

На правах рукописи

МОЖЕНКОВА АННА ВАСИЛЬЕВНА

**ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОПУХОЛЕВОГО
КЛОНА И КЛЕТОК ОКРУЖЕНИЯ В КОСТНОМ МОЗГЕ ПРИ
ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ**

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в 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, профессор

Френкель Марина Абрамовна

Официальные оппоненты:

Гривцова Людмила Юрьевна, доктор биологических наук, заведующая отделом лабораторной медицины медицинского радиологического центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Демина Елена Андреевна, 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

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «26» сентября 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

Фолликулярная лимфома (ФЛ) является индолентным В-клеточным лимфопролиферативным новообразованием, происходящим из фолликулярного центра лимфатических узлов. Она составляет 10-11% среди всех неходжкинских лимфом (НХЛ) в России и занимает второе место по частоте среди индолентных НХЛ. Опухоль представлена двумя типами неопластических клеток герминального центра лимфоузла: центробластами и центроцитами. В число экстранодальных областей поражения при ФЛ входит костный мозг. Результаты современных работ, посвященных изучению прогноза при ФЛ, свидетельствуют о важности использования гематологических показателей для прогноза заболевания. На основании анализа клинических данных индекс прогноза FLIPI-1 для пациентов с ФЛ был уточнен и заменен на FLIPI-2 с включением показателей уровня гемоглобина (Hb) и результатов исследования костного мозга. Однако до настоящего времени отсутствуют исследования гемопоэза больных ФЛ при разных стадиях заболевания, нет сведений о гематологических показателях пациентов без поражения костного мозга и при опухолевой инфильтрации. Дополнительный интерес представляет вопрос об особенностях гемопоэза при различных типах опухолевого субстрата в костном мозге. Остается дискуссионной проблема влияния элементов микроокружения: Т-лимфоцитов и моноцитов на процессы угнетения гемопоэза.

Исследование гемопоэза больных ФЛ, включающее детальное морфоиммунологическое изучение опухолевого субстрата в костном мозге, показателей периферической крови, данных миелограммы, количественную оценку клеток микроокружения при разных стадиях болезни позволит ответить на ряд существенных клинических вопросов. Полученные результаты дадут возможность расширить понимание биологических особенностей этой неоплазии и оценить значение ряда факторов прогноза.

Цель исследования

Оценить изменения показателей гемопоэза больных ФЛ в зависимости от стадии болезни, от опухолевой инфильтрации костного мозга элементами различного цитологического типа и от характеристики клеток микроокружения.

Задачи исследования

1. Оценить показатели крови и данные миелограмм у больных ФЛ при разных стадиях заболевания, в зависимости от отсутствия или наличия поражения костного мозга.
2. Охарактеризовать морфологические типы опухолевого пула в костном мозге на основе подсчета лимфоцитограмм и провести корреляционный анализ иммунофенотипического профиля центроцитов и центробластов.

3. Изучить показатели периферической крови и миелограмм у больных с разным морфологическим типом лейкоемического пула.

4. Проанализировать показатели гемопоэза в зависимости от количественных параметров клеток микроокружения: Т-лимфоцитов и моноцитов.

5. Сопоставить данные исследования аспиратов костного мозга, трепанобиоптатов и пунктатов лимфатического узла для уточнения цитологического типа лимфомы.

Методы и методология

В исследование были включены 152 первичных пациента фолликулярной лимфомой. Диагноз устанавливался на основании классификации ВОЗ 2008 г с учетом морфологических, гистологических, иммуногистохимических и иммунофенотипических критериев.

В зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга все пациенты были разделены на три группы: I группа — без поражения костного мозга, II группа — поражение костного мозга только по трепанобиоптату, III группа — поражение костного мозга по трепанобиоптату и аспирату. Всем пациентам было проведено морфологическое исследование аспирата костного мозга, в большинстве случаев — гистологические и иммуногистохимическое (ИГХ) исследования лимфоузлов, трепанобиоптатов. При наличии опухолевого клона в аспирате проводилось иммунофенотипическое исследование костного мозга, при бластоидном типе опухолевых клеток проводилось цитохимическое исследование. Гистологическое и ИГХ исследование лимфоузлов и трепанобиоптатов костного мозга проводилось в патологоанатомическом отделении отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Морфологическое исследование аспиратов костного мозга у всех 152 пациентов и иммунофенотипическое исследование аспиратов костного мозга у 33 пациентов было проведено в лаборатории иммунологии гемопоэза централизованного клиничко-лабораторного отдела НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Взятие аспирата костного мозга (в объеме 0,5–1 мл.) проводилось в пробирки Vaktainer с сухим ЭДТА. В полученном материале подсчитывалось число миелокариоцитов, приготавливались мазки костного мозга и проводилось исследование иммунофенотипа лимфоидных клеток.

Препараты костного мозга были окрашены по методу Паппенгейма. Подсчет миелограммы проводился двумя врачами, по 250 клеток каждым (в каждом случае исследовалось 500 миелокариоцитов).

Количество миелокарицитов подсчитывалось на гематологическом анализаторе Micros 60. У 33 пациентов с наличием опухолевого поражения в аспирате костного мозга проводился подсчет лимфоцитограммы двумя независимыми экспертами по 100 клеток каждым. Было выделено три типа лимфоидных клеток: типичные лимфоциты, центроциты, центробласты.

Морфологические исследования элементов опухолевого клона в костном мозге включали изучение особенностей структуры хроматина ядер лимфоидных клеток с помощью компьютерной микроскопии. Исследование проводилось на обычных мазках аспиратов костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма. Были проанализированы препараты аспиратов пациентов с ФЛ и в качестве контроля мазки периферической крови доноров. Изображения клеток формировались с использованием цветовой модели RGB (Red, Green, Blue) на автоматизированном микроскопе Olympus BX43 со спектрально-анализирующей камерой Impers IPX-4MIST-GCFB.

Иммунофенотипическое исследование лимфоцитов костного мозга в аспирате проводилось при наличии опухолевого поражения в аспирате. Исследование проводилось на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson США) методом прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной метки для оценки коэкспрессии двух-трех антигенов на мембране одной клетки. Анализ данных проведен с помощью программы WinMDI. Панель моноклональных антител включала антитела к В-линейным антигенам (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, иммуноглобулины), Т-линейным антигенам (CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), нелинейным антигенам CD10, CD38, HLA-DR, общелейкоцитарному антигену CD45.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel и SPSS 17.0 for Windows.

Достоверность различий значений средних показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для параметров качественной оценки применялся точный критерий Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Научная новизна

Проведена комплексная морфо-иммунологическая оценка показателей крови и костного мозга больных ФЛ при разных стадиях заболевания, в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга. Изменение гемопоэза включало анемию и тромбоцитопению, гранулоцитопоз оставался в норме. Было установлено, что частота и глубина анемии и тромбоцитопении связана с величиной опухолевой нагрузки.

Впервые дана детальная характеристика лейкомиического клона в костном мозге на основании подсчета лимфоцитограммы. Определены особенности иммунофенотипического

профиля centroцитов и центробластов, выявлена более высокая экспрессия антигена CD38 на центробластах.

Проанализированы особенности гемопоэза больных в зависимости от состава опухолевого пула в костном мозге. Установлено, что угнетение гемопоэза не ассоциируется с типом лейкоэмических клеток. Показано, что лейкоэмизация в крови коррелирует с центроцитарным, но не с центробластным типом опухоли, что свидетельствует о различии в их функциональных особенностях. Выявлены случаи расхождения морфологической характеристики опухолевых клеток в аспирате костного мозга по сравнению с трепанобиоптатом и пунктатом лимфатического узла.

Практическая значимость

Исследования аспирата костного мозга являются необходимым условием для диагностики варианта опухоли, определения стадии заболевания, что влияет на прогноз у больных ФЛ. Использование компьютерной микроскопии позволяет объективизировать характеристику лимфоидных клеток костного мозга для уточнения диагноза.

Положения, выносимые на защиту

1. Показатели периферической крови позволяют выявить анемию у пациентов с ФЛ на всех стадиях заболевания, тромбоцитопению на продвинутых стадиях.
2. Степень и частота анемии и тромбоцитопении ассоциируются с величиной опухолевой нагрузки и с поражением костного мозга.
3. Показатели нейтрофильного ростка в периферической крови и костном мозге сохраняются в нормальных пределах практически у всех пациентов с ФЛ.
4. На основании результатов подсчета лимфоцитограмм в костном мозге выделяются три группы пациентов с центробластной, смешанной и центроцитарной характеристикой опухолевого пула.
5. Иммунный профиль опухолевых клеток различается в зависимости от морфологической характеристики: центробласты чаще экспрессируют антиген CD38, чем центроциты.
6. Лейкоэмизация опухолевых клеток в периферической крови ассоциируется с пролиферацией в костном мозге центроцитов, но не центробластов.
7. Компьютерная микроскопия может быть использована для детальной характеристики структуры хроматина ядер лимфоидных клеток, что позволяет уточнить дифференциальную диагностику ФЛ.
8. ФЛ отличается гетерогенностью морфологической характеристики опухолевых клеток в различных локализациях. У 10% пациентов констатированы расхождения в типе лимфомы:

центробластной или центроцитарной при сравнении данных аспирата костного мозга, трепанобиоптата костного мозга и пунктата лимфоузла.

Личный вклад

Автор самостоятельно провела тщательный анализ научной литературы, изучила степень разработанности проблемы, на основании чего были сформулированы цель и задачи исследования, самостоятельно анализировала индивидуальные карты пациентов, проводила морфологическое исследование аспиратов костного мозга и подсчет лимфоцитограмм у больных фолликулярной лимфомой, принимала участие в проведении иммунофенотипического исследования пунктатов костного мозга пациентов. Обработка, анализ и оценка результатов всех исследований, указанных в диссертации, проведены лично автором. Автором подготовлены полученные результаты к публикации.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.12 – онкология («Медицинские науки») и областям исследования: п. 2 «исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)» и п. 3 «разработка и совершенствование программ скрининга и ранней диагностики».

Внедрение результатов исследования

Морфологическое и иммунофенотипическое исследования аспирата костного мозга внедрены к применению в качестве необходимой диагностической процедуры у больных ФЛ в отделении химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Апробация

Диссертация апробирована и рекомендована к защите 16 ноября 2018 года на совместной научной конференции лаборатории иммунологии гемопоэза и лаборатории клинической иммунологии опухолей централизованного клинико-лабораторного отдела, патологоанатомического отделения отдела морфологической и молекулярно-генетической диагностики опухолей, отделения химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, кафедры онкологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

Объём и структура работы

Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста, содержит 9 рисунков, 28 таблиц и состоит из введения и 4 глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Заключения», выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы содержит 133 литературных источника, из них 16 отечественных и 117 зарубежных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 152 первичных пациента ФЛ, которые наблюдались, проходили обследование, получали лечение или рекомендации по его проведению на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с января 2006 по декабрь 2016г.

В зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга все пациенты были разделены на три группы:

I группа: без поражения костного мозга — 93 пациента (61,2%)

II группа: поражение костного мозга только по трепанобиоптату — 26 пациентов (17,1%)

III группа: поражение костного мозга по трепанобиоптату и аспирату — 33 пациента (21,7%)

Характеристика трех групп пациентов по полу, возрасту и стадиям опухолевого процесса представлена в табл. 1

Таблица 1 — Клинические характеристики больных ФЛ в зависимости от наличия поражения костного мозга

Группы	пол	Средний возраст M±m (min-max)	Старше 60лет (%)	Распределение пациентов по стадиям опухолевого процесса (%)
I группа	Муж 30 (32,3%) Жен 63 (67,7%)	56,8±1,1 (27–82)	35 (37,6)	1 — 15 (16,1) 2 — 29 (31,2) 3 — 23 (24,7) 4 — 26 (28)
II группа	Муж 8 (30,8%) Жен 18 (69,2%)	56,1±2,8 (26–84)	8 (30,8)	4 — 26 (100)
III группа	Муж 12 (36,4%) Жен 21 (63,6%)	55,4±2,2 (30–78)	13 (39,4)	4 — 26 (100)

Всем 152 пациентам было проведено морфологическое исследование аспирата костного мозга. В большинстве случаев — гистологические исследования лимфоузлов (92,7%), трепанобиоптатов (96,7%), ИГХ лимфоузлов и/или трепанобиоптатов. При наличии опухолевого клона в аспирате проводилось иммунофенотипическое исследование костного

мозга (21,7%), при бластоидном типе опухолевых клеток проводилось цитохимическое исследование (2%). Оно включало определение пероксидазы, липидов, неспецифической эстеразы, ингибируемой фторидом натрия, и PAS-реакцию. (табл.2)

Таблица 2 — Число проведенных исследований в трех группах больных ФЛ.

	I группа (%)	II группа (%)	III группа (%)	Количество исследований (%)
Число больных в группе	93 (61,2)	26 (17,1)	33 (21,7)	152
Гистологическое исследование лимфоузлов и ИГХ	93 (61,2)	26 (17,1)	22 (14,5)	141 (92,7)
трепанобиопсия	93 (61,2)	26 (17,1)	28 (18,4)	147 (96,7)
Морфологическое исследование аспирата костного мозга	93 (61,2)	26 (17,1)	33 (21,7)	152 (100)
Иммунофенотипическое исследование аспирата	0	0	33 (21,7)	33 (21,7)
Цитохимическое исследование аспирата костного мозга	0	0	3 (2)	3 (2)

Для оценки функционального состояния нейтрофилов и нормобластов костного мозга были рассчитаны и проанализированы их индексы созревания.

У 33 пациентов с наличием опухолевого поражения в аспирате костного мозга проводился подсчет лимфоцитогаммы двумя независимыми экспертами по 100 клеток каждым. Было выделено три типа лимфоидных клеток:

1. Типичные лимфоциты. К ним были отнесены клетки округлой формы, небольшого размера (менее 2 эритроцитов). Форма ядер в большинстве клеток была округлой. Структура хроматина неравномерная, глыбчатая. Цитоплазма светло-базофильная с перинуклеарной зоной.

2. Центроциты. К ним относили клетки мелких и средних размеров с угловатыми, вытянутыми, искривленными ядрами. В части ядер определялась расщелина (cleaved).

3. Центробласты. Крупные округлые или овальные клетки, иногда с вогнутым или многодольчатым ядром, везикулярным хроматином, 1 или 3 периферическими нуклеолами и узким ободком цитоплазмы.

Морфологические исследования элементов опухолевого клона в костном мозге были дополнены изучением особенностей структуры хроматина ядер лимфоидных клеток с помощью компьютерной микроскопии. Исследование проводилось на обычных мазках аспиратов костного мозга, окрашенных по методу Паппенгейма. Всего были проанализированы препараты

аспирагов 13 пациентов с ФЛ и в качестве контроля 14 мазков периферической крови доноров. Были рассчитаны для каждого случая средние показатели индексов Pmax и Pdisp

Анализ данных периферической крови включал определение содержания гемоглобина, числа эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов с подсчетом гемограммы, абсолютного количества нейтрофилов. Абсолютное количество лимфоцитов и моноцитов периферической крови вычислялось исходя из результатов подсчета гемограммы под микроскопом. Отношение лимфоциты/моноциты (Л/М) рассчитывалось путем деления абсолютного количества лимфоцитов на абсолютное количество моноцитов. В качестве неблагоприятного фактора при ФЛ рассматривается его уменьшение ниже 4,7.

Статистическая обработка материала и расчеты показателей проведены с использованием компьютерной программы электронных таблиц Microsoft Excel и SPSS 17.0 for Windows. Достоверность различий значений средних показателей оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Для параметров качественной оценки применялся точный критерий Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика кроветворения больных фолликулярной лимфомой на разных стадиях заболевания

Всего было обследовано 152 пациента, из них 1 стадия заболевания была установлена в 15 (9,9%) случаях, 2 — в 29 (19,1%), 3 — в 24 (15,8%), 4 — в 84 (55,3%).

При сравнительном анализе показателей периферической крови всех 152 больных было установлено что снижение уровня гемоглобина определялось в 47 (30,9%), количества эритроцитов в 10 (6,6%) случаях. Число тромбоцитов менее $150 \times 10^9/\text{л}$ было выявлено у 27 (17,8%) пациентов. Нейтропения наблюдалась редко, у 5 (3,3%) пациентов.

Частота снижения гемоглобина была достоверно выше у пациентов с продвинутой III и IV стадиями по сравнению с I и II. Тромбоцитопения обнаруживалась только в III и IV стадиях. Сочетание анемии и тромбоцитопении обнаруживалось соответственно только у больных с продвинутыми стадиями. (таблица 3)

Таблица 3 — Сравнение частоты снижения гемоглобина(Hb) и тромбоцитов в зависимости от стадии ФЛ

Стадии	Число больных со сниженным Hb/ общее число больных (%)	Число больных с тромбоцитопенией/ общее число больных (%)	Число больных с сочетанной анемией и тромбоцитопенией/ Общее число больных (%)
I и II	7/45 (15,5)	0/45	0/45
III и IV	40/107 (37,4)	25/107 (23,5)	12/107(11,2)
	$p = 0,004$		

Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от наличия или отсутствия поражения костного мозга

У больных ФЛ с лимфоидной инфильтрацией костного мозга (III группа) уровень Hb и число тромбоцитов были достоверно ниже, чем у остальных пациентов. (таблица 4)

Таблица 4 — Показатели крови у больных ФЛ с/без поражения костного мозга

Группа	Число больных	Hb г/л M±m (min-max)	Эритроциты 10 ¹² /л M±m (min-max)	Тромбоциты 10 ⁹ /л M±m (min-max)	Нейтро- филы 10 ⁹ /л M±m (min-max)
I	93	133,7±1,8 (82-176)	4,6±0,6 (2,8-5,7)	242,9±8,6 (95-485)	4,6±0,3 (0,4-18,9)
II	26	130,8±3,3 (97-163)	4,5±0,1 (3,5-5,5)	191,9±12,5 (99-295)	3,9±0,3 (1,8-8,7)
III	33	125,3±4,1 (68-170)	4,4±0,13 (1,9-5,4)	187,9±17,5 (81-561)	4,6±0,3 (2,2-10,8)
p* (I и II группы)		0,451	0,312	0,005	0,285
p**(I и III группы)		0,034	0,075	0,003	0,958
p***(II и III группы)		0,325	0,611	0,859	0,218

Такая же зависимость была обнаружена при анализе частоты анемии и тромбоцитопении больных трех групп (табл. 5).

Таблица 5 — Частота снижения Hb, эритроцитов и тромбоцитов у больных ФЛ с/без поражения костного мозга

Группа	Число больных	Число больных со сниженным Hb (%)	Число больных со сниженными эритроцитами (%)	Число больных со сниженными тромбоцитами (%)
I	93	18 (19,3)	3 (3,2)	7 (7,5)
II	26	7 (26,9)	3 (11,5)	7(26,9)
III	33	9 (27,2)	4 (12)	13 (39,4)
p*(I и II группы)		0,768	0,455	0,015
p**(I и III группы)		0,032	0,332	0,000
p***(II и III группы)		0,325	0,919	0,373

В III группе с поражением костного мозга по аспирату и трепанобиоптату число пациентов со сниженными показателями Hb и тромбоцитов было достоверно больше, чем в I группе без поражения.

Процентная доля моноцитов в гемограмме периферической крови не различалась достоверно между тремя группами, однако показатели абсолютного числа моноцитов и его частоты были достоверно выше в III группе. (таблица 6)

Таблица 6 — Число моноцитов (абсолютное и процентное) в крови у больных ФЛ с/без поражения костного мозга.

Группа	Число больных	% моноцитов в ПК M±m (min-max)	Абсолютное значение моноцитов в ПК M±m (min-max)	Количество больных с моноцитозом более $0,8 \times 10^9$ /л/общее число больных (%)
I	55	7,9±0,7 (1–32)	0,54±0,09 (0,05–4,8)	5/55 (9,1)
II	15	7,8±1,1 (2–17)	0,44±0,06 (0,08–0,87)	2/15 (13,3)
III	27	6±0,8 (1–17)	0,7±0,08 (0,19–2,07)	7/27 (25,9)
p* I и II p** I и III p*** II и III		p* 0,924 p** 0,103 p*** 0,176	p* 0,545 p** 0,236 p*** 0,03	p* 0,627 p** 0,043 p*** 0,341

ПК — периферическая кровь

Определение индекса лимфоциты/моноциты было проведено у всех пациентов за исключением 15 случаев III группы с лимфоцитозом в крови более 4000×10^9 /л., обусловленным опухолевыми лимфоидными клетками. (табл.7)

Таблица 7 — Сравнение индекса Л/М у больных с/без поражения костного мозга.

Группа	Число больных	Индекс Л/М M±m (min-max)	Число больных с индексом Л/М < 4,7 (%)
I	55	4,8±0,5 (0,6-23)	33 (60)
II	15	3,9±0,6 (0,8-10)	11 (73,3)
III	13	3,8±0,4 (0,6-6)	11 (84,6)
		p (I и II) 0,375 p (I и III) 0,000 p (II и III) 0,034	p (I и II) 0,343 p (I и III) 0,100 p (II и III) 0,043

Как видно из данных таблицы 7, средние показатели индекса Л/М были сниженными во всех группах у большинства пациентов 55/83 (66%). Частота снижения индекса Л/М нарастала от I группы к III, причем в III она была достоверно выше, чем в двух остальных.

На следующем этапе анализа проводилось сопоставление данных исследования аспиринов костного мозга у больных анализируемых трех групп. Были рассчитаны в среднем по группе показатели количества миелокариоцитов, сумма клеток гранулоцитарного ряда и индекс их созревания, сумма клеток красного ряда и их индекс созревания, доля лимфоидного пула, а также лейкоэритробластическое отношение. (табл.8)

Таблица 8 — Показатели миелограмм больных ФЛ без поражения костного мозга (I группа), с поражением по трепанобиоптату (II группа) и с поражением по трепанобиоптату и аспирату (III группа).

	Группа I (93 б-х) M±m (min-max)	Группа II (26 б-х) M±m (min-max)	Группа III (33 б-х) M±m (min-max)	p	Нормы min-max
Миелокариоциты×10 ⁹ /л	79,7±6,2 (25–394)	96,9±10,8 (24–225)	133,2±20,4 (14–462)	p* 0,184 p** 0,058 p*** 0,516	41,6–195,0
Сумма клеток гранулоцитарного ряда %	61,2±0,7 (42–76,6)	61,3±2,01 (35–75,2)	36,9±2,7 (4,6–65)	p* 0,508 p** 0,000 p*** 0,000	52,7–68,9
Индекс созревания гранулоцитов	0,45±0,02 (0,1–1,8)	0,6±0,1 (0,2–3,2)	0,46±0,05 (0,1–1,4)	p* 0,128 p** 0,119 p*** 0,029	0,5–0,9
Сумма клеток эритроидного ряда %	21,8±0,8 (8,2–41)	24,6±2,1 (9,8–55,4)	10,4±0,9 (0,3–24)	p* 0,308 p** 0,000 p*** 0,000	14,5–26,5
Индекс созревания нормобластов	0,93±0,004 (0,7–1)	0,94±0,01 (0,85–1)	0,96±0,01 (0,82–1)	p* 0,513 p** 0,129 p*** 0,082	0,8–0,9
Лимфоидный пул %	12,1±0,45 (2,2–29,2)	9,7±0,58 (5–16,8)	47,7±3,3 (19,4–92,2)	p* 0,01 p** 0,000 p*** 0,000	4,3–13,7
Лейко-эритрономбластическое отношение	3,3±0,16 (1–8,9)	3,1±0,32 (0,6–7,7)	5,7±1,1 (1,6–31,7)	p* 0,611 p** 0,022 p*** 0,032	2,1–4,5

p* I и II группы

p** I и III группы

p*** II и III группы

Сравнение результатов анализа пациентов I и II групп показало, что количество миелокариоцитов было нормальным и существенно не различалось между собой. Количество клеток гранулоцитарного ряда, индекс созревания гранулоцитов, среднее содержание клеток красного ряда было нормальным в обеих группах. Однако наблюдалось увеличение индекса созревания нормобластов в обеих группах. Увеличение индекса нормобластов определялось в большинстве случаев в I и II групп (86% и 77% пациентов соответственно). Доля лимфоидных элементов практически у всех больных I и II групп была нормальной.

Следует заключить, что проведенный анализ не выявил каких-либо особых изменений в составе аспирата костного мозга пациентов II группы по сравнению с I, несмотря на то, что по данным трепанобиопсии у них было выявлено лимфомное поражение костного мозга.

У больных III группы была установлена более высокая клеточность, чем в предыдущих двух группах, а по сравнению с I эти различия были близки к достоверным. Значительные отличия определялись в составе миелограммы. Повышение количества миелокариоцитов было обусловлено значительным увеличением числа клеток лимфоидного ряда в аспирате за счет пролиферации неопластических лимфоидных форм: centroцитов и centroбластов.

Содержание гранулоцитов и нормобластов в миелограмме в этой группе было достоверно ниже, чем в двух других. Однако снижение доли гранулоцитов и нормобластов в аспиратах было относительным, так как клеточность аспиратов была увеличена.

Лейкоэритробластический индекс у большинства пациентов был в пределах нормы (2,1–5,5).

Индекс созревания нормобластов в среднем у больных III группы был повышен. Частота повышения индекса составила 87,9% и была близка к показателям других групп. Повышение индекса созревания клеток красного ряда в костном мозге коррелирует со снижением показателя уровня Hb в крови. Патогенез этих процессов связан с нарушением синтеза Hb в клетках предшественниках красного ряда. Снижение гемоглобина вызывает снижение насыщенности кислородом тканей, что в свою очередь приводит к компенсаторному увеличению секреции эритропоэтина в почках и усилению пролиферации нормобластов в костном мозге. В результате наблюдается повышение индекса созревания нормобластов.

Состав миелограммы пациентов III группы с лейкемизацией и без нее был сходным.

Характеристика кроветворения больных ФЛ в зависимости от варианта лейкемического пула в аспирате костного мозга

Было выделено три морфологических варианта лейкемического пула на основании количества centroбластов. Один из них был обозначен А — с числом centroбластов более 30%. В него вошли 5 пациентов. Другой вариант В — с числом centroбластов от 1 до 29%, 19 больных. Третий С — только с centroцитами, включал 9 наблюдений. (рис 1)

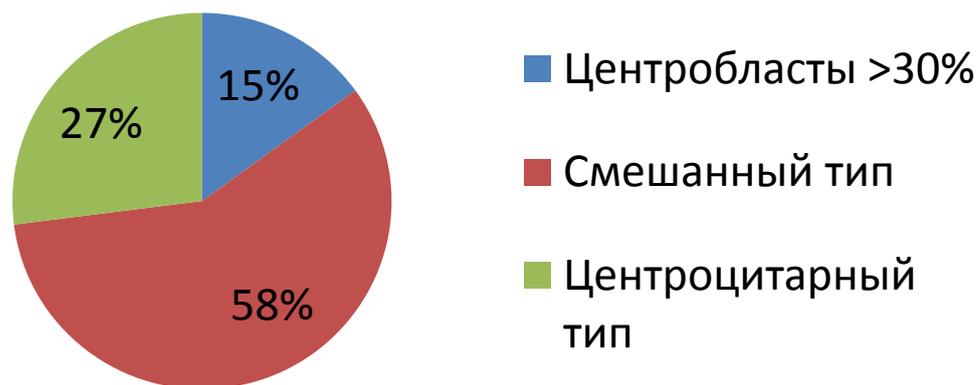


Рисунок 1 — Соотношение числа пациентов с разным цитологическим типом ФЛ

Показатели антигенов в среднем по группе на лимфоидных клетках у больных с разным соотношением центробластов и centroцитов представлено в табл.9.

Таблица 9 — Иммунный профиль опухолевых клеток у больных с разным составом лейкоцитарного пула.

Группы	CD10 M±m (min-max)	CD19+CD23+ M±m (min-max)	CD38 M±m (min-max)	HLA-DR M±m (min-max)
A n=5	29,9±18,7 (0,2-99)	46,3±19,9 (0,2-94,1)	62,1±19,1 (8,5-99)	72,7±8,4 (53,6-91,9)
B n=17	32,2±7,9 (0-87,8)	50,7±7,9 (1,6-99,8)	24,2±6,4 (0,5-91,2)	69,6±6,9 (21,4-95,8)
C n=9	33,1±12,3 (1,4-90)	36,4±9,2 (3,8-91,7)	15,5±3,8 (3,3-34,5)	74,3±6,2 (40,3-96,8)
	p (A:B)=0,9 p (A:C)=0,883 p (B:C)=0,946	p (A:B)=0,809 p (A:C)=0,614 p (B:C)=0,274	p (A:B)= 0,024 p (A:C)= 0,053 p (B:C)=0,371	p (A:B)=0,805 p (A:C)=0,878 p (B:C)=0,634

Средние показатели экспрессии антигенов CD10, CD23 и HLA-DR не различались при разном составе лейкоцитарного пула. Значение CD38 в группе А было достоверно выше, чем в В и С

Частота экспрессии антигенов в исследуемых группах представлена в табл.10.

Таблица 10 — Сравнение больных с разными вариантами опухолевого пула в костном мозге по частоте антиген позитивных случаев.

Группа	Число CD20+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD19+CD23+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число HLA-DR+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD38+ случаев/ общее количество пациентов (%)	Число CD10+ случаев/ общее количество пациентов (%)
A	4/5 (80)	3/5(60)	5/5(100)	4/5(80)	2/5(40)
B	17/18(94,4)	13/17(76,5)	12/12(100)	8/18(44,4)	9/17(52,9)
C	9/9(100)	6/9(66,7)	9/9(100)	2/9(22,2)	4/9(44,4)

Частота CD38+ случаев в группе А(80%) была несколько выше, чем в В (44,4%) и достоверно выше, чем в С (22,2%) ($p = 0,036$). Частота остальных маркеров была одинаковой.

Таким образом, центробласты и centroциты в целом имеют сходный иммунофенотипический профиль, отличие отмечается только в более высокой и частой экспрессии CD38 на центробластах.

Сравнение показателей периферической крови не выявило существенных различий в уровне Hb, количестве эритроцитов и тромбоцитов у пациентов с разной характеристикой опухолевых клеток, что может быть связано с малой выборкой. При анализе количества лимфоцитов в периферической крови было выявлено существенное различие в числе клеток лимфоидного пула (лимфоцитов, centroцитов и центробластов) в абсолютных показателях (табл.11).

Таблица 11 — Сравнение числа лимфоидных клеток в крови у больных с разными вариантами лимфоидного пула в костном мозге.

Группа	Число больных	Число лимфоидных клеток в крови (абсолютное значение) M±m (min-max)	Число лимфоидных клеток в крови (%) M±m (min-max)
А	5	1,85±0,2 (1,5-2,40)	30,5±5,5 (16-43)
В	19	10,3±3,3 (0,52-41,6)	50,8±5,4 (27-88)
С	9	29,2±12 (1,5-85,1)	68,2±11,6 (8-96)
p (А:В)		0,255	0,089
p (А:С)		0,052	0,053
p (В:С)		0.218	0.131

У больных в группе А число лимфоцитов в крови не превышает нормальных показателей, в то время как в остальных двух группах количество лимфоидных элементов повышено за счет наличия лейкоэмических лимфоидных форм. Различия показателей группы С по сравнению с А были близки к достоверным в абсолютных и относительных показателях ($p=0,052$ и $p=0,053$).

Лейкемизация определялась у большинства больных с centroцитарным составом пула, у 1/3 больных со смешанным составом и отсутствовала у больных с центробластами. (табл 12)

Таблица 12 — Частота лимфоцитоза в крови больных с разным составом опухолевого пула костного мозга

Группа	Число больных	Число больных с лимфоцитозом
А	5	0
В	19	6 (31,6%)
С	9	6 (66,6%)

Таким образом, частота лейкомизации ассоциировалась с центроцитарным составом лейкомического пула в костном мозге.

Анализ показателей гранулоцитарного, нормобластного и лимфоидного ростков по данным аспирата костного мозга не выявил достоверных различий между больными трех анализируемых групп. (таблица 13)

Таблица 13 — Сравнение показателей миелограмм у больных с разными вариантами опухолевого пула.

Группа	n	Клеточность $\times 10^9/\text{л}$ M \pm m (min-max)	Гранулоциты (%). M \pm m (min-max)	Лимфоидные клетки (%) M \pm m (min-max)	Нормобласты (%) M \pm m (min-max)
А	5	96,4 \pm 33,2 (30–212)	28,3 \pm 7,6 (4,6–47,4)	48,4 \pm 13,2 (19,4–92,2)	10,9 \pm 3,2 (0,3–17,)
В	19	117 \pm 20,5 (15–325)	38,2 \pm 2,9 (21,4–62,2)	46,3 \pm 3,4 (24,6–71,2)	11,4 \pm 1,2 (2,6–24)
С	9	192,7 \pm 59,1 (14–462)	39,1 \pm 6,7 (16–65)	50,4 \pm 7,2 (20–78)	7,9 \pm 1,5 (2–15,8)
p (А:В)		0,635	0,162	0,819	0,736
p (А:С)		0,255	0,330	0,890	0,238
p (В:С)		0,138	0,894	0,564	0,259

Частота случаев снижения гранулоцитов и нормобластов также не различалась существенно.

Сравнение морфологических показателей лейкомического пула в аспирате костного мозга, в трепанобиоптате и в пунктате лимфоузла

Было проведено сравнение оценки цитологической степени ФЛ по данным аспиратов, трепанатов и биопсии лимфоузла. Для этого случаи с 1, 1–2 и 2 цитологическим типом лимфомы были объединены в одну группу, а с 2–3 и 3 типом — в другую. (табл.14).

Таблица 14 — Сравнение цитологических типов лейкомиического пула в аспирате с трепанатом и лимфоузлом.

группы	общее число больных	трепан		лимфоузел	
		совпадение	расхождение	совпадение	расхождение
I	26	17/18 (94%)	1/18 (6%)	17/18 (94%)	1/18 (6%)
II	7	4/6 (67%)	2/6(33%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)

Расхождение в составе лейкомиического пула было обнаружено у одного больного. В аспирате костного мозга определялись только centroциты, в то время как в трепанате и в лимфоузле была установлена 3 цитологическая степень ФЛ.

Во II группе с выраженной бластной метаплазией костного мозга 3 цитологическая степень в трепанате определялась у 4 из 6 больных, а в лимфоузле у 3 из 4. У остальных пациентов преобладала centroцитарная метаплазия. Таким образом, у части пациентов картина лимфоидной инфильтрации была более продвинутой к бластной фазе.

Представленные данные позволяют констатировать различия в морфологической картине в различных опухолевых очагах при ФЛ. В аспирате костного мозга соотношение centroцитов и centroбластов может существенно отличаться от характеристики лейкомиического пула в трепанобиоптате и в аспирате лимфоузла.

Характеристика лимфоидных клеток лейкомиического пула с помощью метода компьютерной микроскопии

Было проведено сравнительное исследование особенностей пространственно-яркостной характеристики структуры хроматина ядер нормальных лимфоцитов крови (14 доноров) и лейкомиических лимфоидных элементов костного мозга (13 больных ФЛ) с помощью спектрозональной камеры. Оценка структуры хроматина проводилась на основании подсчета специальных индексов P_{max} и P_{disp} в нормальных лимфоцитах и опухолевых лимфоидных клетках.

Число измеренных клеток у доноров колебалось от 22 до 140. Показатели лимфоцитов крови доноров P_{max} колебались от 25,9 до 36,6, а P_{disp} от 11,6 до 16,8. Средние значения индексов по группе составили $30,1 \pm 0,9$ и $14,1 \pm 0,4$ соответственно.

Число исследованных лимфоидных клеток у разных больных колебалось от 39 до 376. Разброс значения индекса P_{max} составил от 23,6 до 38,4, P_{disp} — от 15,1 до 22,8. В среднем по группе значения индекса P_{max} составили $28,2 \pm 1,1$, а P_{disp} — $19,3 \pm 0,8$.

При сравнении показателей P_{max} и P_{disp} нормальных лимфоцитов и лимфоидных клеток больных ФЛ были установлены определенные различия (табл 15). Средние значения индекса P_{Max} близки в обеих группах, в то время как показатели P_{Disp} различаются достоверно ($p = 0,05$).

Таблица 15 — Сравнение средних показателей характеристики P_{Disp} и P_{Max} лимфоцитов и лимфоидных клеток.

Группа	Число наблюдений	P_{Max}	P_{Disp}
Доноры	14	$30,1 \pm 0,9$	$14,1 \pm 0,4$
Больные ФЛ	13	$28,2 \pm 1,1$	$19,3 \pm 0,8$
p		0,2	0,05

Графическое изображение распределения лимфоцитов крови доноров (D) и лейкемических лимфоидных элементов больных ФЛ (FL) в зависимости от индексов P_{Disp} и P_{Max} представлено на рис 2.

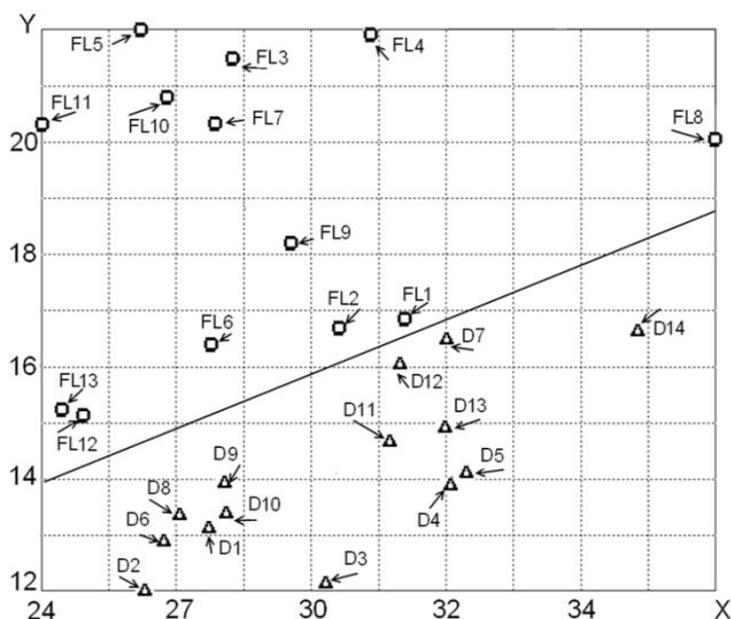


Рисунок 2 — Распределение лимфоидных клеток и лимфоцитов в двумерном пространстве признаков. По координатным осям отложены признаки: по оси абсцисс характеристика $X = P_{Max}$, по оси ординат $Y = P_{Disp}$.

Таким образом, использование компьютерной микроскопии дало возможность установить численные критерии, с помощью которых выявляются различия в структуре хроматина ядер нормальных и лейкемических лимфоцитов. Полученные данные свидетельствуют о применимости метода оценки изображений клеток с помощью оптической микроскопии и спектральной камеры для дифференциальной диагностики типов лимфоидных клеток.

Влияние микроокружения на кроветворение

Снижение T- клеток в аспирате костного мозга наблюдалось у большинства больных ФЛ: CD3+ отмечалось в 23 (69,7%) случаях, CD7+ — в 18 (54,5%), CD4+ — в 20 (60,9%), CD8+ — в 20 (60,6%).

Было проведено исследование количества Т-клеток, экспрессирующих антигены CD3, CD7, CD4 и CD8 у больных ФЛ с разным составом лейкомиического пула (группы А, В, С). Число Т-лимфоцитов с разным фенотипом в анализируемых группах было сходным, т.е. не зависело от морфологического состава лейкомиического пула. (табл. 16)

Таблица 16 — Показатели экспрессии Т-клеточных антигенов у больных ФЛ с различным составом лейкомиического пула

Антиген	Пределы колебаний в норме	Группа А n=5 M±m (min-max)	Группа В n=19 M±m (min-max)	Группа С n=9 M±m (min-max)	
CD3	21–51	16,1±6,4 (3,1-36,2)	19,4±3,4 (3,7-56,9)	11,03±2,3 (2-22.10)	p (A:B)=0.659 p (A:C)=0.381 p (B:C)=0.113
CD7	17–31	13,9±4,1 (2,2-21,3)	19,1±4,3 (2,3-56,8)	12.6±2 (6.1-22)	p (A:B)=0.542 p (A:C)=0.754 p (B:C)=0.281
CD4	14–30	10,4±4,1 (1,3-19)	11,8±2,9 (1,5-37,6)	5.7±0.9 (2.9-10.2)	p (A:B)=0.813 p (A:C)=0.155 p (B:C)=0.154
CD8	11–28	9,2±4,3 (1,7-21,6)	9,7±2,1 (1,6-29,4)	7.4±1.6 (0.7-13.9)	p (A:B)=0.912 p (A:C)=0.639 p (B:C)=0.468

Из литературных данных известно, что уменьшение числа Т-лимфоцитов и, в частности, CD4+ , является неблагоприятным прогностическим фактором. В связи с этим было проведено сопоставление частоты снижения числа Т-лимфоцитов у больных исследуемых групп. (табл.17)

Таблица 17 — Число больных со снижением CD3+, CD7+, CD4+ и CD8+лимфоцитов.

Антиген	Группа А число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	Группа В число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	Группа С число случаев со ↓ экспрессией антигена/общее число пациентов (%)	
CD3 <21	3/5(60)	12/18(66,7)	8/9(89)	p (A:B)=0.782 p (A:C)=0.207 p (B:C)=0.214
CD7 <17	3/4 (75)	9/14 (64,3)	6/8(75)	p (A:B)=0.688 p (A:C)=1.000 p (B:C)=0.604
CD4 <14	2/4(50)	10/15(66,7)	8/9(89)	p (A:B)=0.539 p (A:C)=0.028 p (B:C)=0.065
CD8 <11	3/4 (75)	11/15(73,3)	6/8(75)	p (A:B)=0.946 p (A:C)=1.000 p (B:C)=0.931

Снижение Т-клеток всех типов наблюдалось у большинства больных во всех группах. У больных с центробластным составом лейкомиического пула (А) снижение CD4+ наблюдалось существенно реже, чем при centroцитарном (С). Однако небольшое число наблюдений делает этот вывод недостаточно убедительным.

Для того, чтобы выяснить вопрос о возможном влиянии клеток микроокружения на кроветворение пациентов было проведено изучение показателей периферической крови больных с нормальным и сниженным количеством Т-лимфоцитов. В большинстве случаев зависимость показателей крови от наличия или отсутствия снижения Т-лимфоцитов отсутствовала. Исключение составил показатель гемоглобина. Его значение было достоверно ниже при нормальном числе CD7+ ($P = 0,027$), в частности CD4+ ($p = 0,055$) Т-лимфоцитов по сравнению со сниженными. Взаимосвязь между числом моноцитов в крови и параметрами Т-лимфоцитов отсутствовала.

ВЫВОДЫ

1. Анемия при ФЛ (30,9% пациентов) наблюдается при всех стадиях заболевания. Частота анемии закономерно повышается с увеличением опухолевой нагрузки, достоверно ассоциируется ($p = 0,032$) с лимфомным поражением костного мозга.

2. Тромбоцитопения (17,8% пациентов) выявляется при продвинутых (III и IV) стадиях, ее частота достоверно ($p = 0,000$) увеличивается при лимфомном поражении костного мозга.

3. Показатели нейтрофилов периферической крови у большинства пациентов (93%) колеблются в пределах нормы.

4. Моноцитоз в периферической крови (16% случаев) обнаруживается при всех стадиях ФЛ, при поражении костного мозга достоверно чаще ($p = 0,043$). Снижение индекса соотношения лимфоциты/моноциты ниже 4,7 констатировано у большинства (66%) больных ФЛ.

5. Лейкемические лимфоидные клетки в периферической крови наблюдаются при поражении костного мозга (9,3% пациентов).

6. На основании состава лимфоцитограмм лейкомиического клона костного мозга больные ФЛ делятся на 3 группы: центробластную (15%), смешанную (58%) и centroцитарную (27%).

7. Иммунологический профиль центробластов отличается от centroцитов достоверно более частой ($p = 0,036$) экспрессией антигена CD38. Частота экспрессии CD19, CD20, CD10 и HLA-DR антигенов в разных группах не различалась.

8. Показатели периферической крови: Hb, эритроциты, тромбоциты, нейтрофилы и моноциты, а также данные миелограмм не были взаимосвязаны с типом опухолевых элементов,

с числом клеток микроокружения. Лимфоцитоз крови ассоциировался с centroцитарным характером опухоли.

9. Применение методов математического анализа структуры хроматина ядер лимфоидных клеток при ФЛ с помощью компьютерной микроскопии объективизирует результаты морфологического исследования и расширяет современные диагностические возможности.

10. Сопоставление результатов исследования аспиратов костного мозга, трепанобиоптатов и пунктатов лимфоузла позволяет выявить различия в составе опухоли в разных областях поражения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании проведенного исследования выработаны следующие практические рекомендации:

1. Результаты анализа периферической крови: уровень Нб, число моноцитов и тромбоцитов, индекс соотношения лимфоцитов/моноцитов необходимо использовать для уточнения степени опухолевой нагрузки у больного ФЛ.

2. Обследование больных ФЛ в обязательном порядке должно включать аспират и трепанобиопсию костного мозга. При лимфомном поражении костного мозга в аспирате наряду с морфологическим необходимо проведение иммунофенотипического исследования лимфоидных клеток.

3. Анализ особенностей лейкоцитарного пула в костном мозге должен включать количественную оценку соотношения цитологических типов лимфоидных клеток: центробластов и centroцитов.

4. При исследовании иммунофенотипического профиля опухолевых клеток костного мозга наряду со специфическими В-антигенами требуется определение прогностически значимого антигена CD38

5. При диагностике ФЛ необходимо использовать комплекс морфоиммунологических данных пунктатов и трепанобиоптатов костного мозга и пунктатов лимфоузла.

6. Требуется внедрение высокотехнологичных методов компьютерной микроскопии изучения структуры хроматина ядер лимфоидных клеток для объективизации диагностики и дифференциальной диагностики ФЛ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Володина О.М. Утрата экспрессии CD20 при фолликулярной лимфоме после программной противоопухолевой терапии, включающей ритуксимаб: данные литературы и собственное наблюдение. / Н.А. Купрышина, Н.А. Фалалеева, В.А. Доронин, А.В. Моженкова, М.А. Френкель, Е.Н. Сорокин, Н.В. Кокосадзе, Н.Н. Тупицын, Г.С. Тумян, Е.А. Османов // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. — 2017. — № 2. Т. 10. — С. 176-181.
2. Mozhenkova, A. V. Computer microscopy in lymphoma diagnostics / N. N. Tupitsin, M.A. Frenkel, N.A. Falaleeva, V.G. Nikitaev, E.V. Polyakov, Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, — 2017. – Т. 798. — №. 1. — С. 012126.
3. Колбацкая О.П. Иммунологические аспекты поражения костного мозга при фолликулярной лимфоме./ Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, Н.А. Купрышина, А.И. Павловская// Российский биотерапевтический журнал — 2016. — №4. Т.15.—С. 110-116
4. Фалалеева Н.А. Особенности эритропоза больных фолликулярной лимфомой./ А.В. Моженкова, Е.А. Османов, Н.В. Кокосадзе, Н.Н. Тупицын.// Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.— 2016.—№ 3.—С.35-38
5. Тупицын Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы./ Н.А. Фалалеева, А.В. Моженкова, А.И. Павловская // Российский биотерапевтический журнал .— 2016.—№ 3.—С.95-98.