки более двух лет у больных ДВКЛ в зависимости от этих нарушений в терминальной стадии дифференцировки эритрокариоцитов. Данные, представленные на рисунке 6 и статистические расчеты, убедительно свидетельствуют об ухудшении прогноза у больных с повышенным содержанием оксифильных нормобластов ($p=0,044$). Следует отметить, что количество больных с нормальными показателями оксифильных нормобластов в анализируемые сроки было невелико (7 пациентов), в то время как в группе сравнения было 29 больных.

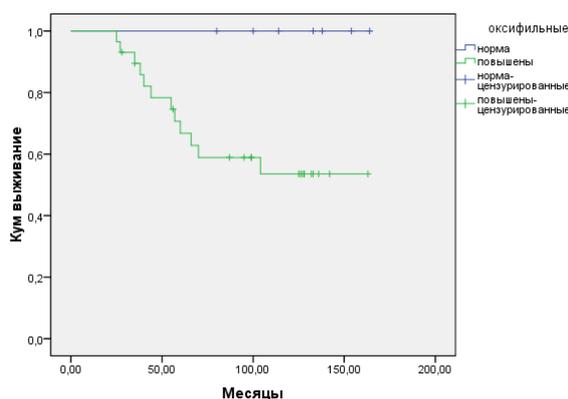


Рисунок 6. — Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ, проживших более 2 лет, в зависимости от содержания оксифильных нормобластов в миелограмме (синяя линия — нормальные уровни оксифильных нормобластов; зеленая линия — повышение).

Всё сказанное свидетельствует о необходимости совершенствования идентификации наиболее зрелых этапов ядродержащих клеток эритроидного ряда. Привлекательным является иммунологический метод, основанный на изменении экспрессии мембранных маркеров по мере дифференцировки эритрокариоцитов.

Проточно-цитометрическая характеристика дифференцировки клеток эритроидного ряда у больных ДВКЛ.

Поскольку морфологическая характеристика эритрокариоцитов является во многом субъективной, мы предприняли попытку охарактеризовать стадии дифференцировки эритрокариоцитов в костном мозге больных ДВКЛ проточно-цитометрически.

С целью оценки возможности характеристики дифференцировки эритрокариоцитов проточно-цитометрическим методом были проанализированы различные методы их идентификации, основанные на следующих положениях:

1. Большинство эритрокариоцитов в костном мозге человека являются CD45-негативными, и лишь немногочисленные наиболее ранние формы слабо экспрессируют CD45.
2. Специфическим маркером клеток эритроидного ряда является гликофорин А, присутствующий на всех ядросодержащих эритроидных клетках костного мозга.
3. Весьма специфичным для клеток эритроидного ряда является трансферриновый рецептор (CD71), который появляется раньше гликофорина А на эритроидных предшественниках и утрачивается на ретикулоцитах и эритроцитах.
4. Ранние предшественники эритроидных клеток могут характеризоваться экспрессией CD34, CD117.
5. Для характеристики эритрокариоцитов использовали также CD36 (в отличие от гликофорина отсутствует на эритроцитах) и CD105 (пик экспрессии примерно совпадает с пиком экспрессии CD71).

Проведенная детальная характеристика эритропоэза, нацеленная на возможность идентификации наиболее зрелых этапов дифференцировки эритрокариоцитов, позволила исключить гликофорин А (затрудняет анализ из-за положительной реакции с эритроцитами), CD45 и ядерные красители SYTO (практически все CD36-позитивные клетки с низкими характеристиками SSC являются CD45-негативными (рис. 7) и SYTO-позитивными), а также маркеры ранних этапов дифференцировки).

Итоговый алгоритм идентификации наиболее зрелых эритрокариоцитов выглядел следующим образом.

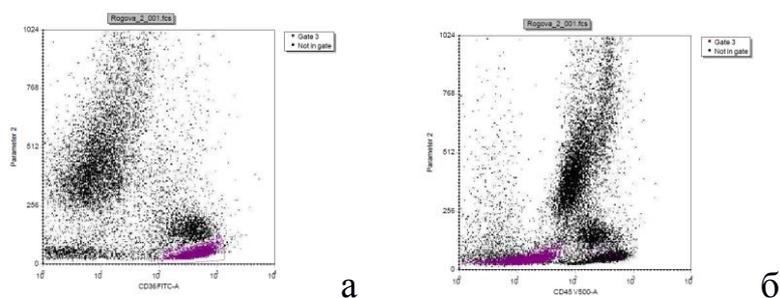


Рисунок 7. — **а.** Экспрессия CD36 на клетках с низкими уровнями SSC. **б.** Отсутствие экспрессии CD45 на CD36-позитивных клеточных элементах костного мозга с низкими характеристиками SSC. Корреляция между процентным содержанием CD36+SSC^{low} клетками и этими клетками, не имеющими CD45 (CD45-) очень высока – R=0,993; p=0,000; n=16. То есть, использование CD45 в этих ситуациях не является обязательным.

Наличие четко выраженного пика экспрессии CD36, совпадающего с пиком CD105, не отражает терминальную дифференцировку эритрокариоцитов. По мере дифференцировки ядерных эритроидных клеток на поздних этапах созревания CD105, CD36 и CD71 снижаются. В случаях наличия четкого пика CD105+CD71+ эритрокариоцитов легко прослеживаются 2 уровня экспрессии CD71 (рисунок 8).

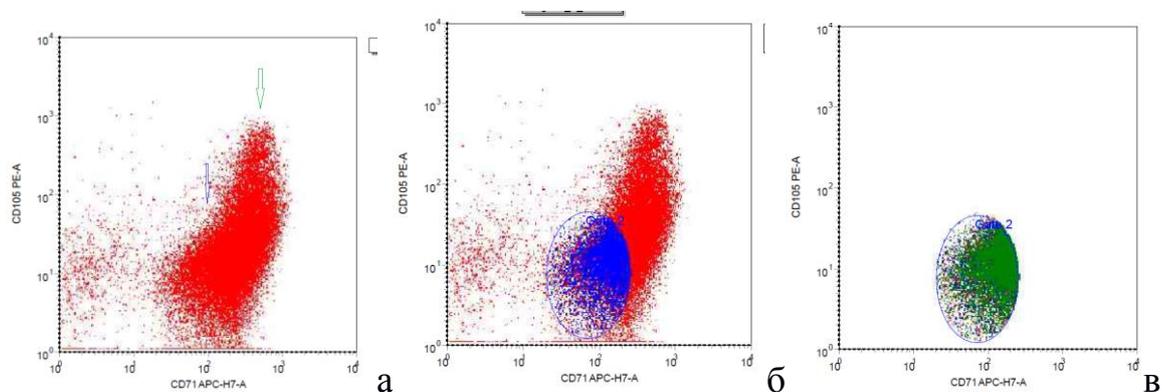


Рисунок 8. — **а.** Взаимоотношения между клетками, экспрессирующими CD71 и CD105, в гейте эритрокариоцитов (CD36+ SSC^{low}). Стрелка зеленого цвета показывает пик наиболее яркой экспрессии CD71, стрелка синего цвета показывает пик более слабой экспрессии CD71 на клетках со сниженной интенсивностью CD105; **б.** Выделение в пределах эритрокариоцитов гейта со слабой экспрессией CD71 и CD105 (иммунологически более зрелые формы); **в.** Более зрелые клетки в пределах эритрокариоцитов.

Далее объединяем гейты R1 (CD36+SSC^{low}) и R2 (CD105^{low}CD71^{low}) с тем, чтобы в итоговый гейт попали клетки CD36+SSC^{low}CD105^{low}CD71^{low} (рисунок 9а). Если рассмотреть эти клетки в гейте всех CD36-позитивных клеток, то, очевидно, что уровни CD36 на этих клетках более низкие (рисунок 9а).

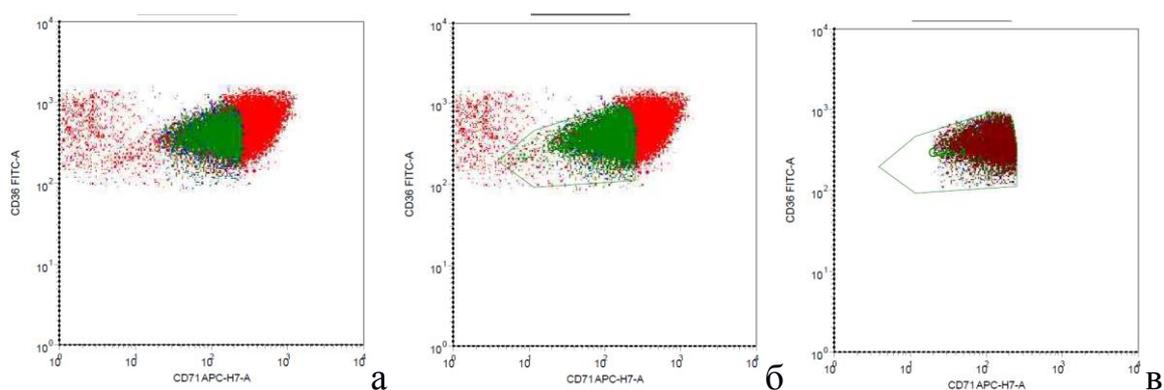


Рисунок 9. — **а.** Гейт CD71^{low} CD105^{low} эритрокариоцитов (окрашен зеленым цветом). Эти клетки также имеют несколько более слабую экспрессию CD36, что типично для эритрокариоцитов поздних стадий дифференцировки; **б.** Гейт включает все CD36^{low} клетки; **в.** Итоговый гейт наиболее зрелых эритрокариоцитов - CD36^{low}SSC^{low}CD105^{low}CD71^{low}.

Конечно, точного совпадения с данными миелограммы нет. Тем не менее, представленный подход отчетливо показывает возможности многоцветной проточной цитометрии в выделении наиболее зрелой популяции эритрокариоцитов костного мозга.

При анализе корреляционных связей выявляемой на основании проточно-цитометрических данных популяции наиболее зрелых эритрокариоцитов с морфологическим составом эритроидных клеток в миелограмме установлено отсутствие достоверной связи с базофильными формами ($R=0,481$; $p=0,069$; $n=15$), полихроматофильными нормобластами ($R=0,06$; $p=0,83$; $n=15$) и суммарным содержанием клеток эритроидного ряда ($R=0,367$; $p=0,178$; $n=15$). Имелась определенная взаимосвязь с оксифильными нормобластами ($R=0,43$, $n=15$), которая была близка к достоверной ($p=0,11$).

Выделение наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов на основании мембранного иммунофенотипа представляется серьезным дополнением к морфологии в оценке степени зрелости ядросодержащих эритроидных клеток костного мозга в норме и при патологии.

Клинико-гематологическое обоснование и иммунологические подходы к диагностике МОБ при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Поражение костного мозга при ДВКЛ относится к числу неблагоприятных факторов прогноза. Иммунологическая диагностика минимальной остаточной болезни при ДВКЛ разработана недостаточно.

Наши данные и предшествующие работы клиники РОНЦ свидетельствуют о том, что у значительной категории больных ДВКЛ отмечается повышение уровня бластных клеток в костном мозге выше верхнего уровня нормы. В этих случаях установление природы этих клеток и их соотнесение с ДВКЛ могло бы иметь важное клиническое значение с точки зрения совершенствования терапии, направленной на эрадикацию минимальных количеств этих клеток.

Мы изучили содержание бластных клеток в миелограммах 60 больных ДВКЛ. Верхняя граница нормы содержания бластных клеток равняется 0,6%. В нашей выборке у 73% больных (44 пациента) содержание бластных клеток было более 1% (максимально – 5,7%).

Мы изучили показатели общей выживаемости в зависимости от повышения процента бластов выше 1%. Повышенные уровни бластных клеток были взаимосвязаны с худшим прогнозом ДВКЛ, $p=0,172$, рисунок 10.

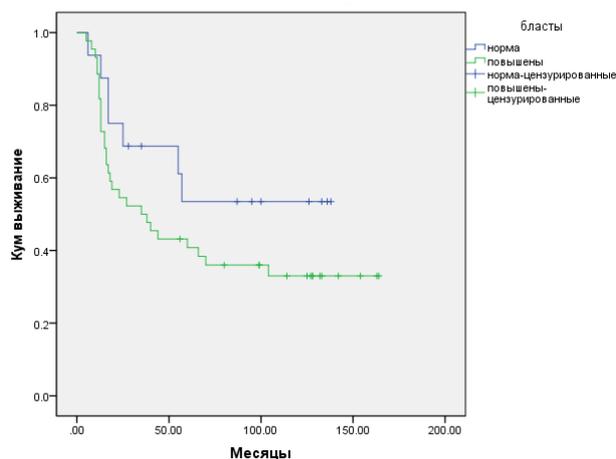


Рисунок 10. —Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от содержания бластных клеток в миелограмме (синяя линия – нормальные уровни бластных клеток; зеленая линия –повышение уровни бластных клеток до 1% и выше).

Как видно из представленных данных, кривые выживаемости существенно расходятся (не достоверно), и продолжительность жизни больных, имеющих повышенный процент бластов, значительно хуже. Данный признак (повышение уровня бластов до 1% и выше) не был связан с наличием у больных поздних (III-IV) стадий, $p=0,26$. Эти результаты могут быть трактованы двояко: с одной стороны, повышение бластоза в костном мозге при ДВКЛ может наблюдаться и при ранних стадиях данной лимфомы (если это опухолевые бласты, то их наличие может быть ранним признаком диссеминации опухоли и, возможно, указанием к необходимости рестадирования), с другой – эти бласты могут не иметь отношения к опухолевой диссеминации и являться предшественниками какого-либо из ростков гемопоэза, в частности, гранулоцитарного ростка (эритроидный росток подробно рассмотрен в предыдущем разделе).

Косвенным подтверждением взаимосвязи бластов с гранулоцитарным ростком могли бы явиться аналогичные связи миелоидных клеток различных стадий дифференцировки (промиелоциты, миелоциты, палочкоядерные, сегментоядерные формы) с прогнозом ДВКЛ. Нами установлено, что ни один из этих типов клеток не был связан с показателями общей выживаемости больных ДВКЛ: для промиелоцитов уровень достоверности связи с прогнозом составил ($p=0,5$), для нейтрофильных миелоцитов $-0,37$, для метамиелоцитов $-0,92$, для палочкоядерных нейтрофилов $-0,35$. Интересные данные получены в отношении сегментоядерных нейтрофилов. Прогностически неблагоприятным было снижение количества сегментоядерных клеток, наблюдавшееся у 11 пациентов. Сравнение выживаемости в этой группе с выживаемостью больных с повышенными уровнями сегментоядерных клеток (19 пациентов) показало наличие достоверной связи ($p=0,015$), рисунок 11.

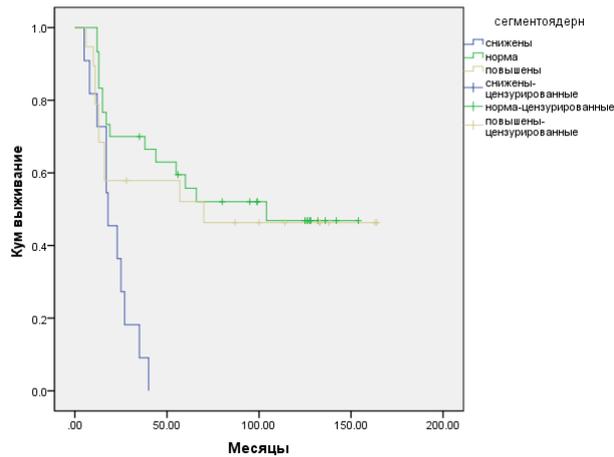


Рисунок 11. —Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от содержания сегментоядерных нейтрофилов в миелограмме (синяя линия – снижение уровня сегментоядерных нейтрофилов; зеленая линия – нормальные уровни; серая линия –повышение).

Важно отметить, что в 91% случаев снижения сегментоядерных нейтрофилов в миелограмме наблюдались поздние (III/IV) стадии ДВКЛ, взаимосвязь была близка к достоверной ($p=0,057$). Иными словами, достоверное влияние на прогноз сниженного количества сегментоядерных клеток, по-видимому, не имеет самостоятельного значения и обусловлено тем, что данный признак наблюдается при поздних стадиях ДВКЛ.

Всё сказанное не исключает того, что бластные клетки в костном мозге больных могут быть отражением диссеминации ДВКЛ. Необходима разработка надежных критериев определения минимального содержания опухолевых клеток ДВКЛ (то есть МОБ) в костном мозге больных ДВКЛ.

Возможности многоцветной проточной цитометрии в диагностике минимального поражения костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Нами использованы 3 многоцветных набора антител для детального изучения В-клеточного звена костного мозга методом проточной цитометрии, таблица 2.

Таблица 2. — Панель моноклональных антител для изучения субпопуляций В-клеток костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

№ пробы	V450	V500	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	CD21	CD45	CD9	CD30	CD19	-	CD22	CD38
2	-	-	CD45	CD20	CD19	CD10	CD5	CD24
3	-	-	kappa	lambda	CD19	-	-	-

Использование конъюгатов антител к каппа и лямбда цепям иммуноглобулинов в сочетании с антителами к В-клеткам (CD19) оказалось мало информативным. Это обусловлено тем, что наряду со зрелыми В-лимфоцитами в костном мозге присутствует выраженная пропорция В-линейных предшественников негативных в отношении мембранных иммуноглобулинов.

Целесообразно включение в панель определения клональности В-лимфоцитов маркеров (CD45, CD20), отражающих зрелость лимфоидных клеток. Сочетание этих 2 маркеров на мембране клетки характерно для зрелых В-лимфоцитов.

Использование данного сочетания антигенов (CD45, CD20, каппа-цепи, лямбда-цепи) для анализа В-лимфоцитов костного мозга больных ДВКЛ (6 пациентов) позволило получить различные варианты реакции. Пример поликлональной реакции представлен на рисунке 12.

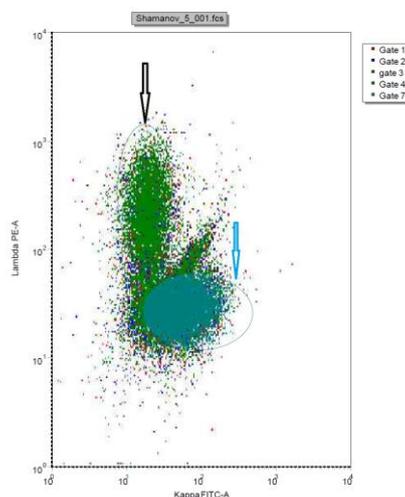


Рисунок 12. — Экспрессия каппа и лямбда полипептидных цепей иммуноглобулинов на зрелых В-лимфоцитах (CD45++ CD20+) костного мозга больного ДВКЛ. Лямбда цепи присутствуют на 22,4% В-лимфоцитов, овал показан стрелкой черного цвета. Каппа цепи – на 55,3% клеток, показано стрелкой голубого цвета. Реакция поликлональна.

Случаев моноклональности легких цепей мембранных иммуноглобулинов при использовании данного метода мы не наблюдали.

Другой подход для оценки клональности В-клеток был применен с целью выявления минимального количества В-лимфоцитов с периферическим иммунофенотипом (CD45+ CD20+ CD5-, моноклональность по каппа или лямбда легким полипептидным цепям иммуноглобулинов.

Подобный подход был реализован у 7 больных ДВКЛ и оказался весьма успешным. Из 7 случаев лишь в 1 не удалось оценить клональность (неспецифическое связывание антител к каппа и лямбда цепям Ig); в одном случае содержание В-клеток в костном мозге (CD20+) было

очень малым – 0,57%. В 3 случаях установлена клональность, в 2 случаях анализируемые В-клетки были поликлональны.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о возможности оценки клональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.

Общая панель для исследования В-лимфоцитов, представленная в таблице 2, позволяет подробно оценить маркеры В-клеток в целом (CD19), их более зрелые формы (CD20); антигены, присутствующие практически на всех периферических В-клетках (CD21, CD22, CD24), клональность по экспрессии каппа и лямбда цепей, дополнительные и активационные маркеры (CD10, CD5, CD38). А также уровень зрелости клеток на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45.

На большинстве зрелых В-клеток костного мозга (CD45+) присутствовали практически все пан-В-клеточные антигены. Клональность популяции В-лимфоцитов костного мозга по каппа и лямбда цепям, как правило, не наблюдалась.

При сравнении средних значений процентного содержания различных популяций лимфоцитов достоверные различия получены для CD19 и CD21 популяций клеток (средние 8,37 и 6,55%, $p=0,035$) и CD19 и CD24 популяций (8,4 и 7,1%, $p=0,03$).

По данным литературы одной из иммунофенотипических особенностей ДВКЛ является отсутствие экспрессии антигена CD21 на клетках у 90% больных.

Действительно, в ряде случаев ДВКЛ мы наблюдали отсутствие CD21 на зрелых В-клетках костного мозга (пример на рисунке 13).

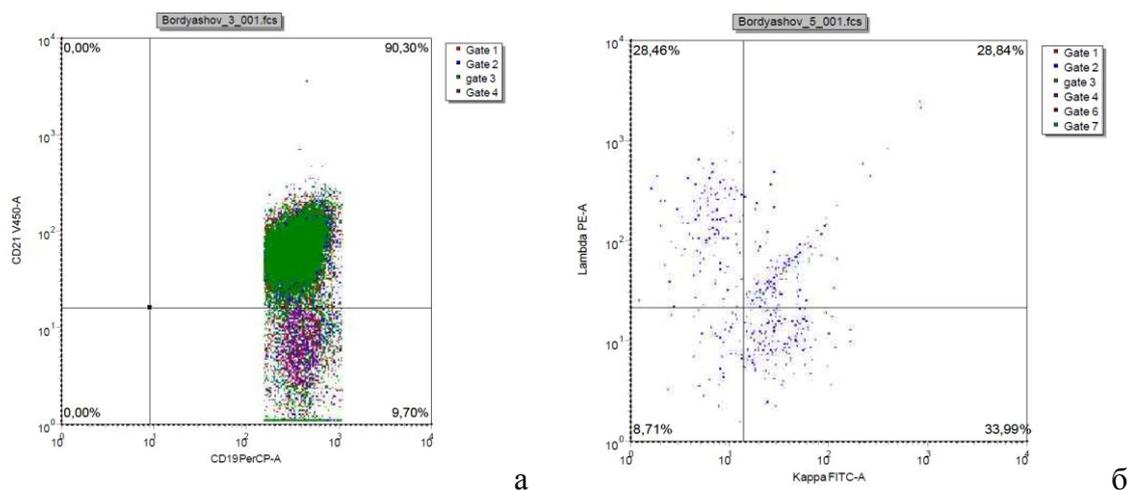


Рисунок 13. — **а.** В пределах зрелых В-клеток костного мозга больного ДВКЛ присутствует фракция CD21-негативных лимфоцитов – 9,7%; **б.** В целом, В-лимфоциты данного больного были поликлональны.

Среди В-клеток в анализируемом случае присутствовала более крупная фракция (0,01%), клональность которой в сочетании с экспрессией CD21 не была оценена ввиду отсутствия необходимых сочетаний флуорохромов.

Таким образом, оценка минимального поражения костного мозга при ДВКЛ должна базироваться на выявлении клональности В-лимфоцитов костного мозга по каппа и лямбда цепям Ig, степени зрелости клеток и особенностях их иммунофенотипа.

Дальнейший анализ минимального поражения костного мозга при ДВКЛ целесообразно вести именно в направлении поиска CD21-негативных В-лимфоцитов крупного размера, моноклональных.

ВЫВОДЫ

1. Клинические и лабораторные факторы прогноза, обозначенные в современных прогностических индексах (МПИ), во многом утратили свое значение в условиях современной терапии ДВКЛ. Наиболее важными и достоверными факторами неблагоприятного прогноза остаются поздние (III, IV) стадии заболевания, повышенные уровни ЛДГ и показатель активности больного по ECOG ≥ 2 .

2. Изменения миелограммы при ДВКЛ носят закономерный характер, наиболее характерным является повышение уровня бластных клеток более 1% (73,3% больных, 44 из 60), оксифильных нормобластов (у 83,3% больных, 50 из 60).

3. Ряд показателей миелограммы, отличающихся от нормы, имеет связь с прогнозом заболевания: снижение уровня нейтрофильных гранулоцитов связано с неблагоприятным прогнозом; повышение уровня оксифильных нормобластов имеет прогностическое значение при сроках наблюдения за больными более 24 мес.

4. В работе предпринята попытка идентификации оксифильных нормобластов проточно-цитометрическим методом. Наиболее соответствуют этим клеткам по иммунологическим характеристиками CD36+ клетки с низкими характеристиками SSC, которые имеют сниженные уровни CD105, CD36, CD71.

5. Учитывая прогностически неблагоприятную роль поражения костного мозга при ДВКЛ, предпринято исследование значения различных дифференцировочных антигенов В-лимфоцита в установлении минимального поражения костного мозга при ДВКЛ – CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, каппа и лямбда цепи мембранных иммуноглобулинов, CD45.

6. Уровни зрелых В-клеток колебались в костном мозге больных ДВКЛ в диапазоне от 0,8 до 22,8% и достоверно не различались для большинства субпопуляций. Вместе с тем, количество CD21+ зрелых В-лимфоидных клеток было достоверно более низким, чем содержание зрелых (CD45++) CD19+ клеток, что типично для иммунофенотипа ДВКЛ. В

пределах фракции CD45++CD19+CD21- зрелых лимфоидных клеток костного мозга присутствует фракция крупных клеток.

7. Оценка клональности В-лимфоцитов костного мозга по каппа и лямбда цепям мембранных иммуноглобулинов при ДВКЛ с целью выявления минимального поражения является наиболее информативной при анализе зрелых В-клеток CD45++ CD20+ CD5-.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В
ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫМ ПЕРЕЧНЕМ ВАК ПРИ МИНОБРНАУКИ
РОССИИ**

1. **Цзяо Ч.** Иммунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой /Н.Н. Тупицын, Цзяо Ч., П.А. Зейналова. //Российский биотерапевтический журнал. -2018. –Том. 17, №4. –С.52-57.

2. **Цзяо Ч.** Прогностически значимые изменения состава миелограммы у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. /Цзяо Ч., П.А.Зейналова. //Российский биотерапевтический журнал. -2018. –Том. 17, №4. –С.58-63.

3. **Цзяо Ч.** Возможности модификации международного прогностического индекса (International Prognostic Index) для пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой: включение гематологических факторов / Цзяо Ч. // Вестник РОНЦ. -2018. –Т.29, №3-4. –С.20-23.