

## ПОСТЕРНАЯ СЕССИЯ КОНГРЕССА ГЕМАТОЛОГОВ РОССИИ

### Количественная оценка мутации V617F гена JAK2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях

А. О. Абдуллаев, О. А. Глинщикова, Е. А. Степанова, А.Л. Меликян, Л. Ю. Колосова, Л. М. Мещерякова, М.В. Вахрушева, А.Б. Сударинов

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

**Введение.** Открытая в 2005 г. точечная мутация 1849G/T гена *JAK2* выявляются у 95% пациентов с истинной полицитемией (ИП), у 50% с эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ) и идиопатическим миелофиброзом (ИМФ). В 2009 г. по инициативе European LeukemiaNet (ELN) с участием 16 исследовательских центров осуществлены первые попытки стандартизации молекулярных методов исследования аллельной нагрузки у больных с +*JAK2V617F* мутацией.

**Материалы и методы.** Предложены новые критерии молекулярного ответа на лечение ЭТ и ИП, согласно которым различают три типа молекулярного ответа (полный, частичный и отсутствие). Полный молекулярный ответ – снижение количества клеток с мутацией до недетектируемого уровня. Частичный молекулярный ответ: 1) уменьшение более чем на 50% количества клеток с мутантным аллелем при первоначальном уровне мутации более 50%; 2) уменьшение более чем на 25% количества клеток с мутантным аллелем при первоначальном уровне мутации менее 50%. Отсутствие молекулярного ответа – это любой ответ, не удовлетворяющий критериям частичного молекулярного ответа. Учитывая назревшую клинико-диагностическую необходимость количественной оценки мутации V617F гена *JAK2* у наших больных, а также высокую стоимость импортных тест-систем для полимеразной цепной реакции (ПЦР) ("Ipsogen"), мы подобрали олигонуклеотидные праймеры и флюоресцентные пробы для количественной оценки мутации V617F гена *JAK2* методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

**Результаты и обсуждение.** На настоящий момент мы обследовали 244 пациента и у 75 (29 мужчин и 46 женщин). Мутации V617F гена *JAK2* обнаружены у 18 из 31 пациентов с ИП (58%), у 31 из 59 (53%) с ИМФ, у 26 из 54 (48%) с ЭТ. Возрастной пик обнаружения мутации V617F гена *JAK2* у заболевших находится между 40 и 70 годами с преобладанием заболеваемости у женщин после 60 лет. Более высокая доля аллельной нагрузки (более 80% клеток с мутацией) имели, в основном, больные ИП ( $n = 5$ ) и ИМФ ( $n = 7$ ).

**Клиническое наблюдение.** Пациентка П.С., 53 года обратилась в поликлиническое отделение с жалобами на постоянные головные боли и снижение остроты зрения с 21.11.09. Данные лабораторных исследований. Общий анализ крови: гемоглобин 184 г/л, эр.  $6,13 \times 10^{12}/л$ , тр.  $861 \times 10^9/л$ , л.  $12 \times 10^9/л$ , п.я. 3%, с.я. 67%, э. 3%, б. 0%, лимф. 17%, мон. 10%; СОЭ 1 мм/ч. Биохимический анализ крови (10.12.09): общий белок 72 г/л, креатинин 101 мкмоль/л, общий билирубин 16 г/л, лактатдегидрогеназа 435 ЕД/л, железо 21 мкмоль/л. Ультра-

звуковое исследование органов брюшной полости (26.11.09): размер селезенки 136 x 80 мм. Гистологическое исследование костного мозга: деятельный костный мозг значительно преобладает над жировым; миелокарициты лежат плотно; эритропоз расширен, много молодых форм; количество мегакарицитов умеренно увеличено, они расположены поодиночке и группами возле синусов, наряду с клетками обычного вида много гигантских форм, много плеоморфных голо- и безъядерных; выявленные в трепанбиоптате изменения соответствует наблюдаемому при эритремии. Для подтверждения диагноза провели (10.12.09) количественный анализ с помощью ПЦР: копии V617F мутантного гена *JAK2* составляют 81% из общего количества копий *JAK2*. Таким образом, на основании клинической картины заболевания (плеторический синдром, увеличение размера селезенки, двухростковой гиперплазии в гемограмме (повышения концентрации Hb, эритроцитов, тромбоцитов, нейтрофилеза в лейкоформуле), увеличения эритроидного и мегакариоцитарного ростков, анаплазии мегакарицитов, а также положительного молекулярного маркера мутации V617F гена *JAK2* (81%) у больной верифицирован диагноз эритремии ПА стадии. В дальнейшем больная получила следующее лечение: 3 сеанса эритроцитафереза (420, 720 и 690 мл) в течение 3 нед, на фоне приема дезагрегантов. Учитывая сохраняющийся и даже нарастающий тромбоцитоз (до  $950 \times 10^9/л$ ) больной начали терапию препаратами интерферона- $\alpha$  (роферон по 3 000 000 ЕД 3 раза в день, возможно). После 6 мес лечения у больной наблюдали полную гематологическую ремиссию (размер селезенки 111 x 71 мм, в анализе крови: Hb 136 г/л, эр.  $4,2 \times 10^{12}/л$ , л.  $6,3 \times 10^9/л$ , тр.  $336 \times 10^9/л$ , Ht 45%; СОЭ 5 мм/ч). Для выяснения минимальной остаточной болезни (24.01.11) провели анализ ПЦР-РВ: копии V617F мутантного гена *JAK2* составили 7% из общего количества исследованных копии генов. За время терапии (с 10.12.09 по 24.01.11) количество копии V617F мутантного гена *JAK2* снизилось с 81 до 7%, что по критериям ELN соответствует частично молекулярному ответу.

**Заключение.** Разработанная методика количественного определения V617F мутантного гена *JAK2* с помощью ПЦР является высокоспецифичной, чувствительной и удачно дополняет морфологические, цитогенетические и биохимические исследования. Она позволяет более глубоко изучить динамику минимальной остаточной болезни на фоне лечения различными препаратами больных хроническими миелопролиферативными заболеваниями и количественно оценить эффективность специфической терапии.

### Показатели клеток периферической крови доноров до и после кроводачи

М.Х. Азимова, Э.Г. Гемджян, В.В. Журавлев, А.В. Точенов, Г.И. Козинец

ФГБУ Гематологический научный центр Минздравсоцразвития России, Москва

**Введение.** В работе представлены результаты мониторинга показателей цитометрии периферической крови доноров до и после кроводачи с целью выявления адаптационных механизмов в организме донора в ответ на умеренную кровопотерю.

**Материалы и методы.** Представлены результаты исследования показателей форменных элементов периферической крови доноров до и после донации, полученные на гематологическом анализаторе Sysmex-XE-2100. Обследовано 45 доноров (5 женщин и 40 мужчин) в возрасте от 25 до 57 лет (медиана возраста 27 лет), из них безвозмездных – 22 (49%),

кадровых – 23 (51%). Объем кроводачи  $450 \pm 50$  мл. Изменения проводили непосредственно до забора крови и сразу после его завершения по следующим показателям: концентрация гемоглобина, число эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, величина гематокрита, эритроцитарные индексы (средние значения): объем эритроцитов, содержание гемоглобина в эритроците, концентрация гемоглобина в эритроците, а также количество ретикулоцитов, содержание фракции незрелых ретикулоцитов, содержание гемоглобина в ретикулоците, разница содержания гемоглобина в эритроцитах и

ретикулоцитах. При статистической обработке данных различие между средними значениями показателей оценивали парным критерием Стьюдента; данные представлены в виде средних значений и их 95% доверительных интервалов; результаты считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** По результатам исследования все показатели могут быть разделены на две группы: те, статистически значимое изменение (непосредственно после кроводачи) которых (при имеющейся разрешающей способности анализатора) не было выявлено, и те, изменение которых было статистически значимо. После кроводачи значимо изменились следующие показатели: 1) снизились: показатели гемоглобина на 3,0 (95% ДИ 1,0–6,0) г/л, разница содержания гемоглобина в эритроцитах и ретикулоцитах на 0,4 (95% ДИ 0,2 – 0,6) пг, лейкоцитов на 0,6 (95% ДИ 0,2 – 0,9)  $\times 10^3$ /мкл

и тромбоцитов на 10,2 (95% ДИ 2,2–18)  $\times 10^3$ /мкл; 2) повысились: показатели фракции незрелых ретикулоцитов на 1,2 (95% ДИ 0,6 – 1,8)% и содержания гемоглобина в ретикулоците на 1,3 (95% ДИ 0,5 – 2,0) пг. По остальным показателям значимых изменений не обнаружено.

**Заключение.** Выявлены показатели периферической крови, которые сразу заметным образом реагируют на процедуру кроводачи. Взаимосвязанная совокупность выявленных изменений является проявлением единого адаптационного ответа системы кроветворения организма на кровопотерю: практически немедленно запускается компенсаторный механизм генерации и выхода в кровоток молодых эритроцитов (ретикулоцитов) с повышенным содержанием гемоглобина (этот процесс, динамически развиваясь во времени, полностью компенсирует относительную анемию, вызванную донацией).

## Изучение эффективности иматиниба у больных хроническим миелоидным лейкозом в хронической фазе: результаты 6-летнего исследования

Г.Ч. Бадалова, Р.Ш. Рустамов

Азербайджанский НИИ гематологии и трансфузиологии, Баку

**Введение.** В работе представлены результаты 6-летнего наблюдения за больными хроническим миелоидным лейкозом в хронической фазе (ХМЛ), получившими иматиниб. Целью работы явилось изучение эффективности иматиниба по частоте, степени и стабильности достижения клинико-гематологической и цитогенетической ремиссии, длительности течения хронической фазы болезни по показателям выживаемости у больных ХМЛ, находящихся в хронической фазе болезни.

**Материалы и методы.** Под нашим наблюдением находились 94 больных (46 мужчин и 48 женщин) в возрасте от 18 до 68 лет ( $41,9 \pm 1,4$  года). Средняя длительность заболевания до начала терапии иматинибом составила  $8,7 \pm 1,1$  мес (0–84). У больных с хронической фазой ХМЛ применяли стандартную дозу иматиниба – 400 мг в сутки. У 77 больных иматиниб применяли впервые, а в остальных случаях больные на предыдущих этапах течения болезни получали терапию миелосаном, гидроксимочевинной, интерфероном- $\alpha$ .

**Результаты и обсуждение.** Как показали результаты исследований, к концу 3-го месяца монотерапии иматинибом у 91 (96,8%) больных была получена полная клинико-гематологическая ремиссия. У 3 больных ответ на терапию был частичный, у них на фоне клинического улучшения состояния,

болезнь постепенно прогрессировала сначала в фазу акселерации, а затем в фазу бластного криза. Полный цитогенетический ответ (ПЦО) наблюдался у 27 больных через 6 мес после начала лечения. К 12-му месяцу терапии ПЦО достигнут у 67 (71,27%) больных. Общая выживаемость больных с хронической фазой ХМЛ составила 81,9%. Изучение влияния давности ХМЛ, предшествующей терапии иматинибом, основных клинических и лабораторных признаков болезни, показателей пола и возраста показало, что они не оказывают достоверного влияния на общий показатель выживаемости. Результаты исследований показали низкую частоту и степень гематологической и негематологической токсичности препарата. Проявления гематологической токсичности (анемия, нейтропения, тромбоцитопения) наблюдалась у 7% больных. Лишь у 3% больных наблюдалось выраженное повышение уровня ферментов печени. Периферические отеки, мышечные судороги, оссалгии, кожная сыпь встречались у 22% больных, в большинстве случаев для их устранения специфическое лечение не требовалось.

**Заключение.** Результаты проведенных исследований подтверждают эффективность иматиниба как препарата 1-й линии в лечении хронической фазы ХМЛ.

## Характеристика субпопуляционного состава продукта афереза и секретируемых цитокинов у больных лимфомами

Д.С. Баранова<sup>1</sup>, И.В. Крючкова<sup>1</sup>, Н.В. Пронкина<sup>1</sup>, Л.В. Сахно<sup>1</sup>, М.А. Тихонова<sup>1</sup>, Е.В. Баторов<sup>1</sup>, А.В. Гилевич<sup>1</sup>, В.В. Сергеевичева<sup>1</sup>, С.А. Сизикова<sup>1</sup>, Г.Ю. Ушакова<sup>1</sup>, А.А. Останин<sup>1</sup>, Т.И. Поспелова<sup>2</sup>, Е.Р. Черных<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, <sup>2</sup> ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России

**Введение.** Раннее восстановление лимфоцитов, являющееся независимым предиктором выживаемости после трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) при ряде лимфопролиферативных заболеваний, в раннем посттрансплантационном периоде в значительной степени происходит за счет гомеостатической пролиферации Т-клеток, инфузируемых в составе продукта афереза.

**Материалы и методы.** Цель исследования – сравнительная оценка клеточного состава периферической крови (ПК) и продукта афереза у 40 больных лимфомами (12 – неходжкинскими лимфомами, 14 – лимфомой Ходжкина, 14 – множественной миеломой), характеристика субпопуляций и цитокинового профиля клеток продукта афереза в зависимости от содержания регуляторных Т-клеток ( $T_{\text{per}}$ ) и типа используемого в режимах мобилизации Г-КСФ (несвязанной формы и ПЭГ-конъюгированной).

**Результаты и обсуждение.** Сравнительное исследование клеточного состава ПК и продукта афереза у больных лимфомами позволило заключить, что процедура сепарации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) сопровождается обо-

гащением продукта афереза Т-клетками памяти:  $28,9 \pm 1,9\%$  против  $23,5 \pm 2,2\%$  в ПК ( $p_U = 0,009$ ) и  $9,2 \pm 0,8\%$  против  $7,1 \pm 1,0\%$  в ПК ( $p_U = 0,016$ )  $CD4^+CD45RO^+$  и  $CD8^+CD45RO^+$ -клеток соответственно. При этом образцы сепарата с повышенным относительно медианы содержанием  $CD4^+CD25^{\text{high}}$  ( $\geq 1,4\%$ ;  $n = 19$ ) и  $CD4^+CD25^+CD127^+$  ( $\geq 5,2\%$ ;  $n = 20$ )  $T_{\text{per}}$  характеризовались более низкой продукцией провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-17 и G-CSF). Относительное количество  $CD4^+FOXP3^+$ -клеток обратно коррелировало с относительным содержанием  $CD16^+$  НК-клеток ( $r_s = -0,53$ ;  $p = 0,001$ ;  $n = 37$ ) и активированных ( $CD14^+HLA-DR^+$ ) моноцитов ( $r = -0,47$ ;  $p = 0,005$ ;  $n = 33$ ) и положительно – с количеством лейкоцитов ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,009$ ;  $n = 38$ ). Сравнение образцов сепаратов, полученных при использовании для мобилизации ГСК различных препаратов Г-КСФ показало, что при режиме мобилизации с ПЭГ-Г-КСФ ( $n = 15$ ) регистрировалось более высокое количество  $CD4^+FOXP3^+$ -клеток и более высокая продукция клетками сепарата IL-2, IL-7 и IL-10, цитокинов, необходимых для пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. При использовании ПЭГ-Г-КСФ для мобилизации в продукте