

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.155.392.8-036.12:575.08

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА УРОВНЯ ТРАНСКРИПТА BCR-ABL^{T315I} У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПРИ ПОМОЩИ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Абдуллаев А.О.¹, Скоробогатова А.В.², Треглазова С.А.¹, Степанова Е.А.¹, Бидерман Б.В.¹, Шухов О.А.¹, Чельшева Е.Ю.¹, Туркина А.Г.¹, Судариков А.Б.¹

¹ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва, Россия; ²ФГОУ ВПО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

Резюме. Резистентность к ингибиторам тирозинкиназ и прогрессия клона трансформированных клеток при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) наиболее часто ассоциированы с мутацией T315I-киназного домена химерного гена *BCR-ABL*. Частота выявления мутации T315I широко варьирует в зависимости от фазы заболевания и используемых методов ее диагностики. В настоящее время для диагностики мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, как правило, применяют метод прямого секвенирования. Однако количественный анализ мутации T315I, основанный на аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), обладает большей чувствительностью по сравнению с прямым секвенированием, является более доступным и менее трудоемким методом. Данные преимущества позволяют использовать аллель-специфичную ПЦР-РВ для раннего выявления мутантного клона *BCR-ABL^{T315I}* у больных ХМЛ.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; *BCR-ABL*; мутация T315I; полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

QUANTITATIVE ALLELE-SPECIFIC REAL-TIME PCR FOR ESTIMATION OF BCR-ABL^{T315I} - MUTANT CLONE IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Abdullayev A.O.¹, Skorobogatova A.V.², Treglazova S.A.¹, Stepanova E.A.¹, Biderman B.V.¹, Shukhov O.A.¹, Chelysheva E.Yu.¹, Turkina A.G.¹, Sudarikov A.B.¹

¹Hematology Research Center, Moscow, Russia; ²M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Summary. Resistance to tyrosine kinase inhibitors and progression of the mutant clone in patients with chronic myeloid leukemia are often associated with T315I mutation of the BCR-ABL kinase domain. Estimation of T315I mutation load varies with the disease phase and assay methods. Despite the low sensitivity, direct sequencing is mostly used to study the presence of BCR-ABL kinase domain mutations. Comparing to direct sequencing, quantitative allele-specific real-time PCR is more sensitive, available and simple technique. These advantages allow using of quantitative allele-specific real-time PCR for early detection of BCR-ABL^{T315I} - mutant clone in patients with chronic myeloid leukemia.

Key words: chronic myeloid leukemia; *BCR-ABL*; T315I mutation; real-time PCR.

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) – миелолипролиферативное заболевание, обусловленное реципрокной транслокацией t(9;22)(q34;q11) и образованием слитного гена *BCR-ABL*, кодирующего белок BCR-ABL p210 [1]. Аномальный белок обладает повышенной тирозинкиназной активностью и играет ключевую роль в активации сигнальных путей, способствующих пролиферации клеток костного мозга, ингибированию апоптоза и снижению клеточной адгезии [2–4].

Для корреспонденции:

Абдуллаев Адхамжон Одилович, кандидат мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России.
Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д.4 а.
Телефон: +7(495) 612-65-11.
E-mail: adham_abdullaev@mail.ru

Corresponding author:

Abdullaev Adhamzhon, MD, PhD (adham_abdullaev@mail.ru).

Использование в клинической практике ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) позволило значительно увеличить продолжительность жизни больных ХМЛ и стало «золотым стандартом» терапии ХМЛ во всем мире [5–7]. Тем не менее у части больных ХМЛ со временем может проявляться резистентность к препаратам ИТК, обусловленная более 70 точечными мутациями киназного домена (КД) химерного гена *BCR-ABL* [8]. Клинико-фармакологический эффект большинства препаратов ИТК реализуется через стерическое взаимодействие с остатком аминокислоты треонина (Thr³¹⁵) в положении 315 белка BCR-ABL p210. Замена треонина (Thr³¹⁵) на изолейцин (Ile³¹⁵) препятствует взаимосвязи химерного белка BCR-ABL p210 с препаратами ИТК и является основной причиной неудачи терапии препаратами ИТК и прогрессии ХМЛ [9–11].

Мутантный клон *BCR-ABL^{T315I}* может быть первичным или появиться в процессе лечения за счет

Сравнительные характеристики методов диагностики мутации T315I

Метод	Чувствительность, %	Преимущества	Недостатки
Секвенирование по Сэнгеру	15–20	Доступность и возможность чтения КД с двух сторон	Дороговизна, трудоемкость, низкая чувствительность, невозможность количественной оценки
Денатурирующая жидкостная хроматография высокого давления	10–15	Возможность исследовать несколько мутаций одновременно	Трудоемкость, низкая чувствительность, невозможность количественной оценки
Пиросеквенирование	1–5	Доступность, чувствительность, возможность количественного анализа	Возможность анализа только коротких фрагментов киназного домена
Аллель-специфичная ПЦР-РВ	0,01–0,1	Высокая чувствительность и количественный анализ, доступность	Необходимость подбора праймеров и зондов для каждой конкретной мутации

селективного ингибирования ИТК чувствительных клонов [12]. В настоящее время для диагностики мутации T315I применяют различные методы: прямое секвенирование [13], денатурирующая жидкостная хроматография высокого давления [14, 15], пиросеквенирование [16], электрофорез в двойном денатурирующем градиенте [17] и аллель-специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР) [18, 19] (табл. 1).

Относительно высокая чувствительность и возможность динамического мониторинга *BCR-ABL*^{T315I} мутантного клона явилась причиной разработки в лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России методики с использованием количественной аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для выявления и количественной оценки соотношения *BCR-ABL*^{T315I} и «дикого» *BCR-ABL*-положительного клона у больных ХМЛ.

Цель исследования – разработка и апробация способа количественного определения мутации T315I киназного домена гена *BCR-ABL* на основе аллель-специфичной ПЦР-РВ в образцах крови и костного мозга больных ХМЛ, резистентных к препаратам ИТК.

Материалы и методы

В исследование включены образцы мРНК от 65 больных ХМЛ с разными фазами заболевания и с уровнем транскрипта *BCR-ABL* p210 от 1% и выше. У 11 из 65 больных не было оптимального ответа на терапию препаратами ИТК.

Выделение мРНК проводили из клеток 2,5 мл крови или 1 мл костного мозга с помощью набора реагентов РИБО-золь-D («Интерлабсервис», Россия) согласно инструкции производителя. Получение кДНК проводили с помощью набора реагентов со случайными гексамерами («Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Количественную оценку уровня транскрипта мРНК *BCR-ABL* p210 проводили методом ПЦР-РВ с гибридно-флюоресцентной детекцией с использованием прибора Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) и набора реагентов Ампли Сенс Лейкоз квант М-bcr-FRT («Интерлабсервис», Россия) согласно инструкции производителя. Исследование мутационного статуса участка химерного гена *BCR-ABL* p210 проводили с помощью метода прямого секвенирования по Сэнгеру [20]. Получение необходимого количества участка химерного гена *BCR-ABL* p210 для прямого секвенирования осуществляли путем проведения двухраундового ПЦР с использованием набора реактивов ПЦР-РВ («Синтол», Россия) с помощью подобранных праймеров (рис. 1).

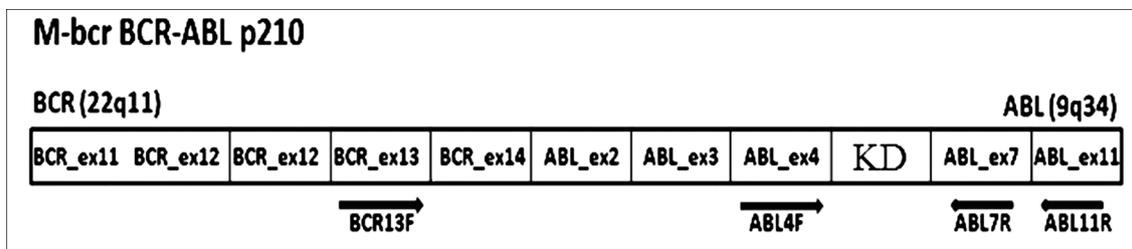


Рис. 1. Расположение праймеров, использованных для проведения ПЦР. KD (kinase domain) – киназный домен.

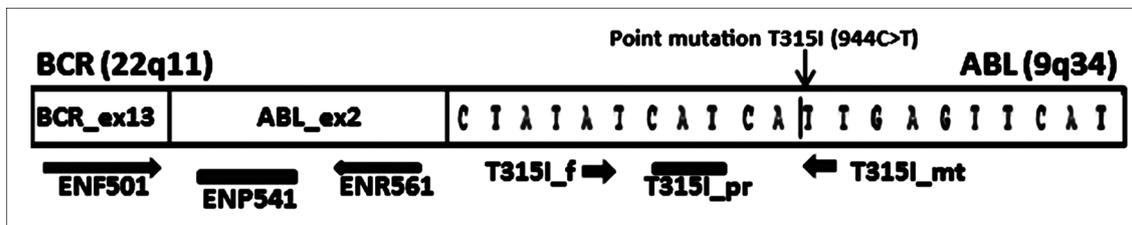


Рис. 2. Расположение праймеров и зондов, использованных для исследования мутации T315I.

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР		
Двух-раундовый ПЦР	Название	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
Первый раунд ПЦР	BCR13F	5'TCCGCTGACCATCAAYAAGGA3'
	ABL11R	3'CCTTCTCTAGCAGCTCATACACCTG3'
Второй раунд ПЦР и секвенирование	ABL4F	5'TGGTTCATCATCATCAACGG3'
	ABL7R	5'GGACATGCCATAGGTAGCA3'

Аmplification проводили в следующем режиме: при температуре 95°C – 10 мин 30 циклов, при температуре 95°C – 30 с, при 60°C – 30 с и при 72°C – 90 с (первый раунд ПЦР) и при температуре 95°C – 10 мин, 40 циклов: при температуре 95°C – 30 с, при 60°C – 30 с, при 72°C – 60 с (второй раунд ПЦР). Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 2.

Конечный ПЦР-продукт очищали в 2% агарозном геле, элюцию из геля проводили с использованием набора реагентов Diatom DNA Elution («Биоком», Россия) согласно инструкции производителя. Полученные фрагменты гена *ABL* секвенировали в обоих направлениях с использованием реактивов BigDye Terminator 1.1. («Applied Biosystems», США) на автоматическом секвенаторе ABI3130 («Applied Biosystems», США). Полученную нуклеотидную последовательность сравнивали с референсной последовательностью транскрипта с-ABL 1 (NCBI Reference Sequence: NM_005157.4).

Количественную оценку содержания *BCR-ABL*^{T315I} – мутантного клона осуществляли с использованием прибора Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) и набора реагентов для проведения ПЦР-РВ («Синтол», Россия). ПЦР-РВ проводили в объеме реакционной смеси 25 мкл, каждая проба содержала 0,2 мкл продукта первого этапа амплификации, 7,5 пкмоль каждого праймера и 0,5 пкмоль зонда. Амплификацию проводили в следующем режиме: при температуре 95°C – 10 мин, 45 циклов в режиме при температуре 95°C – 15 с, при 60°C – 60 с. Для проведения АС ПЦР-РВ подобраны [21] (рис. 2, табл. 3).

Количественную оценку результатов ПЦР проводили по формуле: $BCR-ABL^{T315I} \% = 2^{-\Delta Ct} \cdot 100\%$, где $\Delta Ct = Ct_{BCR-ABL} - Ct_{BCR-ABL}$.

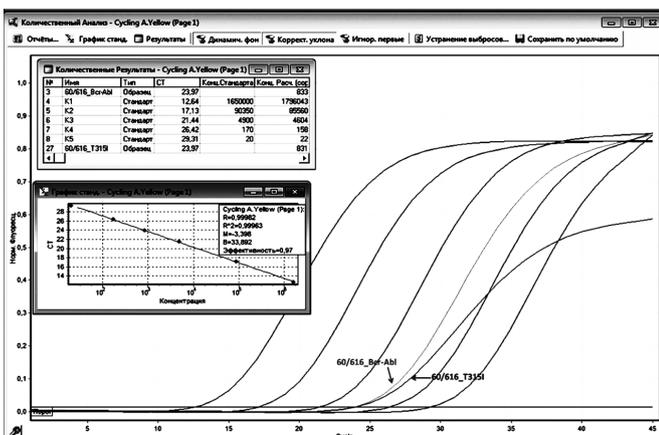


Рис. 3. Кривые количественной аллель-специфичной ПЦР-РВ образца со 100% содержанием мутантного клона *BCR-ABL*^{T315I}.

Таблица 3

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для аллель-специфичной ПЦР-РВ [21]		
Мутация	Название	Последовательность нуклеотидов 5'-3'
BCR-ABL	ENF501	5'TCCGCTGACCATCAAYAAGGA3'
p210	ENP541	5'FAM CCCTTCAGCGGCCAGTAGCATCTGA BQNI 3'
	ENR561	5'CACTCAGACCCTGAGGCTCAA3'
T315I	T315I_f	5'GCCCCCGTTCTATATCATAAT3'
	T315I_pr	5'FAM TACATGGCCACTCAGATCTCGTCA RTQ1 3'
	T315I_mt	5'GGATGAAGTTTTTCTCTCCAG3'

Результаты и обсуждение

Проанализировано 65 образцов мРНК клеток крови и костного мозга больных ХМЛ с различными фазами заболевания. У 3 (27%) из 11 больных был выявлен клон с мутацией T315I в количестве 2,73, 6,75 и 100. Образец со 100% содержанием *BCR-ABL*^{T315I} – мутантного клона принадлежал больному А., длительно страдающему ХМЛ. У больного А. наблюдалась резистентность ко всем зарегистрированным в РФ препаратам ИТК. Уровень экспрессии мРНК (*BCR-ABL*/*ABL* · 100%) *BCR-ABL* p210 в образце составлял 29,3%. Кривые ПЦР-РВ данного образца и расчеты представлены на рис. 3.

Для подтверждения результатов ПЦР-РВ провели секвенирование данного образца. Результаты секвенирования представлены на рис. 4.

Для сравнения чувствительности прямого секвенирования и аллель-специфичной ПЦР-РВ приготовили серийные 2-кратные разведения лейкоцитов больного А. с клетками линии K562 в соотношениях 10, 5, 2,5, 1 и 0,1%. Результаты количественной аллель-специфичной ПЦР-РВ с разведениями 10, 5, 2,5, 1 и 0,1% приведены на рис. 5.

Нижний предел чувствительности прямого секвенирования составил 15% (рис. 6).

Таким образом, вариант количественной оценки мутации T315I, основанный на аллель-специфичной ПЦР-РВ, обладает большей чувствительностью по

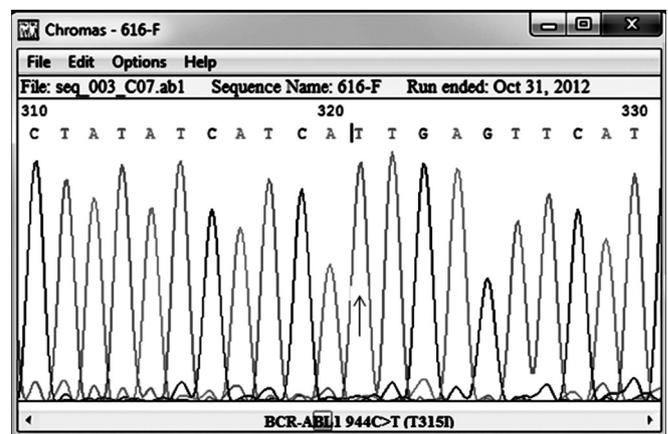


Рис. 4. Нуклеотидная последовательность образца со 100% содержанием мутантного клона *BCR-ABL*^{T315I}. Мутация 944C>T (T315I) указана стрелкой.

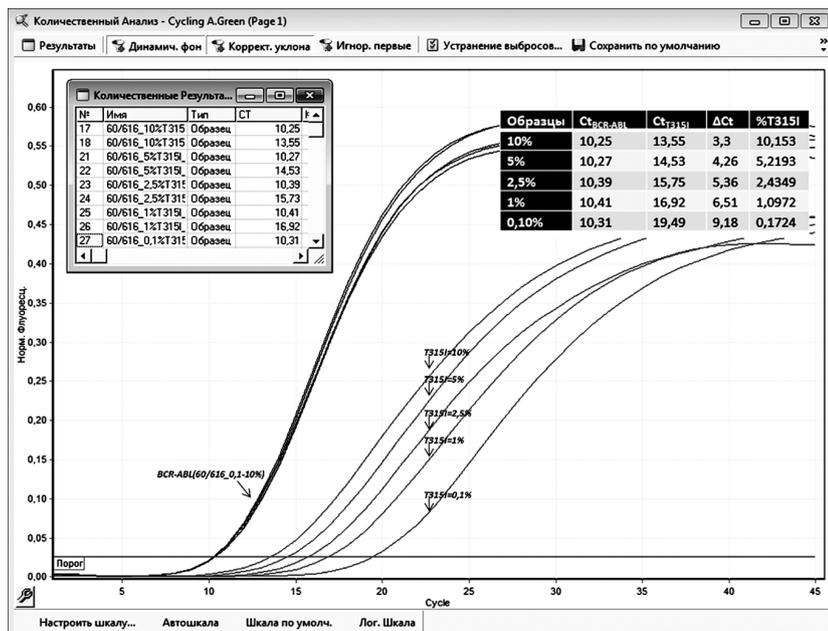


Рис. 5. Кривые аллель-специфичной ПЦР-РВ с калибровочными разведениями.

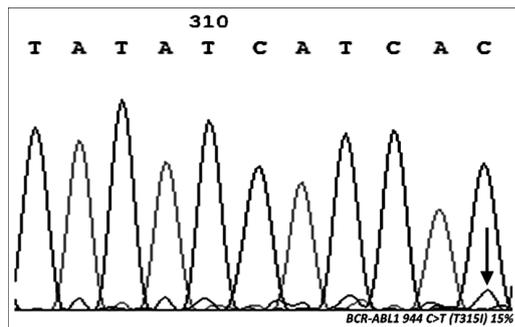


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность образца с 15% мутацией 944C>T (указана стрелкой).

сравнению с прямым секвенированием по Сэнгеру, что позволяет использовать данный метод для раннего выявления *BCR-ABL*^{T315I} – мутантного клона у больных ХМЛ.

Однако остается открытым вопрос, касающийся прогностических значений малых концентраций клона *BCR-ABL*^{T315I}, обнаруживаемых с помощью аллель-специфичной ПЦР-РВ. По данным некоторых исследований [22, 23], низкие концентрации, выявляемые только при аллель-специфичной ПЦР-РВ, не имеют значения в достижении большого молекулярного ответа (БМО) и прогнозе выживаемости больных ХМЛ. T. Lange и соавт. [22] показали, что терапия препаратами ИТК второго поколения (дазатиниб и nilотиниб) позволила к 12 мес достичь БМО у 8 (44%) из 18 больных ХМЛ при наличии мутации *BCR-ABL*^{T315I}. Ранее S. Willis и соавт. [23] отметили отсутствие отрицательного влияния низкого содержания клона *BCR-ABL*^{T315I} на выживаемость больных ХМЛ. Исходя из этого, можно предположить, что клиничко-прогностическое значение имеет только положительная динамика роста уровня мутантного клона *BCR-ABL*^{T315I}. Мы считаем, что молекулярный мониторинг низкоразнообразных клонов *BCR-ABL*^{T315I} с помощью метода аллель-специфичной ПЦР-РВ может стать высоко-

чувствительным маркером для оценки минимальной остаточной болезни при различных методах терапии ХМЛ. Кроме того, высокая специфичность метода и скорость выполнения ПЦР-РВ являются преимуществами для быстрого получения результатов и принятия клинических решений.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Sawyers C.L. Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340(17): 1330–40.
2. Cilloni D., Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18(4): 930–7.
3. Pendergast A.M., Muller A.J., Havlik M.H., Maru Y., Witte O.N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine dependent manner. *Cell.* 1991; 66(1): 161–71.
4. Zhang X., Subrahmanyam R., Wong R., Gross A.W., Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21(3): 840–53.
5. Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. Chronic myeloid leukemia. *Lancet.* 2007; 370 (9584): 342–50.
6. Kantarjian H., O'Brien S., Jabbour E., Garcia-Manero G., Quintas-Cardama A., Shan J., et al. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood.* 2012; 119(9): 1981–87.
7. Туркина А.Г., Хорошко Н.Д., Дружкова Г.А. Эффективность терапии иматиниба мезилатом (гливеком) в хронической фазе миелолейкоза. *Терапевтический архив.* 2003; 8: 62–7.
- [Turkina A.G., Khoroshko N.D., Druzhkova G.A. The effectiveness of therapy imatinib mesylate (Gleevec) in chronic phase of myeloid leukemia. *Терапевтический архив.* 2003; 8: 62–7]. (in Russian)
8. Soverini S., Hochhaus A., Nicolini F.E., Gruber F., Lange T., Saglio G., et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood.* 2011; 118 (5): 1208–15.
9. Hughes T., Saglio G., Branford S., Soverini S., Kim D.W., Muller M.C., et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(25): 4204–10. doi: 10.1200/JCO.2009.21.8230
10. Bradeen H.A., Eide C.A., O'Hare T., Johnson K.J., Willis S.G., Lee F.Y., et al. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood.* 2006; 108(7): 2332–8.
11. Wei G., Rafiyath S., Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J. Hematol. Oncol.* 2010; 3: 47. doi: 10.1186/1756-8722-3-47.
12. Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Gardel-Duflos N., Lai J.L., Philippe N., Facon T., et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood.* 2002; 100(3): 1014–8.
13. Kang H.Y., Hwang J.Y., Kim S.H., Goh H., Kim M., Kim D.W. Comparison of allele specific oligonucleotide-polymerase chain reaction and direct sequencing for high throughput screening of ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia resistant to imatinib. *Haematologica.* 2006; 9(5): 659–62.
14. Deininger M.W., McGreevey L., Willis S., Bainbridge T.M., Druker B.J., Heinrich M.C. Detection of ABL kinase domain mutations with denaturing high-performance liquid chromatography. *Leukemia.* 2004; 18(4): 864–71.

15. Soverini S., Martinelli G., Amabile M., Poerio A., Bianchini M., Rosti G., et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. *Clin. Chem.* 2004; 50(7): 1205–13.
16. Schumacher J.A., Szankasi P., Bahler D.W., Ho A.K., Kelley T.W. A pyrosequencing-based test for detection and relative quantification of the BCR-ABL1 T315I point mutation. *J. Clin. Pathol.* 2011; 64(7): 618–25.
17. Sorel N., Chazelas F., Brizard A., Chomel J.C. Double-gradient-denaturing gradient gel electrophoresis for mutation screening of the BCR-ABL tyrosine kinase domain in chronic myeloid leukemia patients. *Clin. Chem.* 2005; 51(7): 1263–6.
18. Chomel J.C., Sorel N., Bonnet M.L., Bertrand A., Brizard F., Saulnier P.J., et al. Quantitative monitoring of the T315I mutation in patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk. Res.* 2009; 33(4): 551–5.
19. Manrique Arechavaleta G., Scholl V., Perez V., Bittencourt R., Moellmann A., Hassan R., et al. Rapid and sensitive allele-specific (AS)-RT-PCR assay for detection of T315I mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosinekinase inhibitors. *Clin. Exp. Med.* 2011; 11(1): 55–9.
20. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–67.
21. Gabert J., Beillard E., van der Velden V.H., Bi W., Grimwade D., Pallisgaard N., et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003; 17: 2318–57. Available at: <http://www.nature.com/leu/journal/v17/n12/pdf/2403135a.pdf>
22. Lange T., Ernst T., Gruber F.X., Maier J., Cross M., Müller M.C., et al. The quantitative level of T315I mutated BCR-ABL predicts for major molecular response to second-line nilotinib or dasatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2013; 98(5): 714–17.
23. Willis S.G., Lange T., Demehri S., Otto S., Crossman L., Niederwieser D., et al. High sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood.* 2005; 106(6): 2128–37.

Поступила 21.07.14
Received 21.07.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014
УДК 616.155.194.7-085.275.2-036.8

КОМБИНИРОВАННАЯ ИММУНОСУПРЕССИВНАЯ ТЕРАПИЯ БОЛЬНЫХ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОВТОРНЫХ КУРСОВ АНТИТИМОЦИТАРНОГО ГЛОБУЛИНА

Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н., Троицкая В.В., Гальцева И.В., Шитарева И.В.,
Цыба Н.Н., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва

Резюме. Цель настоящей работы – изучить эффективность повторных курсов терапии антитимоцитарным глобулином (АТГ), алгоритм их проведения в сочетании с длительным приемом циклоспорина А (ЦСА) и определить частоту выявления и динамику клона клеток, характерного для пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ-клон) у больных апластической анемией (АА) на различных этапах иммуносупрессивной терапии (ИСТ). Используемый алгоритм лечения позволил у большинства больных АА (84,9%) получить положительный ответ, а у 76,7% ответивших больных была отмечена ремиссия, из них у 76,8% полная ремиссия. Большинство больных (61,6%) ответили на терапию после 1-го курса АТГ, при этом через 3 мес от начала лечения клинико-гематологическое улучшение было достигнуто уже у 52,8%, а общий ответ через 6 мес – у 83,4% больных. Этот период времени (3–6 мес от начала ИСТ) в случаях отсутствия ответа на 1-й курс АТГ следует рассматривать как оптимальный для проведения 2-го курса АТГ. После 2-го курса АТГ в данном исследовании положительный ответ был получен еще у 16 больных, т.е. после двух курсов АТГ положительно ответили 80,2% больных. Больные АА, не ответившие после 2-го курса АТГ через 6–9 мес от начала ИСТ, могут быть отнесены к группе больных рефрактерной АА. Общая и бессобытийная 7-летняя выживаемость больных АА, получавших комбинированную ИСТ, составила 89% (95% доверительный интервал – ДИ 83–96%) и 93% (95% ДИ 88–97%) соответственно. До проведения ИСТ ПНГ-клон был выявлен у 20 (61%) из 33 больных АА, прослеженных в динамике. Медиана ПНГ-клона по гранулоцитам составила 1,93% (0,1–99,5%). Появление и дальнейшая персистенция клона отмечены у 6 (46%) из 13 больных, у которых ПНГ-клон до начала ИСТ не обнаруживали. У всех 6 больных был получен ответ на ИСТ. У 17 (85%) из 20 больных АА, протекающей с ПНГ-клоном, обнаруженным до начала ИСТ, наблюдался ответ на лечение. У остальных 3 (15%) больных отмечено уменьшение размера ПНГ-клона более чем в 5 раз, вплоть до полной элиминации у 1 больного. Среди больных АА, у которых до начала лечения ПНГ-клон не обнаруживался, на лечение ответили 8 (61%) больных. Результаты нашего исследования подтверждают вероятность ответа на ИСТ больных АА, протекающей с ПНГ-клоном. Анализ результатов комбинированной ИСТ у больных АА показал высокую эффективность программы, включающей повторные курсы АТГ и длительную терапию ЦСА.

Ключевые слова: апластическая анемия; иммуносупрессивная терапия; повторные курсы антитимоцитарного глобулина; пароксизмальная ночная гемоглобинурия; ПНГ-клон.

COMBINED IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY OF PATIENTS WITH APLASTIC ANEMIA: EFFICIENCY OF REPEATED ANTITHYMOCYTIC GLOBULIN COURSES

Mikhailova E.A., Fidarova Z.T., Ustinova E.N., Troitskaya V.V., Galtseva I.V., Shitareva I.V., Tsyba N.N., Parovichnikova E.N.,
Savchenko V.G.

Hematology Research Center, Moscow, 125167, Russia.

Summary. The efficiency of repeated courses of antithymocytic globulin (ATG) and algorithm thereof in combination with long-term cyclosporin A (CsA) therapy were studied. The incidence and time course of the cell clone characteristic of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH clone) were studied in patients