

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский университет)**

На правах рукописи

ЦЗЯО ЧЭН

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

14.01.12 – онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Зейналова Первин Айдыновна

Москва – 2019 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
ГЛАВА 3. ЗНАЧЕНИЕ КРИТЕРИЕВ МЕЖДУНАРОДНОГО ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ИНДЕКСА НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДВКЛ.....	26
ГЛАВА 4. К ДАЛЬНЕЙШЕМУ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОК ЭРИТРОИДНОГО РОСТКА В КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ ДВКЛ.....	41
4.1. Проточно-цитометрическая характеристика дифференцировки клеток эритроидного ряда.....	44
ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ МРБ ПРИ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ.....	81
5.1. Возможности многоцветной проточной цитометрии в диагностике минимального поражения костного мозга при диффузной в-крупноклеточной лимфоме.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

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 [77, 78], которая пришла на смену классификации ВОЗ 2008 года.

ДВКЛ относится к разряду излечимых лимфом, однако, это достигается не более чем у 70% больных [41]. 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 минимальные поражения 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

гемопоза 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 внеодальных зон, повышенных уровней ЛДГ, ECOG), а также адаптированного к возрасту МПИ (авМПИ).
2. Изучить особенности эритропоза при ДВКЛ и их прогностическую значимость.
3. Оценить возможности иммунологической проточно-цитометрической характеристики эритропоза 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 присутствующего пула 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 клиничко-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 клиничко-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

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.

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 эритроблостограммы.

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.

Степень достоверности и апробация результатов

Апробация результатов работы состоялась 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 гемопоза централизованного клинико-лабораторного отдела, патологоанатомического отделения отдела

патологической анатомии опухолей человека, отделения химиотерапии гемобластозов отдела химиотерапии НИИ ДОиГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) является одной из главных проблем онкогематологии. Это самый частый вариант агрессивных лимфом у взрослых, составляет 25-30% неходжкинских лимфом. В основе диагностики ДВКЛ лежит гистопатологическая классификация ВОЗ 2017 года [80], которая пришла на смену классификации ВОЗ 2008 года. Сравнительная оценка этих классификаций дана в целом ряде работ [79, 81].

ДВКЛ относится к разряду излечимых лимфом, однако, это достигается не более чем у 70% больных [41]. Предсказание течения болезни, возможности развития резистентности к терапии, рецидивов и прочих неблагоприятных исходов – это главные направления совершенствования диагностики ДВКЛ. Здесь важную роль, наряду с международным прогностическим индексом (МПИ), играют молекулярные, иммунологические и генетические факторы [43, 73].

Как при всякой излечимой лимфоме на первое место в предикции исхода выходит степень полноты эрадикации опухоли. Это понятие прочно заняло лидирующие позиции при ряде периферических В-клеточных лимфом, например, при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Остаточная опухоль, определяемая после эффективного лечения, получила название минимальной остаточной болезни (МОБ). Основные методы определения МОБ – молекулярно-генетический и иммунологический. Следует отметить, что наиболее эффективным является определение МОБ при злокачественных опухолях В-линии, протекающих с лейкоэмическим компонентом. Помимо ХЛЛ сюда относятся острый лимфобластный лейкоз и множественная миелома. В этих случаях диагностика МОБ осуществляется при изучении клеток костного мозга, реже – крови. Поскольку при ДВКЛ явное, морфологически устанавливаемое вовлечение крови и костного мозга является нечастым явлением, то, соответственно, и подходы к диагностике МОБ при данном заболевании разработаны в меньшей степени.

Обычно диагностика МОБ проводится на основании aberrантного иммунофенотипа злокачественных опухолевых клеток. Именно такой подход

реализуется при В-ХЛЛ, острых лейкозах и множественной миеломе. Аберрантность иммунофенотипа ДВКЛ – это вопрос открытый, и многое здесь еще предстоит изучить. А пока, в настоящее время главным методом диагностики МОБ является генетический в двух главных направлениях – определение специфических для данного заболевания реаранжировок генов иммуноглобулинов и определение специфичных для конкретного случая соматических мутаций.

Интересным направлением совершенствования диагностических исследований при ДВКЛ является изучение гемопоэза. Речь не идет об установлении поражения костного мозга, что само по себе чрезвычайно информативно и прогностически значимо. В этом вопросе уже достигнут определенный консенсус. Доказано, что при выявлении поражения костного мозга методом ПЭТ (позитронной эмиссионной томографии) пункцию или трепанобиопсию костного мозга можно не делать. В то же время выявление небольшого поражения (менее 10%) возможно лишь при морфологическом исследовании костного мозга гистологическим (трепанобиопсия) или цитологическим (миелограмма) методами. Конкордантность поражения (неблагоприятный признак [53]) также можно установить только морфологически. Однако в данном обзоре, говоря об исследовании костного мозга, мы хотели бы сосредоточиться не на этих моментах, а на характеристике собственно гемопоэза, то есть на особенностях гранулоцитарного, эритроидного и других ростков в условиях опухолевого роста, в конкретном случае – при ДВКЛ.

Это главные разделы данного обзора литературы, а клинические и морфологические данные будут представлены в меньшей степени, так как подробно освещались ранее [71].

Начнем с минимальной остаточной болезни. Как мы уже отметили, из числа периферических В-клеточных лимфом этот вопрос наиболее детально разработан при В-ХЛЛ. Причем стандарты исследования МРБ при В-ХЛЛ установлены сравнительно недавно, всего лишь 11 лет назад [70]. При исследовании клеток В-

ХЛЛ в сравнении с В-лимфоцитами крови и костного мозга здоровых лиц с использованием широкой панели моноклональных антител (более 50) и надежных контролей А. Rawstron и коллеги (консорциум ERIC – European Research Initiative in CLL), показали, что злокачественные клетки имеют совершенно уникальный иммунофенотип. Причем речь не шла о качественных особенностях антигенного состава клеток В-ХЛЛ в отличие от нормы. Особенности состояли в количественных различиях, то есть уровнях экспрессии отдельных антигенов клеток В-ХЛЛ в сравнении с нормальными В-лимфоцитами. Интересно отметить, что авторы сочли возможным строить иммунодиагностику МОБ даже не на основании специфического иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов В-ХЛЛ – CD19+CD5+CD23+. Оказалось, что экспрессия CD23 не позволяет дискриминировать опухолевые лимфоциты от нормальных. Вместе с тем, уровни экспрессии антигенов CD20, CD79b, CD22, наряду с CD43 и CD38 давали возможность четко выявлять даже самые минимальные количества лимфоцитов В-ХЛЛ среди В-клеток крови и костного мозга. В качестве стандарта принят пороговый уровень в 0,01%, то есть наличие 1 клетки среди 10 000 нормальных лейкоцитов крови или миелокариоцитов костного мозга. Более высокое содержание клеток В-ХЛЛ свидетельствует о наличии у больного МОБ, то есть о неэффективности проведенной химиотерапии или химиоиммунотерапии.

Разумеется, при ДВКЛ отсутствуют сведения о различиях в уровнях экспрессии злокачественных клеток данного заболевания от нормы, и критерии диагностики МОБ или минимального вовлечения костного мозга (крови) при диагностике пока не разработаны.

Подобные попытки при ДВКЛ были, но они не увенчались успехом. И определение минимальных уровней содержания злокачественных клеток в крови или костном мозге проводится генетическими методами. В нашей работе генетические методы не были использованы, и приводимые ниже сведения имеют целью показать информативность для клиники установления истинного распространения опухоли.

Новые методы определения МОБ, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) или секвенировании следующей генерации (next-generation sequencing, NGS), в настоящее время дают обнадеживающие результаты. Одним из таких перспективных подходов является так называемая жидкостная биопсия с выделением циркулирующей опухолевой ДНК из крови (ctDNA), то есть неинвазивным методом и определение опухолеспецифичных таргетных последовательностей. ctDNA легко определяется при диагностике ДВКЛ с использованием либо IgNGS либо mutNGS [22, 54, 72], и в последующем эти сведения можно использовать для мониторинга МОБ.

Уже на сегодняшний день ясно, что изучение МОБ методами NGS при ДВКЛ имеет важный клинический потенциал. Повышенные уровни ctDNA при диагностике имеет неблагоприятное прогностическое значение [47, 92]. Следует отметить, однако, что количественно пороговый уровень ctDNA при диагностике ДВКЛ варьирует в различных исследованиях, что усложняет проведение сравнения данных, полученных разными группами авторов.

Мониторинг промежуточных образцов показал, что статус МОБ после второго цикла химиоиммунотерапии имеет достоверную связь с прогрессированием в течение 5 лет [72]. Скорость клиренса в эти сроки достоверно предсказывает достижение полной ремиссии [69]. Оценка МОБ в ходе терапии может служить для раннего прогноза исхода у больных, которые проходят лечение по поводу рецидивов заболевания или рефрактерной ДВКЛ [24].

Очень интересным является то, что МОБ оказалась информативной на этапе окончания терапии в случаях полной ремиссии, установленной радиологическими методами. Некоторые из этих больных имели молекулярную болезнь, определение которой предвещало рецидив заболевания [72]. Теми же авторами показано, что у больных с персистирующей молекулярной болезнью, определенной по IgH-V_DJ, выживаемость без прогрессирования была достоверно более короткой. Конечно, пока еще не совсем понятно, можно ли улучшить

прогноз в группах больных с персистенцией МОБ, однако, уже сам факт определения этой категории больных открывает возможность к видоизменению терапии с целью улучшения прогноза. По-видимому, часть опухолевых клеток рассеяны в минимальном количестве в костном мозге больных ДВКЛ, хотя в целом, как известно, характер поражения костного мозга при этой лимфоме очаговый [30, 57, 61, 75, 89, 93]. Следует также отметить, что рецидивы при ДВКЛ прогрессируют очень быстро, и их ранняя диагностика на основании МОБ статуса была бы очень полезна.

Всё это свидетельствует о целесообразности совершенствования оценки эффективности терапии при ДВКЛ, мониторинга статуса остаточной болезни и отработки новых методов ее мониторинга.

Второй аспект проблемы, на котором мы хотели бы остановиться, это изучение гемопоэза при ДВКЛ. Наряду с опубликованными данными нашего института – ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н.Блохина» Минздрава России – относительно особенностей эритропоэза при ДВКЛ, в последнее время появились сообщения других российских центров и зарубежные данные по этому вопросу.

Напомним, что в работах Онкоцентра им. Блохина было установлено нарастание пропорции оксифильных эритробластов в костном мозге больных периферическими В-клеточными лимфомами – ДВКЛ и фолликулярной лимфомой [11, 12]. Эти данные имели прогностическое значение и по этой причине привлекли внимание для дальнейшего изучения.

Как и все другие клетки крови, эритроцит развивается первоначально из стволовой гемопоэтической клетки. CD34+ плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки костного мозга составляют примерно 0,1% миелокариоцитов, и только около 5% которых находятся в клеточном цикле. Пул стволовых клеток является самоподдерживающимся с ничтожным истощением: это происходит путем асимметричного деления в коммитированную колониобразующую единицу (КОЕ) и в другую стволовую клетку. Бездействующая стволовая клетка остается в фазе G0 или G1, защищенная от генотоксических событий и с

продолжительным временем для восстановления ДНК. Связывание мембранных рецепторов стволовой клетки с цитокинами ведет к ее активации. Ранние КОЕ имеют высокую скорость пролиферации, но более ограниченную скорость самообновления, чем стволовая клетка. Потомки плюрипотентных КОЕ являются гетерогенными – результат стохастического процесса с возможностью более чем одному типу клеток развиваться из ранних КОЕ-предшественников; пролиферация и выживание регулируются цитокинами.

Природа эритроидных предшественников - БОЕ-Э и КОЕ-Э – была определена *in vitro* исследованиями клеточного роста в метилцеллюлозе. БОЕ-Э образуют в культуре большие мультикластерные «бурсты» - колонии из 30 000 клеток. Морфологически клетки этих колоний обладают нежным ядерным хроматином, ядрышками и обильной цитоплазмой бластной клетки. Они пролиферируют под влиянием стимулов ИЛ-3, ИЛ-9, ГМ-КСФ плюс инсулиноподобного фактора роста (ИФР-1). Ранняя БОЕ-Э имеет несколько эритропоэтиновых рецепторов (ЭПО-Р) и поэтому реагирует минимально на эритропоэтин (ЭПО). По мере созревания клеток все большее количество ЭПО-Р экспрессируется, и поздние БОЕ-Э становятся ЭПО-чувствительными. *In vitro* потомки КОЕ-Э образуют единичные мелкие колонии из 10-50 клеток, экспрессирующих много рецепторов ЭПО; эти клетки интенсивно реагируют на ЭПО. ЭПО стимулирует рост и предотвращает апоптоз эритроидных предшественников; *in vitro* клетки, лишенные ЭПО, не делятся и подвергаются апоптозной гибели в течение нескольких часов.

БОЕ-Э составляют только 0,03% гемопоэтических клеток костного мозга, и только 40% из них находятся в клеточном цикле, в то время как КОЕ-Э составляют 0,3% костномозговых гемопоэтических клеток, и большинство из них активно делятся. Переход ранних БОЕ-Э в поздние КОЕ-Э является непрерывным клеточным процессом, но БОЕ-Э и КОЕ-Э нуждаются в совершенно разных ростовых факторах. Для роста и дифференцировки БОЕ-Э требуется фактор стволовых клеток и многие другие гемопоэтические факторы, в то время как

КОЕ-Э зависит только от эритропоэтина. КОЕ-Э дифференцируются в морфологически идентифицируемые клетки эритроидной линии – проэритробласты.

На стадии развития КОЕ-Э собираются цитоскелетные белки и появляются определенные мембранные компоненты, включая поверхностные адгезивные молекулы, способствующие удержанию эритрокариоцитов в костном мозге.

Иммунологические подходы к характеристике эритроидного ростка гемопоэза предпринимались уже давно.

Трансферриновые рецепторы (ТФ-Р) являются общими для большинства клеток млекопитающих и обеспечивают доступ железа, связанного с ТФ, для синтеза гема и других железосодержащих белков. Множество ТФ-Р находятся на гемоглобин-синтезирующих клетках, достигая пика около 800 000 на клетку на полихроматофильных эритробластах и уменьшаясь до 100 000 на ретикулоцитах. На эритроцитах экспрессия ТФ-Р отсутствует.

Морфологическая идентификация стадий созревания эритрокариоцитов хорошо известна, она не нуждается в повторении в данном литературном обзоре [29, 32, 36]. С точки зрения пропорций клеточных элементов в пределах эритроидного ростка в норме, то преобладающими являются полихроматофильные эритробласты [1, 2]. При различных видах неопухолевой патологии могут наблюдаться ситуации с возрастанием уровней базофильных [1] или полихроматофильных форм [2]. При опухолях гемопоэтической и лимфоидной тканей подобные закономерности не описаны.

Интересной является работа Черновой Е.Н. и соавторов [15], показавших, что ранним гематологическим симптомом в случаях индукции опухолей у животных является ретикулоцитоз крови.

У больных ДВКЛ соотношение клеточных элементов эритроидного ростка было изменено, что имело связь с прогнозом заболевания. Важно отметить, что изменения эритропоэза у больных лимфомами наблюдались не только при ДВКЛ. Это может быть достаточно универсальным механизмом. Например, при

фолликулярных лимфомах (ФЛ) нарастание процента оксифильных нормобластов имело достоверную взаимосвязь с показателями красной крови у больных [12, 13]. В обширном исследовании (263 больных фолликулярной лимфомой) подтвержден факт увеличения процентного содержания оксифилов. Это носило компенсаторный характер, так как в данной группе пропорция клеток эритроидного ростка была в нормальных пределах (23%), а в группе сравнения – только 9,3% (различия достоверны). Аналогичным образом, показатели гемоглобина крови также были более высокими (133 и 124, соответственно). Интересно отметить, что нарастание уровня оксифильных нормобластов чаще наблюдалось при отсутствии специфического поражения костного мозга как по данным гистологического, так и по данным цитологического исследований (79% и 67%, $p=0,043$). Это противоположно тем данным, которые были получены в работе [10], в которой отмечены иные взаимосвязи при плоскоклеточном раке головы и шеи. Подобные изменения наблюдались, в основном, при опухолях большого размера (T4) или при наличии микрометастазов в костном мозге - имело место изолированное повышение оксифильных нормобластов при сохранном суммарном количестве эритрокариоцитов. Следует подчеркнуть, что данный феномен был тесно связан с наличием микрометастазов рака в костном мозге. Причем характерным и достоверным явилось снижение относительного количества полихроматофильных форм в 100% случаев при наличии микрометастазов.

При сохранном (с точки зрения процентного содержания в миелограмме) эритроидном ростке у больных фолликулярной лимфомой наблюдаются значительные изменения в количестве и соотношении эритроидных предшественников различной степени зрелости. Имела место ускоренная дифференцировка эритрокариоцитов с истощением пула базофильных форм, снижением полихроматофилов более чем у половины больных и значительным нарастанием оксифильных нормобластов, причем в 73,8% случаев процент этих клеток превышал нормальный уровень.

В нормальной эритроидной дифференцировке среди эритрокариоцитов преобладают полихроматофильные нормобласты, количество оксифильных нормобластов более низкое. У больных ФЛ наблюдается противоположная ситуация – у 54% больных преобладали оксифильные нормобласты [11, 14]. Установлено, что из числа оцененных показателей (уровни гемоглобина, эритроциты, MCV, MCH, MPV, MCHC) только концентрация гемоглобина в эритроците была достоверно связана с повышением оксифильных эритробластов в костном мозге больных ФЛ.

Повышенный уровень оксифильных нормобластов был напрямую взаимосвязан не только с уровнем гемоглобина, отмечена также невысокая, но достоверная прямая корреляция содержания этих клеток с количеством эритроцитов крови: $R=0,125$, $p=0,044$ ($n=250$) [11, 13]. Таким образом, ускоренная эритроидная дифференцировка с увеличением процента оксифильных нормобластов ассоциируется с увеличением суммарного содержания эритрокариоцитов в костном мозге и с более высокими уровнями гемоглобина крови [60].

Следует отметить, что попытки охарактеризовать эритрокариоциты иммунологически предпринимались уже давно. Майкл Локен использовал для этих целей общелейкоцитарный антиген, гликофорин А и трансферриновый рецептор [56]. Автор представил схемы дифференцировки клеток эритроидного ряда, в которых снижение размера клеток по мере созревания ассоциировалось со снижением экспрессии CD45 и взаимоотношениями между CD71 и экспрессией гликофорина А [56]. Конечно, подобные схемы дифференцировки не давали ответа к разграничению морфологически распознаваемых форм эритрокариоцитов. Тот период исследований характеризовался примерно схожим подходом к иммунодиагностике острых эритроидных лейкозов [83].

В 2004 году E.G. van Lohem et al. [85] представили характеристику эритропоэза с добавлением в панель антител маркера CD117, характеризующего наиболее ранние стадии созревания. Однако отмеченные в исследованиях

отечественных гематологов изменения эритропоэза касались в основном конечных этапов эритроцитарной дифференцировки.

В 2012 году консорциум Еврофлоу опубликовал данные по проточно-цитометрической иммунодиагностике гемобластозов человека [35]. В разделе, посвященном эритроидным лейкозам, представлена наиболее полная характеристика эритрокариоцитов. Включены маркеры CD36, CD71, CD105, исключен из панели гликофорин А, так как он экспрессирован на эритроцитах. Использование данного подхода для детальной характеристики эритроидного ростка не применялось и представляется целесообразным, так как в соответствии с нормальными стадиями созревания именно данные антигены позволяют характеризовать зрелые эритрокариоциты [58].

В последние годы появились данные относительно изменений нормального гемопоэза при лимфомах. Эти данные касаются клеток-предшественников [59]. Авторы справедливо отмечают, что зрелые В-клеточные опухоли – это основная группа гематологических опухолей, но информации о гемопоэзе при этих опухолях мало. Вовлечение гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников гемопоэза по мнению авторов может осуществляться как за счет мутаций стволовых клеток (что может предрасполагать к развитию злокачественной опухоли), а также путем прямого или непрямого влияния на гемопоэз злокачественных лимфоцитов, присутствующих в костном мозге или экстрамедуллярной ткани.

В данной работе была обнаружена взаимосвязь количества стволовых клеток и клеток-предшественников с возрастом у здоровых лиц. Установлено нарастание уровней мультипотентных и мультилинейных предшественников, а также снижение уровней про-В лимфоцитов с возрастом. Группа больных периферическими В-клеточными лимфомами включала В-ХЛЛ, ДВКЛ, фолликулярную лимфому, мантийноклеточную лимфому и множественную миелому (в примерно равных количествах). У этих больных не отмечено возрастных изменений стволовых клеток. Исключение составили про-В

лимфоциты, которые отрицательно коррелировали с возрастом. Эти данные свидетельствуют о том, что гемопоэз повреждается при периферических В-клеточных лимфомах. Установлены достоверные различия в уровнях различных подклассов стволовых клеток и клеток предшественников (за исключением про-В) у больных лимфомами по сравнению с соответствующей возрастной группой доноров. Степень поражения костного мозга злокачественными клетками, как правило, была обратно взаимосвязана с абсолютным содержанием стволовых клеток и клеток-предшественников, что особенно отчетливо наблюдалось при В-ХЛЛ.

В работе [4] проанализировано влияние схем полихимиотерапии на содержание стволовых гемопоэтических (CD34+) клеток в костном мозге больных ДВКЛ в отдаленные после лечения сроки (5-10 лет). Установлено, что высокодозная химиотерапия вызывает более глубокие повреждения, чем схемы СНОР и R-СНОР-21.

Разумеется, затронутые нами разделы – МРБ и эритропоэз при ДВКЛ – это наиболее малоизученные при ДВКЛ проблемы. Они являются, несомненно, перспективными и актуальными, однако, в настоящее время относятся в большей степени к области исследований, нежели к диагностической клинической практике.

Что же касается практической, диагностической и прогностической стороны вопроса, то здесь в последнее время произошли лишь незначительные изменения. По-прежнему, главным ориентиром для онкогематологов при ДВКЛ является МПИ.

Диагноз ДВКЛ базируется на морфологических, иммуногистохимических, цитогенетических и молекулярных данных. ДВКЛ характеризуется экспрессией пан-В-клеточных маркеров, таких как CD20, PAX5, транскрипционный октамерный фактор 2 (ОСТ2) и CD79a, которые могут выявляться иммуногистохимически или методом проточной цитометрии [63].

По меньшей мере 2 молекулярных подтипа ДВКЛ установлены на основании профилей генной экспрессии – GCB (подобен клеткам зародышевых центров) и ABC (подобен активированным В-клеткам) [20]. Классификация этих подтипов базируется на иммуногистохимических алгоритмах, точность которых варьирует от 85 до 93% [23, 31, 44, 64]. Алгоритм Хэнса является прогностически значимым в отношении PFS, однако, принятие терапевтических решений на основании этого алгоритма не подтверждено имеющимися данными. Коэкспрессия белков MYC и BCL2 обнаруживается в 20-35% случаев [21, 42, 42, 48, 52, 68]. В этих случаях отмечается плохой прогноз (ретроспективные исследования) вне зависимости от молекулярного подтипа ДВКЛ. Вместе с тем, не существует убедительных доказательств того, что в этих случаях необходимо применение иных терапевтических подходов. Установление источника происхождения В-клеточных лимфом дает более полезную информацию относительно прогноза, чем метод Хэнса [88].

Целесообразно оценивать экспрессию CD30, наблюдающуюся в 14-25% случаев ДВКЛ [49, 77]. Международный прогностический индекс (МПИ) применяется для оценки прогноза [International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic], но он не позволяет идентифицировать больных группы очень высокого риска из числа леченных R-CHOP [76]. Необходимы дальнейшие исследования для оценки большей эффективности новых индексов, включая NCCN-IPi и GELTAMO-IPi [62, 90].

Моноклональные антитела к CD20 (ритуксимаб) являют собой хороший пример того, как внедрение иммунологического подхода к лечению ДВКЛ существенно меняет прогноза заболевания и нивелирует значение ряда факторов неблагоприятного прогноза [38, 65, 66, 87, 91].

В целом ряде публикаций оценивается роль маркеров и генетических поломок в прогнозе ДВКЛ [19, 25, 26, 27, 33, 34, 39, 44, 45, 46, 50, 51, 66, 82, 86], однако, результаты не однозначны, а подчас даже противоречивы, что затрудняет

их клиническое применение. В обзорах последних лет большое внимание уделяется сигнальным путям CD79a, CD79b и мутациям MYD88 [67, 68, 74].

Одной из наиболее полных и полезных рекомендаций по использованию классификационных подходов и прогностических маркеров при ДВКЛ является статья ESMO, построенная на принципах доказательности [37, 40].

Важно отметить, что в последние годы в области исследований лимфом наметилось новое направление иммуногематологических исследований. Это исследования костного мозга, которые, с одной стороны, позволяют более точно установить минимальное опухолевое поражение, а с другой — детально охарактеризовать состояние гемопоэза. Поскольку доказано прогностическое значение нарушений гемопоэза у больных ДВКЛ, мы в своей работе основное внимание уделяем именно этому аспекту — поиску иммунологических маркеров, которые могут дополнять морфологическую характеристику костного мозга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

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 [78]. 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. [9].

30 больным проведено иммунофенотипирование миелокариоцитов методом многоцветной проточной цитофлуориметрии:

1. Была проведена детальная иммунологическая характеристика эритропоэза с использованием следующих моноклональных антител: Гликофорин

A, CD36, CD105, CD34, CD71, HLA-DR, CD117, CD33, ядерных красителей SYTO 16 и SYTO 41. Детали выявления эритрокариоцитов представлены в главе 4.

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 главе 5.

Стадию ДВКЛ устанавливали на основании общепринятых критериев [28, 55] (таблица 2.1), преобладали поздние (III-IV) стадии.

Таблица 2.1 — Стадии ДВКЛ.

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 и высокого 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 об счета результатов - SPSS 20.0 for Windows. Кумулятивную выживаемость рассчитывали по методике Kaplan-Meier (1958).

ГЛАВА 3. 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.

Как видно из представленных на рисунке 3.1 данных, кумулятивная общая выживаемость практически идентична для больных пожилого возраста и больных моложе 60 лет, то есть, не установлено прогностической значимости пожилого возраста больных ($p=0,418$).

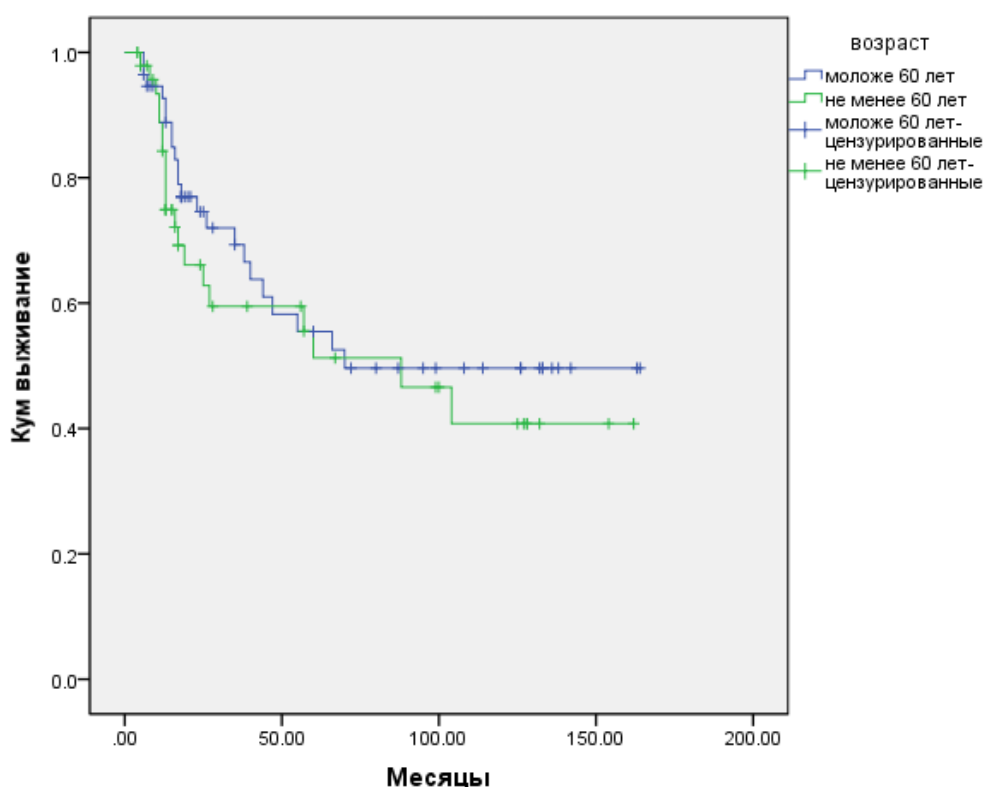


Рисунок 3.1. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от возраста (синяя линия – пациенты моложе 60 лет; зеленая линия – возраст не менее 60 лет).

Стадия ДВКЛ. Одним из наиболее значимых прогностических факторов при ДВКЛ в соответствии с МПИ является стадия заболевания. В нашем исследовании установлено, что стадия заболевания (I-IV) не имела достоверного влияния на прогноз ($p=0,175$), рисунок 3.2. Распределение больных, у которых проведен анализ, по стадиям: I стадия - 10, II-ая – 31, III-я – 12, IV-ая – 52.

При более поздних стадиях ДВКЛ, как показано на рисунке 3.2, кривые кумулятивной выживаемости демонстрируют существенно меньшую продолжительность жизни больных.

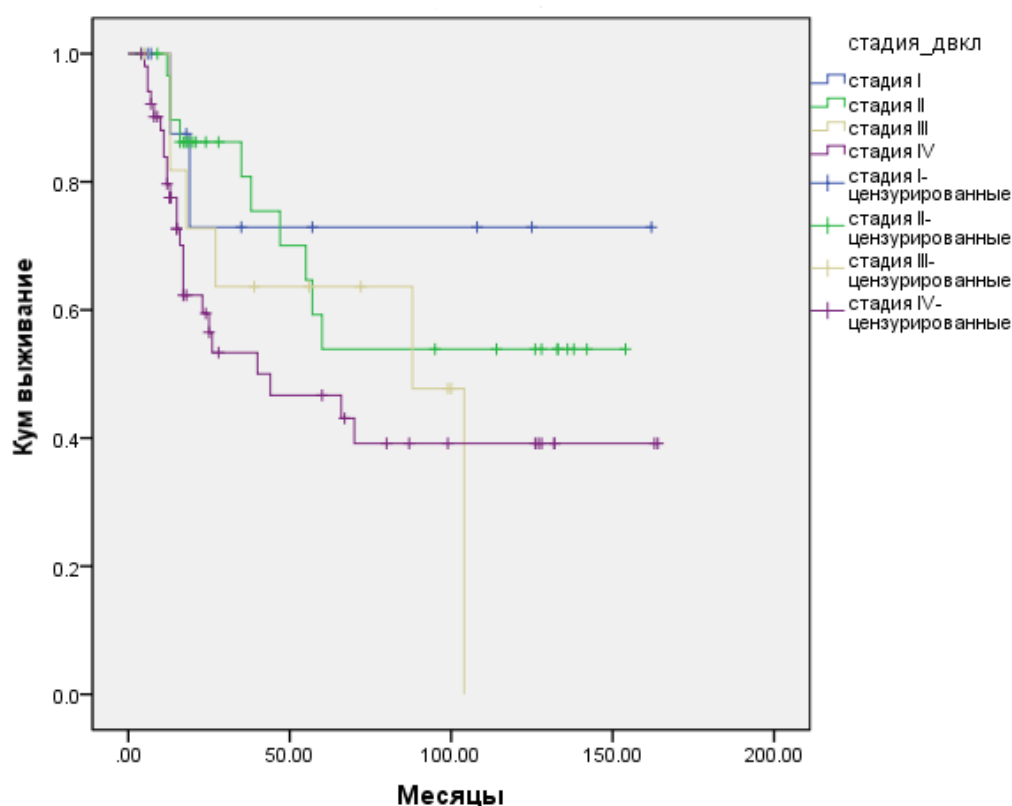


Рисунок 3.2. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от стадии лимфомы (синяя линия – стадия I; зеленая линия – стадия II; желтая линия – стадия III; фиолетовая линия – стадия IV).

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 3.3. Различия высоко достоверны, $p=0,028-0,037$ в зависимости от примененного статистического теста).

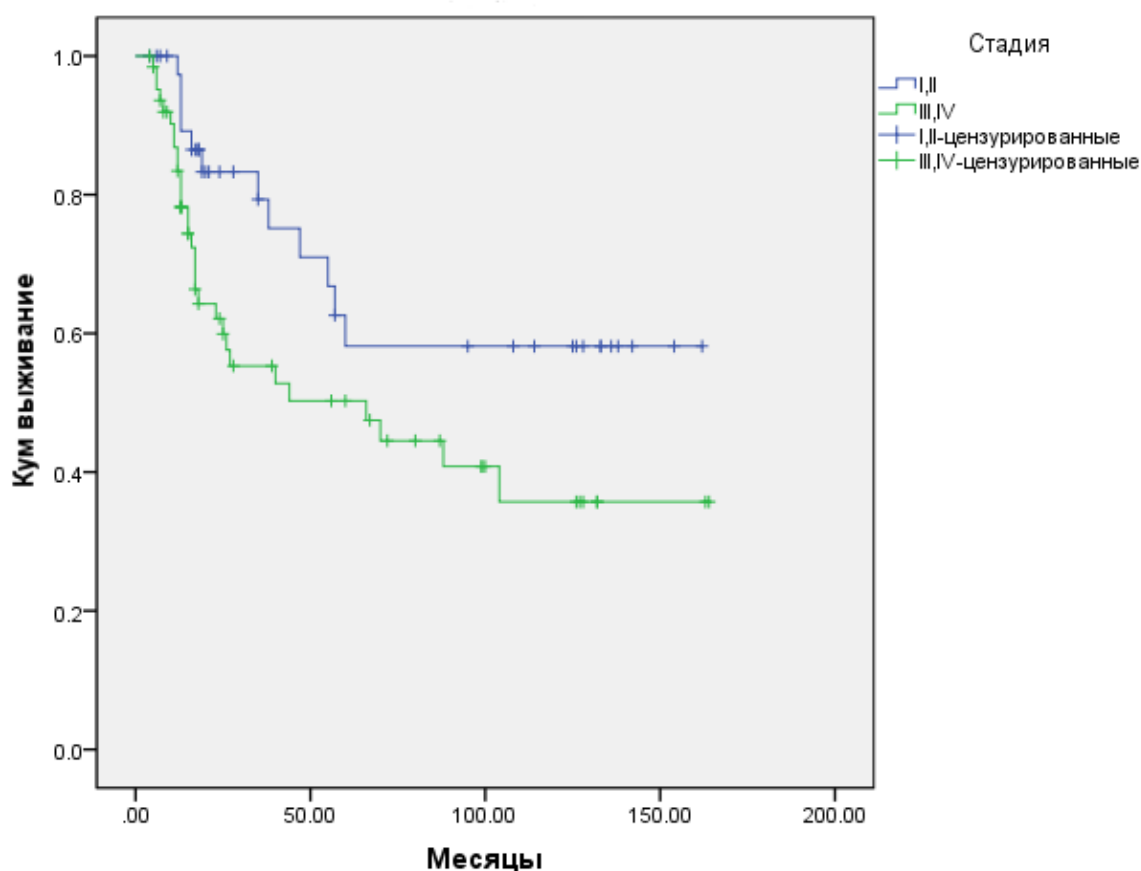


Рисунок 3.3. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от стадии лимфомы (синяя линия – стадии I-II; зеленая линия – стадии III-IV).

Лактат дегидрогеназа (ЛДГ).

Повышенные уровни фермента ЛДГ в сыворотке крови пациентов является важным показателем неблагоприятного прогноза в соответствии с МПИ.

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 3.4.

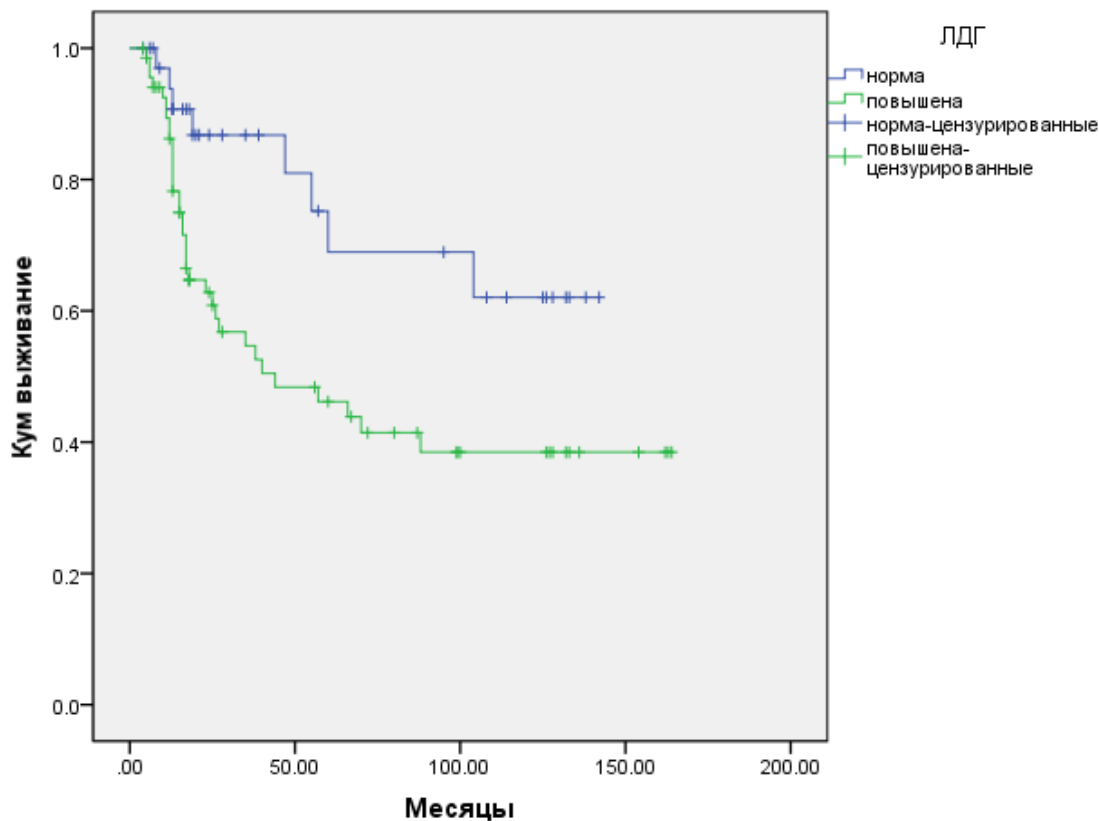


Рисунок 3.4. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от уровней фермента ЛДГ в сыворотке крови (синяя линия — нормальные уровни фермента; зеленая линия — повышенные уровни фермента).

Активность больных по ECOG.

В соответствии с индексом МПИ для ДВКЛ активность пациентов в соответствии с ECOG взаимосвязана с прогнозом заболевания. Мы изучили наличие этой взаимосвязи у 105 больных ДВКЛ, из которых ECOG \geq 2 имел место в 68 случаях. Именно в этих случаях кривые общей выживаемости демонстрировали резкое уменьшение продолжительности жизни, включая медиану выживаемости. Различия высоко достоверны ($p=0,015$), что представлено на рисунке 3.5.

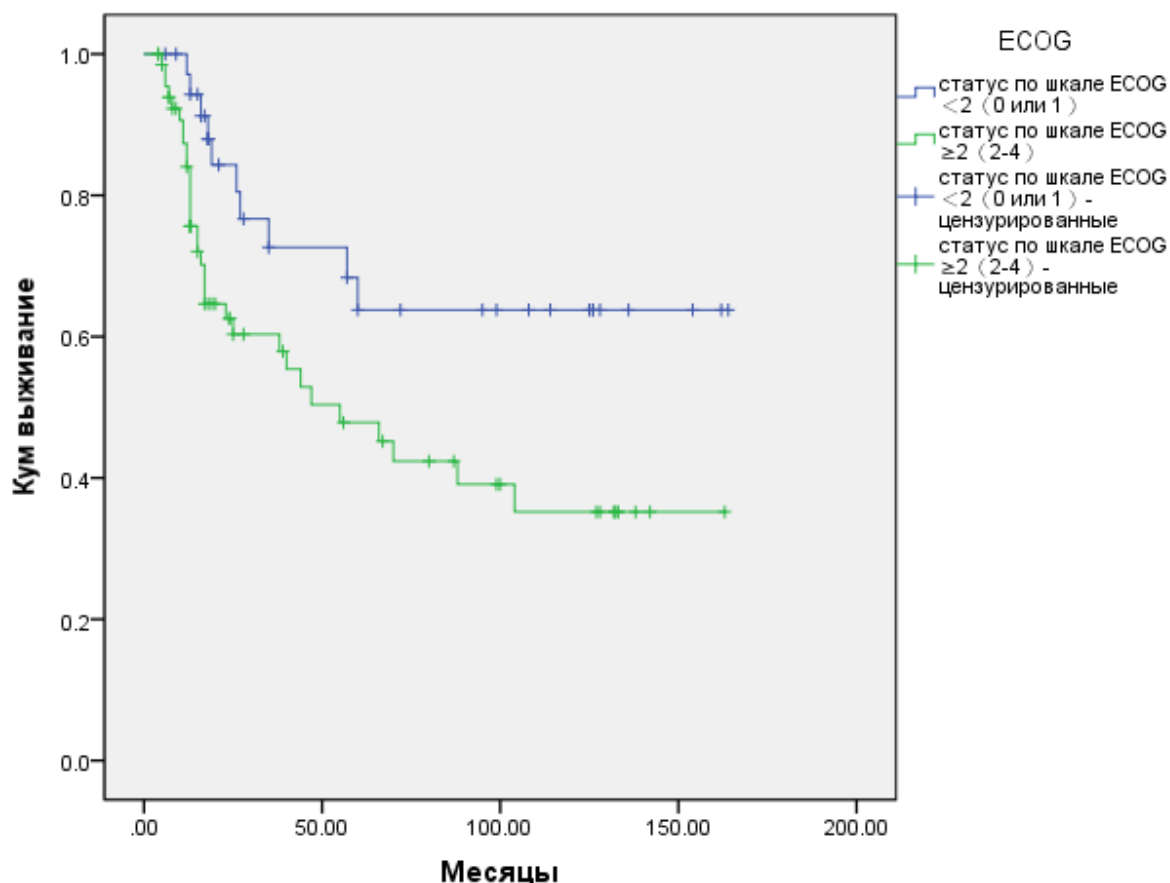


Рисунок 3.5. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от ECOG. (синяя линия – ECOG менее 2; зеленая линия – ECOG ≥ 2).

Экстранодальная лимфома.

Первичная опухоль при ДВКЛ может располагаться не только в лимфатических узлах, но и вне их. Может иметь место поражение желудка, яичек, мягких тканей, печени, легких и других органов. Подробно данные о внеодальных локализациях опухоли представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1. — Характеристика внеодальных ДВКЛ

Внеодальное расположение	Число больных
Желудок	15
Яички	8
Мягкие ткани	9
Селезенка	6
Печень	13
Кишечник	4
Легкое	10
Кожа	1
Миндалин	3
Молочная железа	2
Поджелудочная железа	2
Щитовидная железа	2
Большой сальник	2
Матка	1
Итого	78

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 ($p=0,679$), данные представлены на рисунке 3.6.

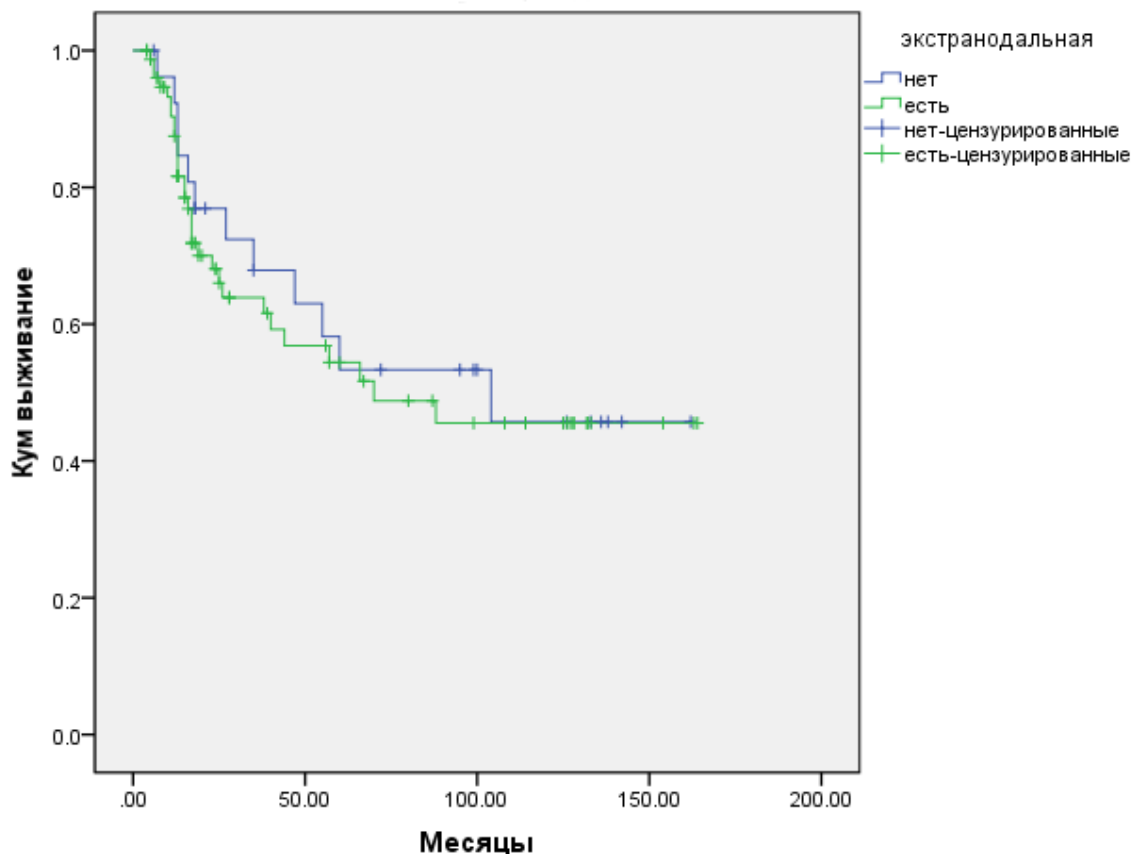


Рисунок 3.6. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от наличия внеодальной локализации лимфомы (синяя линия – нодальные лимфомы, зеленая линия – больные с наличием внеодальной лимфомы).

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, $p=0,123-0,139$), данные представлены на рисунке 3.7.

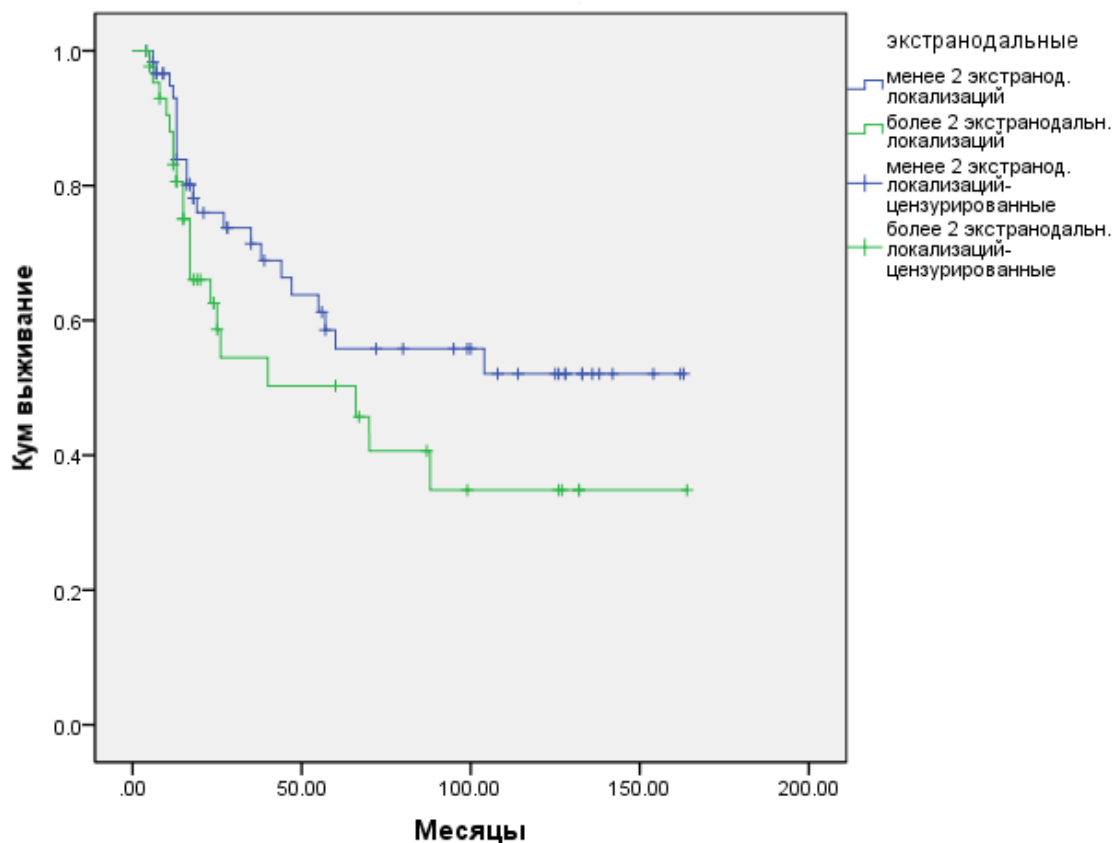


Рисунок 3.7. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от наличия или отсутствия двух и более внеодальных локализаций лимфомы (синяя линия – менее двух внеодальных локализаций; зеленая линия – две и более внеодальные локализации).

Интересно отметить, что у больных, имеющих не менее двух внеодальных локализаций лимфомы, имели место только поздние (III-IV) стадии лимфомы. Неблагоприятное прогностическое значение поздних стадий высоко достоверно, что было показано нами ранее. Из этого можно сделать вывод, что именно стадия лимфомы определяет прогноз вне зависимости от того поражены ли генерализованно лимфатические узлы или вовлечены внеодальные зоны.

Роль прогностического индекса МПИ.

В нашей работе мы оценили, насколько **сумма баллов по МПИ** взаимосвязана с длительностью жизни больных ДВКЛ. В нашей выборке имело

место 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), данные представлены на рисунке 3.8.

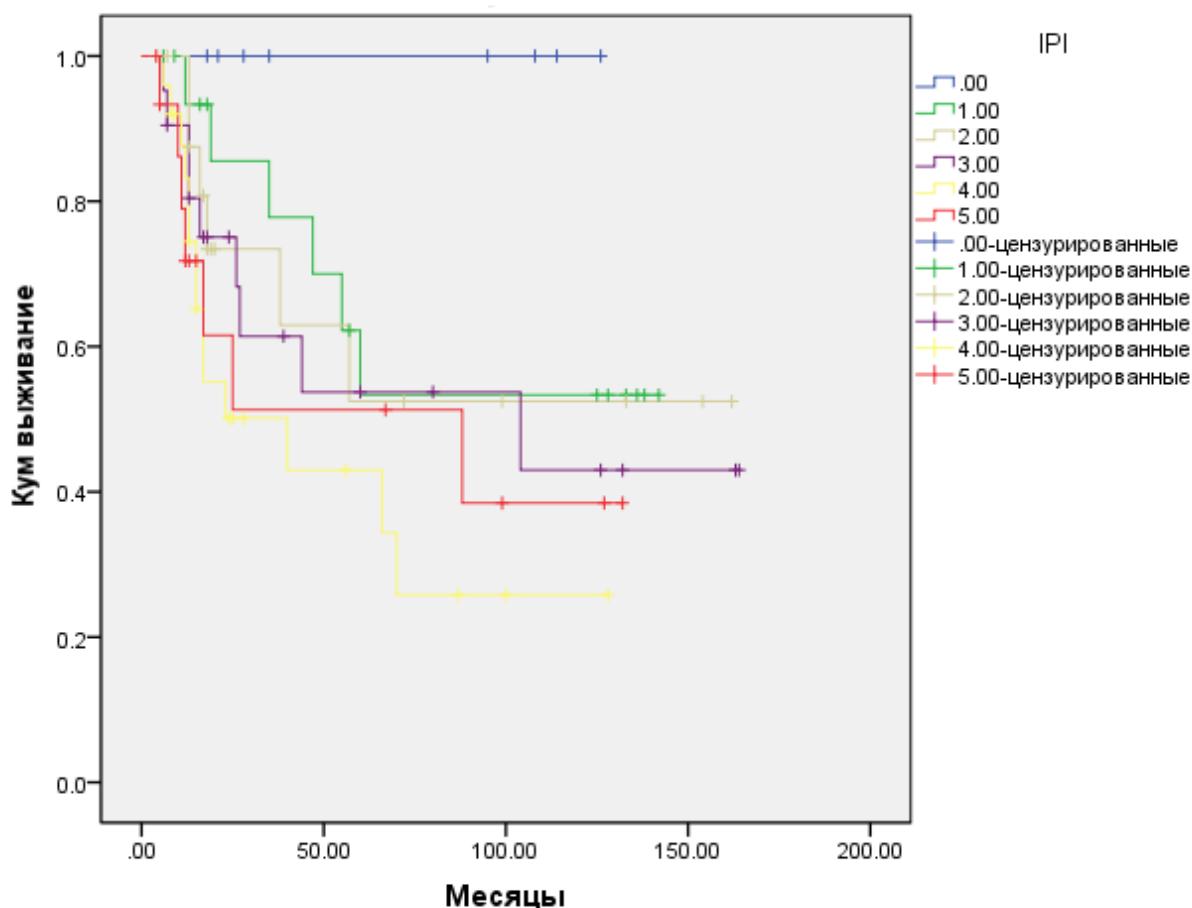


Рисунок 3.8. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от суммы признаков неблагоприятного прогноза по МПИ, $p = 0,06-0,054$ (сумма баллов МПО: синяя линия – 0; зеленая линия – 1; кофейная линия – 2; фиолетовая линия – 3; желтая линия – 4; красная линия – 5).

Тот факт, что возрастание признаков неблагоприятного прогноза по МПИ отрицательно коррелирует с выживаемостью достаточно интересен. Вместе с тем, 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 ($p=0,023$), данные представлены на рисунке 3.9.

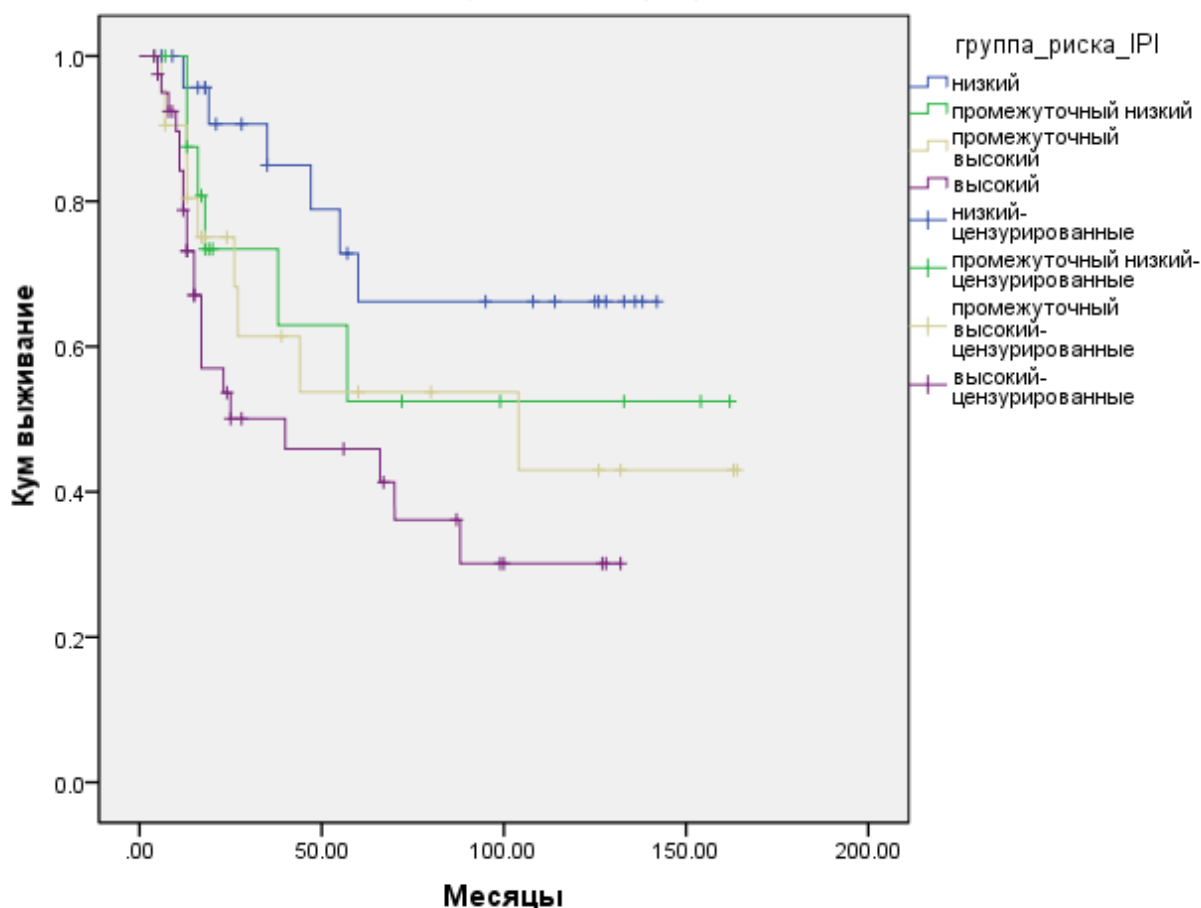


Рисунок 3.9. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в группах риска по МПИ (синяя линия – низкий риск; зеленая линия – низкий промежуточный риск; кофейная линия – промежуточный высокий риск; фиолетовая линия – высокий риск).

Обращает на себя внимание тот факт, что некоторые группы были очень малочисленны, и выживаемость при низком и низком промежуточном риске прогрессирования не различались. Мы объединили эти группы прогноза с целью получить более крупные группы сравнения и более достоверные данные. Объединили также группы промежуточного высокого и высокого рисков. Общее

количество больных в группе низкого/промежуточного низкого рисков стало 42, а в группе высокого/промежуточного высокого рисков стало 63. Сравнение общей выживаемости больных в этих двух категориях установило высокую достоверность связи прогноза с риском прогрессирования по МПИ ($p=0,008$), данные представлены на рисунке 3.10.

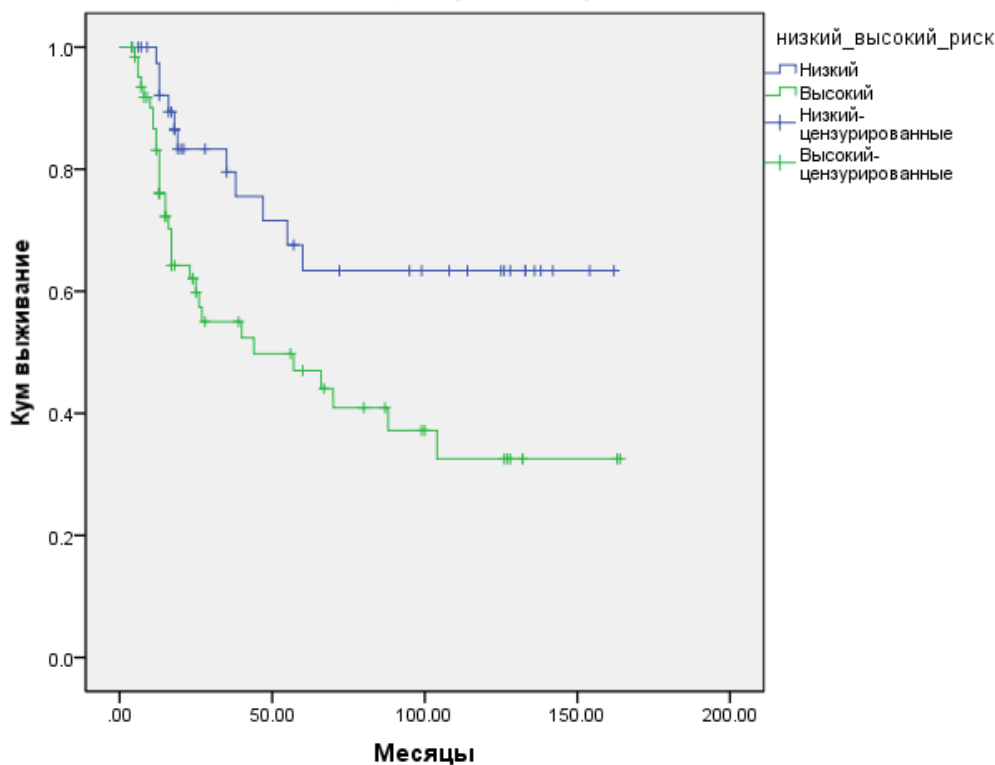


Рисунок 3.10. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от риска прогрессировании по МПИ (синяя линия – условно низкий риск; зеленая линия – условно высокий риск). Пояснения в тексте.

Таким образом, по нашим данным следующие признаки МПИ имеют сильную связь с риском прогрессирования, продолжительностью жизни больных ДВКЛ: распространенность процесса (III,IV стадии), уровни ЛДГ, а также показатель активности больного по ECOG.

Группы риска в соответствии с МПИ дают очень важную информацию относительно прогноза ДВКЛ. По нашим данным больные могут быть сгруппированы в две более крупные когорты при объединении групп низкого и

промежуточного низкого риска, а также групп промежуточного высокого и высокого рисков. В этом случае связь с прогнозом наиболее значимая.

Прогностический индекс, адаптированный к возрасту (авМПИ),

основан на тех же признаках, что и МПИ (за небольшими исключениями) и позволяет выделять группы риска у больных моложе 60 лет и старшей возрастной группы.

В соответствии с критериями авМПИ в нашей выборке было 17 (16,2%) больных низкого риска, 21 (20%) больной промежуточного низкого риска, 21 (20%) больной промежуточного высокого риска и 46 (43,8%) больных высокого риска.

Анализ выживаемости в группах риска в соответствии с авМПИ у 105 больных ДВКЛ показал, что эти группы различаются по прогнозу ($p=0,013$), данные представлены на рисунке 3.11.

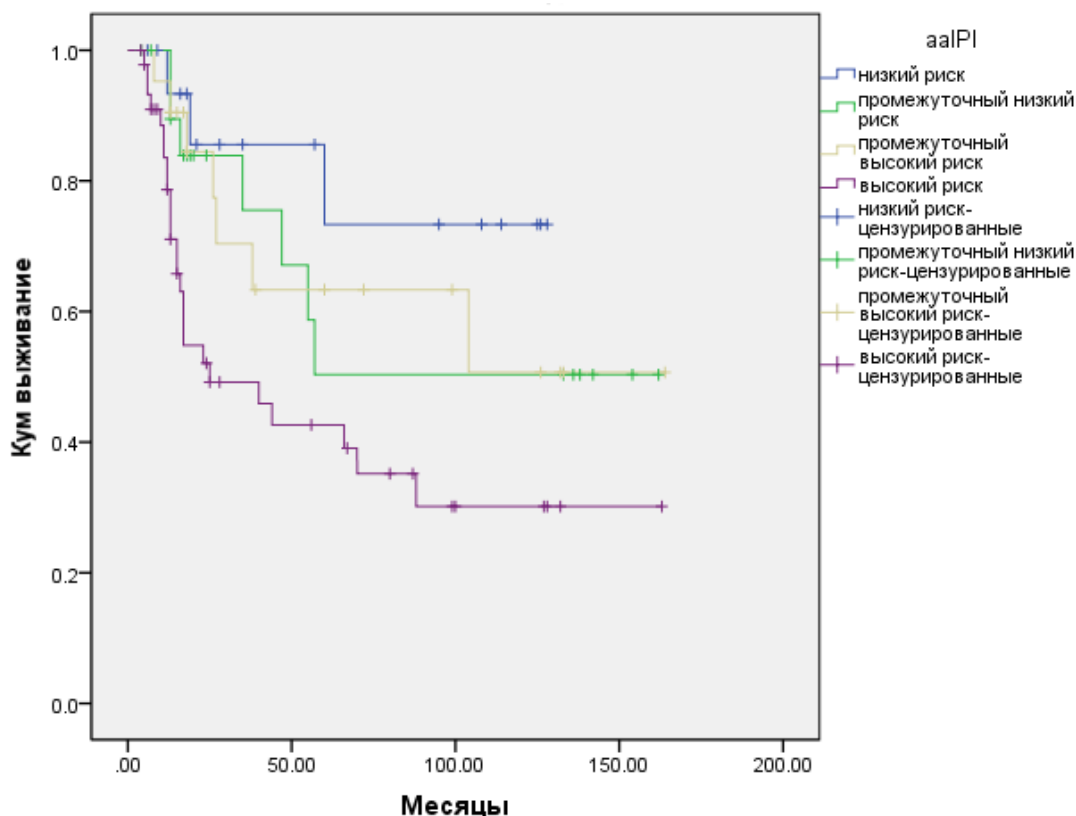


Рисунок 3.11. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ в группах риска по авМПИ (синяя линия – низкий риск; зеленая линия –

низкий промежуточный риск; кофейная линия – высокий промежуточный риск; фиолетовая линия – высокий риск).

Выбор тактики лечения в зависимости от авМПИ проводится в различных возрастных группах - у больных более молодого (до 60 лет) и пожилого (60 лет и старше) возраста. У больных молодого возраста группы риска авМПИ имели прогностическое значение ($p=0,000$), рисунок 3.12.

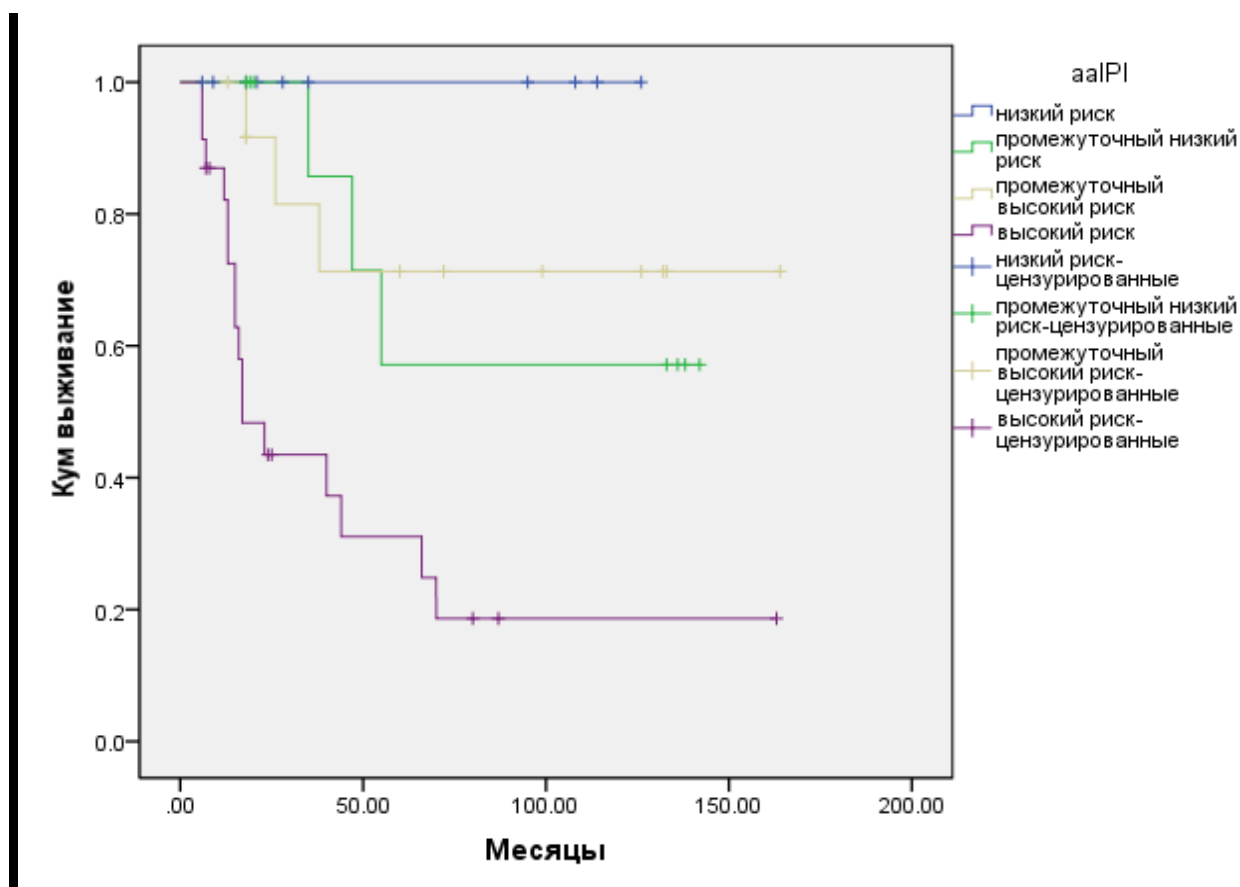


Рисунок 3.12. — Кривые кумулятивной общей выживаемости больных ДВКЛ молодого возраста (до 60 лет) в группах риска по авМПИ (синяя линия – низкий риск, $n=10$; зеленая линия – низкий промежуточный риск, $n=10$; кофейная линия – промежуточный высокий риск, $n=13$; фиолетовая линия – высокий риск, $n=23$).

У больных 60 лет и старше сравниваемые группы риска авМПИ не имели прогностического значения, $p=0,926$. Данные представлены на рисунке 3.13.

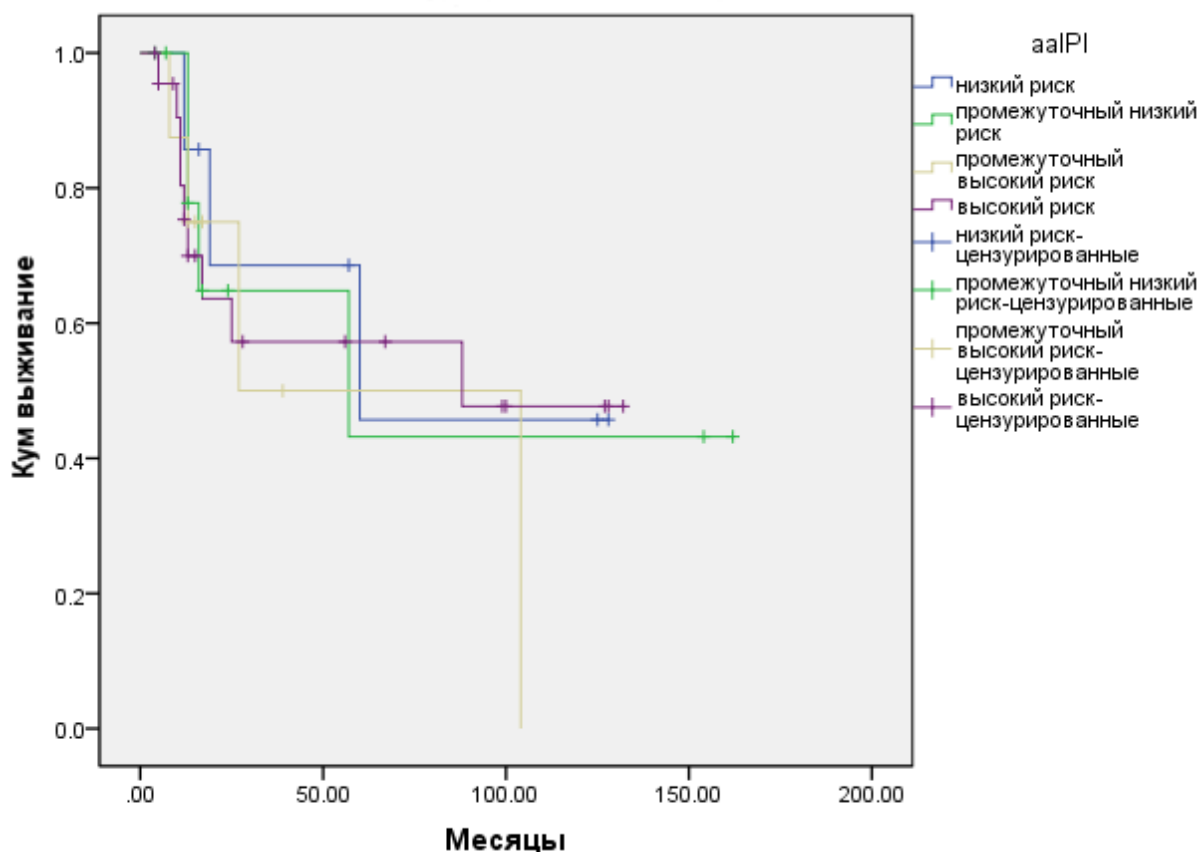


Рисунок 3.13. — Кривые кумулятивной общей выживаемости пожилых больных ДВКЛ в группах риска по авМПИ (синяя линия – низкий риск, n=7; зеленая линия – низкий промежуточный риск, n=11; кофейная линия – промежуточный высокий риск, n=8; фиолетовая линия – высокий риск, n=23).

РЕЗЮМЕ

Проведенное нами изучение клинической значимости факторов МПИ убедительно доказывает, что наиболее важное отрицательное влияние на прогноз ДВКЛ оказывает диагностика заболевания на поздних 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. В числе лабораторных показателей прогноза наиболее важным явился повышенный уровень лактат дегидрогеназы.

Выделение групп риска прогрессирования на основании международного прогностического индекса сохраняет важное прогностическое значение. Особенно достоверные результаты связи с прогнозом отмечены при укрупнении близких групп риска по МПИ.

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.

Таким образом, по нашим данным улучшить результаты лечения ДВКЛ можно на основании совершенствования ранней диагностики заболевания.

ГЛАВА 4. К ДАЛЬНЕЙШЕМУ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОК ЭРИТРОИДНОГО РОСТКА В КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ ДВКЛ.

Эритрокариоциты костного мозга представляют интерес при изучении лимфом и некоторых форм рака [10, 11, 12]. Это связано с изменением эритробластограммы, соотношений клеточных элементов эритрокариоцитов, возрастанием количества наиболее зрелых морфологически распознаваемых форм ядродержащих 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.

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

Изученные образцы костного мозга характеризовались в основном нормальной клеточностью, большинство остальных показателей также было в пределах нормальных значений. Обращало на себя внимание то, что эритроидный росток был в большинстве случаев изменен. Это проявлялось в том, что при сравнении показателей с данными нормы [9, 16, 17, 18] 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 ростка в большинстве случаев (42%) было в пределах нормы, а отклонения в сторону снижения или повышения были в примерно равных пропорциях (28% и 30% соответственно).

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 ($p=0,084$). Наиболее близкими к достоверным были взаимосвязи оксифильных нормобластов с прогнозом, представлены на рисунке 4.1.

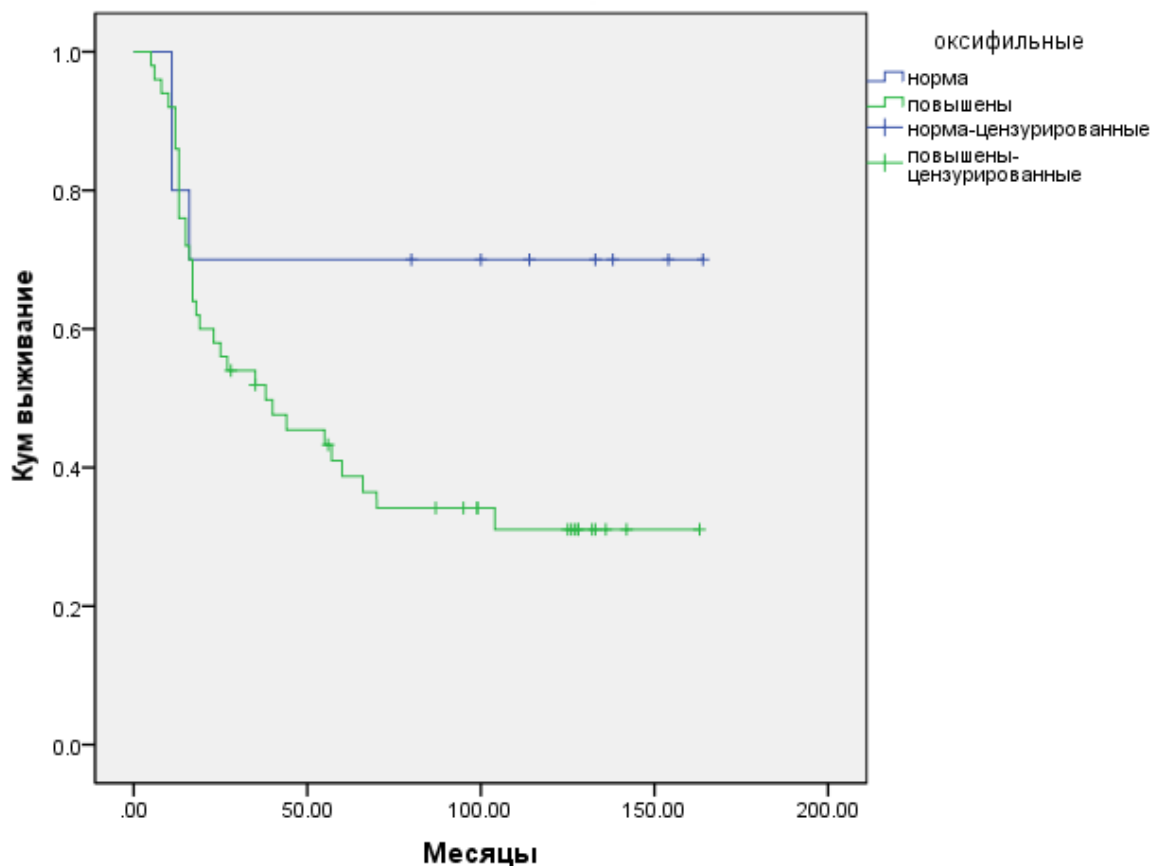


Рисунок 4.1. Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от содержания оксифильных нормобластов в миелограмме (синяя линия — нормальные уровни оксифильных нормобластов; зеленая линия — повышение).

При внимательном анализе кривых выживаемости становится очевидно, что в первые 2 года жизни больных ДВКЛ наступление летального исхода в обеих группах идет примерно в одинаковой степени. А далее больные с нормальным содержанием оксифилов 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 4.2 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.

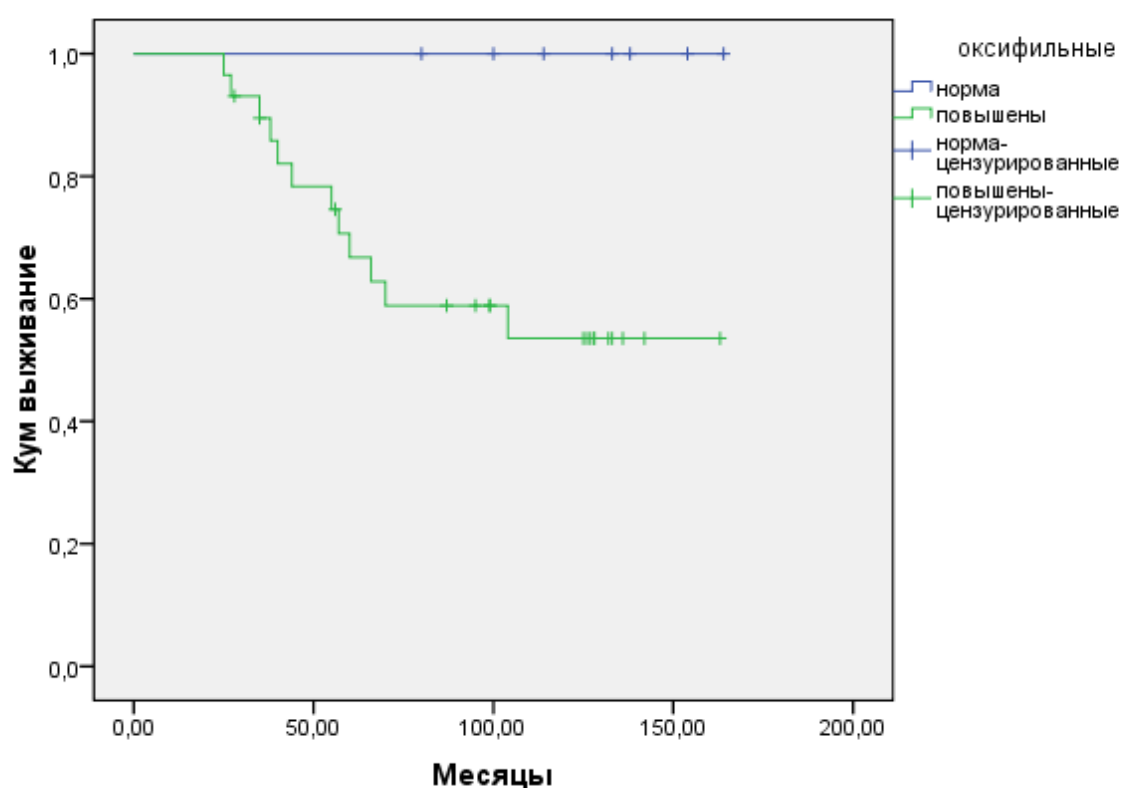


Рисунок 4.2. — Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ, проживших более 2 лет, в зависимости от содержания оксифильных нормобластов в миелограмме (синяя линия – нормальные уровни оксифильных нормобластов; зеленая линия – повышение).

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.

4.1. Проточно-цитометрическая характеристика дифференцировки клеток эритроидного ряда

В нашей работе показано, что у больных ДВКЛ достаточно часто имеет место изменение эритроидной дифференцировки, заключающееся в своего рода ускорении дифференцировки с накоплением терминальных эритрокариоцитов – оксифильных нормобластов – в отличие от нормальной дифференцировки, в ходе которой преобладают полихроматофильные формы. Эти изменения настолько значимы, что имеют взаимосвязь с прогнозом ДВКЛ.

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

С этой целью были проанализированы различные методы идентификации эритрокариоцитов.

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 ядродержащих эритроидных клетках костного мозга.

Мы, в первую очередь, стремились охарактеризовать именно ядродержащие эритроидные формы с тем, чтобы иметь возможность сопоставить полученные данные с результатами морфологического исследования

костного мозга. С этой целью оценили возможность использования ядерных красителей SYTO 16 и SYTO 41. Они относятся к проникающим неселективным красителям группы SYTO. Красители группы SYTO способны пассивно диффундировать через мембраны большинства клеток и обладают низким сродством к нуклеиновым кислотам. Эти возбудимые УФ или видимым светом красители могут быть использованы для окрашивания РНК и ДНК в живых и фиксированных эукариотических клетках, а также в грамположительных и грамотрицательных бактериях. Обладают высоким молярным коэффициентом поглощения, с экстинкцией более $50\ 000\ \text{см}^{-1}/\text{M}^{-1}$, чрезвычайно низкой собственной флуоресценцией (квантовый выход в несвязанном состоянии меньше 0,01). SYTO-красители могут быть использованы и для выявления нуклеиновых кислот в растворах, электрофоретических гелях и в других вариантах исследований [7].

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. Весьма распространенным подходом к характеристике эритрокариоцитов является использование CD36 (в отличие от гликофорина отсутствует на эритроцитах) и CD105 (пик экспрессии примерно совпадает с пиком экспрессии CD71).

6. Оценили также возможность использования дополнительных маркеров эритрокариоцитов, таких как HLA-DR, CD123, CD9.

Возможности характеристики эритропоэза на основе CD45, гликофорина А и CD71.

Общелейкоцитарный антиген CD45 является обязательным маркером, включаемым во все пробы при характеристике эритропоэза. Это обусловлено тем, что на эритроидных предшественниках экспрессия антигена практически отсутствует, что является отличительной чертой от незритроидных клеток с низкими характеристиками бокового светорассеяния (лимфоцитов и др.).

В гейте CD45- у больных ДВКЛ взаимосвязь между антигенами CD71 и гликофорин А была близка к таковой, описываемой в литературе для нормальной дифференцировки миелокариоцитов, рис.4.1.1а.

Вместе с тем, присутствовали события отрицательные по обоим маркерам и клетки, соответствующие зрелым эритроцитам (гликофорин А+, CD71-).

Следует отметить 2 характеристики исследуемого образца: большое количество незритроидных предшественников (левый нижний квадрант) и значительная примесь эритроцитов (правый нижний квадрант, CD71- гликофорин А+).

Эти затруднения легко преодолимы путем последовательного гейтирования. Во первых, исключаем из анализа обломки клеток на основании характеристик FCS/SSC (рис.4.1.1б). Во-вторых, смотрим вырезанный гейт на основании ядерного красителя SYTO 41 и убеждаемся, что большинство клеток, оставленных вне гейта (левый нижний квадрант) не содержат ДНК (Рис.4.1.1в). С учетом этих данных доводим анализируемый гейт, включая в него только клетки, окрашиваемые ядерным красителем (Рис.4.1.1г). В характеристиках светорассеяния клетки, которые соответствуют требованиям гейтов 1 и 2, выглядят следующим образом (Рис.4.1.1д).

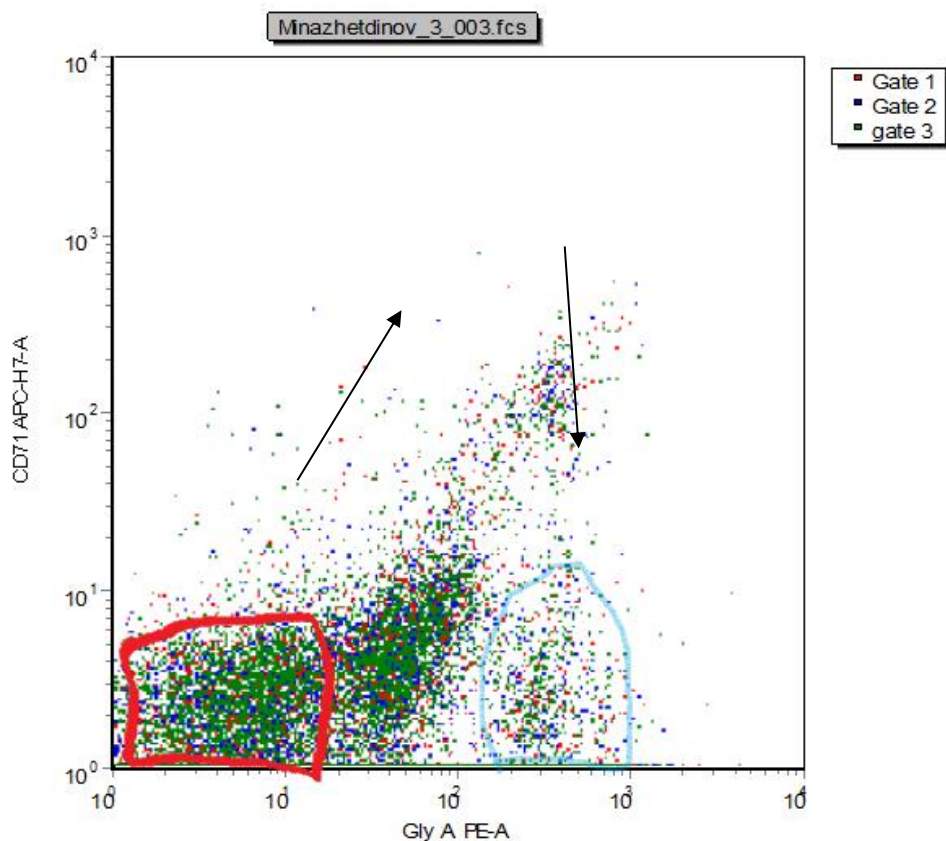


Рисунок 4.1.1а. — Проточно-цитометрическая цитограмма, иллюстрирующая взаимоотношение между экспрессией трансферринового рецептора CD71 (ось Y) и гликофорином А (ось X) в гейте CD45-негативных клеточных элементов с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC^{low}).

Стрелками показано вначале нарастание экспрессии обоих антигенов, а затем снижение трансферринового рецептора при сохраняющейся экспрессии гликофорина А. Красным обведен гейт неэритроидных клеточных элементов, отрицательных по экспрессии гликофорина А. Голубым обведен гейт эритроцитов и ретикулоцитов – CD71-GlyA+.

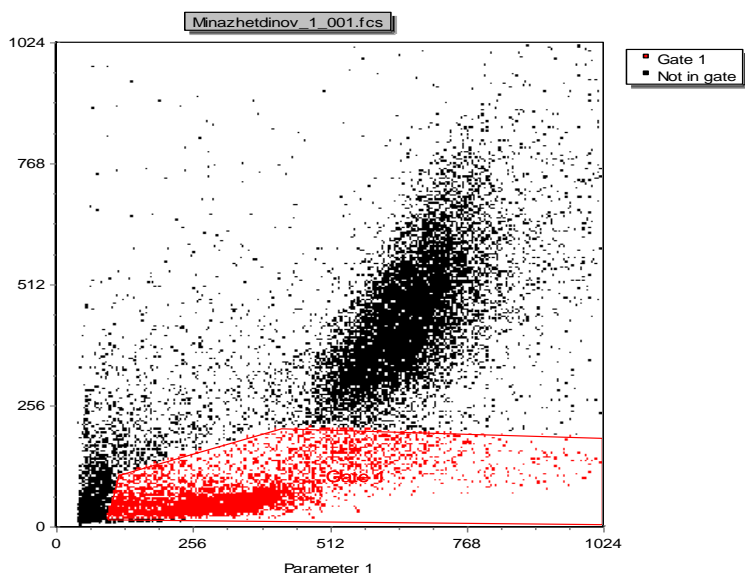


Рисунок 4.1.1.б. — Характеристики светорассеяния (FSC-SSC) в анализируемом образце костного мозга. Красным показан гейт клеток с низкими характеристиками бокового светорассеяния (SSC), включающий клетки любого размера (за исключением самых мелких – обломки) на основании прямого светорассеяния (FSC).

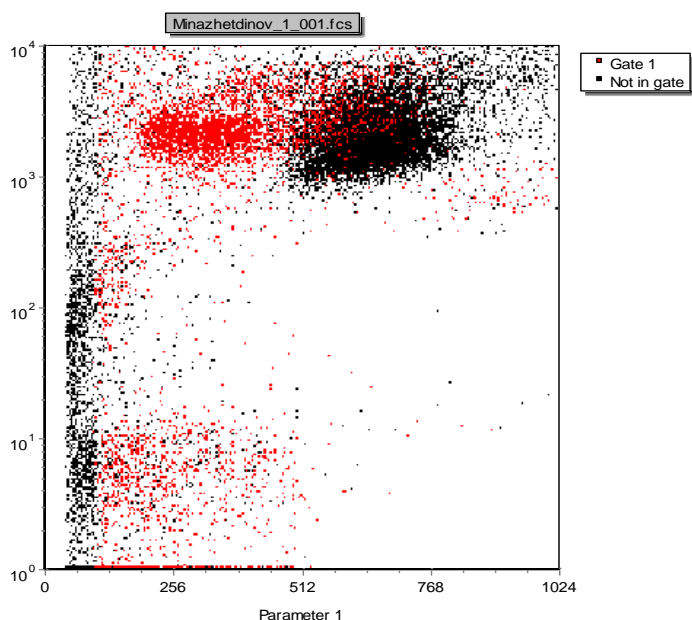


Рисунок 4.1.1.в. — Окрашивание клеток анализируемого образца костного мозга суправитальным красителем SYTO 41 (уровни экспрессии представлены по оси абсцисс).

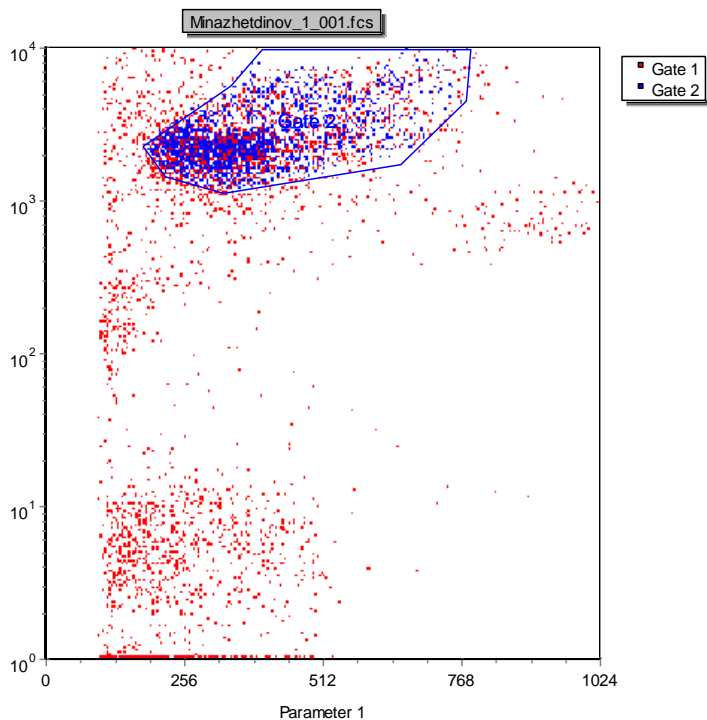


Рисунок. 4.1.1г. — Гейт живых клеток (окрашены синим) в пределах клеток, выделенных на основании светорассеяния на рис. 5.1б.

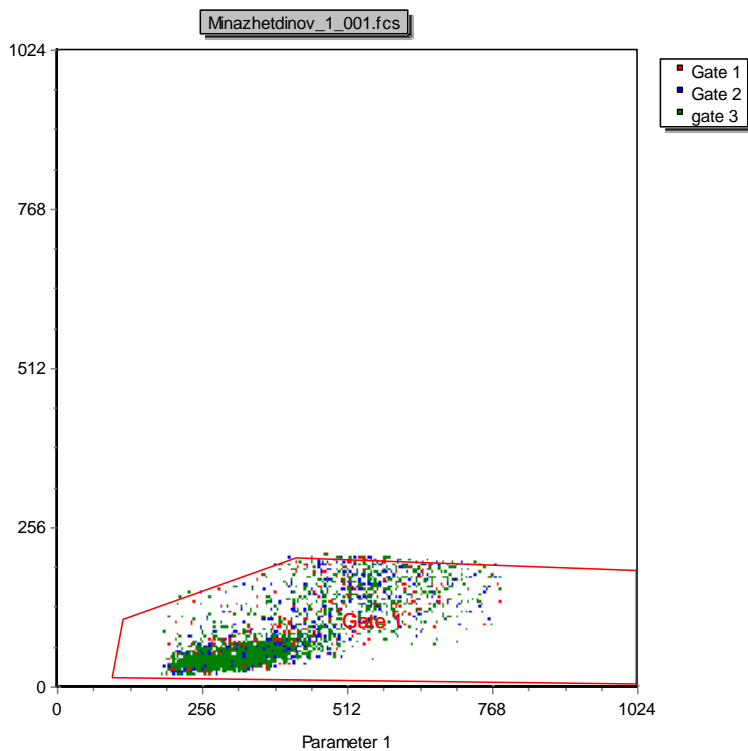


Рисунок 4.1.1д. — Клетки, выделенные в гейте 1 на рис. 5.1а, с учетом характеристик светорассеяния и окрашивания ядерным красителем SYTO 41.

Соотношение экспрессии трансферринового рецептора CD71 и гликофорина А в итоговом гейте полностью соответствует таковому, который дается в специальной литературе (Рис.4.1.2).

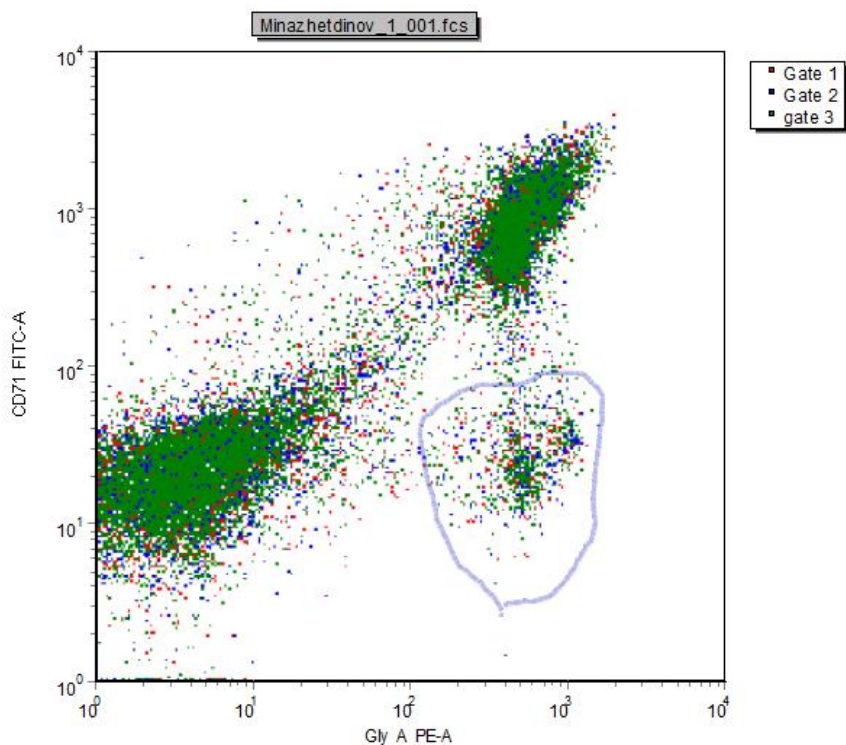


Рисунок 4.1.2. — Взаимоотношение между клетками, экспрессирующими гликофорин А (эритроидные клетки), и CD71-позитивными клеточными элементами в CD45-негативном гейте, выделенном на основании светорассеяния и окраски ядерным красителем SYTO 41. Голубым цветом обведены ретикулоциты – CD71- Гликофорин А+ SYTO41+.

По-прежнему, видна примесь клеток с фенотипом CD71-GlyA+ (правый нижний квадрант, обведены голубым). Учитывая гейтирование по SYTO 41, это могут быть ретикулоциты или поздние стадии дифференцировки эритрокариоцитов.

На рисунке 4.1.3 показано, высокое связывание SYTO 41 с этими клетками, в отличие от эритроцитов, представленных на рисунке 4.1.4 без гейтирования.

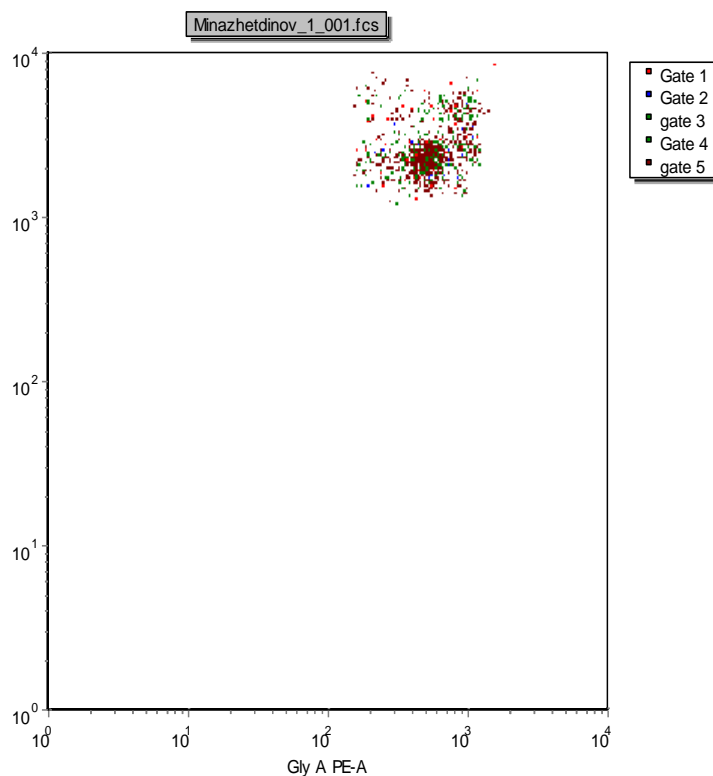


Рисунок 4.1.3. — Высокий уровень связывания SYTO 41 с клетками, обведенными голубой линией на рисунке 4.1.2.

На следующем рисунке без гейтирования (Рис.4.1.4) показано, что эти клетки достаточно ярко окрашиваются ядерными ДНК-красителями в сравнении с эритроцитами, то есть являются ретикулоцитами.

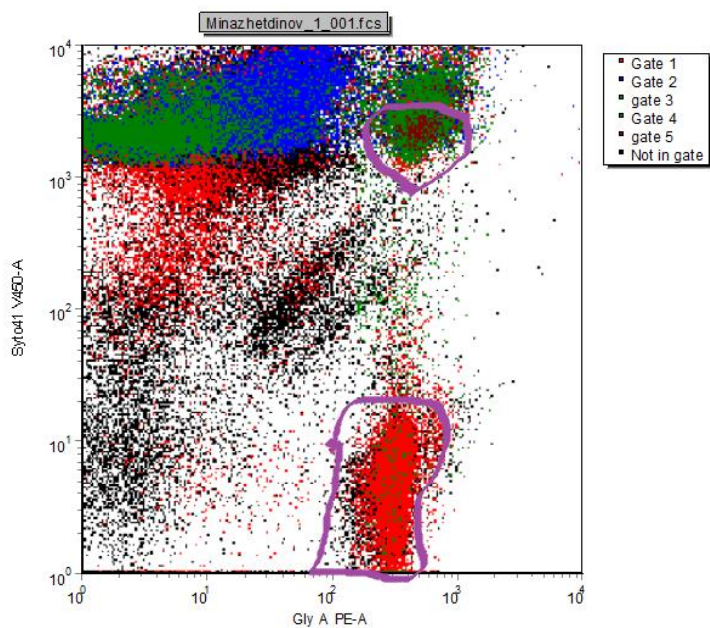


Рисунок 4.1.4. — Характеристика экспрессии гликофорина А и уровней окрашивания ядерным красителем SYTO 41 клеток представленных на рис. 4.1.2 (CD71-GlyA+) – ретикулоциты – в сравнении с эритроцитами (обведенная популяция внизу графика).

На следующем рисунке (Рис. 4.1.5) видно, что эти клетки (CD71-GlyA+) негативны по экспрессии CD36.

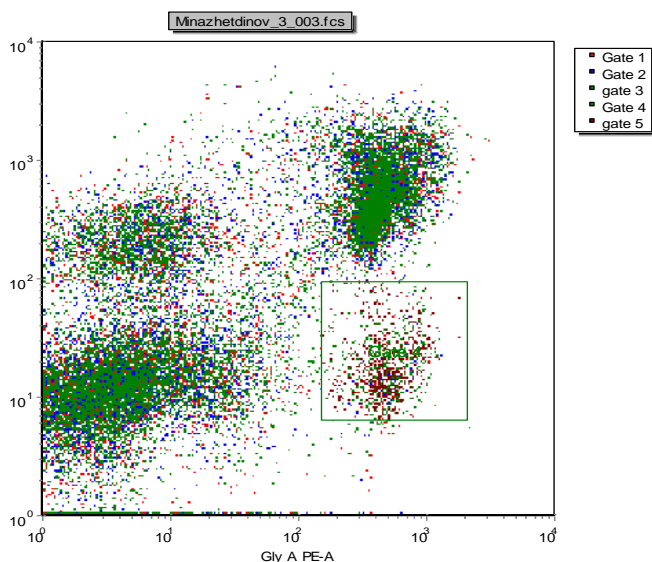


Рисунок 4.1.5. — Клетки CD71-GlyA+ являются практически негативными по CD36 (обведены квадратной рамкой).

Взаимоотношение CD36 и CD71 представлено на следующем рисунке, стрелками показано направление дифференцировки (рис. 4.1.6).

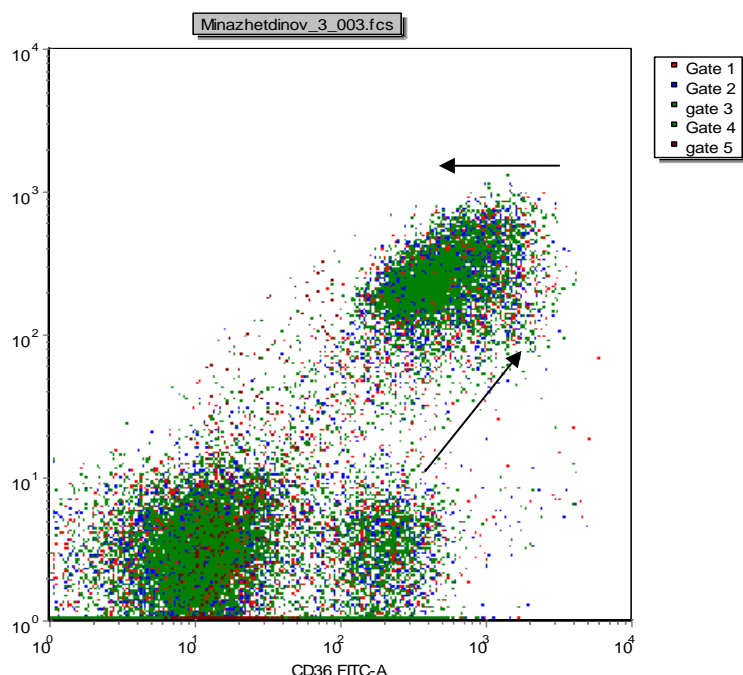


Рисунок 4.1.6. — Взаимоотношения между экспрессией антигенов CD36 и CD71 в ходе эритроидной дифференцировки. Стрелками показано направление дифференцировки.

Таким образом, на основании использования следующих красителей, применяемых в одной пробе, можно характеризовать основные этапы дифференцировки эритрокариоцитов:

1. CD45 V500
2. Glycophorin A PE
3. Syto 41 V450
4. CD36 FITC
5. CD71 APC-H7

Рассмотрим схему дифференцировки эритрокариоцитов (рисунок 4.1.7), сопоставив с ней полученные данные.

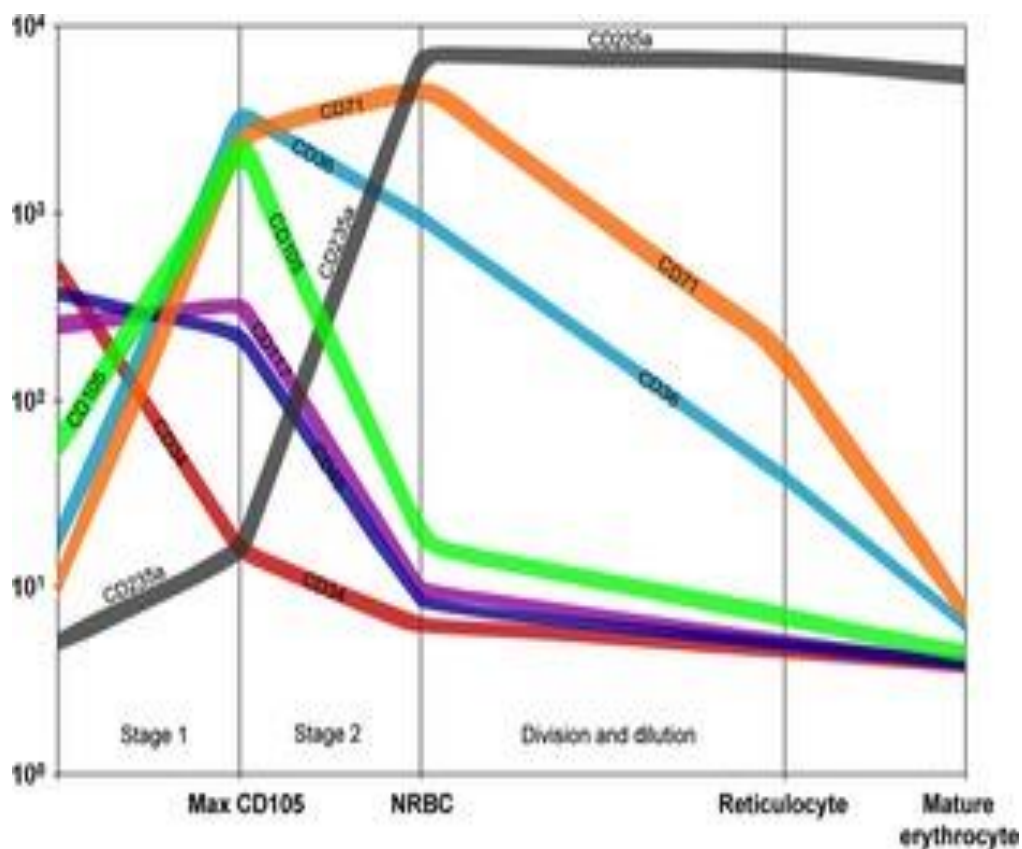


Рисунок 4.1.7. — Изменение антигенного состава эритрокариоцитов по мере их дифференцировки [60].

Как видно, антигены CD36 и CD71 достигают пика экспрессии примерно в одно время, и их появление обозначается как стадия 1 дифференцировки эритрокариоцитов. На представленных нами далее данных по анализу эритропоэза у конкретного больного видно, что отчетливо видна стадия CD36+CD71-. Эта стадия может быть очень транзиторной, связанной с особенностями эритропоэза у пациента. В анализируемом случае общее содержание эритрокариоцитов составило 15,4% (базофильные 0,2%, полихроматофильные 10,2%, оксифильные 5,0%) и единственным отличием от нормы было некоторое снижение базофильных форм. Возможно, представленные CD36+CD71- клетки соответствуют незрелым предшественникам (CD34+, CD117+, CD45+/-), которые на морфологическом уровне не могут быть распознаны как эритроидные предшественники.

Как видно из представленной схемы эритроидной дифференцировки, большинство эритрокариоцитов имеют фенотип CD36+CD71+, что соответствует эритрокариоцитам в целом, и не позволяет дифференцировать базофильные, полихроматофильные и оксифильные формы.

Для понимания возможности идентификации подтипов эритрокариоцитов цитометрически мы применили некоторые другие маркеры и их сочетания.

Очень хорошие результаты дает гейтирование по CD45low SYTO16+. В этом гейте взаимоотношения CD71 и гликофорина А представлены на рисунке 4.1.8.

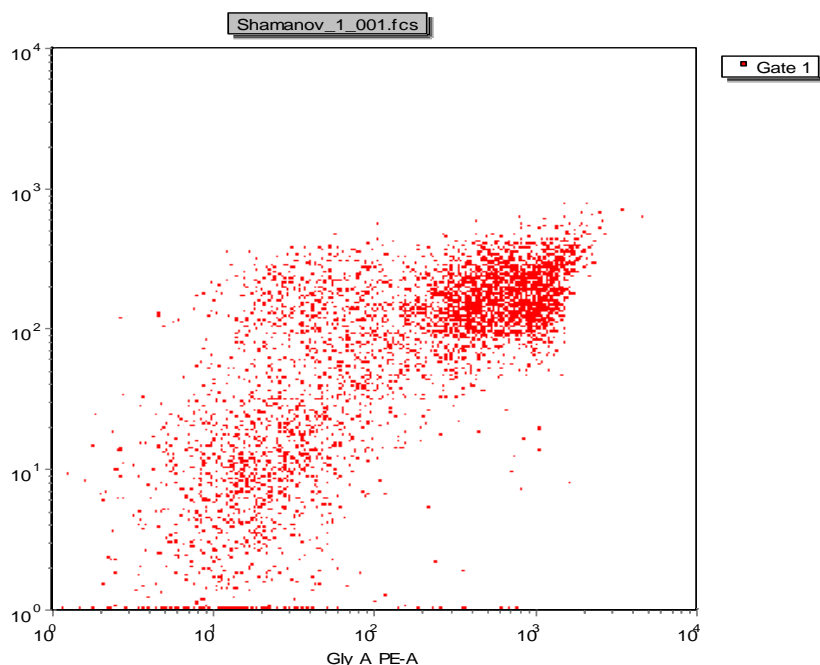


Рисунок 4.1.8. — Взаимоотношения между клетками, экспрессирующими Гликофорин А и трансферриновый рецептор в гейте CD45low SYTO16+.

Видно, что отчетливо выделяются 3 популяции клеток: отрицательные по обоим маркерам, CD71+GlyA-, CD71+ GlyA+. Присутствуют единичные клетки, соответствующие поздним этапам дифференцировки эритроидного ряда – CD71-GlyA+.

При накоплении большого числа событий можно подсчитать взаимоотношения между квадрантами, рис. 4.1.9.

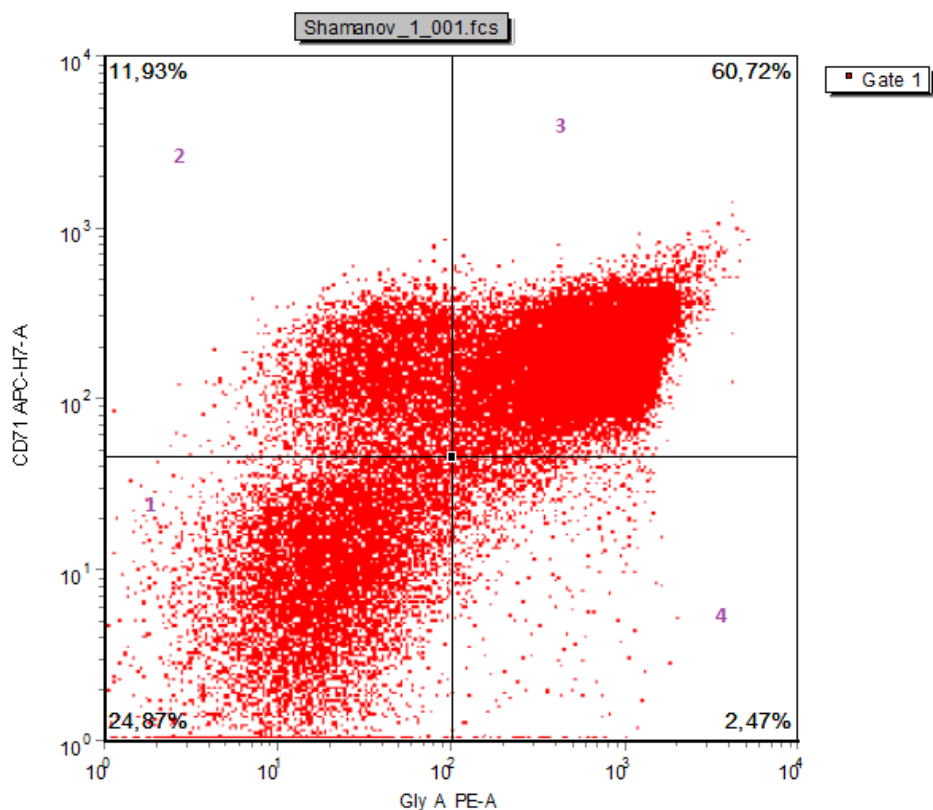


Рисунок 4.1.9. — Взаимоотношения между основными стадиями дифференцировки эритрокариоцитов, выделяемых на основании гликофорина А и CD71.

Преобладающей является CD71+ GlyA+ фракция (61%). В миелограмме данного больного базофильные нормобласты составили 2,4%, полихроматофильные – 16,4%, оксифильные были повышены – 13,2% (при норме 0,8-5,6%).

Остановимся на фенотипической характеристике каждого из квадрантов.

В первую очередь проанализируем наличие маркеров ранних стадий гемопоэза, начнем с квадранта 2 на рисунке 4.1.9, который характеризуется фенотипом CD71+ Гликофорин А- (Рисунок 4.1.10).

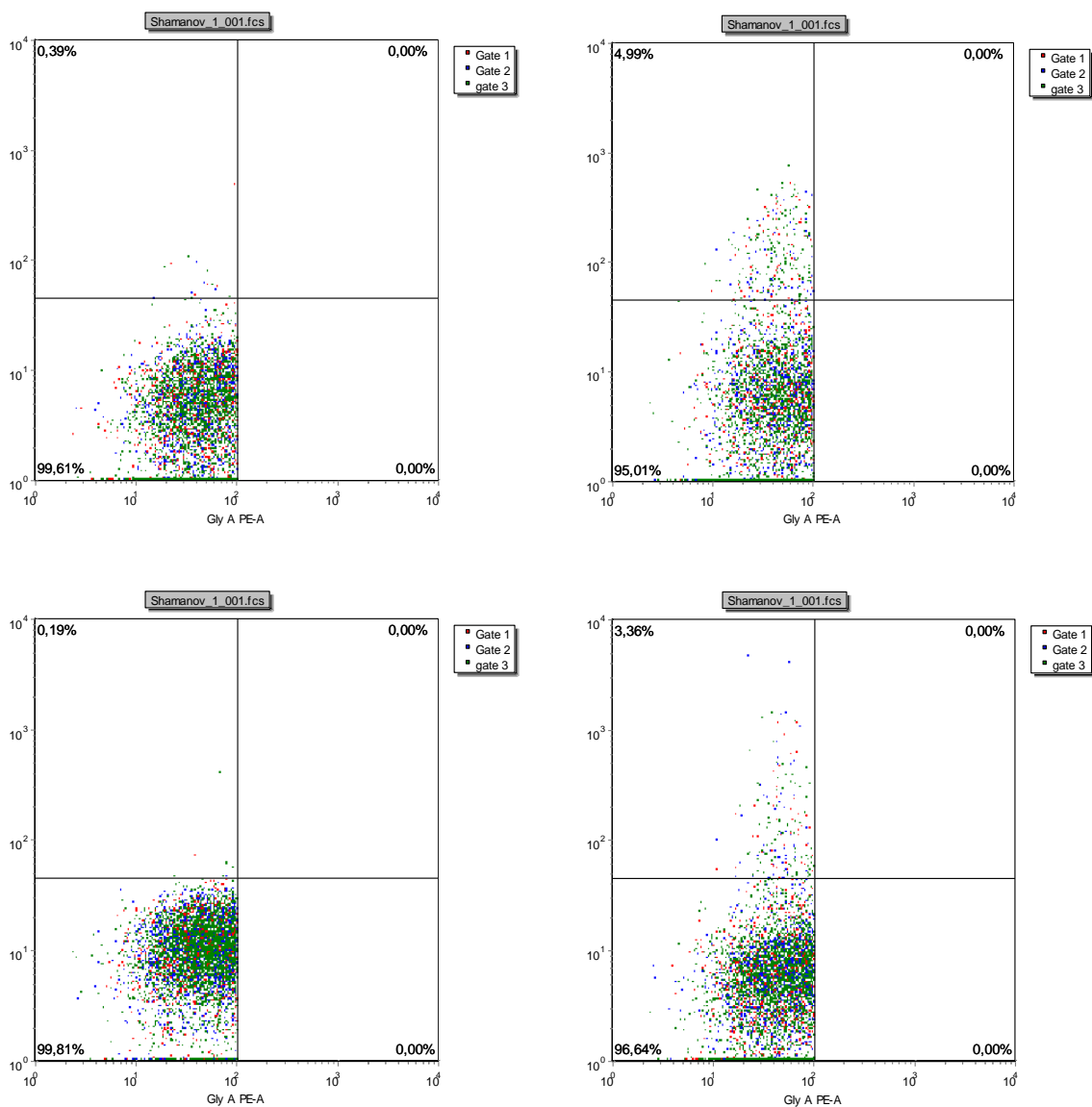


Рисунок 4.1.10. — Экспрессия маркеров CD34, CD117, CD123, HLA-DR на клетках, коммитированных по эритроидной дифференцировке – CD71+ Гликофорин А- (квадрант 2 на рисунке 4.1.9).

Как видно из представленных данных, на коммитированных по эритроидной дифференцировке клетках (CD71+ GlyA-) в незначительном количестве присутствуют только антигены CD117 и HLA-DR, CD34 и CD123 полностью отсутствуют.

На рисунке 4.1.11 представлен более ранний этап дифференцировки (CD71- Гликофорин А-), квадрант 1 на рисунке 4.1.9).

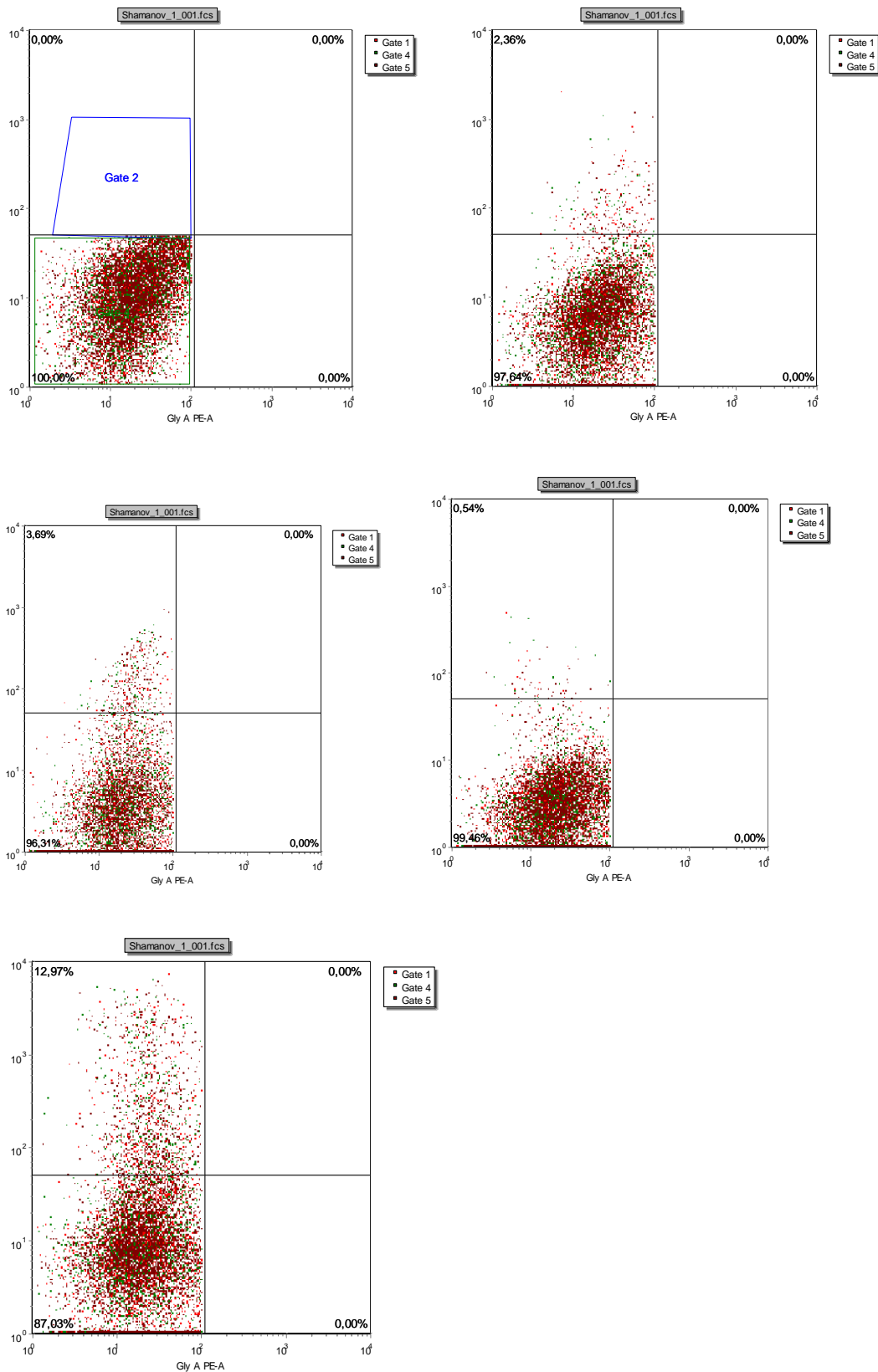
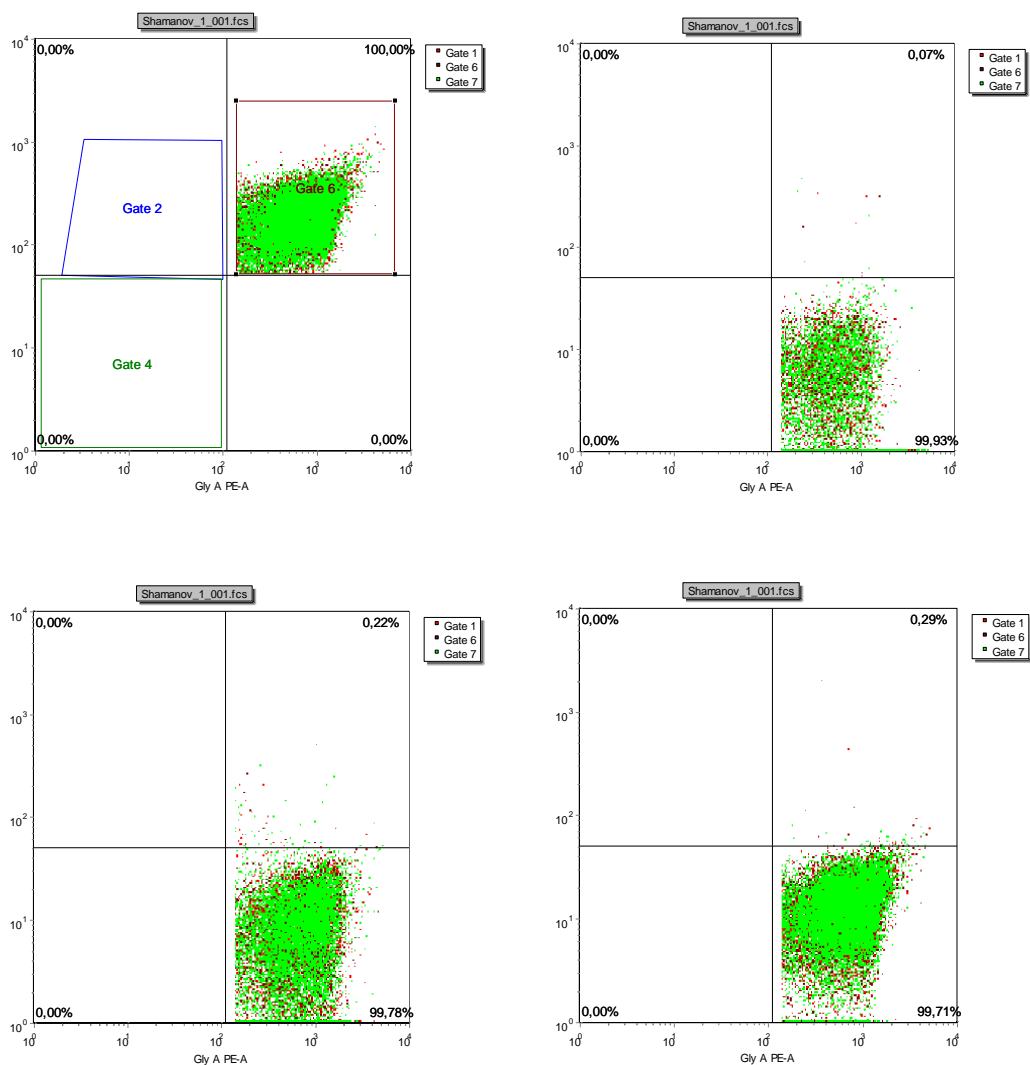


Рисунок 4.1.11. — Квадрант 1, представленный на рисунке 4.1.9 (CD71-Гликофорин А-), соответствует более ранним предшественникам. Отмечается экспрессия CD34, CD117, HLA-DR.

Как видно, этот гейт представлен более ранними клетками с экспрессией CD34.

И, наконец, фенотипическая характеристика клеток доминирующей популяции эритрокариоцитов, квадрант 3 (CD71+ GlyA+) представлена на рисунке 4.1.12.



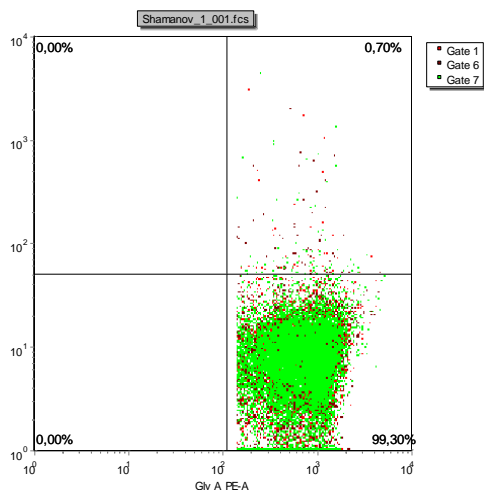
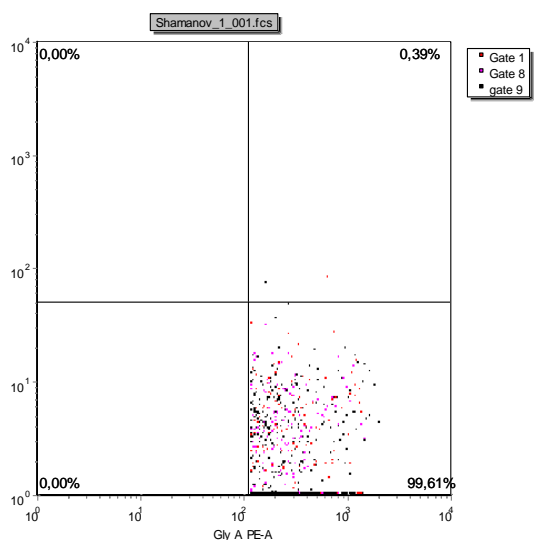
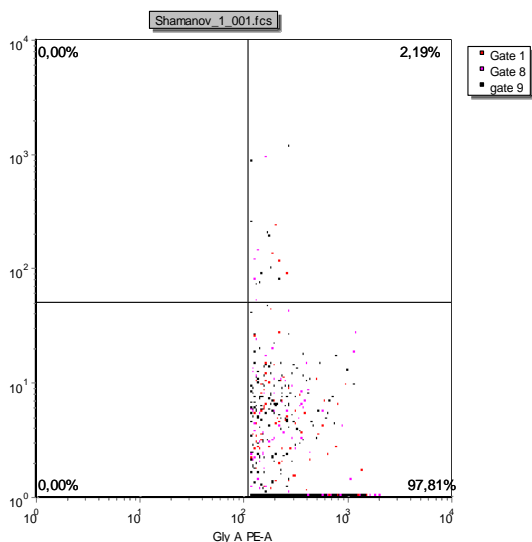


Рисунок 4.1.12. — Иммунофенотипическая характеристика доминирующей популяции эритрокариоцитов костного мозга (CD71+ Гликофорин А+)

Как видно, на этой стадии дифференцировки все маркеры клеток-предшественников отсутствуют, что свойственно морфологически распознаваемым эритроидным клеткам.

В 4-м квадранте клетки практически отсутствуют. Однако представим фенотипические данные и для этой популяции, рисунок 4.1.13.



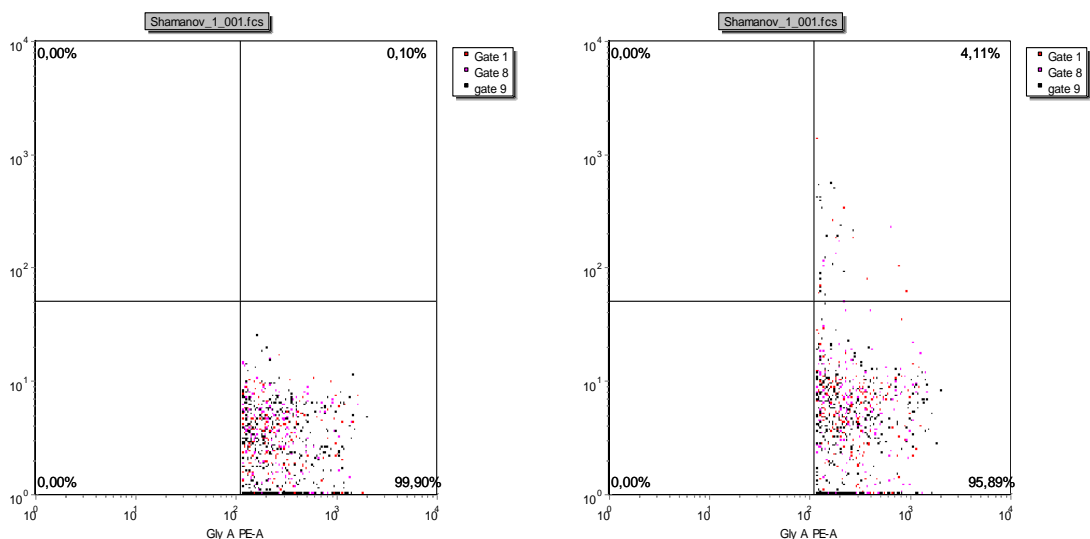


Рисунок 4.1.13. — Иммунофенотипическая характеристика клеток с фенотипом Гликофорин А+ CD71-в костном мозге, квадрант 4 на рис. 4.1.9.

В этом гейте (GlyA+ CD71-) также отсутствуют маркеры незрелых стадий дифференцировки.

Учитывая тот факт, что в данном образце практически отсутствовала примесь эритроцитов, а также то, что на зрелых эритроцитах экспрессии CD36 не наблюдается, дальнейший анализ экспрессии CD36 проведен в гейте CD45-негативных клеток (рис.4.1.14).

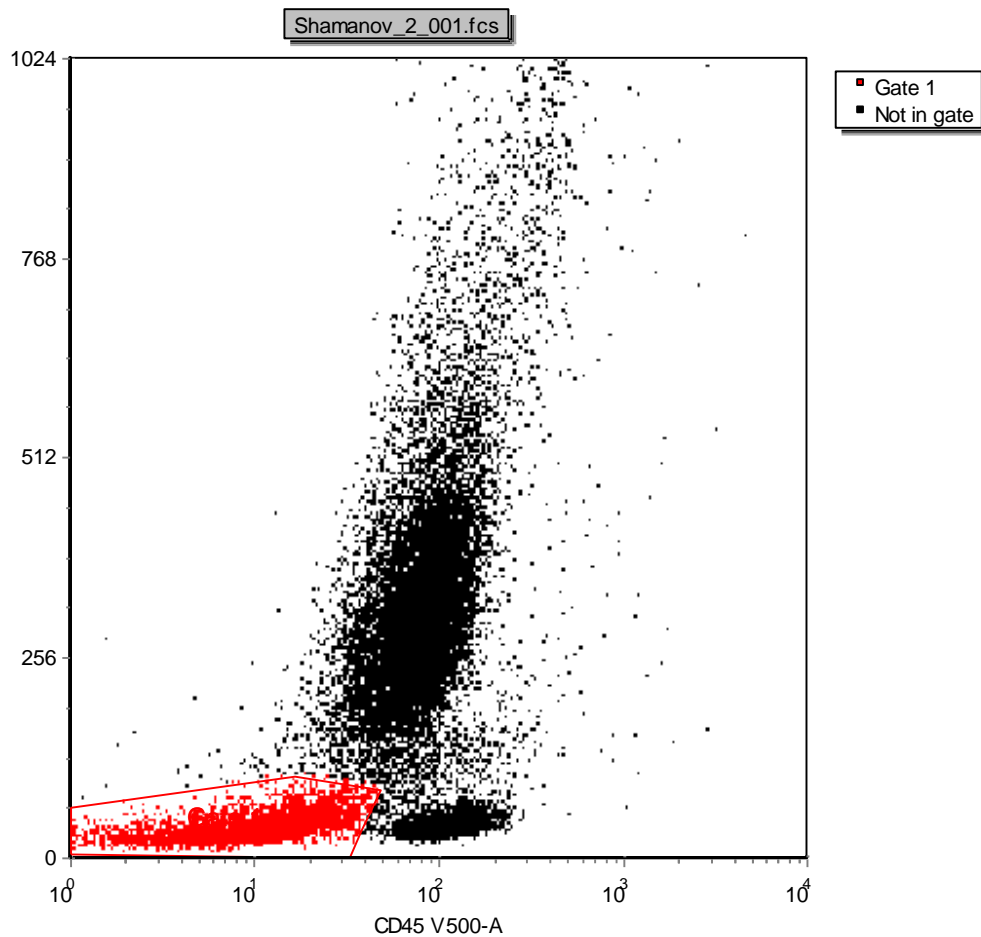


Рисунок 4.1.14. — Гейт CD45-негативных клеток костного мозга с низкими характеристиками SSC.

Как и следовало ожидать, большинство клеток в этом гейте CD36+CD71+, стрелками показано направление дифференцировки (рисунок 4.1.15).

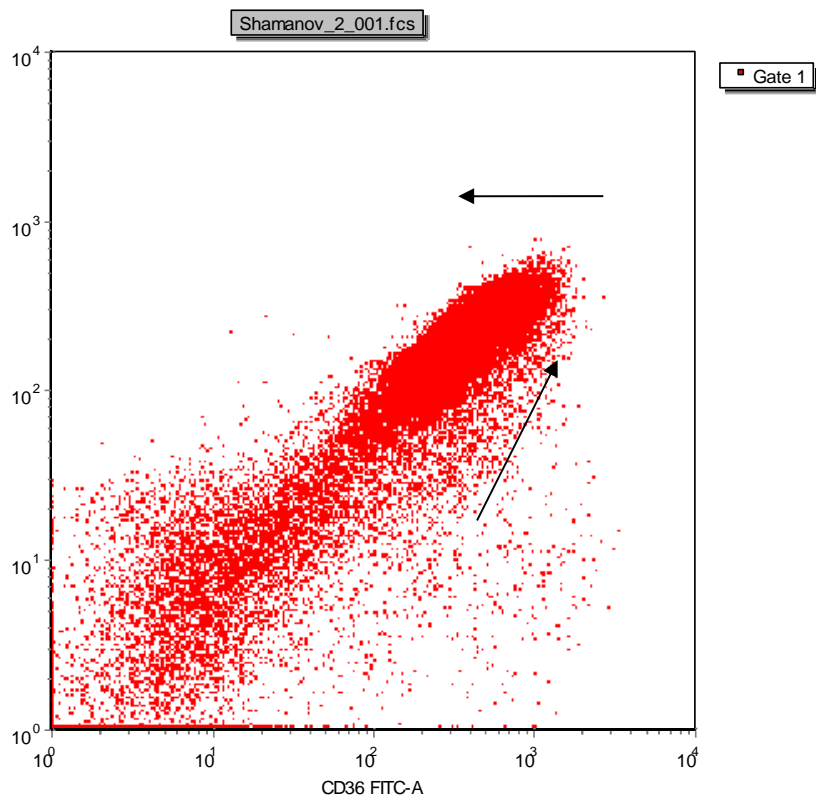


Рисунок 4.1.15. — Взаимоотношения между популяциями эритрокариоцитов, экспрессирующими CD36 и CD71.

Большой интерес с точки зрения дифференцировки эритрокариоцитов вызывает антиген CD105, появляющийся довольно рано в ходе эритроидного созревания.

Взаимоотношения этого антигена с антигеном CD36 характеризуются параллельным нарастанием, а затем снижением, рисунок 4.1.16.

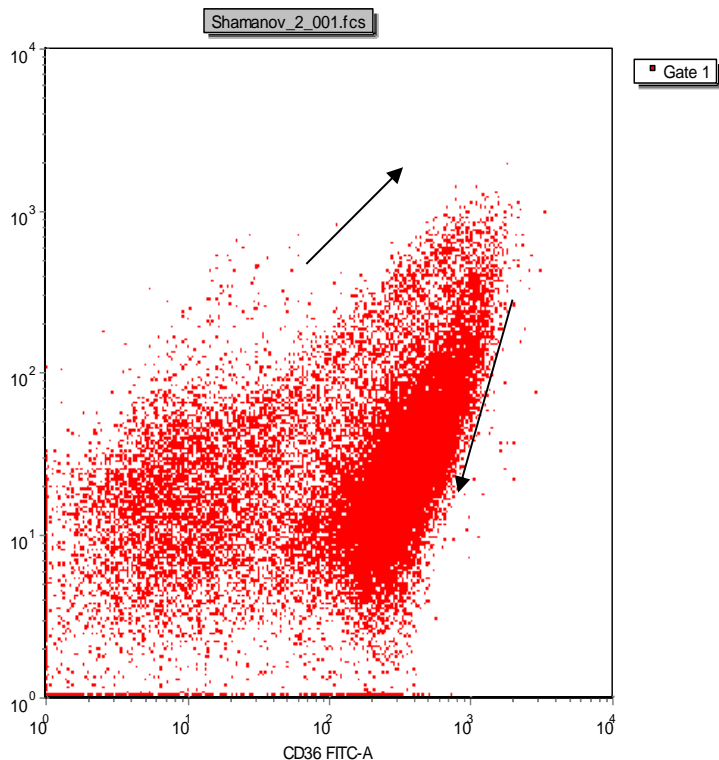


Рисунок 4.1.16. — Взаимоотношения между эритрокариоцитами CD36+ и CD105+ в ходе эритроидной дифференцировки.

Не меньший интерес представляет изменение состава эритрокариоцитов CD105+ с клетками, экспрессирующими трансферриновый рецептор CD71, рисунок 4.1.17.

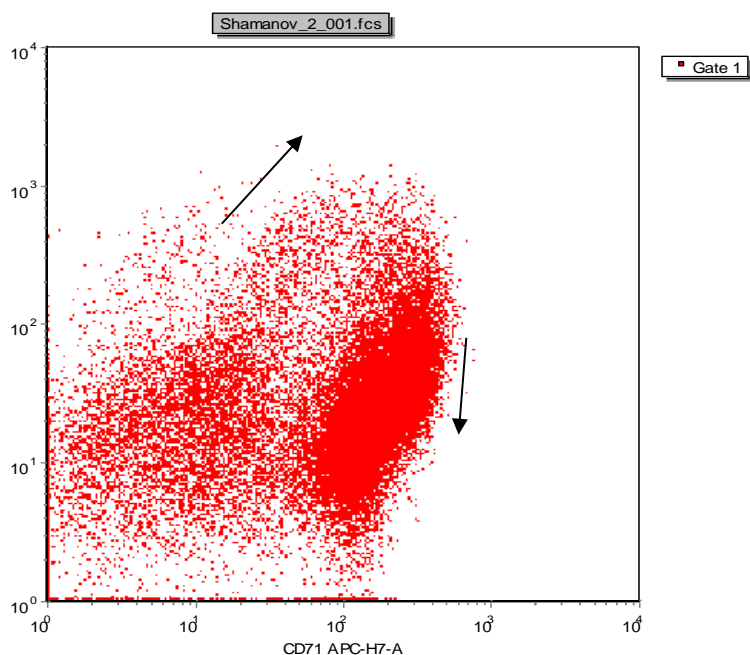


Рисунок 4.1.17. — Взаимоотношения между CD105-положительными и CD71-положительными эритрокариоцитами в ходе эритроидной дифференцировки.

Отчетливо видны популяции CD105+CD71-, CD105+CD71+ и CD105-CD71+ клеток. Наиболее важным является возможность дифференцировки основной массы эритрокариоцитов (CD71+) на 2 популяции (CD105+ - 7,5% и CD105- - 67,6%) и выделение в пределах CD71-негативных клеток популяции CD105-положительных (2,5%).

Эти данные свидетельствуют о возможности дополнительной характеристики эритрокариоцитов на основании CD105 (примерно 10% от эритрокариоцитов) и разделения фракции CD71+ клеток на 2 популяции.

Для подтверждения предположения о важной роли маркера CD105 в разделении полихроматофильных нормобластов и оксифильных нормобластов мы отобрали случаи с явным преобладанием фракции оксифильных нормобластов. Действительно в подобных случаях фракция CD105 положительных эритрокариоцитов выделялась наиболее отчетливо.

Пример. Больная Р., 28 лет. Диагноз: диффузная В-крупноклеточная лимфома. В миелограмме – клеточность снижена – $16 \times 10^3/\text{мкл}$. Гранулоцитарный ряд сужен. Число клеток красного ряда близко к верхней границе нормы – 28% (норма 14,5-26,5%). Пронормобласты – 0% (норма 0,2-1,1%); нормобласты базофильные – 1% (1,4-4,6%); нормобласты полихроматофильные 7,8% (8,9-16,9%); нормобласты оксифильные резко повышены – 19,2% при норме 0,8-5,6%.

Далее представляем цитометрические характеристики образца костного мозга больной, рисунок 4.1.18а.

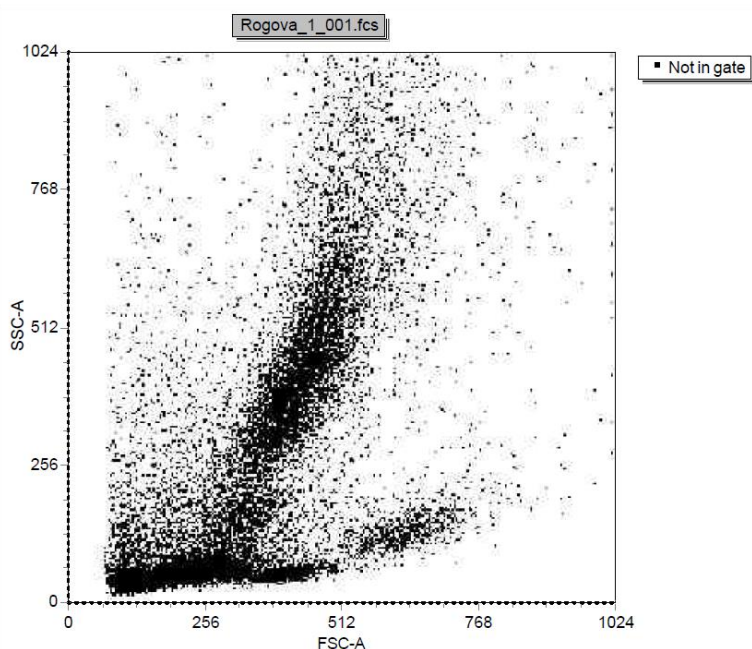


Рисунок 4.1.18а. — Характеристики светорассеяния клеток костного мозга больной Р.

Большинство клеток образца выглядело как нормальные ядродержащие клетки при окрашивании красителем Syto 16, рисунок 4.1.18б.

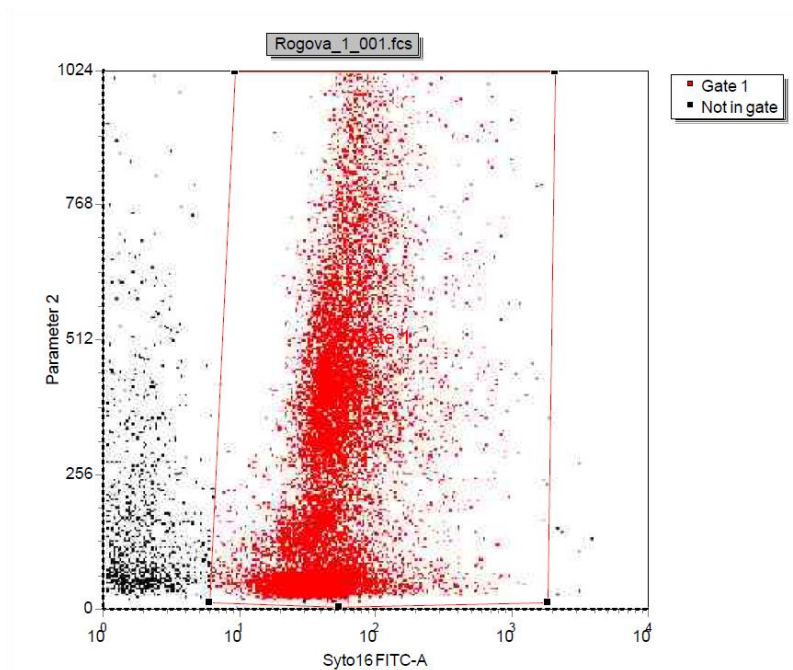


Рисунок 4.1.18б. — Оценка жизнеспособности клеток костного мозга больной Р. на основании окрашивания суправитальным красителем SYTO 16.

Распределение клеточных элементов в гейте Syto16+ по экспрессии гликофорина А свидетельствовало о наличии выраженной пропорции позитивных клеток (17,2%) с низкими характеристиками светорассеяния SSC (эритроидные элементы), рисунок 4.1.18в.

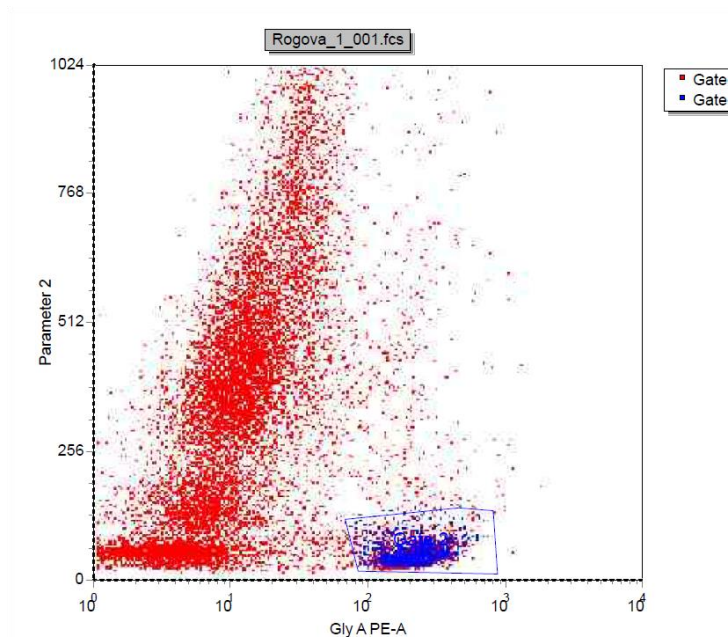


Рисунок 4.1.18в. — Пропорция гликофорин А-положительных клеток в гейте живых миелокариоцитов составляет 17,2%.

Маркер CD36 рекомендован консорциумом Еврофлоу для изучения ядродержащих клеток костного мозга вместо гликофорина А. Антитела к CD36 не взаимодействуют с эритроцитами. Количество клеток, выявляемых в костном мозге на основании экспрессии CD36, практически совпадало с количеством Гликофорин А положительных элементов – 19,2%, рисунок 4.1.18г.

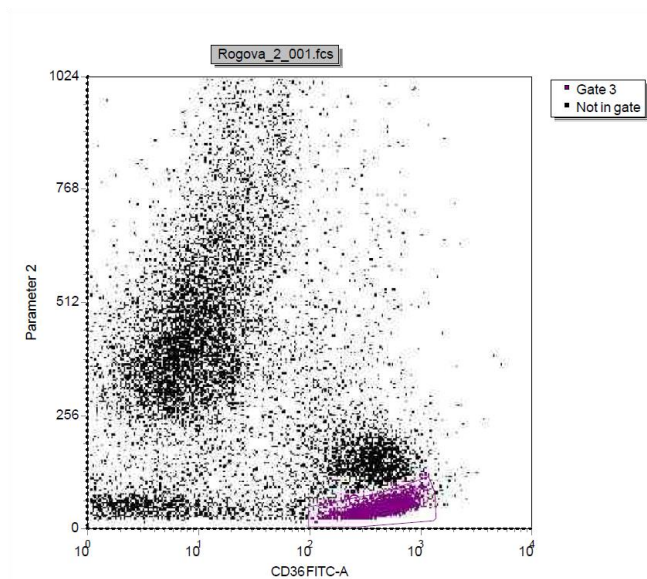


Рисунок 4.1.18г. — Экспрессия CD36 на клетках костного мозга с низкими характеристиками светорассеяния (SSC).

Практически все CD36-позитивные клетки с низкими характеристиками SSC были отрицательны по CD45, что типично для эритрокариоцитов, рисунок 4.1.18д.

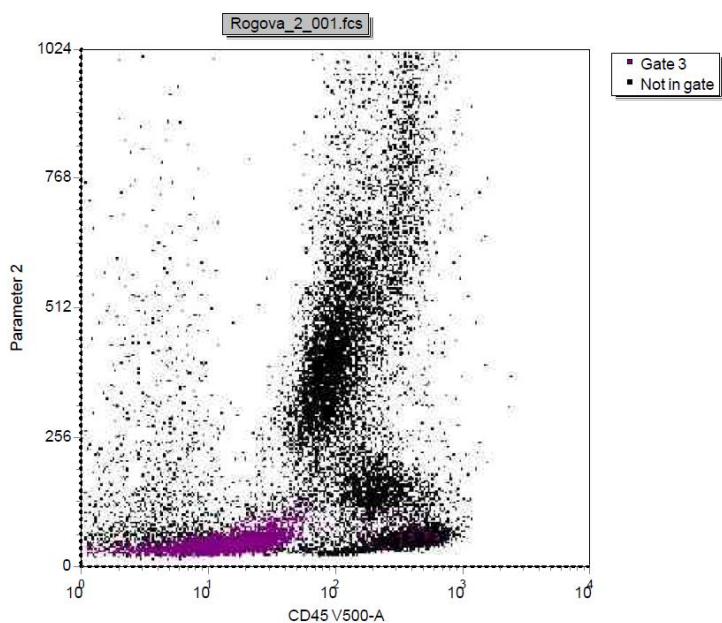


Рисунок 4.1.18д. — Отсутствие экспрессии CD45 на CD36-позитивных клеточных элементах костного мозга с низкими характеристиками SSC.

Объединение этих двух гейтов (CD45- и CD36+) позволяет идентифицировать доминирующую фракцию эритрокарицитов (рисунок 4.1.18е).

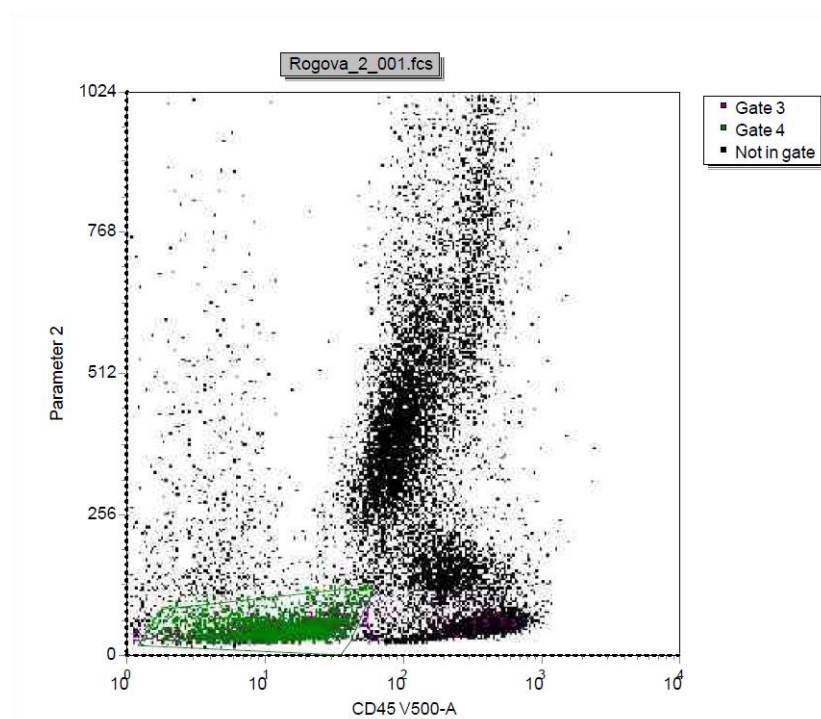


Рисунок 4.1.18е. — Зеленым цветом показан гейт CD45-CD36+ с низкими характеристиками SSC в костном мозге больной Р.

Дальнейшие исследования эритрокарицитов целесообразно проводить в этом гейте – CD36+CD45-.

Практически все клетки в этом гейте CD71-позитивны, лишь 2,2% негативны по экспрессии трансферринового рецептора, рисунок 4.1.18ж.

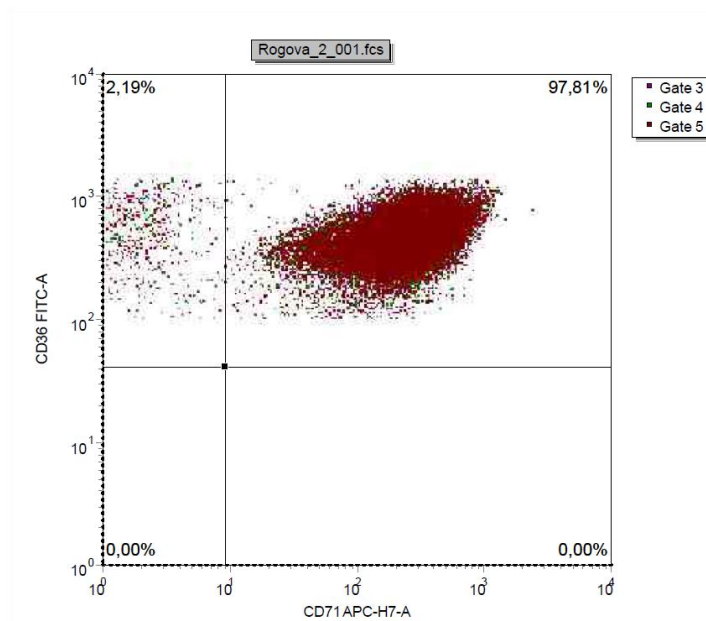


Рисунок 4.1.18ж. — Экспрессия CD71 на эритроидных клетках костного мозга с низкими характеристиками SSC и фенотипом CD36+CD45-.

Экспрессия CD105 в данном гейте (при использовании ранее применявшегося для CD71 уровня) составила 72%, рис. 4.1.18з.

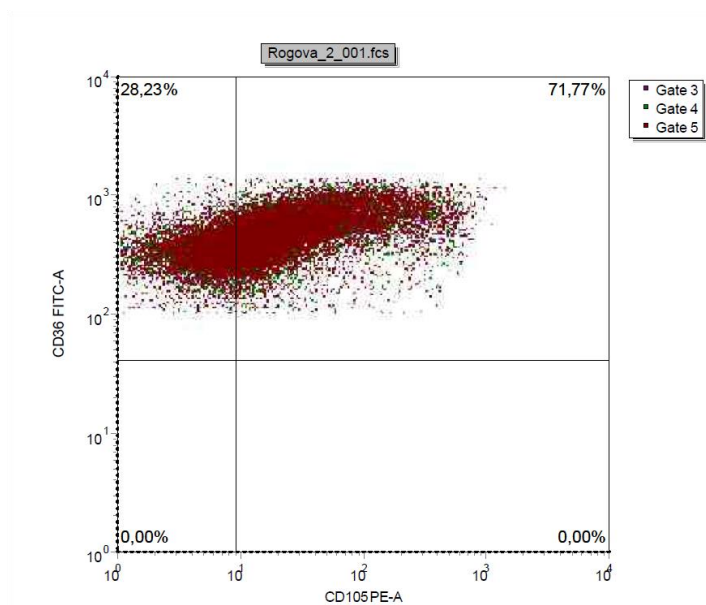


Рисунок 4.1.18з. — Экспрессия CD105 на CD36+CD45- клетках с низкими характеристиками SSC.

Коэкспрессия CD71 и CD105 в данном гейте (CD36+CD45-SSClow) (эритрокариоцитов) составила 69,6%, рис. 4.1.18и.

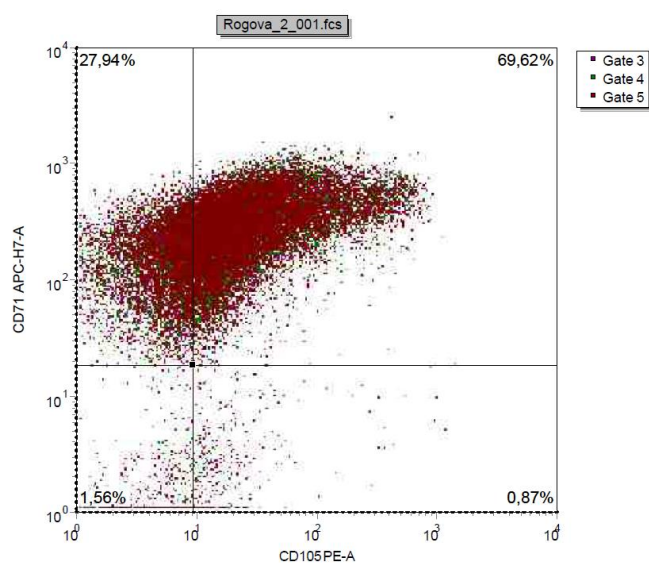


Рисунок 4.1.18и. — Коэкспрессия CD71 и CD105 в гейте эритрокариоцитов (CD36+CD45-SSClow).

Данный цитометрический способ позволяет выделять подгруппы в пределах эритрокариоцитов на основании существующих представлений о степени зрелости этих клеток, определяемой по сочетанию мембранных маркеров.

Очень важно, что маркер CD36 оказался информативным в идентификации эритрокариоцитов. Поскольку CD36 не экспрессирован на эритроцитах, то эти клетки не скажутся на изучении популяций CD36+ эритрокариоцитов. Мы оценили, насколько необходимо использовать маркер CD45 и ядерные красители для идентификации эритрокариоцитов. Оказалось, что 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, иными словами, использование CD45 в этих ситуациях не является обязательным.

Мы проанализировали корреляционные связи выделенной на основании экспрессии CD105 в пределах CD36 клеточной популяции. Наиболее сильные корреляционные связи отмечены с полихроматофильными номобластами ($R=0,756$; $p=0,001$; $n=17$) и с общим количеством эритрокариоцитов ($R=0,692$; $p=0,003$; $n=16$). Взаимосвязь с оксифильными формами была недостоверной ($R=0,420$; $p=0,105$; $n=16$).

Наличие четко выраженного пика экспрессии CD36, совпадающего с пиком CD105, не отражает терминальную дифференцировку миелокариоцитов. 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 4.1.19а).

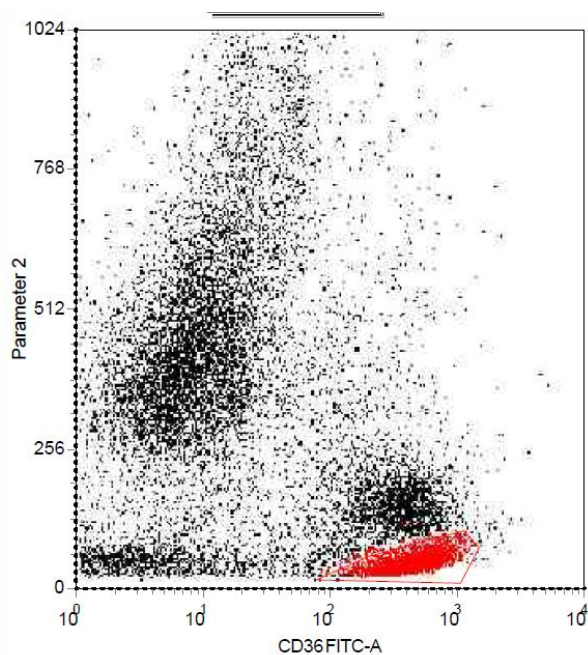


Рисунок 4.1.19а. — Выделение гейта CD36-позитивных клеток с низкими характеристиками SSC (эритрокариоциты).

Далее клетки в гейте CD36+ SSC^{low} размещаем в осях координат CD105 vs CD71 (рисунок 4.1.19б).

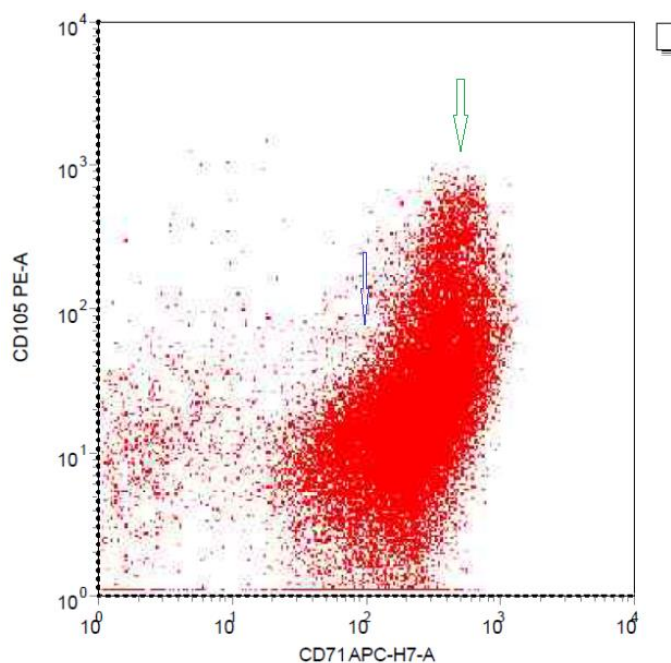


Рисунок 4.1.19б. — Взаимоотношения между клетками, экспрессирующими CD71 и CD105, в гейте эритрокариоцитов (CD36+ SSClow). Стрелка зеленого цвета показывает пик наиболее яркой экспрессии CD71, стрелка синего цвета показывает пик более слабой экспрессии CD71 на клетках со сниженной интенсивностью CD105.

Видно, что пики наиболее яркой экспрессии антигенов CD105 и CD71 практически совпадают. А далее по мере дифференцировки эритрокариоцитов уровень экспрессии CD71 снижается (сдвигается влево).

Выделяем гейт вокруг более слабо экспрессирующих CD71 клеток (пик экспрессии CD71 на этой популяции показан стрелкой синего цвета), рисунок 4.1.19в.

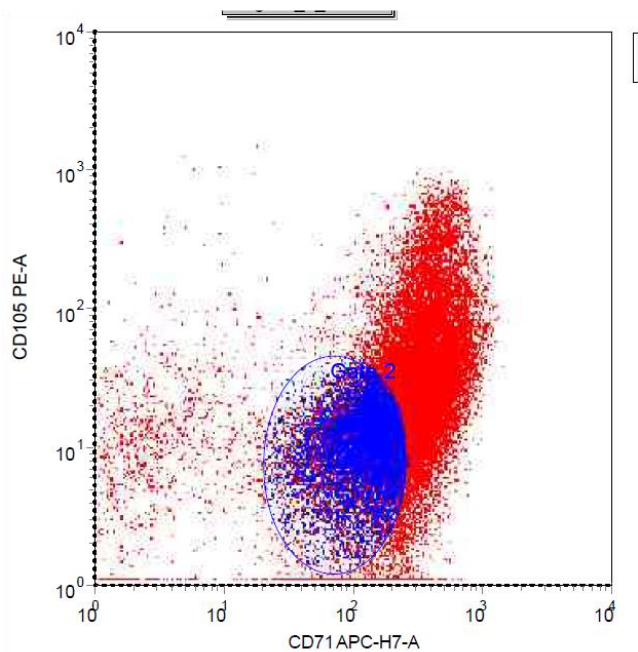


Рисунок 4.1.19в. — Выделение в пределах эритрокариоцитов гейта со слабой экспрессией CD71 и CD105 (иммунологически более зрелые формы).

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 4.1.19г).

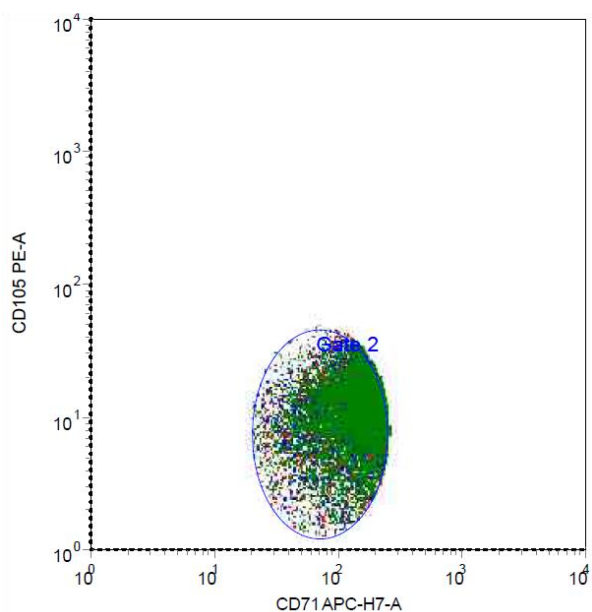


Рисунок 4.1.19г. — Более зрелые клетки в пределах эритрокариоцитов.

Если рассмотреть эти клетки в гейте всех CD36-позитивных клеток, то, очевидно, что уровни CD36 на этих клетках более низкие (рисунок 4.1.19д).

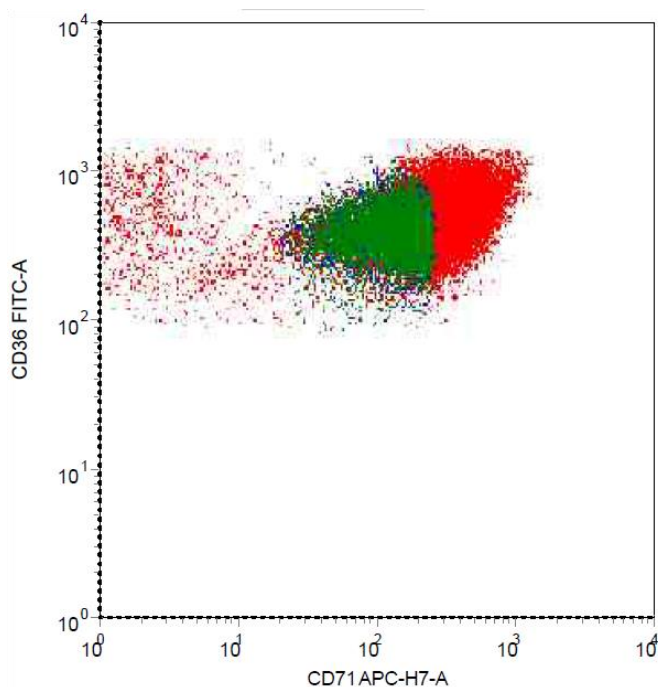


Рисунок 4.1.19д.— Гейт CD71^{low} CD105^{low} эритрокариоцитов (окрашен зеленым цветом). Эти клетки также имеют несколько более слабую экспрессию CD36, что типично для эритрокариоцитов поздних стадий дифференцировки.

Далее распространяем гейт на все CD36^{low} клетки (рисунок 4.1.19е).

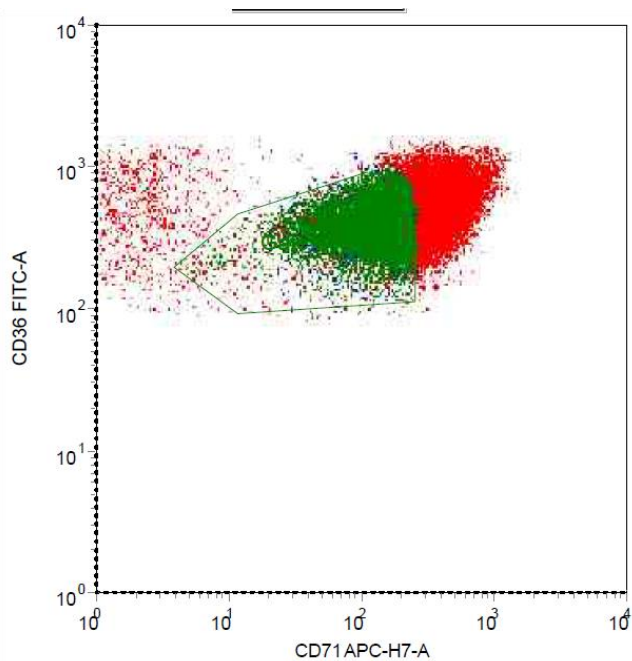


Рисунок 4.1.19е. — распространяем гейт на все CD36 low эритрокарициты.

Далее объединяем гейты 3 и 4 с тем, чтобы в итоговом гейте были все интересующие нас более зрелые эритрокарициты — CD36lowSSClowCD105lowCD71low. Эти клетки показаны на рисунке 4.1.19ж.

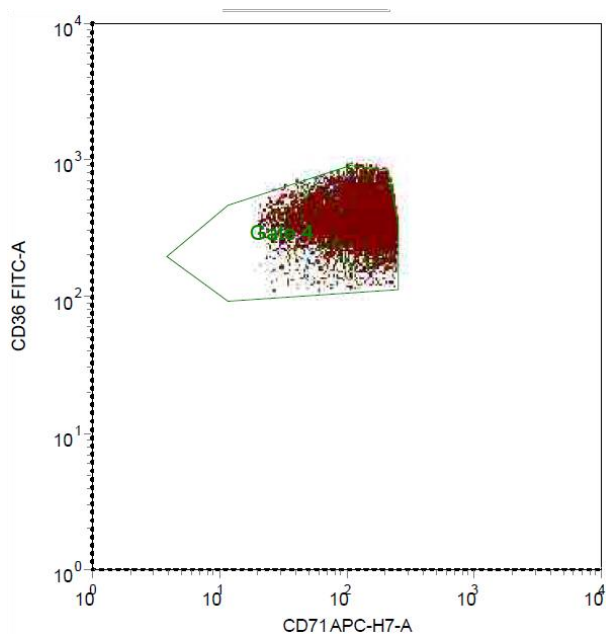


Рисунок 4.1.19ж. — Зрелые (по данным иммунофенотипирования) эритрокарициты в координатах CD36/CD71.

По данным проточной цитометрии процент более зрелых эритрокариоцитов от миелокариоцитов в представленном на примерах случае составил 7,48%, а все эритроидные клетки – 18,88%.

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.

Мы проанализировали корреляционные связи выявляемой на основании проточно-цитометрических данных популяции наиболее зрелых эритрокариоцитов с морфологическим составом эритроидных клеток в миелограмме. Достоверной связи с базофильными формами не отмечено ($R=0,481$; $p=0,069$; $n=15$). Не было абсолютно никакой связи с 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 ($R=0,43$, $n=15$), однако, она не была достоверной ($p=0,11$).

Совершенно очевидно, что в данном случае из числа морфологически распознаваемых форм эритрокариоцитов большая связь наблюдается с оксифильными нормобластами в сравнении с полихроматофильными нормобластами. Следует отметить, что полного совпадения данных проточной цитометрии с данными морфологического исследования практически никогда не наблюдается и с другими клеточными типами (лимфоциты, бласты, плазматические клетки и т.д.) – это разные методы. Тем не менее, 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.

РЕЗЮМЕ

Нарастание процентного содержания оксифильных нормобластов в миелограмме больных ДВКЛ является достаточно типичным признаком и наблюдается у большинства больных – 83,3%. Этот признак имеет прогностическое значение. Больные с нормальным процентом оксифильных нормобластов имеют лучшие показатели выживаемости, чем больные с повышенным содержанием этих клеток. При сроках наблюдения за больными более двух лет прогностическая роль данного неблагоприятного признака (нарастание пропорции оксифильных нормобластов) становится достоверной.

Это послужило основанием для проведения углубленного изучения эритропоэза у 30 больных ДВКЛ. Мы использовали наряду с традиционными также самые современные подходы для идентификации эритрокариоцитов и установления степени их дифференцировки. Эти современные подходы впервые были предложены Европейским консорциумом Еврофлоу и опубликованы в Журнале *Leukemia* в 2012 году [84]. В основу положен принцип многоцветной проточной цитофлуориметрии, используемый для диагностики эритробластных лейкозов.

Мы оценили возможность использования гликофорина А наряду с ядерными красителями для выделения пула эритроидных клеток и его дальнейшей детализации (ядерные красители необходимы, так как гликофорин А экспрессирован помимо эритрокариоцитов также и на эритроцитах). Использован целый ряд наиболее информативных характеристик эритроидной дифференцировки: маркеры незрелых клеток – слабая экспрессия CD45, наличие на мембране антигенов CD34, CD117, HLA-DR; наиболее типичные для эритрокариоцитов антигены гликофорин А, трансферриновый рецептор CD71, антигены CD105 и CD36, а также ряд дополнительных антигенов – CD123, CD9 и т.д.

Отработана методика идентификации эритрокариоцитов на основании гликофорина А, слабой экспрессии CD45, наряду с ядерными красителями

SYTO16, SYTO 43. Установлены изменения экспрессии антигенов ранних этапов дифференцировки эритрокариоцитов в координатах Гликофорин A/ CD71. Показана важная роль экспрессии CD105 для дальнейшей детальной характеристики степени зрелости эритрокариоцитов.

Наиболее плодотворным оказался подход, основанный на использовании маркера CD36 для идентификации всего пула эритроидных предшественников среди клеток с низкими характеристиками светорассеяния SSC. Как оказалось практически все эти клетки имели низкие уровни экспрессии CD45, так что использование данного маркера (CD45) можно было исключить. Снижение уровней экспрессии CD105 и CD71 в гейте клеток CD36+ SSC^{low} характеризует наиболее зрелую популяцию эритрокариоцитов. Интересно отметить, что уровни экспрессии CD36 на этих клетках также были более низкими. Таким образом, идентификация наиболее зрелой клеточной популяции эритрокариоцитов – CD36^{low} SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} – целесообразна для установления степени дифференцировки эритрокариоцитов. Именно эта фракция в большей степени коррелировала с морфологически распознаваемыми оксифильными нормобластами.

Проведенные исследования важны для более детального понимания процессов дифференцировки эритрокариоцитов у больных ДВКЛ, так как изменения созревания, заключающиеся в накоплении оксифильных нормобластов, находят отражение в клиническом течении и прогнозе пациентов. В частности, выживаемость у этих больных при сроках наблюдения более двух лет достоверно более короткая в сравнении с больными, имеющими нормальные соотношения различных морфологически распознаваемых эритрокариоцитов.

ГЛАВА 5. КЛИНИКО-ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ МРБ ПРИ ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ.

Поражение костного мозга при ДВКЛ относится к числу неблагоприятных факторов прогноза. Как мы уже отмечали в литературном обзоре, 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 5.1.

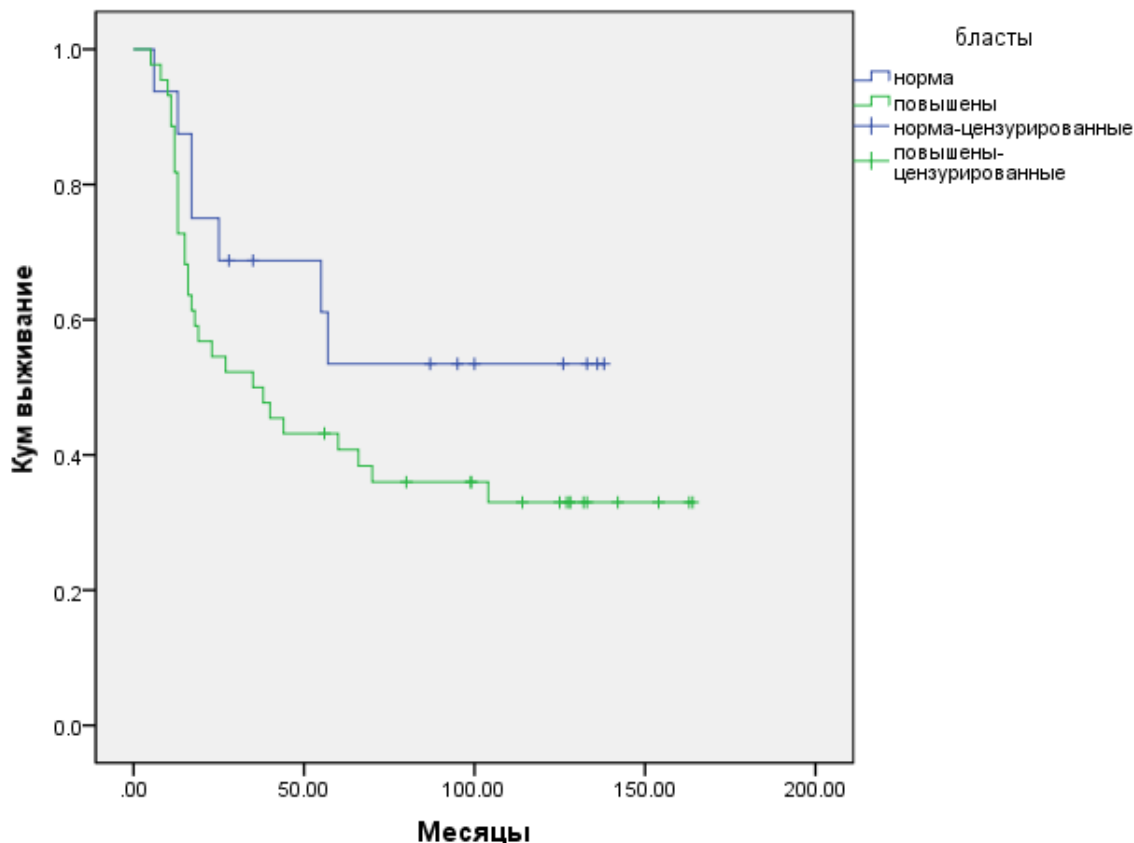


Рисунок 5.1. — Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от содержания бластных клеток в миелограмме (синяя линия – нормальные уровни бластных клеток; зеленая линия – повышение уровни бластных клеток до 1% и выше).

Хотя данные относительно выживаемости не достоверны, однако, кривые существенно расходятся и выживаемость больных, имеющих повышенный процент бластов, значительно хуже. Мы оценили взаимосвязь данного признака с распространенными стадиями заболевания. Оценка взаимосвязи на основании критерия сопряженности признаков приведена в таблице 5.1. Как видно, из представленных в таблице данных, признаки не являются взаимосвязанными ($p=0,26$). Хотя частота случаев с повышенным бластозом была несколько выше при поздних стадиях (78% и 65%), достоверных данных не получено.

Таблица 5.1. — сопряженность двух признаков (стадии ДВКЛ и повышенного бластоза в костном мозге) у больных ДВКЛ.

Стадия	Частота, %	Процент бластов		Итого
		<1%	>=1%	
I/II	Количество,	8	15	23
	% в стадии I/II	34,8%	65,2%	100,0%
III/IV	Количество,	8	29	37
	% в стадии III/IV	21%	78,3%	100,0%
Итого	Количество	16	44	60
	% %	26,7%	73,3%	100,0%

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 предыдущей главе).

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. Анализ прогностической значимости этого типа клеток костного мозга при ДВКЛ выявил интересные данные. 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, $p=0,015$. Данные представлены на рисунке 5.2.

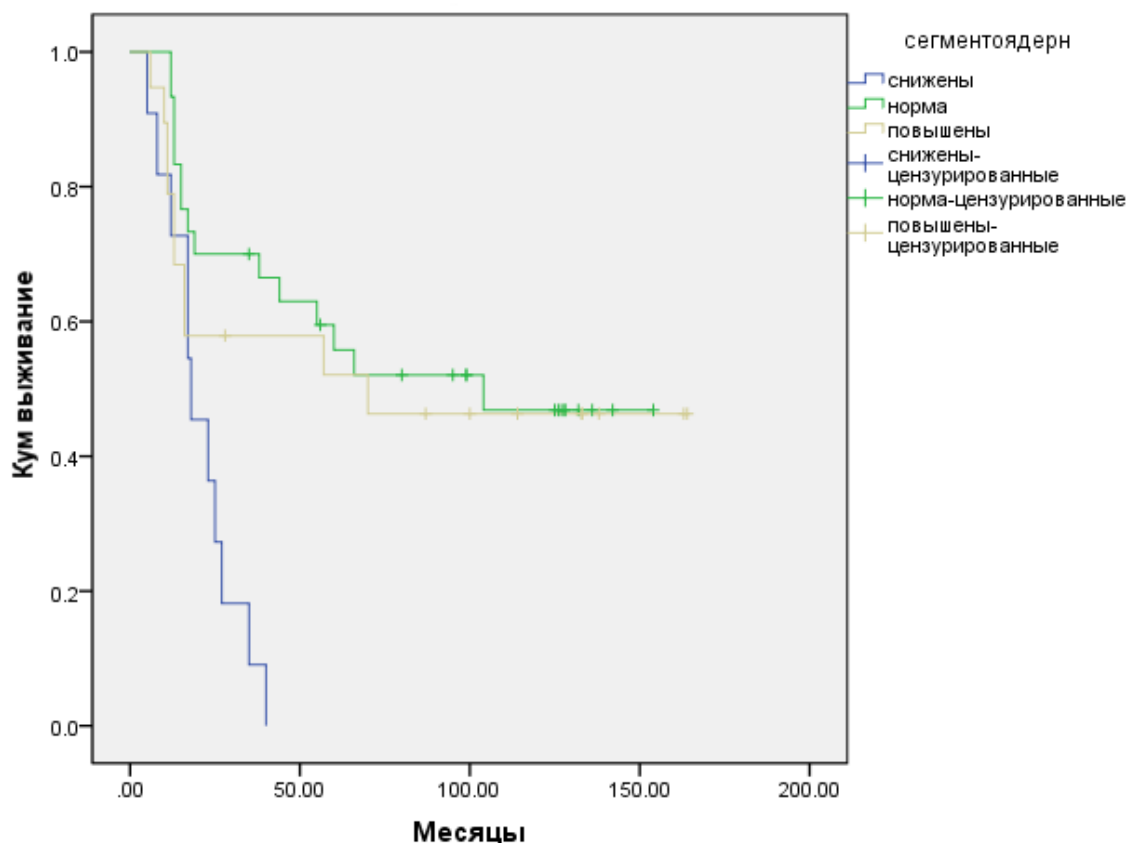


Рисунок 5.2. — Кумулятивные кривые общей выживаемости больных ДВКЛ в зависимости от содержания сегментоядерных нейтрофилов в миелограмме (синяя линия – снижение уровни сегментоядерных нейтрофилов; зеленая линия – нормальные; серая линия – повышение).

Мы проанализировали взаимосвязь между уровнями сегментоядерных нейтрофилов в миелограмме и стадиями ДВКЛ. В 91% случаев снижения сегментоядерных нейтрофилов в миелограмме наблюдались поздние (III/IV) стадии ДВКЛ, взаимосвязь была близка к достоверной (Хи-квадрат=5,72; $p=0,057$). 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.

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

Нами использованы 3 пробы для детального изучения В-клеточного звена костного мозга методом проточной цитометрии, таблица 5.1.1.

Таблица 5.1.1. — 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	-	-	каппа	лямбда	CD19	-	-	-

Во-первых, необходимо оценить возможность определения клональности В-лимфоцитов костного мозга у больных ДВКЛ. Следует отметить, что в стандартной постановке иммунологических реакций (таблица 5.1.1) мы использовали конъюгат антител к каппа-цепям иммуноглобулинов человека, меченый флуоресцеин-изтиоцианатом (FITC), а к лямбда-цепям – фикоэритрином (PE). Простое использование этих конъюгатов в сочетании с антителами к В-клеткам (CD19), как правило, мало информативно. Это обусловлено тем, что наряду со зрелыми В-лимфоцитами в костном мозге присутствует выраженная

пропорция В-линейных предшественников негативных в отношении мембранных иммуноглобулинов. В этих случаях оценка клональности в пределах популяции CD19+ лимфоцитов представляется сложной ввиду разбавления В-клеток В-линейными предшественниками.

По этой причине целесообразно включение в панель определения клональности В-лимфоцитов маркеров, отражающих зрелость лимфоидных клеток. Мы использовали антитела к CD45 (позволяют исключить из анализа клетки-предшественники на основании более слабой экспрессии на них антигена) и CD20 (мембранный CD20 экспрессирован на всех зрелых В-клетках и лишь на небольшой пропорции предшественников). Сочетание этих 2 маркеров на мембране клетки характерно для зрелых В-лимфоцитов. Используемые антитела и флуорохромы представлены в таблице 5.1.2.

Таблица 5.1.2. — Панель моноклональных антител, использованная для оценки моноклональности зрелых В-клеток костного мозга больных ДВКЛ.

№ пробы	V450	V500	FITC	PE
1	CD20	CD45	Каппа	Lambda

Данное сочетание антигенов (CD45, CD20, каппа-цепи, лямбда-цепи) использовано при исследовании В-лимфоцитов костного мозга 6 больных ДВКЛ.

Приводим примеры различных вариантов экспрессии каппа и лямбда цепей на В-лимфоцитах костного мозга больных ДВКЛ.

Пример поликлональной реакции.

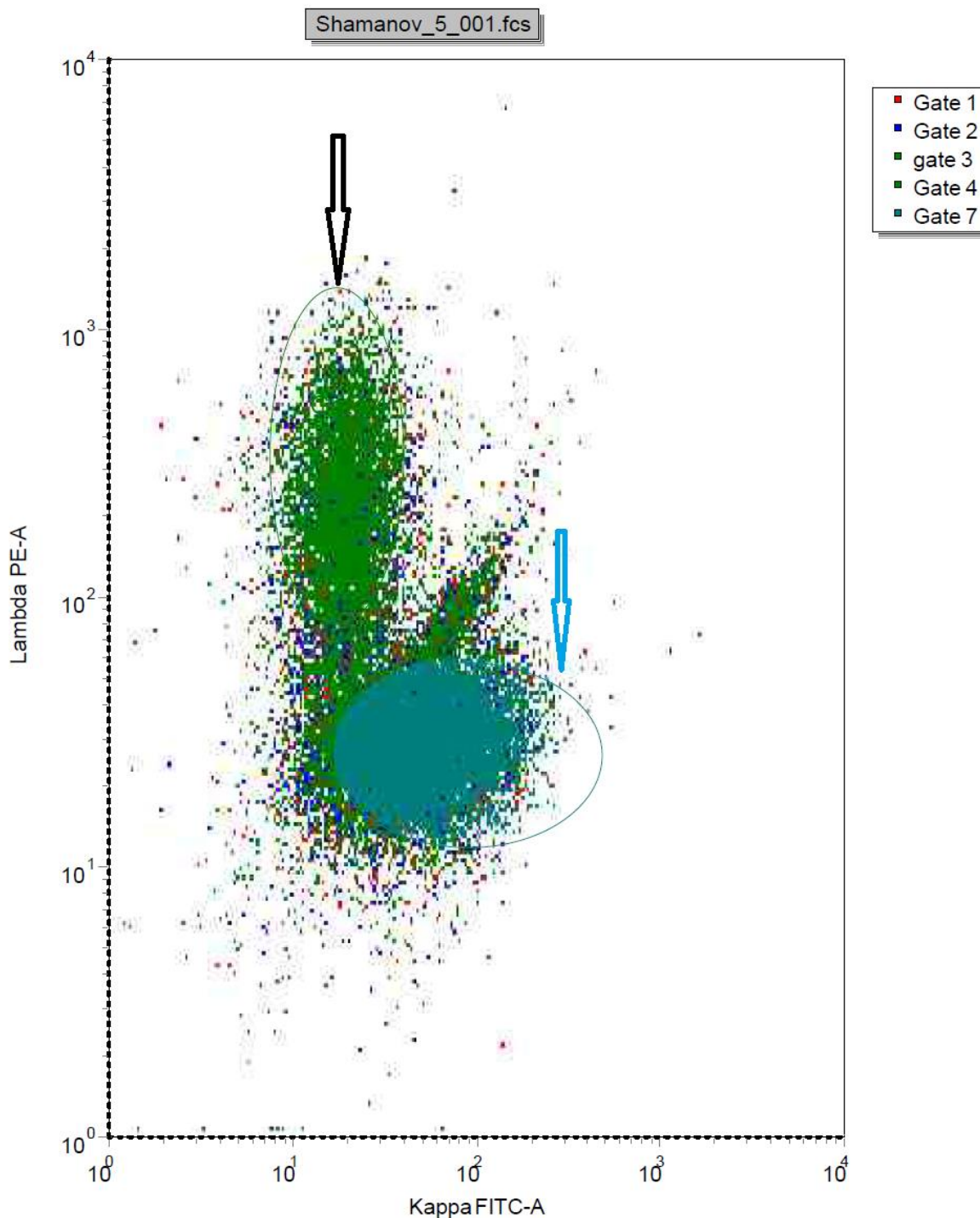


Рисунок 5.1.1. — Экспрессия каппа и лямбда полипептидных цепей иммуноглобулинов на зрелых В-лимфоцитах (CD45++ CD20+) костного мозга больного ДВКЛ. Лямбда цепи присутствуют на 22,4% В-лимфоцитов, овал показан стрелкой черного цвета. Каппа цепи – на 55,3% клеток, показано стрелкой голубого цвета. Реакция поликлональна.

Следующий пример иллюстрирует пример В-лимфоцитов с наличием явной тенденции к моноклональности по лямбда цепям мембранных иммуноглобулинов.

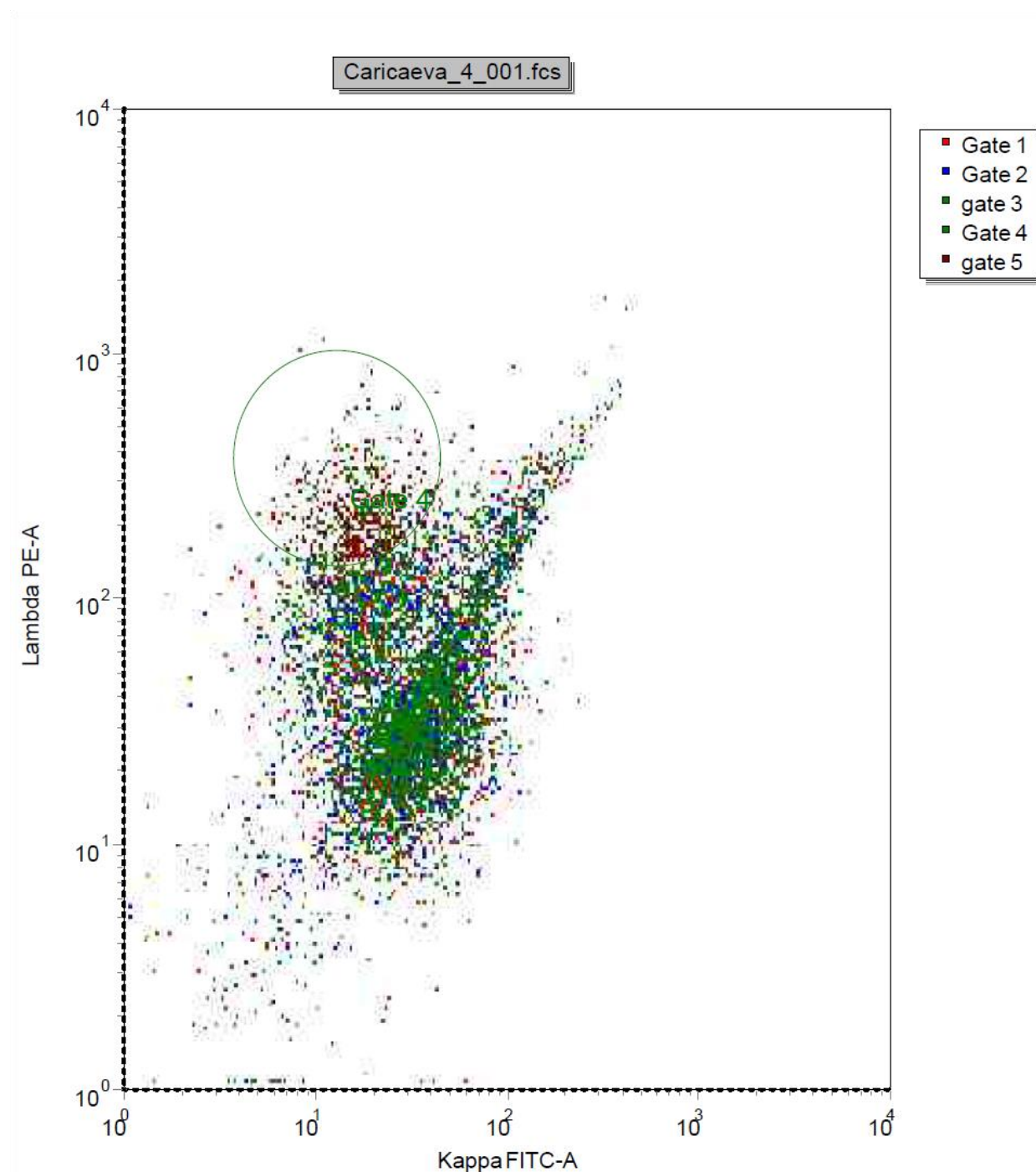


Рисунок 5.1.2. — Тенденция к моноклональности легких цепей Ig по лямбда типу. Часть клеток имеют выраженную экспрессию (++) лямбда цепей. Обведены овалом. Видно, что в пределах этих клеток присутствует отчетливая пропорция крупных клеток, как показано на рис. 5.1.3.

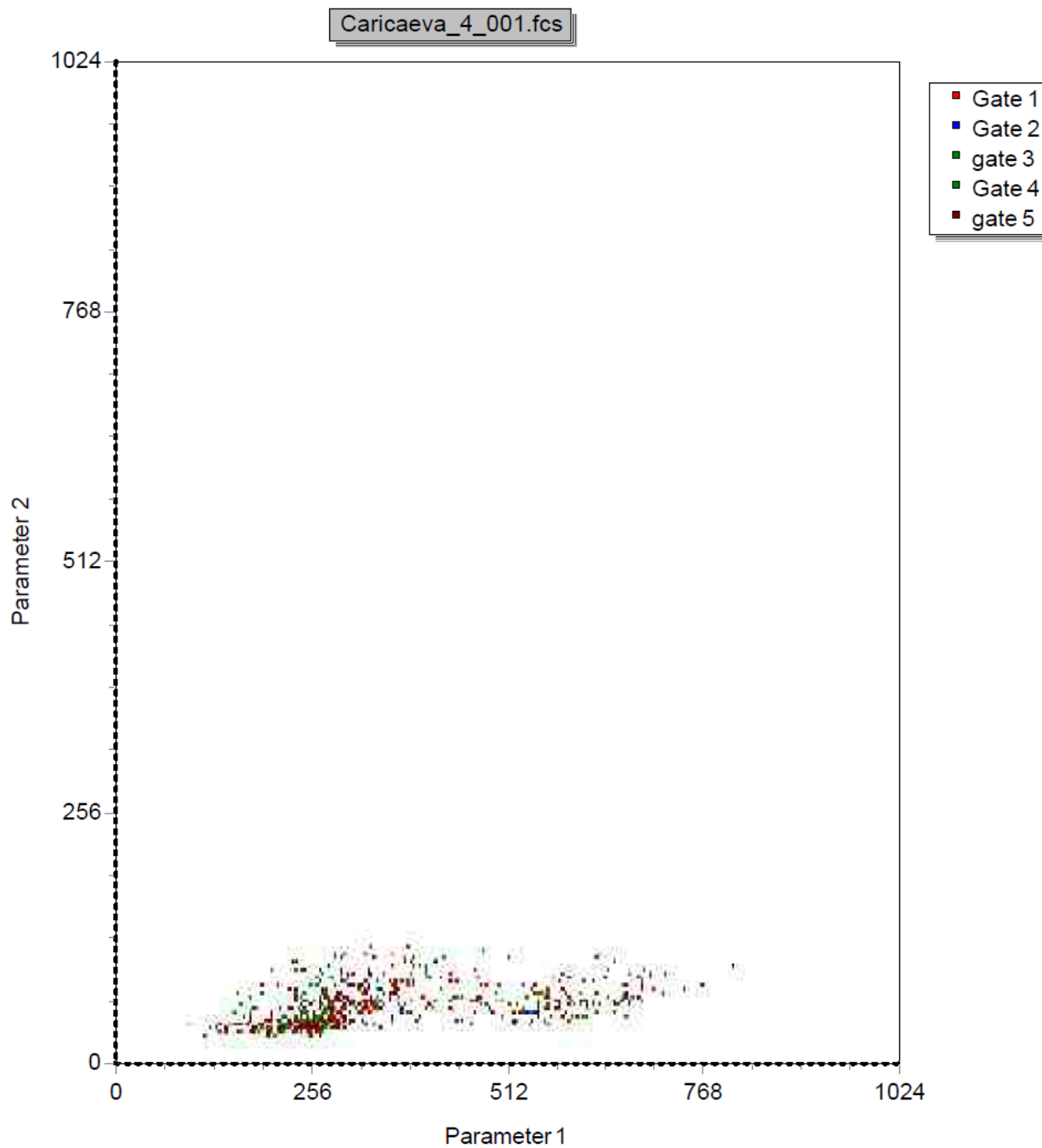


Рисунок 5.1.3. — Характеристики светорассеяния В-клеток костного мозга больной ДВКЛ. Видно, что в пределах клеток, гиперэкспрессирующих лямбда цепи (обведены овалом на рис. 5.1.2), присутствует пропорция крупных клеток с большими значениями параметра 1 (соответствует FSC – прямому рассеянию света лазерного луча).

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. В этом случае для оценки клональности мы применили антитела меченые APC-H7 и APC, таблица 5.1.3.

Таблица 5.1.3. — Панель моноклональных антител для оценки моноклональности зрелых CD5-негативных В-лимфоцитов костного мозга.

№ пробы	V500	FITC	PE	APC	APC-H7
1	CD45	CD5	CD20	каппа	lambda

Подобный подход был реализован у 7 больных ДВКЛ и оказался весьма успешным. Последовательность гейтирования была такова: CD45++ лимфоидные клетки (низкое SSC), CD20+ В-лимфоциты, CD5+ В-лимфоциты. Далее берем гейт CD5-негативных лимфоцитов, в котором присутствуют зрелые В-клетки – CD20+ CD45++ CD5-. В этом гейте оцениваем клональность В-клеток по каппа или лямбда полипептидным цепям иммуноглобулинов. 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.

Пример клональности В-клеток костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме представлен на рис. 5.1.4.

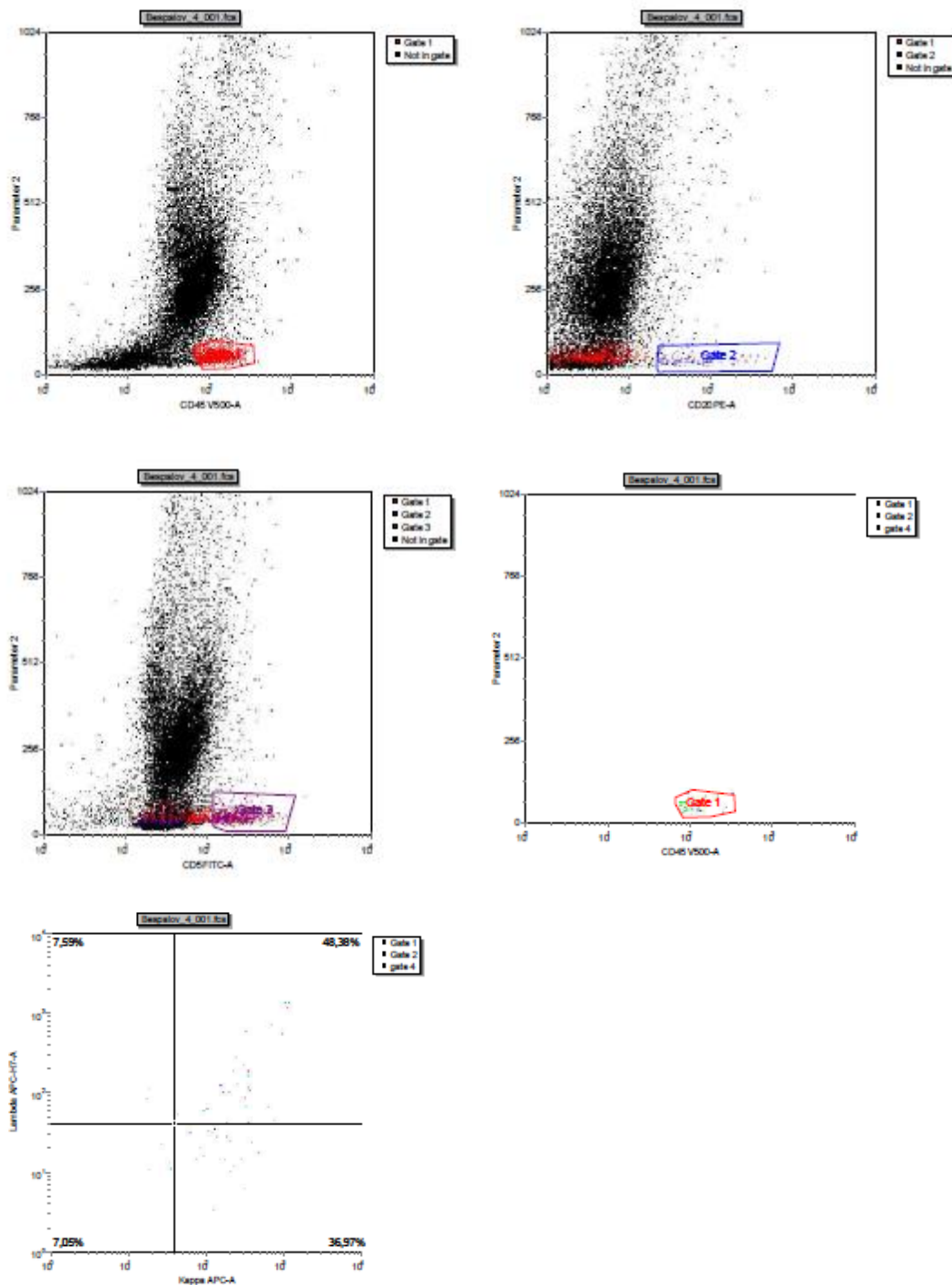


Рисунок 5.1.4. — Зрелые В-клетки (CD45++CD20+CD5-) костного мозга больного ДВКЛ моноклональны по каппа цепям Ig: Каппа+ В-лимфоциты – 37%, Лямбда+ - 7,6%.

Другой пример представлен на рисунке 5.1.5.

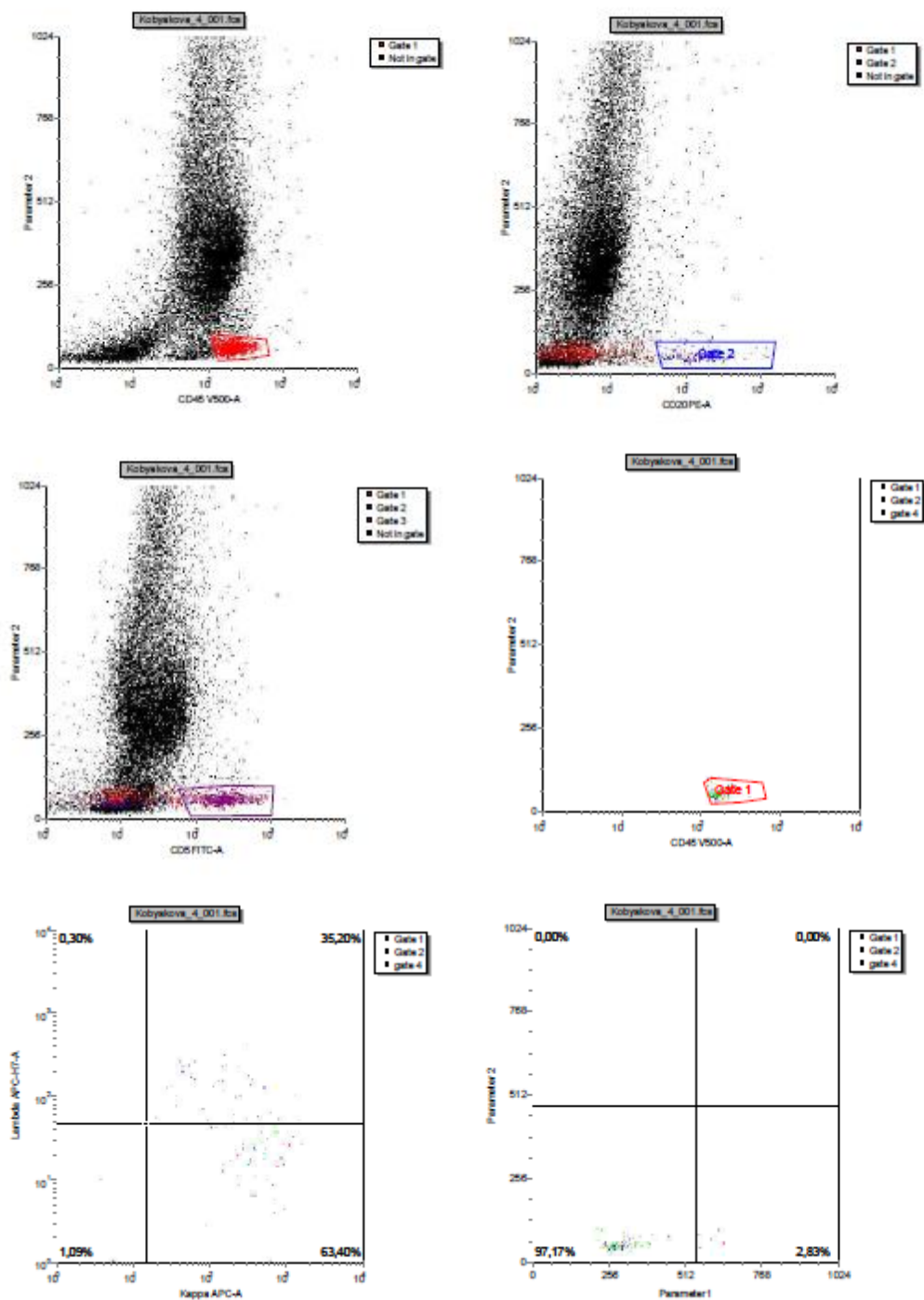
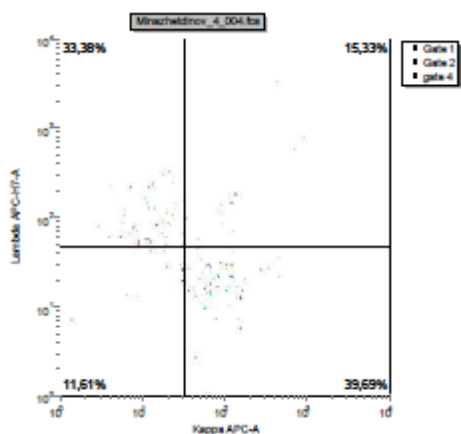


Рисунок 5.1.5. — Моноклональность мембранных иммуноглобулинов В-клеток костного мозга больного ДВКЛ по каппа-типу. Интересно отметить, что большинство этих клеток не выглядели крупными в проточно-цитометрическом анализе.

На рис. 5.1.6 приведены примеры поликлональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.



Другой пример.

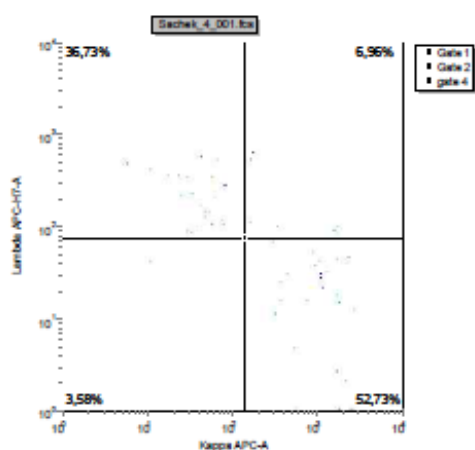


Рисунок 5.1.6. — Примеры поликлональности зрелых В-клеток (CD45++ CD20+ CD5-) костного мозга больных ДВКЛ по каппа и лямбда цепям мембранных Ig.

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

Общая панель для исследования В-лимфоцитов, представленная в таблице 5.1.1., 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, CD9). А также уровень зрелости клеток на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45.

Остановимся на анализе каждого из маркеров.

CD19. Среднее содержание зрелых В-лимфоцитов в костном мозге больных ДВКЛ среди CD45+ лимфоцитов составило $8,4 \pm 1,4\%$ (диапазон от 0,8 до 22,8%). В приведенном на рис. 5.1.7 примере содержание В-клеток высокое - 22,8%.

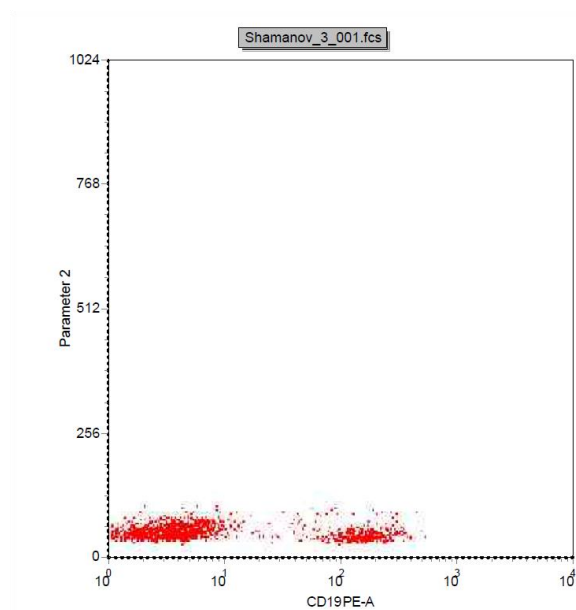


Рисунок 5.1.7. — CD19+ В-клетки костного мозга больного ДВКЛ.

Уровень CD22+ лимфоцитов у этого больного был аналогичным – 23%, рис. 5.1.8. В целом по группе $9,1 \pm 1,6\%$ (0,17-23,0%).

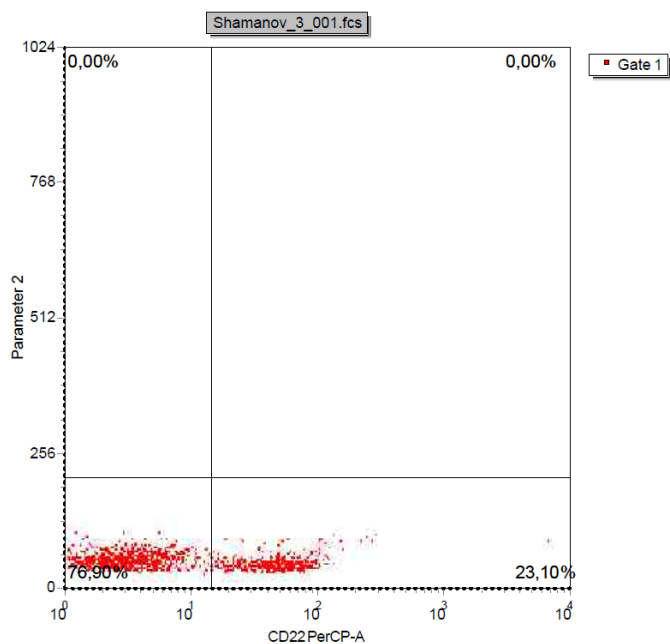


Рисунок 5.1.8. — Экспрессия CD22 на В-клетках костного мозга больного ДВКЛ.

Аналогичные значения у данного больного отмечены и для CD20 – 22,0%, рис. 5.1.9. В целом по группе $8,3 \pm 1,4\%$ (0,04-22,0%).

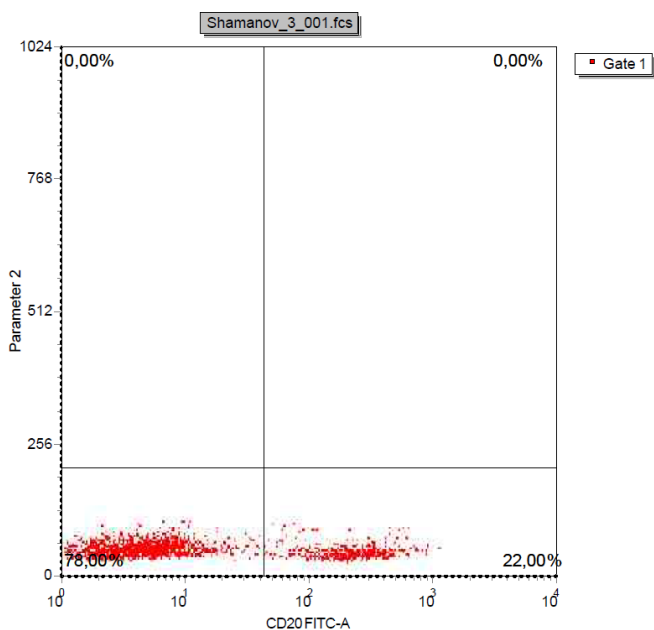


Рисунок 5.1.9. — CD20-позитивные В-лимфоциты костного мозга у больного ДВКЛ.

Содержание CD24+ клеток у данного больного было более низким – 9,8%, рис.5.1.10. В целом по группе $7,2 \pm 1,6\%$ (0,06-22,1%).

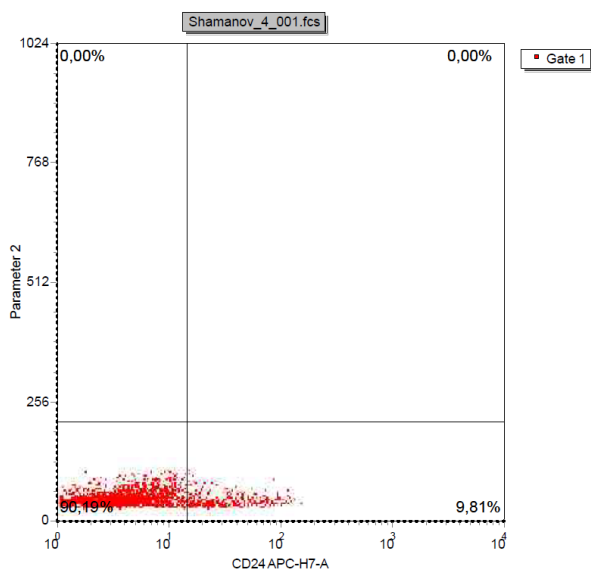


Рисунок 5.1.10. — Экспрессия CD24 на В-клетках костного мозга больного ДВКЛ.

При оценке экспрессии антигена CD24 гейтирования по CD45 было недостаточно (перекрест с Т-клетками), поэтому использовали в CD45+ гейте оси CD19 и CD24. Практически все CD19+ клетки были CD24-позитивны, рисунок 5.1.11.

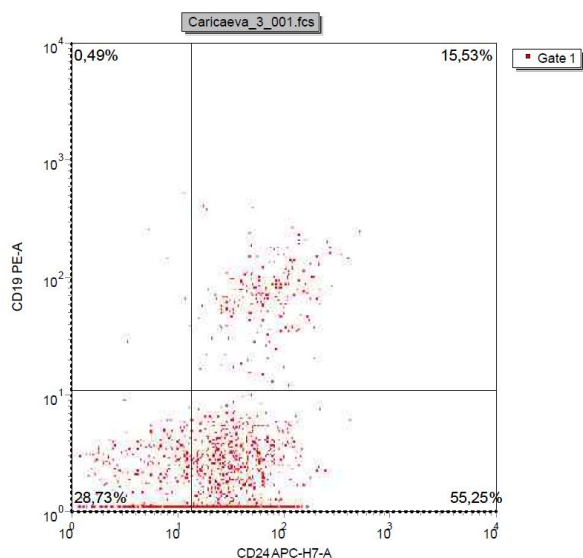


Рисунок 5.1.11. — Экспрессия CD24 на всех В-клетках (CD19+) костного мозга больного ДВКЛ.

Количество CD21+ лимфоцитов со слабой экспрессией в иллюстрируемом случае (рис. 5.1.12) соответствовало CD19 – 22,9%. В целом по группе – $6,6 \pm 1,7\%$ (0,08-22,9%).

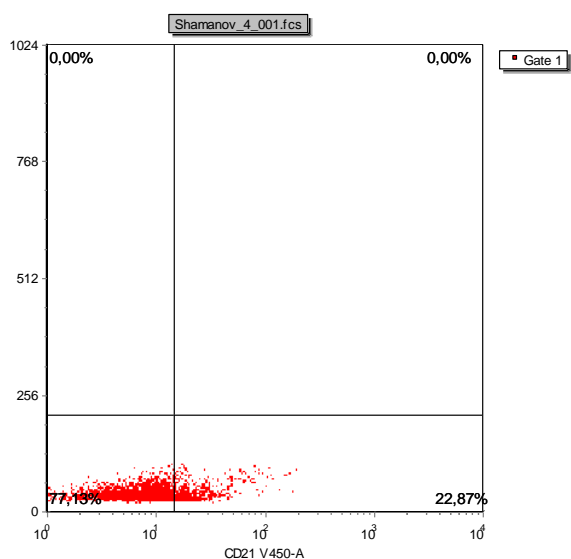


Рисунок 5.1.12. — Экспрессия CD21 на лимфоцитах костного мозга больного ДВКЛ.

Как и следовало ожидать, 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%. Кроме того достоверно различались CD19 и CD24 популяции 8,4 и 7,1%., табл. 5.1.4.

Таблица 5.1.4. — Парное сравнение средних значений процентного содержания В-клеток костного мозга, выявляемого на основании экспрессии различных дифференцировочных антигенов, у больных ДВКЛ.

Сравниваемые пары	t	Ст. свободы	p
CD19CD45 - CD20CD45	1,835	17	,084
CD19CD45 - CD22CD45	-,341	16	,738
CD19CD45 - CD21CD45	2,350	13	,035
CD19CD45 - CD24CD45	2,415	14	,030
CD20CD45 - CD22CD45	-1,295	15	,215
CD20CD45 - CD21CD45	1,968	13	,071
CD20CD45 - CD24CD45	1,721	14	,107
CD22CD45 - CD21CD45	1,991	13	,068
CD22CD45 - CD24CD45	1,611	13	,131
CD21CD45 - CD24CD45	-,608	13	,554

Для более глубокого понимания данного вопроса мы обратились к данным зарубежной и отечественной литературы относительно особенностей иммунофенотипа клеток диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Одной из таких особенностей является отсутствие экспрессии антигена CD21 на клетках диффузной В-крупноклеточной лимфомы. По данным отечественных онкогематологов [3, 5, 6, 8] антиген экспрессирован лишь в 10% случаев ДВКЛ.

Действительно, в ряде случаев ДВКЛ популяция зрелых В-лимфоцитов костного мозга была гетерогенна по экспрессии данного антигена. Демонстрируем это на конкретном примере.

Больной Б., мужчина 64 лет. Первичная локализация опухоли – лимфатические узлы, печень и селезенка не вовлечены.

Миелограмма: пунктат гипоклеточный (22 тыс /мкл), несколько разбавлен периферической кровью, мегакарициты в достаточном количестве, количество лимфоцитов – 12,8% (норма 4,3-13,7%). Морфологических признаков поражения

костного мозга нет. На рис. 5.1.13а показано светорассеяние клеток костного мозга. Большинство лимфоидных клеток - мелкие.

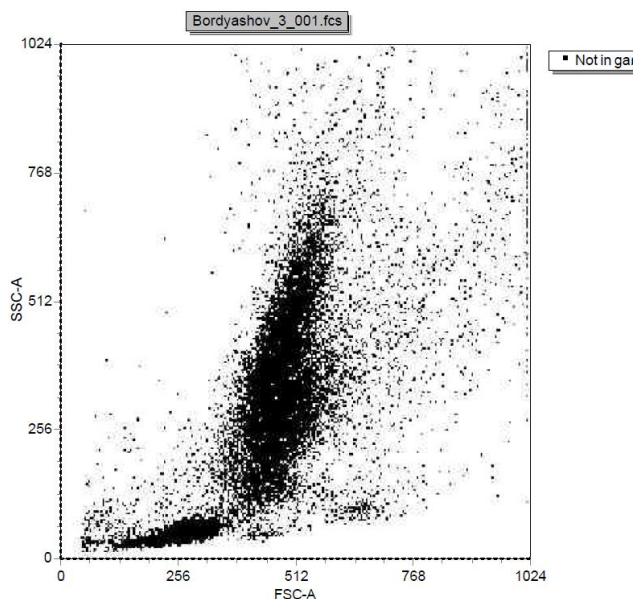


Рисунок 5.1.13а. — Характеристика светорассеяния (FSC/SSC) клеток костного мозга больного ДВКЛ.

При оценке по CD45 зрелые лимфоциты составили – 13,4% (то есть их количество, выявленное цитометрически, точно совпадало с количеством, определенным морфологически).

При анализе в гейте зрелых лимфоцитов (CD45+) количество В-клеток (CD19+) составило 14%. Объединение этих 2 гейтов (CD45+CD19+) проведено для дальнейшего анализа экспрессии CD21 на В-лимфоцитах (рис 5.1.13б).

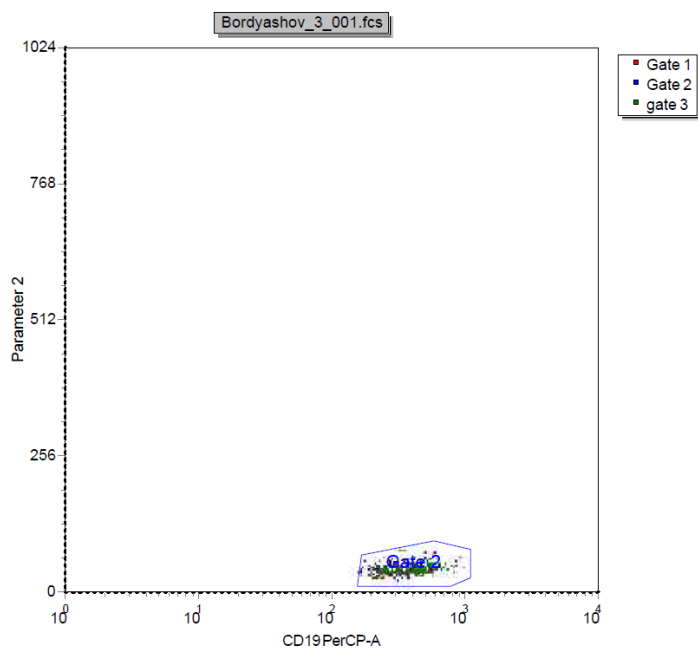


Рисунок 5.1.13б. — Гейт зрелых В-лимфоцитов (CD45+CD19+) в костном мозге больного ДВКЛ.

Анализ экспрессии CD21 указывает на наличие четкой отрицательной фракции, рисунок 5.1.13в. Содержание CD21-негативных В-клеток составило 9,7% от В-клеток. Они представлены на рис. 5.1.13г.

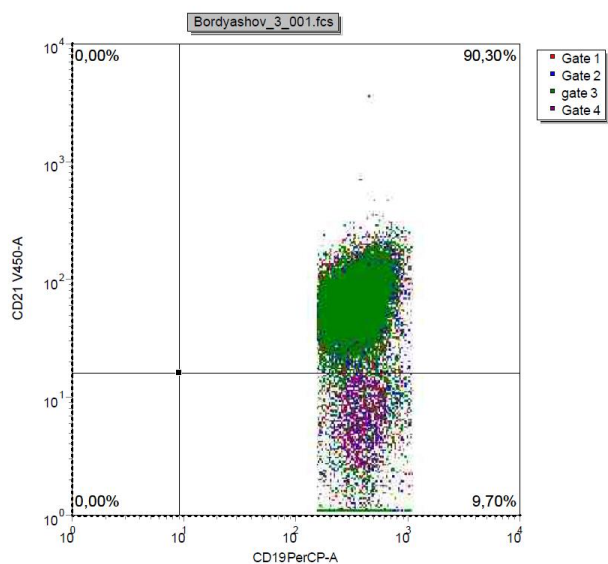


Рисунок 5.1.13в. — В пределах зрелых В-клеток присутствует фракция CD21-негативных лимфоцитов – 9,7%

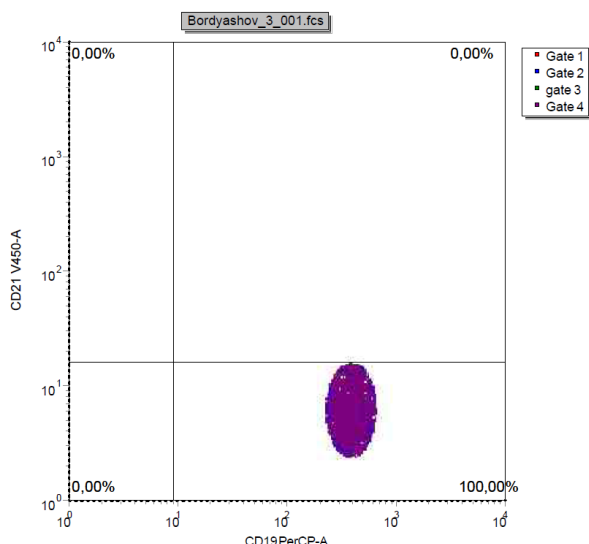


Рисунок 5.1.13г. — Зрелые CD21-негативные клетки костного мозга больного ДВКЛ.

Далее мы оценили размер этих клеток на основании характеристик светорассеяния, рис. 5.1.13д.

Отчетливо видна фракция более крупных клеток, которая в пределах зрелых CD21-негативных В-лимфоцитов составила 9,53% или 0,01% от общего числа миелокариоцитов, рис. 5.1.13д.

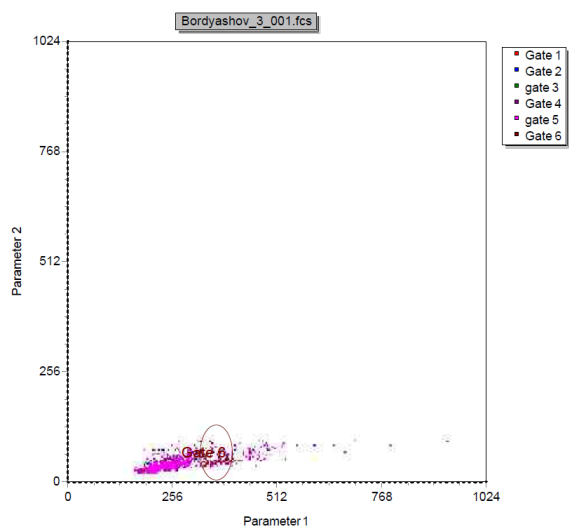


Рисунок 5.1.13д. — В пределах CD21-негативных В-лимфоцитов костного мозга больного ДВКЛ присутствует фракция крупных клеток, выделяемая на основании характеристик прямого светорассеяния FSC (на рисунке – параметр 1).

Как видно, в пределах клеток костного мозга цитометрически можно выделять фракцию крупных клеток с фенотипом ДВКЛ даже при их очень низком содержании (в представленном случае – 0,01%).

Последующие исследования клональности и сопоставление с первичным иммунофенотипом необходимы для подтверждения взаимосвязи этих клеток с первичной ДВКЛ.

Интересно отметить, что в целом популяция зрелых В-клеток (CD19+) была поликлональной, рис. 5.1.14.

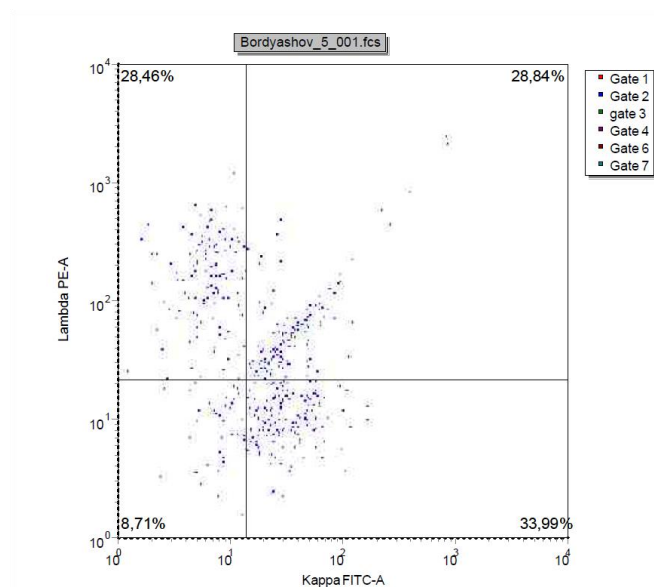


Рисунок 5.1.14. — Общая популяция В-клеток (CD19+) костного мозга больного ДВКЛ поликлональна по каппа и лямбда цепям иммуноглобулинов.

Популяцию более крупных клеток (CD21-) оценить с позиций клональности не удалось, так как не было подходящих флуорохромов.

РЕЗЮМЕ

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.

Оценка клональности общих В-клеток (CD19+), как правило, безуспешна, так как присутствует большое количество В-линейных предшественников, негативных по мембранным Ig. Эти предшественники создают фон и

«разбавляют» зрелые В-клетки, что делает определение клональности в большинстве случаев безуспешным.

Использование маркеров зрелых В-клеток (CD20+CD45++) позволяет выявить поликлональность В-клеток и тенденцию к моноклональности. Исключение из состава этих клеток CD5-лимфоцитов (в анализируемой группе больных не было CD5-позитивных ДВКЛ) позволяет с большей точностью оценить клональность зрелых В-клеток. Из 7 оцененных случаев в 2 возможно было установить моноклональность В-лимфоцитов. Целесообразным явилось использование конъюгатов антител к каппа и лямбда цепям с флуорохромами APC и APC-H7.

Подробный анализ иммунофенотипа В-лимфоцитов костного мозга больных ДВКЛ по экспрессии мембранных CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 позволил установить особую группу пациентов с наличием CD21-негативных В-клеток. Это типично для первичной ДВКЛ. Для подобного анализа необходима многоцветная проточная цитометрия – CD45+CD19+CD21-. Эти зрелые В-клетки наиболее напоминают по иммунофенотипу ДВКЛ, в пределах них присутствует фракция крупных клеток.

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе поставлена задача анализа существующих клинических, лабораторных факторов прогноза, поиска новых прогностических критериев и их объективизации при ДВКЛ.

Нами продемонстрировано, что факторы прогноза, перечисленные в МПИ, в основном, являются информативными для выделения групп риска прогрессирования и в наши дни. 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.

В числе лабораторных показателей прогноза наиболее важным явился повышенный уровень лактат дегидрогеназы.

Выделение групп риска прогрессирования на основании международного прогностического индекса (МПИ) сохраняет важное прогностическое значение. Наибольшими различиями в прогнозе характеризуются группы с наличием менее двух и двух и более факторов 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.

У большинства больных, проанализированных в нашей работе, были распространенные стадии ДВКЛ. Эти больные характеризовались плохим прогнозом, в то время как у больных первой и второй стадий общая выживаемость была существенно (достоверно) лучше. Диагностика на поздних стадиях наблюдается ещё и потому, что ДВКЛ относится к разряду быстро прогрессирующих опухолей. Надеяться на то, что эта лимфома в ближайшее

время будет диагностироваться на ранних стадиях достаточно сложно, так как течение может быть бессимптомным. Более оправданным является поиск ранних признаков распространения опухоли (МОБ), а также поиск признаков системного влияния опухоли на гемопоэтическую ткань.

Нами установлены изменения в содержании бластных клеток, особенности гранулоцитарного роста дифференцировки, а также ускорение эритроидной дифференцировки с повышением пропорции оксифильных нормобластов в миелограмме у 83,3% больных. Снижение пропорции сегментоядерных нейтрофилов было достоверно связано с неблагоприятным прогнозом ДВКЛ. Изменения в эритроидном ростке дифференцировки носили близкий к достоверному характер.

Изменения гранулоцитарного роста в костном мозге больных ДВКЛ имели связь с прогнозом. Относительное (процентное) снижение сегментоядерных нейтрофилов, наблюдающееся у 18% больных ДВКЛ, было ассоциировано с ухудшением общей выживаемости ($p=0,015$). Однако судить о самостоятельном прогностическом значении снижения сегментоядерных нейтрофилов не представляется возможным, требуется дальнейшее накопление материала. Это обусловлено тем, что данный признак наблюдается практически исключительно (в 91% случаев) при запущенных стадиях болезни, и связь между стадией и снижением сегментоядерных клеток костного мозга близка к достоверной ($p=0,057$).

Наиболее характерны для ДВКЛ отклонения в эритроблостограмме. На первый план выходят диспропорции в соотношениях базофильных, полихроматофильных и оксифильных форм. Последние клеточные элементы становятся преобладающими среди клеток эритроидного ростка. Это нарастание оксифилов отражается на прогнозе лимфомы в поздние сроки наблюдения, как правило, после двух лет от момента установления диагноза. В эти сроки различие от кривых выживаемости от случаев с нормальным содержанием оксифильных нормобластов становятся высоко достоверными.

Нарастание процентного содержания оксифильных нормобластов в миелограмме больных ДВКЛ является достаточно типичным признаком и наблюдается у большинства больных – 83,3%. Этот признак имеет прогностическое значение. Больные с нормальным процентом оксифильных нормобластов имеют лучшие показатели выживаемости, чем больные с повышенным содержанием этих клеток. При сроках наблюдения за больными более двух лет прогностическая роль данного неблагоприятного признака (нарастание пропорции оксифильных нормобластов) становится достоверной.

Это послужило основанием для проведения углубленного изучения эритропоэза у 30 больных ДВКЛ. Мы использовали наряду с традиционными также самые современные подходы для идентификации эритрокариоцитов и установления степени их дифференцировки. Эти современные подходы впервые были предложены Европейским консорциумом Еврофлоу и опубликованы в Журнале *Leukemia* в 2012 году [84]. В основу положен принцип многоцветной проточной цитофлуориметрии, используемый для диагностики эритробластных лейкозов.

Мы оценили возможность использования гликофорина А наряду с ядерными красителями для выделения пула эритроидных клеток и его дальнейшей детализации (ядерные красители необходимы, так как гликофорин А экспрессирован помимо эритрокариоцитов также и на эритроцитах). Использован целый ряд наиболее информативных характеристик эритроидной дифференцировки: маркеры незрелых клеток – слабая экспрессия CD45, наличие на мембране антигенов CD34, CD117, HLA-DR; наиболее типичные для эритрокариоцитов антигены гликофорин А, трансферриновый рецептор CD71, антигены CD105 и CD36, а также ряд дополнительных антигенов – CD123, CD9 и т.д.

Отработана методика идентификации эритрокариоцитов на основании гликофорина А, слабой экспрессии CD45, наряду с ядерными красителями SYTO16, SYTO 43. Установлены изменения экспрессии антигенов ранних этапов

дифференцировки эритрокариоцитов в координатах Гликофорин A/ CD71. Показана важная роль экспрессии CD105 для дальнейшей детальной характеристики степени зрелости эритрокариоцитов.

Наиболее плодотворным оказался подход, основанный на использовании маркера CD36 для идентификации всего пула эритроидных предшественников среди клеток с низкими характеристиками светорассеяния SSC. Как оказалось практически все эти клетки имели низкие уровни экспрессии CD45, так что использование данного маркера (CD45) можно было исключить. Снижение уровней экспрессии CD105 и CD71 в гейте клеток CD36⁺ SSC^{low} характеризует наиболее зрелую популяцию эритрокариоцитов. Интересно отметить, что уровни экспрессии CD36 на этих клетках также были более низкими. Таким образом, идентификация наиболее зрелой клеточной популяции эритрокариоцитов – CD36^{low} SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} – целесообразна для установления степени дифференцировки эритрокариоцитов. Именно фракция в большей степени коррелировала с морфологически распознаваемыми оксифильными нормобластами.

Проведенные исследования важны для более детального понимания процессов дифференцировки эритрокариоцитов у больных ДВКЛ, так как изменения созревания, заключающиеся в накоплении оксифильных нормобластов, находят отражение в клиническом течении и прогнозе пациентов. В частности, выживаемость у этих больных при сроках наблюдения более двух лет достоверно более короткая в сравнении с больными, имеющими нормальные соотношения различных морфологически распознаваемых эритрокариоцитов.

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.

Оценка клональности общих В-клеток (CD19⁺), как правило, безуспешна, так как присутствует большое количество В-линейных предшественников, негативных по мембранным Ig. Эти предшественники создают фон и

«разбавляют» зрелые В-клетки, что делает определение клональности в большинстве случаев безуспешным.

Использование маркеров зрелых В-клеток (CD20+CD45++) позволяет выявить поликлональность В-клеток и тенденцию к моноклональности. Исключение из состава этих клеток CD5-лимфоцитов (в анализируемой группе больных не было CD5-позитивных ДВКЛ) позволяет с большей точностью оценить клональность зрелых В-клеток. Из 7 оцененных случаев в 2 возможно было установить моноклональность В-лимфоцитов. Целесообразным явилось использование конъюгатов антител к каппа и лямбда цепям с флуорохромами APC и APC-H7.

Подробный анализ иммунофенотипа В-лимфоцитов костного мозга больных ДВКЛ по экспрессии мембранных CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 позволил установить особую группу пациентов с наличием CD21-негативных В-клеток. Это типично для первичной ДВКЛ. Для подобного анализа необходима многоцветная проточная цитометрия – CD45+CD19+CD21-. Эти зрелые В-клетки наиболее напоминают по иммунофенотипу ДВКЛ, в пределах них присутствует фракция крупных клеток.

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

В целом, проведенные исследования позволили установить прогностическую роль факторов, перечисленных в международных прогностических индексах МПИ, авМПИ на современном этапе лечения ДВКЛ. На основании изучения морфологических показателей костного мозга показано, что типичные отклонения в составе миелограммы заслуживают пристального внимания: так, увеличение процентного содержания бластных клеток диктует необходимость разработки тонких критериев диагностики минимального вовлечения костного мозга при ДВКЛ. Изменения в эритроидном ростке, связанные с нарастанием пропорции оксифильных нормобластов, имеющие

прогностическое значение целесообразно подкрепить иммунологической характеристикой степени зрелости этих клеток. Именно это и было проведено в работе – характеристика эритроидного ростка гемопоэза и критерии диагностики минимального вовлечения костного мозга в процесс. Представляется целесообразным и полезным использовать полученные в работе данные в дальнейших клинических и фундаментальных исследованиях ДВКЛ.

ВЫВОДЫ

1. Клинические и лабораторные факторы прогноза, обозначенные в современных прогностических индексах (PI), во многом утратили свое значение. Значимыми 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 низким или характеристическими SSC, которые имеют снижение уровни CD105, CD36, CD71.

5. Учитывая прогностически неблагоприятную роль поражения костного мозга при ДВКЛ, предпринято исследование значения различных дифференцировочных антигенов В-лимфопоэза 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адылов, М.А. Изменение эритрона при длительных геморрагиях // Лабораторное дело. - 1990. - №5. – С. 24 - 26. / М.А. Адылов, Б.Х. Хамзалиев.
2. Владимирская, Е.Б. Основы кроветворения. В кн. Гератрическая гематология / Е.Б. Владимирская, ред. Л.Д. Гриншпун, А.В.Пивник // Медиум. – Москва, 2011. – С.21 - 44. / Е.Б. Владимирская.
3. Долгих, Т.Ю. Морфологическая характеристика центрального звена эритрона при агрессивных и индолентных неходжкинских лимфомах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2011. – Т.151, №2. – С.224 - 228. / Т.Ю. Долгих, Н.П. Домникова, Е.Е. Петрусенко.
4. Дорохина, Е.И. Количество ранних CD34+ предшественников костно-мозгового гемопоэза у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. //Тер. Архив. – 2017. –Т.89, №1. –С.43-48 / Е.И. Дорохина, А.У. Магомедова, И.В. Гальцева.
5. Зейналова, П.А. Взаимосвязь иммунофенотипа диффузной В-крупноклеточной лимфомы с особенностями кроветворения у больных // Технологии живых систем. - 2015. —№1. — С. 63 - 68. / П.А. Зейналова, Е.Н. Шолохова, М.А. Френкель, Е.А. Османов, Н.Н. Тупицын.
6. Зейналова, П.А. Диагностическая и прогностическая роль активационных антигенов опухолевых клеток при диффузной В-крупноклеточной лимфоме : автореферат дис. ... доктора медицинских наук : 14.01.12 - Москва, 2015. - С. 43. / П.А. Зейналова.
7. Коржевского, Д.Э. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии - Санкт-Петербург : СпецЛит, 2014. - 110 с. / Д.Э. Коржевского.
8. Павлов, А.Д. Эритропоэз, эритропоэтин, железо. Молекулярные и клинические аспекты // М., Гэотар-Медиа. - 2011. - 304 с. / А.Д. Павлов, Е.Ф. Морщакова.
9. Соколов, В.В. Гематологические показатели здорового человека —

М., 1972. — 102 с. / В.В. Соколов, И.А. Грибова.

10. Тимонина, Е.Г. Характеристика гемопоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи // Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН. - 2009. – Т.20, №3. – С. 75 - 81 / Е.Г. Тимонина, М.А. Френкель, О.П. Колбацкая, С.О. Подвязников.

11. Тупицын, Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — №3. — С.99-102. / Н.Н. Тупицын, Н.А. Фалалеева, А.И. Моженкова.

12. Тупицын, Н.Н. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2015. — №1. — С.72-77. / Н.Н. Тупицын, П.А. Зейналова, М.А. Френкель, Е.А. Османов.

13. Фалалеева, Н.А. Особенности эритропоэза больных фолликулярной лимфомой // вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». - 2016. – №3. - С.34-37. / Н.А. Фалалеева, Е.А. Моженкова, Е.А. Османов, Н.В. Кокосадзе, Н.Н. Тупицын.

14. Френкель, М.А. Исследование костного мозга в онкологии // Иммунология гемопоэза. - 2014. – Т.12. - №1-2. – С. 18-41. / М.А. Френкель.

15. Чернова, Е.Н. Состояние эритрона в процессе роста индуцированных опухолей // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1992. - №2. – С. 52-54. / Е.Н. Чернова, Е.Д. Гольдберг, В.Д. Новицкий.

16. Adams, H.J. FDG PET/CT for the detection of bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: systematic review and meta-analysis / H.J. Adams, T.C. Kwee, B. de Keizer, R. Fijnheer, J.M. de Klerk, R.A. Nievelstein // European journal of nuclear medicine and molecular imaging. – 2014. – Vol. 41 – № 3 – P. 565–574.

17. Adams, H.J. Bone marrow biopsy in diffuse large B-cell lymphoma: useful or redundant test? / H.J. Adams, J.M. De Klerk, R. Fijnheer, B.G. Heggelman, S.V. Dubois, R.A. Nievelstein, T.C. Kwee // Acta Oncologica. – 2015. – Vol. 54 – № 1 – P. 67–72.

18. Adams, H.J. Opportunities and limitations of bone marrow biopsy and bone marrow FDG-PET in lymphoma / H.J. Adams, R.A. Nievelstein, T.C. Kwee // *Blood reviews*. – 2015. – Vol. 29 – № 6 – P. 417–425.
19. Adida, C. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas / C. Adida, C. Haioun, P. Gaulard, E. Lepage, P. Morel, J. Briere, H. Dombret, F. Reyes, J. Diebold, C. Gisselbrecht // *Blood*. – 2000. – Vol. 96 – № 5 – P. 1921–1925.
20. Alizadeh, A.A. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling / A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu // *Nature*. – 2000. – Vol. 403 – № 6769 – P. 503–511.
21. Amen, F. Absence of cyclin-D2 and Bcl-2 expression within the germinal centre type of diffuse large B-cell lymphoma identifies a very good prognostic subgroup of patients / F. Amen, D. Horncastle, K. Elderfield, A.H. Banham, M. Bower, D. Macdonald, E. Kanfer, K.N. Naresh // *Histopathology*. – 2007. – Vol. 51 – № 1 – P. 70–79.
22. Armand, P. Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma / P. Armand, Y. Oki, D.S. Neuberg, M. Faham, C. Cummings, M. Klinger, L. Weng, S. Bhattar, A.S. LaCasce, E.D. Jacobsen // *British journal of haematology*. – 2013. – Vol. 163 – № 1 – P. 123–126.
23. Armitage, J.O. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. / J.O. Armitage, D.D. Weisenburger // *Journal of Clinical Oncology*. – 1998. – Vol. 16 – № 8 – P. 2780–2795.
24. Assouline, S.E. Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large B-cell lymphoma / S.E. Assouline, T.H. Nielsen, S. Yu, M. Alcaide, L. Chong, D. MacDonald, A. Tosikyan, V. Kukreti, A. Kezouh, T. Petrogiannis-Haliotis // *Blood*. – 2016. – Vol. 128 – № 2 – P. 185–194.
25. Barrans, S.L. Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of

diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome / S.L. Barrans, J.A. Fenton, A. Banham, R.G. Owen, A.S. Jack // *Blood*. – 2004. – Vol. 104 – № 9 – P. 2933–2935.

26. Bea, S. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction [Электронный ресурс] / S. Bea // *Blood*. – 2005. – Vol. 106 – № 9 – P. 3183–3190 – doi:10.1182/blood-2005-04-1399.

27. Berglund, M. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis / M. Berglund, U. Thunberg, R.-M. Amini, M. Book, G. Roos, M. Erlanson, J. Linderoth, M. Dictor, M. Jerkeman, E. Cavallin-Ståhl // *Modern pathology*. – 2005. – Vol. 18 – № 8 – P. 1113–1120.

28. Carbone, P.P. Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification / P.P. Carbone, H.S. Kaplan, K. Musshoff, D.W. Smithers, M. Tubiana // *Cancer res*. – 1971. – Vol. 31 – № 11 – P. 1860–1861.

29. Carr, R. Detection of lymphoma in bone marrow by whole-body positron emission tomography / R. Carr, S.F. Barrington, B. Madan, M.J. O'Doherty, C.A. Saunders, J. van der Walt, A.R. Timothy // *Blood*. – 1998. – Vol. 91 – № 9 – P. 3340–3346.

30. Chigrinova, E.V. The role of immunophenotyping in the diagnosis of bonemarrow involvement in patients with peripheral bcellnonhodgkin's lymphoma / E.V. Chigrinova, A.I. Pavlovskaya, N.N. Tupitsyn // *Иммунология гемопоеза*. – 2006. – № 2 – P. 22–45.

31. Choi, W.W. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy / W.W. Choi, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, M.A. Piris, A.H. Banham, J. Delabie, R.M. Braziel, H. Geng, J. Iqbal, G. Lenz // *Clinical Cancer Research*. – 2009. – Vol. 15 – № 17 – P. 5494–5502.

32. Coiffier, B. Rituximab therapy in malignant lymphoma / B. Coiffier // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26 – № 25 – P. 3603–3613.

33. Colomo, L. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma / L. Colomo, A. López-Guillermo, M. Perales, S. Rives, A. Martinez, F. Bosch, D. Colomer, B. Falini, E. Montserrat, E. Campo // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 1 – P. 78–84.

34. De Paepe, P. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas / P. De Paepe, R. Achten, G. Verhoef, I. Wlodarska, M. Stul, V. Vanhentenrijk, M. Praet, C. De Wolf-Peeters // *Journal of clinical oncology*. – 2005. – Vol. 23 – № 28 – P. 7060–7068.

35. Dongen, J.J.M. van EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine / J.J.M. van Dongen, A. Orfao // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26 – № 9 – P. 1899–1908.

36. Dunleavy, K. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma / K. Dunleavy, S. Pittaluga, M.S. Czuczman, S.S. Dave, G. Wright, N. Grant, M. Shovlin, E.S. Jaffe, J.E. Janik, L.M. Staudt // *Blood*. – 2009. – Vol. 113 – № 24 – P. 6069–6076.

37. Dykewicz, C.A. Summary of the guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients / C.A. Dykewicz // *Clinical infectious diseases*. – 2001. – Vol. 33 – № 2 – P. 139–144.

38. Ferreri, A.J. Re-occurrence of the CD20 molecule expression subsequent to CD20-negative relapse in diffuse large B-cell lymphoma / A.J. Ferreri, G.P. Dognini, C. Verona, C. Patriarca, C. Doglioni, M. Ponzoni // *Haematologica*. – 2007. – Vol. 92 – № 1 – P. e1–e2.

39. Gascoyne, R.D. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma / R.D. Gascoyne, S.A. Adomat, S. Krajewski, M. Krajewska, D.E. Horsman, A.W. Tolcher, S.E. O'Reilly, P. Hoskins, A.J. Coldman, J.C. Reed // *Blood*. – 1997. – Vol. 90 – № 1 – P. 244–251.

40. Ghilmini, M. ESMO Guidelines consensus conference on malignant

lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) / M. Ghielmini, U. Vitolo, E. Kimby, S. Montoto, J. Walewski, M. Pfreundschuh, M. Federico, P. Hoskin, C. McNamara, F. Caligaris-Cappio // *Annals of Oncology*. – 2012. – Vol. 24 – № 3 – P. 561–576.

41. González-Barca, E. Spanish Lymphoma Group (GELTAMO) guidelines for the diagnosis, staging, treatment, and follow-up of diffuse large B-cell lymphoma / E. González-Barca, M. Coronado, A. Martín, C. Montalbán, S. Montes-Moreno, C. Panizo, G. Rodríguez, J.M. Sancho, A. López-Hernández // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9 – № 64 – P. 32383–32399.

42. Green, T.M. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone / T.M. Green, K.H. Young, C. Visco, Z.Y. Xu-Monette, A. Orazi, R.S. Go, O. Nielsen, O.V. Gadeberg, T. Mourits-Andersen, M. Frederiksen // *Journal of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30 – № 28 – P. 3460–3467.

43. Gutiérrez-García, G. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. / G. Gutiérrez-García, T. Cardesa-Salzmann, F. Climent, E. González-Barca, S. Mercadal, J.L. Mate, J.M. Sancho, L. Arenillas, S. Serrano, L. Escoda // *Blood*. – 2011. – Vol. 117 – № 18 – P. 4836–4843.

44. Hans, C.P. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray / C.P. Hans, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, R.D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H.K. Müller-Hermelink, E. Campo, R.M. Braziel, E.S. Jaffe // *Blood*. – 2004. – Vol. 103 – № 1 – P. 275–282.

45. Hans, C.P. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma / C.P. Hans, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner, W.C. Chan, P. Aoun, G.T. Cochran, Z. Pan, L.M. Smith, J.C. Lynch, R.G. Bociak // *Modern pathology*. – 2005. – Vol. 18 – № 10 – P. 1377–1384.

46. Hermine, O. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) / O. Hermine, C. Haioun, E. Lepage, M.-F. d'Agay, J. Briere, C. Lavignac, G. Fillet, G. Salles, J.-P. Marolleau, J. Diebold // *Blood*. – 1996. – Vol. 87 – № 1 – P. 265–272.
47. Hohaus, S. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas / S. Hohaus, M. Giachelia, G. Massini, G. Mansueto, B. Vannata, V. Bozzoli, M. Criscuolo, F. D'Alò, M. Martini, L.M. Larocca // *Annals of oncology*. – 2009. – Vol. 20 – № 8 – P. 1408–1413.
48. Hu, S. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program / S. Hu, Z.Y. Xu-Monette, A. Tzankov, T. Green, L. Wu, A. Balasubramanyam, W. Liu, C. Visco, Y. Li, R.N. Miranda // *Blood*. – 2013. – Vol. 121 – № 20 – P. 4021–4031.
49. Hu, S. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study / S. Hu, Z.Y. Xu-Monette, A. Balasubramanyam, G.C. Manyam, C. Visco, A. Tzankov, W.M. Liu, R.N. Miranda, L. Zhang, S. Montes-Moreno // *Blood*. – 2013. – Vol. 121 – № 14 – P. 2715–2724.
50. Huang, J.Z. The t (14; 18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile / J.Z. Huang, W.G. Sanger, T.C. Greiner, L.M. Staudt, D.D. Weisenburger, D.L. Pickering, J.C. Lynch, J.O. Armitage, R.A. Warnke, A.A. Alizadeh // *Blood*. – 2002. – Vol. 99 – № 7 – P. 2285–2290.
51. Iqbal, J. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma / J. Iqbal, V.T. Neppalli, G. Wright, B.J. Dave, D.E. Horsman, A. Rosenwald, J. Lynch, C.P. Hans, D.D. Weisenburger, T.C.

Greiner // *Journal of Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24 – № 6 – P. 961–968.

52. Johnson, N.A. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. / N.A. Johnson, G.W. Slack, K.J. Savage, J.M. Connors, S. Ben-Neriah, S. Rogic, D.W. Scott, K.L. Tan, C. Steidl, L.H. Sehn // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2012. – Vol. 30 – № 28 – P. 3452–3459.

53. Juweid, M.E. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma / M.E. Juweid, S. Stroobants, O.S. Hoekstra, F.M. Mottaghy, M. Dietlein, A. Guermazi, G.A. Wiseman, L. Kostakoglu, K. Scheidhauer, A. Buck // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – Vol. 25 – № 5 – P. 571–578.

54. Kurtz, D.M. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing / D.M. Kurtz, M.R. Green, S.V. Bratman, F. Scherer, C.L. Liu, C.A. Kunder, K. Takahashi, C. Glover, C. Keane, S. Kihira // *Blood*. – 2015. – Vol. 125 – № 24 – P. 3679–3687.

55. Lenz, G. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas / G. Lenz, G. Wright, S.S. Dave, W. Xiao, J. Powell, H. Zhao, W. Xu, B. Tan, N. Goldschmidt, J. Iqbal // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 359 – № 22 – P. 2313–2323.

56. Loken, M.R. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development / M.R. Loken, V.O. Shah, K.L. Dattilio, C.I. Civin // *Blood*. – 1987. – Vol. 69 – № 1 – P. 255–263.

57. Lossos, I.S. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma / I.S. Lossos, D. Morgensztern // *Journal of clinical oncology*. – 2006. – Vol. 24 – № 6 – P. 995–1007.

58. Martelli, M. Diffuse large B-cell lymphoma / M. Martelli, A.J. Ferreri, C. Agostinelli, A. Di Rocco, M. Pfreundschuh, S.A. Pileri // *Critical reviews in oncology/hematology*. – 2013. – Vol. 87 – № 2 – P. 146–171.

59. Maswabi, B.C.L. Hematopoiesis in patients with mature B-cell

malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement / B.C.L. Maswabi, J. Molinsky, F. Savvulidi, T. Zikmund, D. Prukova, D. Tuskova, M. Klanova, P. Vockova, L. Lateckova, L. Sefc // *haematologica*. – 2017. – Vol. 102 – № 4 – P. e152–e155.

60. McGrath, K.E. Delineating stages of erythropoiesis using imaging flow cytometry / K.E. McGrath, S.C. Catherman, J. Palis // *Methods*. – 2017. – Vol. 112 – P. 68–74.

61. Miller, T.P. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial / T.P. Miller, T.M. Grogan, S. Dahlberg, C.M. Spier, R.M. Braziel, P.M. Banks, K. Foucar, C.R. Kjeldsberg, N. Levy, B.N. Nathwani // *Blood*. – 1994. – Vol. 83 – № 6 – P. 1460–1466.

62. Montalbán, C. Validation of the NCCN-IPI for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): the addition of β 2-microglobulin yields a more accurate GELTAMO-IPI / C. Montalbán, A. Díaz-López, I. Dlouhy, J. Rovira, A. Lopez-Guillermo, S. Alonso, A. Martín, J.M. Sancho, O. García, J.M. Sánchez // *British journal of haematology*. – 2017. – Vol. 176 – № 6 – P. 918–928.

63. Montes-Moreno, S. Recomendaciones para el estudio histopatológico, inmunohistoquímico, citogenético y molecular e informe diagnóstico de los procesos neoplásicos linfoides / S. Montes-Moreno, M. Mollejo Villanueva, M. Fraga, J.F. García, J.L. Villar, A. Martínez, S.M. Rodríguez Pinilla, A. Battle, M.P. Pulla, M. Rozman // En: *Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España*. – 2017. – P. 63–174.

64. Moskowitz, C.H. Cell of origin, germinal center versus nongerminal center, determined by immunohistochemistry on tissue microarray, does not correlate with outcome in patients with relapsed and refractory DLBCL / C.H. Moskowitz, A.D. Zelenetz, T. Kewalramani, P. Hamlin, S. Lessac-Chenen, J. Houldsworth, A. Olshen, R. Chaganti, S. Nimer, J. Teruya-Feldstein // *Blood*. – 2005. – Vol. 106 – № 10 – P. 3383–3385.

65. Mounier, N. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--

associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) / N. Mounier // *Blood*. – 2003. – Vol. 101 – № 11 – P. 4279–4284.

66. Mounier, N. Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma / N. Mounier, J. Briere, C. Gisselbrecht, F. Reyes, P. Gaulard, B. Coiffier, G. d'Etude des L. de l'Adulte // *Haematologica*. – 2006. – Vol. 91 – № 5 – P. 715–716.

67. Onaindia, A. Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms / A. Onaindia, L.J. Medeiros, K.P. Patel // *Modern Pathology*. – 2017. – Vol. 30 – № 10 – P. 1338–1366.

68. Otto, C. Novel IGH and MYC Translocation Partners in Diffuse Large B-Cell Lymphomas / C. Otto, R. Scholtysik, R. Schmitz, M. Kreuz, C. Becher, M. Hummel, A. Rosenwald, L. Trümper, W. Klapper, R. Siebert // *Genes, Chromosomes and Cancer*. – 2016. – Vol. 55 – № 12 – P. 932–943.

69. Prediction of therapeutic outcomes in DLBCL from circulating tumor DNA dynamics. / D.M. Kurtz, F. Scherer, A.M. Newman, A.F. Craig, M.S. Khodadoust, A.F. Lovejoy, D.M. Klass, J.J. Chabon, C. Glover, L. Zhou. – American Society of Clinical Oncology, 2016.

70. Rawstron, A.C. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia / A.C. Rawstron, N. Villamor, M. Ritgen, S. Bottcher, P. Ghia, J.L. Zehnder, G. Lozanski, D. Colomer, C. Moreno, M. Geuna // *Leukemia*. – 2007. – Vol. 21 – № 5 – P. 956–956.

71. Robertson, L.E. Discordant bone marrow involvement in diffuse large-cell lymphoma: a distinct clinical-pathologic entity associated with a continuous risk of relapse. / L.E. Robertson, J.R. Redman, J.J. Butler, B.M. Osborne, W.S. Velasquez, P. McLaughlin, F. Swan, M.A. Rodriguez, F.B. Hagemeister, L.M. Fuller // *Journal of clinical oncology*. – 1991. – Vol. 9 – № 2 – P. 236–242.

72. Roschewski, M. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study / M. Roschewski, K. Dunleavy, S. Pittaluga, M. Moorhead, F. Pepin, K. Kong, M. Shovlin,

E.S. Jaffe, L.M. Staudt, C. Lai // *The Lancet Oncology*. – 2015. – Vol. 16 – № 5 – P. 541–549.

73. Rosenwald, A. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma / A. Rosenwald, G. Wright, W.C. Chan, J.M. Connors, E. Campo, R.I. Fisher, R.D. Gascoyne, H.K. Muller-Hermelink, E.B. Smeland, J.M. Giltane // *New England Journal of Medicine*. – 2002. – Vol. 346 – № 25 – P. 1937–1947.

74. Rovira, J. MYD88 L265P mutations, but no other variants, identify a subpopulation of DLBCL patients of activated B-cell origin, extranodal involvement, and poor outcome / J. Rovira, K. Karube, A. Valera, D. Colomer, A. Enjuanes, L. Colomo, A. Martínez-Trillos, E. Giné, I. Dlouhy, L. Magnano // *Clinical Cancer Research*. – 2016. – P. 2755–2764.

75. Salles, G. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium / G. Salles, D. de Jong, W. Xie, A. Rosenwald, M. Chhanabhai, P. Gaulard, W. Klapper, M. Calaminici, B. Sander, C. Thorns // *Blood*. – 2011. – P. blood-2011-04-345256.

76. Sehn, L.H. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP / L.H. Sehn, B. Berry, M. Chhanabhai, C. Fitzgerald, K. Gill, P. Hoskins, R. Klasa, K.J. Savage, T. Shenkier, J. Sutherland, R.D. Gascoyne, J.M. Connors // *Blood*. – 2007. – Vol. 109 – № 5 – P. 1857–1861.

77. Slack, G.W. CD 30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia / G.W. Slack, C. Steidl, L.H. Sehn, R.D. Gascoyne // *British journal of haematology*. – 2014. – Vol. 167 – № 5 – P. 608–617.

78. Stein, H. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified / H. Stein, R.A. Warnke, W.C. Chan, E.S. Jaffe, J.K.C. Chan, K.C. Gatter, E. Campo // *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. – 2008. – Vol. 2 – P. 233–237.

79. Swerdlow, S.H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S.H. Swerdlow, E. Campo, S.A. Pileri, N.L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G.A. Salles, A.D. Zelenetz // *Blood*. – 2016. – Vol. 127 – № 20 – P. 2375–2390.

80. Swerdlow, S.H. WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition) IARC / S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris, E.S. Jaffe, S.A. Pileri, H. Stein // Lyon, France. – 2017.

81. Szumera-Ciećkiewicz, A. Comprehensive histopathological diagnostics of aggressive B-cell lymphomas based on the updated criteria of the World Health Organisation's 2017 classification / A. Szumera-Ciećkiewicz, G. Rymkiewicz, B. Grygalewicz, D. Jesionek-Kupnicka, A. Gruchała, B. Ziarkiewicz-Wróblewska, K. Gałązka, J. Reszeć, K. Borg, M. Prochorec-Sobieszek // *Polish Journal of Pathology*. – 2018. – Vol. 69 – № 1 – P. 1–19.

82. Tagawa, H. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma / H. Tagawa, M. Suguro, S. Tsuzuki, K. Matsuo, S. Karnan, K. Ohshima, M. Okamoto, Y. Morishima, S. Nakamura, M. Seto // *Blood*. – 2005. – Vol. 106 – № 5 – P. 1770–1777.

83. Tupitsyn, N.N. Two different anti-erythroid monoclonal antibodies in immunodiagnosis of human leukemias: A comparative study / N.N. Tupitsyn, E.B. Mechetner, A.J. Baryshnikov, T.S. Drozdova, M.A. Frenkel, E.S. Ievleva, A.V. Kiselev, A.A. Perilov, I.S. Peterson, N.A. Probatova // *International journal of cancer*. – 1989. – Vol. 44 – № 4 – P. 589–592.

84. Van Dongen, J.J.M. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes / J.J.M. Van Dongen, L. Lhermitte, S. Böttcher, J. Almeida, V.H.J. Van der Velden, J. Flores-Montero, A. Rawstron, V. Asnafi, Q. Lecomte, P. Lucio // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26 – № 9 – P. 1908–1975.

85. Van Lochem, E.G. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: Reference patterns for age-related changes and

disease-induced shifts / E.G. Van Lochem, V.H.J. Van der Velden, H.K. Wind, J.G. Te Marvelde, N.A.C. Westerdal, J.J.M. Van Dongen // *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. – 2004. – Vol. 60 – № 1 – P. 1–13.

86. Veelken, H. Immunophenotype as prognostic factor for diffuse large B-cell lymphoma in patients undergoing clinical risk-adapted therapy / H. Veelken, S. Vik Dannheim, J. Schulte Moenting, U.M. Martens, J. Finke, A. Schmitt-Graeff // *Annals of oncology*. – 2007. – Vol. 18 – № 5 – P. 931–939.

87. Winter, J.N. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study [Электронный ресурс] / J.N. Winter, E.A. Weller, S.J. Horning, M. Krajewska, D. Variakojis, T.M. Habermann, R.I. Fisher, P.J. Kurtin, W.R. Macon, M. Chhanabhai, R.E. Felgar, E.D. Hsi, L.J. Medeiros, J.K. Weick, J.C. Reed, R.D. Gascoyne // *Blood*. – 2006. – Vol. 107 – № 11 – P. 4207–4213 – doi:10.1182/blood-2005-10-4222.

88. Yoon, N. Cell-of-origin of diffuse large B-cell lymphomas determined by the Lymph2Cx assay: better prognostic indicator than Hans algorithm / N. Yoon, S. Ahn, H. Yong Yoo, S. Jin Kim, W. Seog Kim, Y. Hyeon Ko // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 – № 13 – P. 22014–22022.

89. Zhang, A. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas / A. Zhang, K. Ohshima, K. Sato, M. Kanda, J. Suzumiya, K. Shimazaki, C. Kawasaki, M. Kikuchi // *Pathology international*. – 1999. – Vol. 49 – № 12 – P. 1043–1052.

90. Zhou, Z. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era / Z. Zhou, L.H. Sehn, A.W. Rademaker, L.I. Gordon, A.S. LaCasce, A. Crosby-Thompson, A. Vanderplas, A.D. Zelenetz, G.A. Abel, M.A. Rodriguez // *Blood*. – 2014. – Vol. 123 – № 6 – P. 837–842.

91. Ziepert, M. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era / M. Ziepert, D. Hasenclever, E. Kuhnt, B. Glass, N. Schmitz, M.

Pfreundschuh, M. Loeffler // Journal of clinical oncology. – 2010. – Vol. 28 – № 14 – P. 2373–2380.

92. Zohren, F. Prognostic value of circulating Bcl-2/IgH levels in patients with follicular lymphoma receiving first-line immunochemotherapy / F. Zohren, I. Bruns, S. Pechtel, T. Schroeder, R. Fenk, A. Czibere, G. Maschmeyer, D. Kofahl-Krause, N. Niederle, G. Heil // Blood. – 2015. – Vol. 126 – № 12 – P. 1407–1414.

93. Zucca, E. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group / E. Zucca, A. Conconi, T.I. Mughal, A.H. Sarris, J.F. Seymour, U. Vitolo, R. Klasa, M. Ozsahin, G.M. Mead, M.A. Gianni // Journal of Clinical Oncology. – 2003. – Vol. 21 – № 1 – P. 20–27.