

На правах рукописи

Кувшинов Алексей Юрьевич

**РОЛЬ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ В ТЕЧЕНИИ
ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА И ВОЗМОЖНОСТИ
СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Научные руководители:

Кандидат медицинских наук **Волошин Сергей Владимирович**

Доктор биологических наук **Мартынкевич Ирина Степановна**

Официальные оппоненты:

Моисеев Сергей Иванович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом радиационной медицины, гематологии и токсикологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России

Рукавицын Олег Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра Федерального государственного казенного учреждения «Главный военный клинический госпиталь им. академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, главный гематолог Министерства обороны Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2018 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России по адресу 191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (www.bloodscience.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

Актуальность темы исследования

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – клональное злокачественное лимфопролиферативное заболевание, первично локализующееся в костном мозге, субстратом которого являются зрелые лимфоциты в количестве не менее $5 \times 10^9/\text{л}$ в периферической крови, несущие на своей мембране рецепторы CD5, CD19, CD23.

Стратегия ведения пациентов с ХЛЛ значительно изменилась за последние десятилетия. И если раньше целями лечения таких больных было купирование симптомов заболевания, то в последние 20 лет – увеличение общей (ОВ) и беспрогрессивной выживаемости (БПВ). Достижение полной ремиссии (ПР) у больных ХЛЛ стало осуществимой целью лечения, которая напрямую коррелирует с длительной выживаемостью. Однако ХЛЛ все еще остается неизлечимым заболеванием.

Достижения в области изучения биологии ХЛЛ привели к разработке современных программ лечения, а также внедрению новых диагностических методов и прогностических факторов в повседневную деятельность. Появление новых вариантов терапии ХЛЛ (в том числе с использованием моноклональных антител и таргетных препаратов) привело к улучшению результатов лечения. Полная ремиссия и длительная БПВ стали достигаться уже после первой линии химиоиммунотерапии у многих пациентов с ХЛЛ. Тем не менее, у большинства пациентов, достигших ПР, в организме остается минимальное количество опухолевых клеток – минимальная остаточная болезнь (МОБ).

Минимальная остаточная болезнь, по сути, это наличие в организме опухолевых клеток (1 на 10000), которые невозможно выявить морфологическими методами. Внедрение новых методов в оценку эффективности лечения позволило разделить пациентов с ПР и частичной ремиссией (ЧР) на две группы: имеющие МОБ и те, у которых МОБ отсутствует.

Отсутствие МОБ становится важной оценкой результатов лечения, а МОБ-негативный статус пациента ассоциируется с длительной БПВ и ОВ и является единственным благоприятным прогностическим фактором, определяемым после терапии. Это подчеркивает важность искоренения болезни на молекулярном уровне. Следовательно, отсутствие МОБ может стать решающим показателем успешности лечения.

Степень разработанности темы

Большое количество работ посвящено возможности применения современных методов исследований для оценки МОБ при ХЛЛ. Описаны прогностические группы течения ХЛЛ, основанные на выявлении характерных иммунологических, цитогенетических и молекулярно-генетических маркеров. Количественная оценка МОБ после лечения предложена в качестве альтернативного средства для прогнозирования БПВ и ОВ. Однако, так как прогностическая

значимость МОБ никогда не была оценена вместе с предшествующими факторами риска, такими как цитогенетические аберрации, значимость этого анализа остается предметом многочисленных споров. Кроме того, неизвестно, какое прогностическое значение имеет МОБ при различных программах химиоиммунотерапии.

В настоящее время не решен вопрос о необходимости проведения поддерживающей терапии больным ХЛЛ. Поэтому, вероятно, проводя оценку МОБ, будет возможно определить необходимость поддерживающей терапии и ее влияние на МОБ.

Таким образом, необходимость оценки МОБ постепенно выходит за рамки клинических испытаний и становится частью рутинной клинической практики.

Цель

Оценить влияние минимальной остаточной болезни на результаты лечения хронического лимфолейкоза и разработать терапевтическую тактику на основе её детекции.

Задачи исследования

1. Выявить частоту встречаемости минимальной остаточной болезни у больных хроническим лимфолейкозом с помощью различных методов исследования.
2. Определить прогностическое значение минимальной остаточной болезни у пациентов с хроническим лимфолейкозом.
3. Исследовать взаимосвязь минимальной остаточной болезни с клинико-лабораторными и инструментальными характеристиками хронического лимфолейкоза и определить её место среди других прогностических факторов.
4. Разработать алгоритм мониторинга минимальной остаточной болезни и терапевтические подходы к ее коррекции у пациентов с хроническим лимфолейкозом.

Научная новизна

В ходе выполнения исследования впервые:

- установлена частота выявления и клиническое значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе;
- установлена степень взаимосвязи между минимальной остаточной болезнью и другими прогностическими факторами течения хронического лимфолейкоза;
- разработан алгоритм мониторинга минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза на этапах наблюдения и поддерживающей терапии;
- предложены подходы к терапевтической коррекции минимальной остаточной болезни у больных хроническим лимфолейкозом.

Практическая значимость работы

Определены индивидуальные маркеры, необходимые в комплексном обследовании (цитогенетический анализ, проточная цитометрия) для выявления и мониторинга минимальной остаточной болезни у пациентов с хроническим лимфолейкозом. Показана актуальность детекции минимальной остаточной болезни после проведенного лечения и ее мониторинга на этапах поддерживающей терапии и/или наблюдения. Показано, что на сегодняшний день оптимальным методом оценки минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза является многоцветная проточная цитометрия, с помощью которой МОБ-положительный статус определяется у 59,7% пациентов после 1-й линии лечения и у 56,2% – после терапии рецидива заболевания. Это обусловлено высокой чувствительностью метода (10^{-5} - 10^{-6}) и возможностью использования у всех пациентов вне зависимости от наличия или отсутствия генетических аномалий. Выявление минимальной остаточной болезни позволяет разделить больных хроническим лимфолейкозом на две различные прогностические группы течения заболевания после проведенного лечения: пациенты с отсутствием минимальной остаточной болезни имеют преимущества в беспрогрессивной и общей выживаемости (67,5 мес. и медиана не достигнута, соответственно) в сравнении с пациентами с МОБ-положительным статусом (33,2 мес. и 105,5 мес., соответственно). Стратификация больных хроническим лимфолейкозом в зависимости от достигнутого МОБ-статуса позволяет определять дальнейшую тактику ведения пациентов. Увеличение количества циклов индукционной программы терапии повышает частоту достижения МОБ-негативного статуса на 19,4%. Разработанная методика проведения поддерживающей терапии пациентам с хроническим лимфолейкозом позволяет повысить частоту достижения полных ремиссий на 10,4%, МОБ-негативного статуса на 23,5% и увеличить длительность достигнутого ответа на 17,4 мес.

Методология и методы исследования

В работе использованы клиничко-лабораторные, морфологические, цитогенетические, молекулярно-генетические, иммунофенотипические, рентгенорадиологические и статистические методы анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Минимальная остаточная болезнь хронического лимфолейкоза выявляется у 27,7% больных при использовании цитогенетических методов исследования и у 58,6% при определении с помощью проточной цитометрии. Проточная цитометрия является оптимальным методом детекции минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза ввиду высокой чувствительности и возможности применения у всех больных.

2. Наличие минимальной остаточной болезни является неблагоприятным фактором течения хронического лимфолейкоза, обуславливающим меньшую продолжительность общей и беспрогрессивной выживаемости. Медиана беспрогрессивной выживаемости у пациентов с МОБ-негативным статусом составляет 67,5 мес., а с МОБ-позитивным – 33,2 мес. ($p < 0,00001$). В группе пациентов с МОБ-негативным статусом медиана общей выживаемости не достигнута, а в случаях МОБ-позитивного – составила 105,5 мес. ($p = 0,044$).

3. Минимальная остаточная болезнь является важным прогностическим фактором течения хронического лимфолейкоза, не зависящим от других факторов прогноза (возраста, стадии заболевания, уровня $\beta 2$ -микроглобулина, уровня экспрессии CD38, молекулярно-генетической стратификации), и единственным, который может быть определен после проведенного лечения.

4. Предложенный алгоритм оценки минимальной остаточной болезни позволяет выявлять и контролировать размер остаточного опухолевого клона при проведении терапевтической коррекции минимальной остаточной болезни. Индивидуализация лечения позволяет улучшить качество ремиссии и увеличить частоту МОБ-негативного статуса на 19,4% при интенсификации терапии и на 23,5% при проведении поддерживающей терапии.

Степень достоверности, публикации и апробация диссертации

Степень достоверности обусловлена проведением обследования 198 больных ХЛЛ, использованием достоверных объективных методов исследования, качеством проведения лабораторных анализов, методами компьютерной визуализации изображений и статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации представлены на II Конгрессе гематологов России (Москва, 2014), 19-ом Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (19th Congress of the European Hematology Association, Милан, Италия, 2014), 57-ом Ежегодном Собрании Американского Общества Гематологов (57th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition, Орландо, США, 2015), Собрании Международного гематологического клуба (The International Hematology Club Meeting: a focus on lymphoid diseases, Париж, Франция, 2015), 21-ом Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (21st Congress of European Hematology Association, Копенгаген, Дания, 2016), IV Евразийском гематологическом форуме, XXI ЕАФО Семинаре по онкопатологии «Клиническая гематология» (Санкт-Петербург, 2016), II Петербургском онкологическом форуме (Санкт-Петербург, 2016), 58-ом Ежегодном Собрании Американского Общества Гематологов (58th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition, Сан-Диего, США, 2016).

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них – 2 в журналах,

рекомендованных ВАК РФ Министерства образования и науки РФ для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методологии и методов исследования, собственных результатов исследования, заключения, практических рекомендаций и библиографии. Список литературы включает 121 источник литературы на русском и иностранном языках. Работа содержит 34 рисунка и 9 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования и характеристика пациентов

Характеристика исследуемой группы пациентов

В исследование были включены 198 больных ХЛЛ, проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА» и других гематологических отделениях лечебных учреждений г. Санкт-Петербурга с 2007 по 2016 год. Среди них было 110 (55,6%) мужчин и 88 (44,4%) женщин. Возраст больных на момент постановки диагноза составил от 31 до 80 лет (медиана 61 год).

Диагностика ХЛЛ и показания к началу терапии определялись в соответствии с международными критериями IWCLL 2008 г. Характеристика больных ХЛЛ перед началом терапии представлена в таблице 1.

Программы химиотерапии (ХТ), проводимые пациентам, распределились следующим образом: в рамках 1-й линии – RFC (ритуксимаб, флударабин, циклофосфамид) (n=70), RB (ритуксимаб, бендамустин) (n=28), FC (флударабин, циклофосфамид) (n=12), R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон) (n=6), O-Chl (офатумумаб, хлорбутин) (n=4), R-Chl (n=6), R-I (ритуксимаб, ибрутиниб) (n=8); в рамках 2-й и последующих линий – RFC (n=18), RB (n=18), FC (n=6), I±ХТ (ибрутиниб, химиоиммунотерапия) (n=20), R-Campath (ритуксимаб, алемтузумаб) (n=2).

Таблица 1 – Характеристика больных хроническим лимфолейкозом перед началом лечения

| Параметр | Количество случаев, n (%) |
|--|---------------------------|
| Классификация по Rai | (n=198) |
| 0 | 0 (0%) |
| I | 50 (25,3%) |
| II | 104 (52,5%) |
| III | 22 (11,1%) |
| IV | 22 (11,1%) |
| Классификация по Binet | (n=198) |
| A | 30 (15,2%) |
| B | 138 (69,6%) |
| C | 30 (15,2%) |
| Прогностические группы | (n=198) |
| 1. Нейтральный прогноз | 136 (68,7%) |
| – трисомия 12 хромосомы | 26 (19,1%) |
| – нормальный кариотип | 104 (76,5%) |
| – генетические аномалии неопределенного значения | 6 (4,4%) |
| 2. Благоприятный прогноз (del13q) | 34 (17,2%) |
| 3. Неблагоприятный прогноз | 28 (14,1%) |
| – del 11q | 12 (42,9%) |
| – del 11q и del 13q | 10 (35,7%) |
| – del 17p | 6 (21,4%) |
| Показания к началу лечения | |
| – Анемия | 8 (4,0%) |
| – Тромбоцитопения | 10 (5,1%) |
| – Анемия + Тромбоцитопения | 12 (6,1%) |
| – В-симптомы | 48 (24,2%) |
| – Слабость | 42 (21,2%) |
| – Bulky Disease | 12 (6,1%) |
| – Прогрессивная лимфаденопатия | 42 (21,2%) |
| – Сдавление или смещение другого органа | 8 (4,0%) |
| – Удвоение лимфоцитоза менее чем за 6 месяцев | 16 (8,1%) |
| Уровень гемоглобина | |
| гемоглобин \geq 100 г/л | 178 (89,9%) |
| гемоглобин < 100 г/л | 20 (10,1%) |
| Уровень тромбоцитов | |
| тромбоциты \geq 100 $\times 10^9$ /л | 176 (88,9%) |
| тромбоциты < 100 $\times 10^9$ /л | 22 (11,1%) |

Методы исследования

Обследование пациентов с ХЛЛ на момент диагностики и с целью оценки эффективности проведенного лечения, проходило согласно рекомендациям IWCLL 2008 г. – применялись клинические и инструментальные методы исследования: сбор жалоб, анамнеза, объективный статус больного; клинический анализ крови; биохимические показатели крови; морфологическое исследование аспирата и трепанобиоптата костного мозга; проточная цитометрия периферической крови и/или костного мозга; цитогенетические исследования периферической крови и/или костного мозга; КТ шеи, груди, живота и таза; сбор информации о сопутствующих заболеваниях и сопутствующей терапии.

Интерпретация патологии кариотипа производили в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2013) [Simons A. et al., 2013]. Цитогенетический анализ и архивирование полученных данных выполняли с использованием компьютерной системы анализа изображений «ВидеоТест». FISH исследование проводили с использованием суспензии клеток, приготовленной для стандартного цитогенетического исследования или мазков периферической крови/костного мозга на предметном стекле.

Лабораторные исследования по диагностике МОБ ХЛЛ проводили на 5-цветном цитофлуориметре проточного типа. За основу комбинаций антител был взят международный стандартизированный протокол для мониторинга МОБ ХЛЛ European Research Initiative in CLL (ERIC) [Rawstron A.C. et al., 2007].

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы STATISTICA 10.0. Анализ общей и беспрогрессивной выживаемости проводили с использованием метода Каплана-Майера, с применением лог-ранк теста для оценки достоверности различий. В качестве точки отсчета для вычисления общей выживаемости выбрали дату постановки диагноза ХЛЛ, для вычисления беспрогрессивной выживаемости – дату начала терапии. Регрессионный анализ проводили при помощи метода Кокса. Для сравнения различий в непрерывных данных использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни и хи-квадрат, а также корреляционный анализ. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Частота встречаемости минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза в различных группах больных

Цитогенетические методы исследования

С целью определения статуса МОБ с помощью цитогенетических методов всем пациентам выполнены кариотипирование и FISH-исследование периферической крови или костного мозга. Всего генетические аномалии (ГА) выявлены в 94 (47,5%) случаях: с помощью GTG-метода в 13,1% (26/198) случаев; с помощью FISH-исследования – в 44,4% (88/198).

После индукционной программы терапии МОБ с помощью цитогенетических методов исследования выявлена у 27,7% пациентов (26/94), соответственно МОБ-негативный статус достигнут у 72,3% (68/94).

Иммунофенотипирование

Оценка МОБ после завершения индукционной программы химиотерапии проводилась на

образцах костного мозга всем больным (N=198), а в период ПТ или наблюдения в 89 случаях (на образцах костного мозга и/или периферической крови).

Минимальная остаточная болезнь выявлена в 116 случаях – 58,6%. МОБ-негативный статус достигнут в 41,4% (82/198) случаях: у 40,3% (54/134) пациентов после 1-й линии терапии и в 43,8% (28/64) случаях у пациентов после 2-й или последующих линий терапии ($p>0,05$).

Проведен сравнительный анализ частоты выявления МОБ с помощью цитогенетических методов с данными, полученными при ПЦ (рисунок 1).

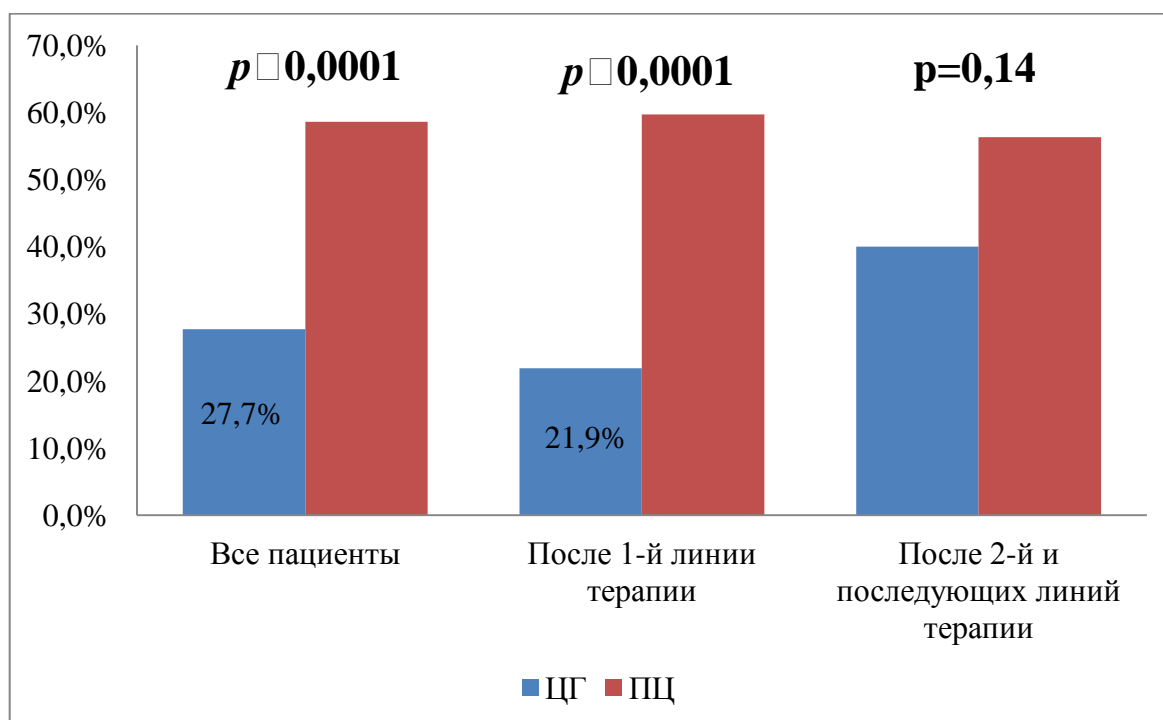


Рисунок 1 – Частота выявления МОБ с помощью цитогенетических методов и проточной цитометрии

У 76,9% (20/26) с помощью ПЦ подтверждено наличие МОБ, выявленное цитогенетическими методами. Среди 68 пациентов с МОБ-негативным статусом по данным цитогенетических методов исследований, при проведении ПЦ отсутствие МОБ подтверждено только у 26 (38,2%) пациентов.

Среди пациентов, достигших МОБ-негативный статус по данным ПЦ, лишь у 6 (17,6%) определялись ранее выявленные ГА. В то время как среди пациентов с МОБ-негативным статусом по данным цитогенетических методов исследований (n=68), МОБ с помощью ПЦ выявлена в 40 (58,8%) случаях ($p=0,0001$) (рисунок 2).

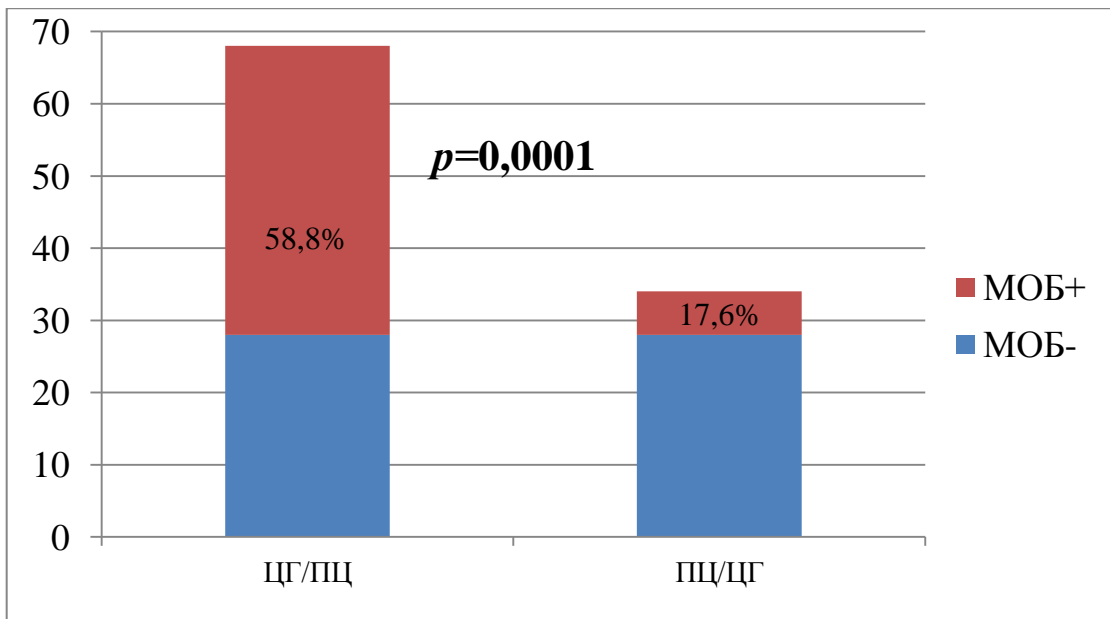


Рисунок 2 – Сравнительный анализ методов оценки МОБ-статуса

Прогностическая значимость минимальной остаточной болезни

Учитывая результаты сравнительного анализа методов детекции МОБ, представлены данные о прогностической значимости МОБ, определяемой с помощью ПЦ.

Медиана БПВ у пациентов с МОБ-негативным статусом вне зависимости от линий терапии составила 67,5 мес., а с МОБ-позитивным – 33,2 мес. ($p \leq 0,000001$) (рисунок 3).

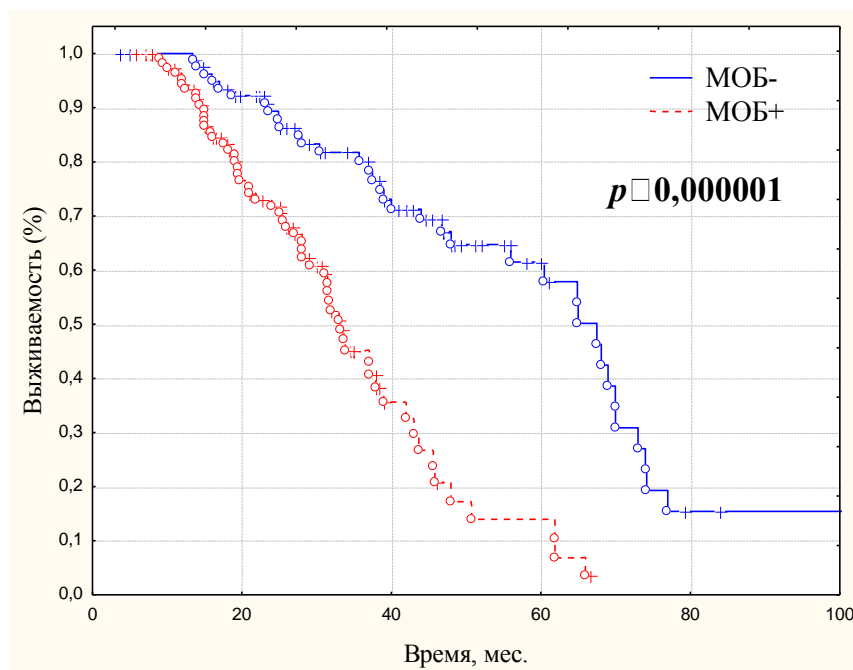


Рисунок 3 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов с МОБ-негативным статусом

При этом, достоверные различия также были выявлены и внутри групп в зависимости от линии терапии: в группе 1 у пациентов с МОБ-негативным статусом медиана БПВ составила

70,0 мес., а с МОБ-положительным – 37,0 мес. ($p < 0,00001$); в группе 2 – 46,7 мес. 26,0 мес., соответственно ($p = 0,003$).

Среди пациентов с ПР БПВ отличалась в зависимости от МОБ-статуса. Значимые различия были выявлены в общей выборке и в группе 1: медиана БПВ с МОБ-негативным статусом не достигнута в общей выборке и в группе 1, а с МОБ-положительным составила 33,2 мес. ($p = 0,005$) и 45,6 мес. ($p = 0,007$), соответственно (рисунок 4).

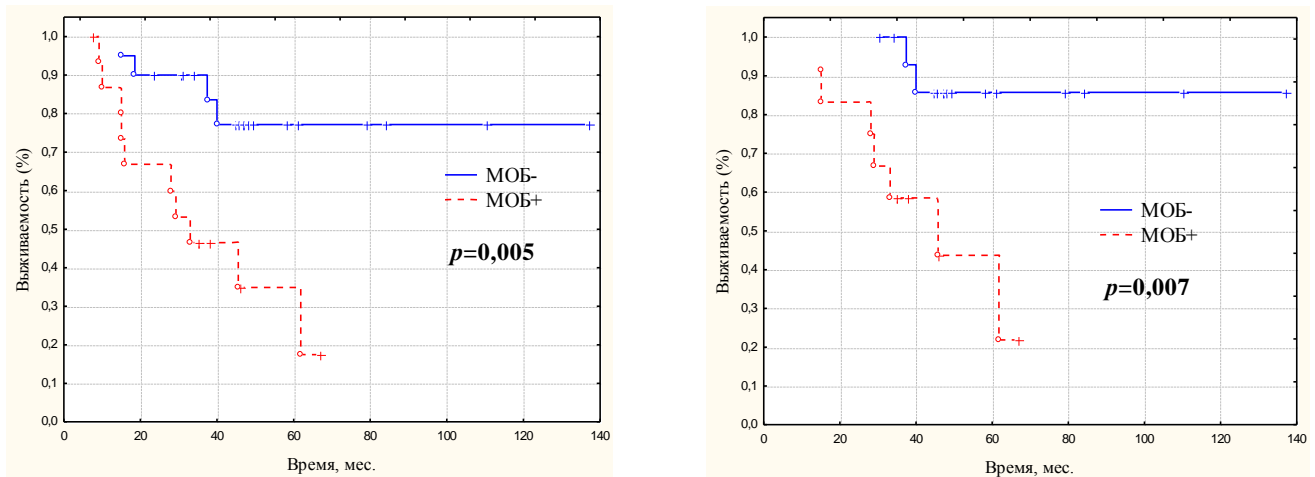


Рисунок 4 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов с полной ремиссией в зависимости от МОБ-статуса: общая выборка (слева), группа 1 (справа).

Пациенты с ЧР также имели различия в БПВ в зависимости от наличия или отсутствия МОБ. Так, медиана БПВ при МОБ-негативном статусе составила 64,9 мес., а при МОБ-положительном – 33,0 мес. ($p = 0,00001$) (рисунок 5).

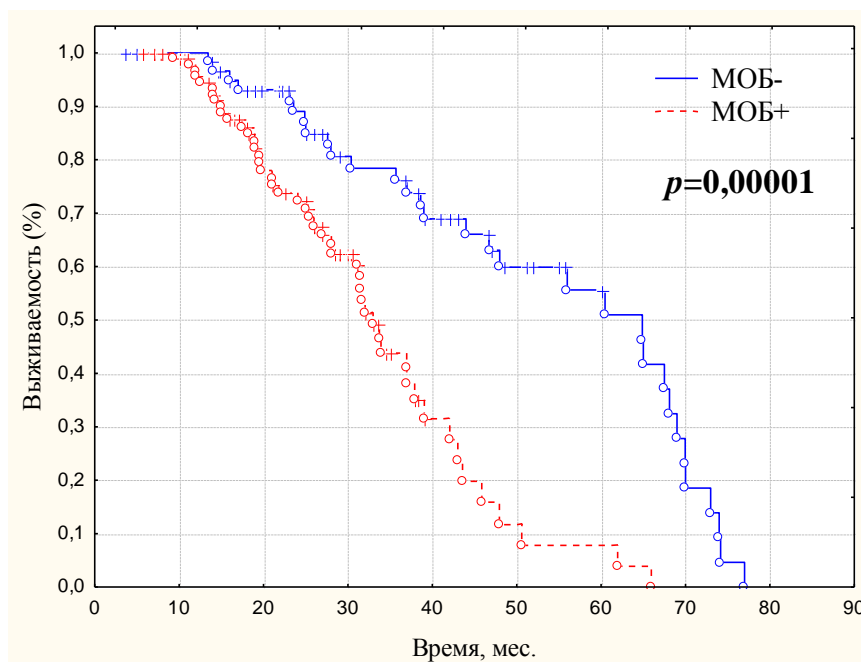


Рисунок 5 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов с частичной ремиссией в зависимости от МОБ-статуса

Значимые различия в БПВ среди пациентов достигших ЧР были выявлены и внутри групп: в группе 1 у пациентов с МОБ-негативным статусом медиана составила 68,1 мес., а с МОБ-позитивным – 37,0 мес. ($p=0,00023$); в группе 2 – 48,0 мес. и 25,0 мес., соответственно ($p=0,004$) (рисунок 6).

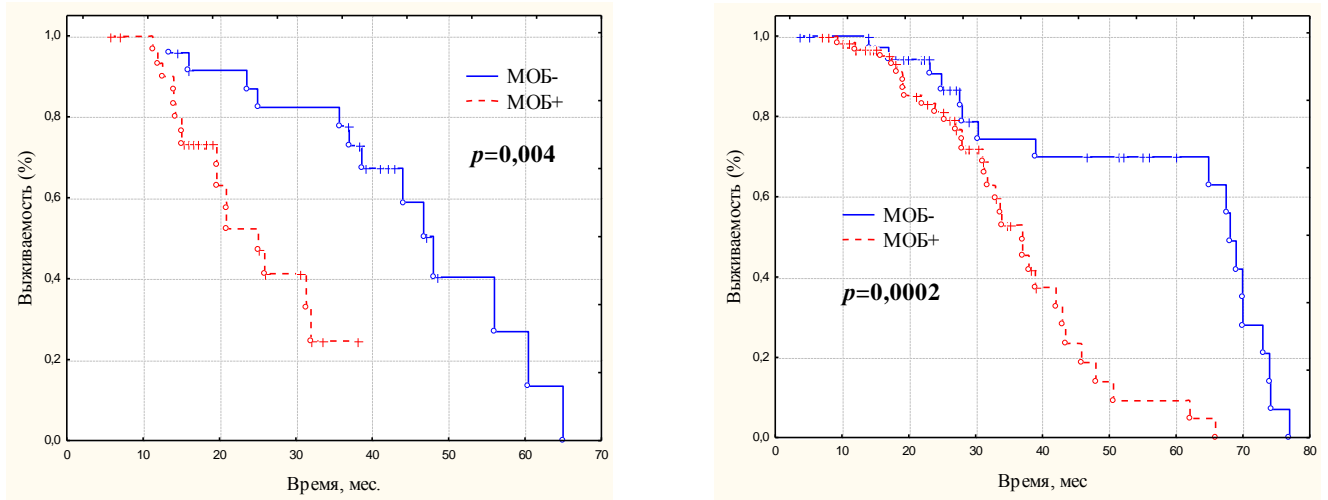


Рисунок 6 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов с частичной ремиссией в зависимости от МОБ-статуса после 1-й линии терапии (слева) и 2-й и последующих линий (справа)

Был проведен сравнительный анализ БПВ среди пациентов, достигших МОБ-негативный статус, в зависимости от клинического ответа на проведенное лечение. Медиана БПВ у пациентов с МОБ-негативной ПР не достигнута, а среди пациентов с МОБ-негативной ЧР составила 64,9 мес. ($p=0,0015$) (рисунок 7).

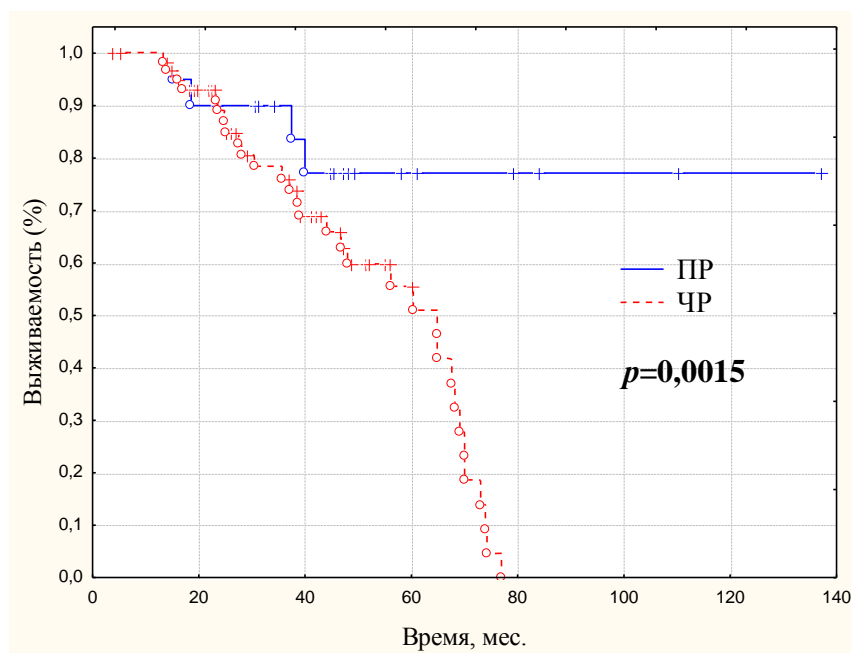


Рисунок 7 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов МОБ-негативным статусам в зависимости от клинического ответа

В группе 1 также были выявлены значимые различия в БПВ среди пациентов имевших МОБ-негативные ПР и ЧР: медиана БПВ у пациентов с ПР не достигнута, а у пациентов с ЧР составила 68,1 мес. ($p=0,0007$).

Учитывая полученные ранее результаты сравнения БПВ у пациентов в МОБ-негативным статусом в зависимости от полноты ремиссии, нами была проанализирована значимость отсутствия МОБ вне зависимости от клинического эффекта. По результатам проведенного исследования установлены различия между пациентами с МОБ-положительными ПР и МОБ-негативными ЧР: в общей выборке медиана БПВ составила 32,2 мес. и 64,9 мес., соответственно ($p=0,048$) (рисунок 8).

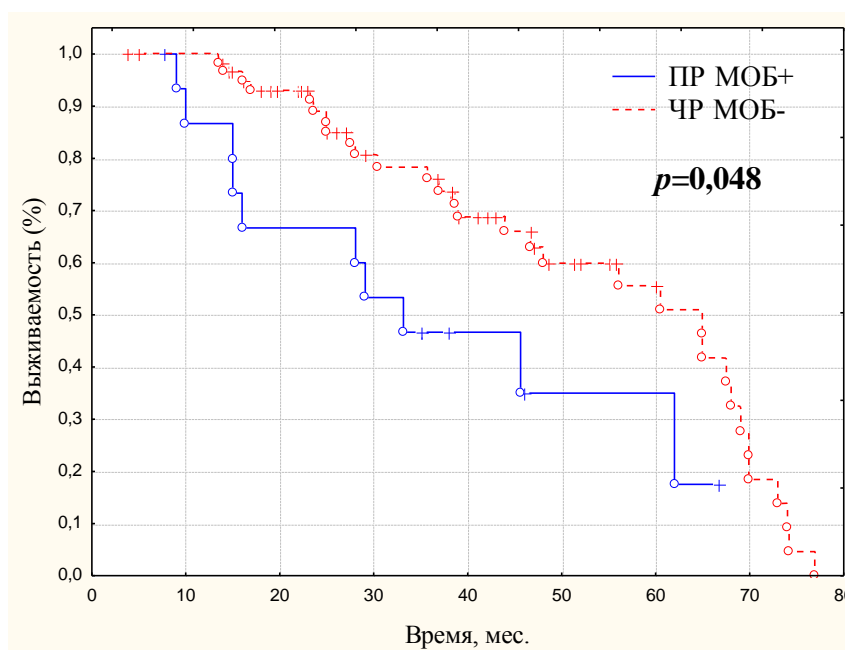


Рисунок 8 – Беспрогрессивная выживаемость у пациентов в зависимости от клинического ответа и МОБ-статуса

Достоверные различия были выявлены и в группе 2: медиана БПВ у пациентов с МОБ-положительной ПР составила 10,0 мес., а у пациентов с МОБ-негативной ЧР – 42,0 мес. ($p=0,037$).

На заключительном этапе оценки прогностической значимости МОБ-статуса в течении ХЛЛ нами была проанализирована ОВ у пациентов в группе 1. На основании полученных данных установлено, что пациенты с МОБ-негативным статусом имеют более длительную ОВ по сравнению с пациентами с МОБ-положительным статусом: медиана ОВ не достигнута и 105,5 мес., соответственно ($p=0,044$) (рисунок 9).

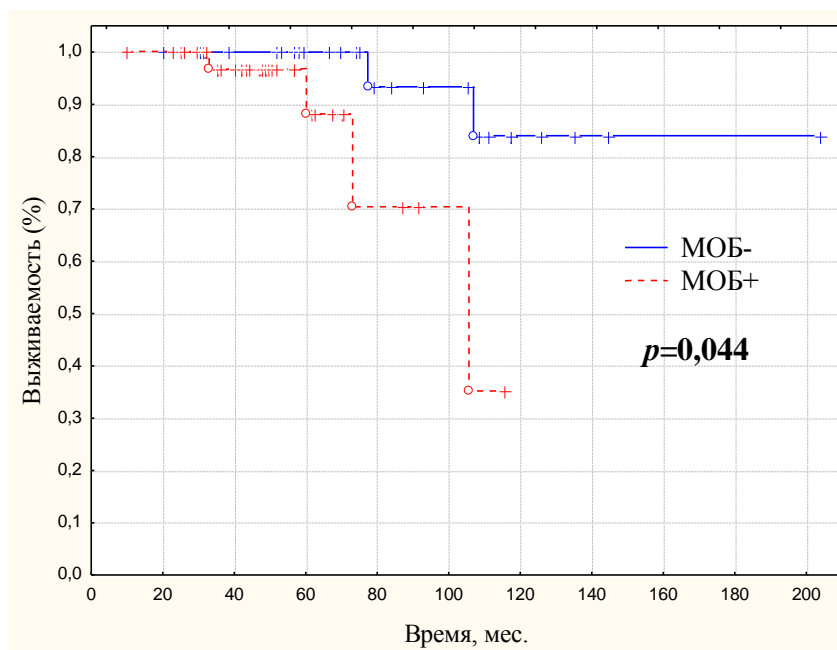


Рисунок 9 – Общая выживаемость у пациентов в зависимости от МОБ-статуса

Взаимосвязь минимальной остаточной болезни с клинико-лабораторными и инструментальными характеристиками хронического лимфолейкоза и другими прогностическими факторами

Нами был проведен однопараметрический, а в последствие и многопараметрический анализ, с целью определения факторов, оказывающих влияние на течение ХЛЛ (таблица 2).

Таблица 2 – Анализ факторов, оказывающих влияние на течение хронического лимфолейкоза

| Факторы, оказывающие влияние на течение ХЛЛ | | Однопараметрический анализ, p | Многопараметрический анализ, p | |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|--|---------------|
| Все случаи (N=198) | | | | |
| Общая выживаемость | Возраст | 0,007 | 0,08 | |
| | Стадия | Binet | 0,00005 | 0,0002 |
| | | Rai | 0,07 | |
| | CD38 | 0,003 | 0,54 | |
| | Прогностическая группа | 0,006 | 0,23 | |
| | Генетические аномалии | 0,007 | 0,001 | |
| | Минимальная остаточная болезнь | <input type="checkbox"/> 0,000001 | 0,003 | |
| $\beta 2$ -микроглобулин | 0,36 | | | |
| Беспрогрессивная выживаемость | Возраст | 0,89 | | |
| | Стадия | Binet | 0,58 | |
| | | Rai | 0,74 | |
| | Клинический ответ | 0,00003 | 0,0003 | |
| | Прогностическая группа | 0,75 | | |
| | Генетические аномалии | 0,32 | | |
| | CD38 | 0,37 | | |
| | Минимальная остаточная болезнь | 0,000003 | <input type="checkbox"/> 0,000001 | |
| Поддерживающая терапия | 0,04 | 0,64 | | |

| Пациенты после 1-й линии терапии (n=134) | | | |
|--|--------------------------------|---------|----------------|
| Беспрогрессивная выживаемость | Клинический ответ | 0,00001 | 0,00002 |
| | Минимальная остаточная болезнь | 0,00001 | 0,00003 |
| | Программа химиотерапии | 0,02 | 0,14 |
| Пациенты после 2-й и последующих линий терапии (n=64) | | | |
| Беспрогрессивная выживаемость | Генетические аномалии | 0,04 | 0,005 |
| | Минимальная остаточная болезнь | 0,0009 | 0,00001 |

В дальнейшем нами проведена оценка характера и значимости влияния всех выявленных ранее прогностических факторов.

При анализе ОВ в зависимости от возраста выявлены статистически значимые различия между пациентами моложе 65 лет (n=140) и 65 лет и старше (n=58): медиана не достигнута и 102 мес., соответственно ($p=0,002$).

Значимые различия в ОВ были выявлены при сравнении стадий заболевания по системе Binet. Сравнивались стадии А (медиана не достигнута) со стадией В (медиана составила 110 мес.) ($p=0,00005$) и со стадией С (медиана – 57 мес.) ($p=0,0003$). Проведение анализа ОВ, включающего все стадии, не представлялось возможным в связи с недостаточным количеством событий в одной из групп.

Среди пациентов, различавшихся по уровню экспрессии CD38 (30% и более), обнаружены значимые различия в ОВ: медиана ОВ у пациентов с высокой экспрессией составила 102 мес., а с низкой (менее 30%) – не достигнута ($p=0,00009$).

Получены результаты о значимом влиянии программы ХТ на БПВ у пациентов в группе 1. Проведено сравнение наиболее часто используемых программ: FC, RFC и RB. Медиана БПВ после проведения ХТ по программе FC составила 39 мес., RFC – 62 мес., RB – 50,7 мес., а при других вариантах ХТ – 31 мес. ($p=0,031$).

При оценки значимости полноты ремиссии было установлено, что медиана БПВ у пациентов с ПР не достигнута, а с ЧР составила 42 мес. ($p=0,00001$).

Пациенты, получавшие ПТ имели более длительную медиану БПВ, чем пациенты, которые находились под наблюдением без ПТ: 48 мес. и 37 мес., соответственно ($p=0,03$).

Кроме того, в результате анализа были получены достоверные данные о более длительном сохранении достигнутого ответа у пациентов получавших ПТ. Медиана

длительности ответа у пациентов получавших ПТ составила 44,0 мес. и 26,6 мес. у пациентов без ПТ ($p=0,0006$). Значимые различия были выявлены и внутри каждой из групп: в группе 1 – 46,1 мес. с ПТ и 28,8 мес. без ПТ ($p=0,047$); в группе 2 – 35,0 мес. и 20,2 мес., соответственно ($p=0,013$).

При дальнейшем анализе установлено, что частота достижения МОБ-негативного статуса не зависела от:

- возраста;
- стадии заболевания (выявлены различия в группе 1 между ранними и поздними стадиями: по Rai – 58,8% и 32,4% ($p=0,0105$); по Binet – 66,7% и 35,4% ($p=0,0131$));
- уровня гемоглобина (менее 100 г/л) и тромбоцитов (менее 100×10^9 /л);
- уровня экспрессия CD38;
- клинического ответа;
- прогностической группы;
- программы химиотерапии.

Мониторинг минимальной остаточной болезни в процессе поддерживающей терапии или наблюдения

Проведен мониторинг МОБ у 101 пациента: 89 – находившиеся на этапе ПТ, 12 – без ПТ. У пациентов, имевших МОБ-негативный статус, по данным исследования костного мозга, дальнейшая оценка МОБ проводилась на образцах периферической крови. Исследования выполнялись на основании разработанного алгоритма мониторинга МОБ (рисунок 10). Оценка МОБ после индукционной программы терапии проводилось на образцах костного мозга.

Прогрессирование/рецидив заболевания отмечены у 28,0% (14/50) пациентов с МОБ-негативным статусом (двое из них достигли МОБ-негативный статус на этапе ПТ) и у 35,9% (14/39) пациентов с МОБ-позитивным статусом ($p>0,05$). Среди пациентов с МОБ-негативным статусом прогрессирование/рецидив заболевания, как правило, развивался после завершения программы ПТ, а среди пациентов с МОБ-позитивным лишь четверо смогли завершить программу ПТ полностью ($p=0,0001$).

Также стоит отметить, что у пациентов с МОБ-позитивным статусом отмечалось снижение уровня МОБ в процессе ПТ до $4,9 \pm 3,2\%$ через 6 мес., $3,8 \pm 2,5\%$ через 12 мес., $2,3 \pm 1,8\%$ через 1,5 года и $1,0 \pm 0,6\%$ через 2 года ($p<0,05$). При этом частота развития инфекционных осложнений не отличалась от пациентов не получавших ПТ: 3,2 случая в год против 2,6 ($p \square 0,05$).

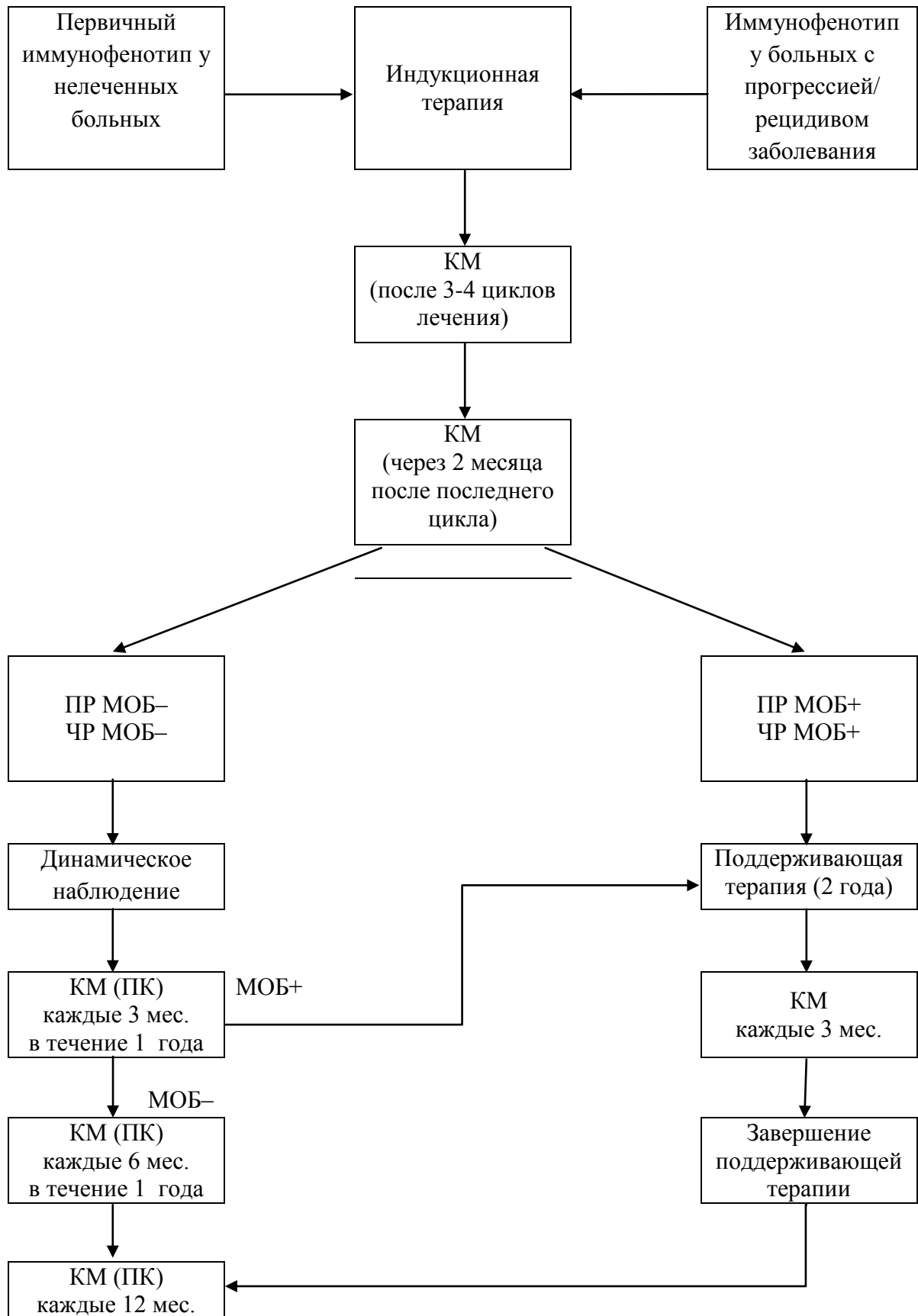


Рисунок 10 – Алгоритм мониторинга минимальной остаточной болезни при ХЛЛ

Примечание: МОБ – минимальная остаточная болезнь; КМ – костный мозг; ПК – периферическая кровь; ПР МОБ+ – полная МОБ-положительная ремиссия; ПР МОБ- – полная МОБ-отрицательная ремиссия; ЧР МОБ+ – частичная МОБ-положительная ремиссия; ЧР МОБ- – частичная МОБ-отрицательная ремиссия.

Возможности терапевтических методов коррекции минимальной остаточной болезни

При проведении однопараметрического регрессионного анализа нами было установлено значимое влияние на БПВ количества циклов терапии ($p=0,006$). Поэтому в дальнейшем, определена возможность влиять на частоту достижения МОБ-негативного статуса увеличением количества циклов терапевтических программ. Нами была проанализирована частота достижения МОБ-негативного статуса среди пациентов, которым проводилась промежуточная оценка МОБ в середине программы (после 3-4 циклов) лечения ($n=54$). Среди этих пациентов частота достижения МОБ-негативной ремиссии составила 18,5% при промежуточной оценке и 48,1% после завершения индукционной программы терапии ($p=0,009$). Затем мы определили общую частоту достижения МОБ-негативных ремиссий у пациентов, которым было проведено 4 цикла индукционной программы лечения, и у пациентов, которым проведено 6-8 циклов. МОБ-негативный статус достигнут в 23,3% (20/86) после 4 циклов лечения и в 42,7% после завершения программы химиотерапии ($p=0,0024$).

Анализ БПВ также продемонстрировал значимые различия между этими группами пациентов (4 цикла химиотерапии против 6-8 циклов): медиана БПВ составила 32,0 мес. и 48,0 мес., соответственно ($p=0,015$) (рисунок 11).

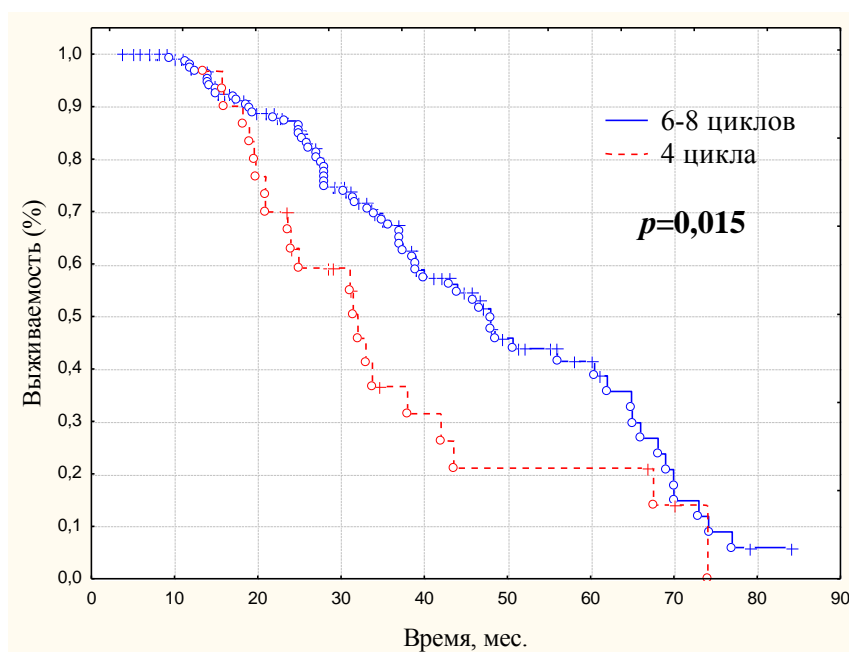


Рисунок 11 – Беспрогрессивная выживаемость при проведении различного количества циклов химиотерапии

Преимущество в длительности достигнутого ответа и увеличении БПВ у пациентов с ХЛЛ, получавших ПТ в нашем исследовании было продемонстрировано ранее. Помимо этого, нами отмечено, что усиление качества ответа (с ЧР до ПР) наблюдалось только у пациентов,

получавших ПТ – 10,4% (15/144) ($p=0,013$).

В нашей работе также было проведено сравнение различных программ ПТ. Отличия в длительности ответа в зависимости от вида поддерживающей терапии (ритуксимаб или ибрутиниб) выявлены не были ($p \geq 0,05$). При этом, на ПТ ибрутинибом частота увеличения глубины ответа составила 28,6% (8/28), а на ПТ ритуксимабом – 6,0% (7/144) ($p=0,0005$).

Частота развития прогрессирования/рецидива заболевания у пациентов, получавших ПТ, составила 39,6% (57/144) случаев, а у пациентов без ПТ – 66,7% (36/54) ($p=0,0007$). Прогрессирование/рецидив заболевания чаще возникали у пациентов, получавших ПТ ритуксимабом, в сравнении с получавшими ибрутиниб: 45,7% (53/116) и 14,3% (4/28), соответственно ($p=0,0023$).

Среди пациентов, получавших ПТ, 42,7% (38/89) имели МОБ-негативный статус после завершения программы химиотерапии. На фоне проведения ПТ в 23,5% (12/51) случаев, среди пациентов с МОБ-позитивным статусом, через 6-12 мес. МОБ не определялась. В группе без ПТ у всех пациентов сохранялся МОБ-статус, достигнутый после завершения программы индукционной терапии.

Среди пациентов с МОБ-негативной ПР рецидив заболевания встречался реже, чем у пациентов с МОБ-позитивной ПР – 20,0% (4/20) против 62,5% (10/16), соответственно ($p=0,0093$).

Таким образом, результаты научного исследования, выполненного с применением стандартных и современных иммунофенотипических и цитогенетических методов, показали, что минимальная остаточная болезнь является независимым прогностическим фактором течения хронического лимфолейкоза. Кроме того, минимальная остаточная болезнь – это единственный прогностический фактор, определяемый после лечения. В работе доказано, что достижение МОБ-негативного статуса является благоприятным прогностическим фактором вне зависимости от клинического ответа на лечение и количества проводимых линий терапии. Продемонстрирована необходимость выявления и мониторинга МОБ с помощью проточной цитометрии на различных этапах лечения. Также показана возможность терапевтического воздействия на МОБ с помощью интенсификации лечения и поддерживающей терапии.

Выводы

1. Частота выявления минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза при помощи проточной цитометрии составляет 59,7% после 1-й линии лечения и 56,2% – после терапии рецидива заболевания. Вследствие высокой чувствительности и возможности применения у всех больных, проточная цитометрия является оптимальным

методом детекции и мониторинга минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза.

2. Достижение МОБ-негативного статуса ассоциируется с более длительной выживаемостью больных хроническим лимфолейкозом: медиана беспрогрессивной выживаемости составила 67,5 мес. по сравнению с 33,2 мес. в группе с МОБ-позитивным статусом, а медиана общей выживаемости не достигнута против 105,5 мес. при наличии минимальной остаточной болезни ($p=0,044$).

3. Минимальная остаточная болезнь является значимым и независимым фактором течения хронического лимфолейкоза и единственным, который определяется после проведенного лечения. Прогностическая значимость минимальной остаточной болезни не зависит от вида терапии, других факторов прогноза, а также от достигнутого клинического эффекта (пациенты с частичной ремиссией и отсутствием минимальной остаточной болезни имели более длительную беспрогрессивную выживаемость (64,9 мес.) по сравнению с пациентами с полной ремиссией и наличием минимальной остаточной болезни (32,2 мес.) ($p=0,048$)).

4. Терапевтическая коррекция – индивидуализация интенсификации лечения и поддерживающей терапии, основанная на алгоритме мониторинга минимальной остаточной болезни, позволяет повысить частоту достижения полных ремиссий на 10,4%, МОБ-негативного статуса на 23,5%, и увеличивает длительность достигнутого ответа на 17,4 мес.

Практические рекомендации

1. Детекция минимальной остаточной болезни хронического лимфолейкоза на основе первичного иммунофенотипа опухолевых клеток, определенного с помощью проточной цитометрии, и результатов цитогенетического анализа должны являться обязательной частью комплексного обследования для стратификации больных на прогностические группы.

2. Использование алгоритма мониторинга минимальной остаточной болезни позволяет определять величину остаточного опухолевого клона и проводить индивидуальную коррекцию лечения. Достижение МОБ-негативного статуса позволяет завершить программу лечения пациента или отсрочить проведение поддерживающей терапии при её необходимости.

3. Максимальный эффект постиндукционного лечения (интенсификация или проведение поддерживающей терапии) у больных хроническим лимфолейкозом может быть достигнут на основе результатов оценки минимальной остаточной болезни. Наличие минимальной остаточной болезни после индукционной терапии является показанием к проведению поддерживающего лечения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Фоминых, М.С. Информативность различных методов оценки поражения костного мозга при хронических В-лимфопролиферативных новообразованиях: сравнение морфологической, гистологической методик, иммунофенотипирования методом проточной цитометрии / М.С. Фоминых, А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин и др. // Вестник Гематологии. – 2012. – Т. 8, №4. – С. 37.
2. Кувшинов, А.Ю. Динамика величины опухолевого клона и диагностика минимальной остаточной болезни у больных хроническим лимфолейкозом / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, В.А. Шуваев и др. // Вестник Гематологии. – 2014. – Т. 10, №1. – С. 76.
3. Волошин, С.В. Сравнительный анализ результатов лечения хронического лимфолейкоза по программам R-FC и RB // С.В. Волошин, А.В. Шмидт, В.А. Шуваев и др. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, №1. – С. 84.
4. Кувшинов, А.Ю. Динамика величины опухолевого клона у больных хроническим лимфолейкозом / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, В.А. Шуваев и др. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, №1. – С. 98-99.
5. Kuvshinov, A. Prognostic significance of immunophenotyping and quantification of clonal lymphoid cells in patients with chronic lymphocytic leukemia / A. Kuvshinov, S. Voloshin, A. Schmidt et al. // Haematologica (Abstract Book). – 2014. – Vol. 99 – PB1524.
6. Kuvshinov, A. The Frequency of Occurrence of Minimal Residual Disease into Different Prognostic Groups of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia / A. Kuvshinov, S. Voloshin, I. Martynkevich et al. // Blood (57th ASH Annual Meeting Abstracts). – 2015. – Vol. 126. – P. 5275.
7. Kuvshinov, A. Phenotypic Characteristics of Tumor Cells in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia into Different Prognostic Groups / A. Kuvshinov, S. Voloshin, I. Martynkevich et al. // Blood (57th ASH Annual Meeting Abstracts). – 2015. – Vol. 126. – P. 5276.
8. Кувшинов, А.Ю. Хронический лимфолейкоз: прогностическое значение минимальной остаточной болезни, возможности современных методов ее выявления и коррекции (обзор литературы) / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, №2. – С. 191-198.
9. Кувшинов, А.Ю. Эффективность современных лекарственных препаратов в достижении МОБ-негативного статуса у больных хроническим лимфолейкозом / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2017. – Т. 18. – С. 362-381. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.medline.ru/public/art/tom18/art25.html>.

10. Кувшинов, А.Ю. Частота МОБ-отрицательных ремиссий у больных хроническим лимфолейкозом с различным прогнозом / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, №3. – С. 349-350.
11. Кувшинов, А.Ю. Оценка минимальной остаточной болезни при применении ибрутиниба в терапии рецидивирующих и рефрактерных форм хронического лимфолейкоза / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Гематология и трансфузиология (Приложение №1). – 2016. – Т. 61 – С. 130.
12. Кувшинов, А.Ю. Влияние иммунофенотипа опухолевых клеток на достижение МОБ-негативных ремиссий у больных хроническим лимфолейкозом различных прогностических групп / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Вестник Гематологии. – 2016. – Т. 12, №2. – С. 17-18.
13. Кувшинов, А.Ю. Значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе в эру таргетных лекарственных препаратов / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61, №4. – С. 190-196.
14. Кувшинов, А.Ю. Эффективность применения ибрутиниб-содержащих программ терапии в лечении рецидивирующих и рефрактерных форм хронического лимфолейкоза / А.Ю. Кувшинов, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич и др. // Вестник Гематологии. – 2016. – Т. 12, №2. – С. 39.
15. Kuvshinov, A. Ibrutinib-Based Therapy in the Treatment of Relapsed and Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia / A. Kuvshinov, S. Voloshin, I. Martynkevich et al. // Blood (58th ASH Annual Meeting Abstracts). – 2016. – Vol. 128. – P. 5599.

Список сокращений и условных обозначений

| | |
|----------|--|
| АутоТГСК | – аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток |
| БПВ | – беспрогрессивная выживаемость |
| ГА | – генетические аномалии |
| КМ | – костный мозг |
| КТ | – компьютерная томография |
| МОБ | – минимальная остаточная болезнь |
| МФЦ | – метафазная цитогенетика |
| ОВ | – общая выживаемость |
| ПР | – полная ремиссия |
| ПТ | – поддерживающая терапия |
| ПЦ | – многоцветная проточная цитометрия |
| ЧР | – частичная ремиссия |
| ХЛЛ | – хронический лимфолейкоз |
| ЧОО | – частота общего ответа |
| CD | – кластер дифференцировки |
| Del | – делеция |
| IWCLL | – International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (Международный симпозиум по изучению хронического лимфолейкоза) |
| FISH | – флуоресцентная in situ гибридизация |
| β2-МГ | – бета-2-микроглобулин |