

**Н. В. Горяїнова, Н. М. Третяк, А. І. Гордієнко, В. О. Кубарова, О. В. Басова,
Г. С. Стародуб, А. А. Бортнік**

Державна установа “Інститут гематології та трансфузіології НАМН України”, 04060 Київ

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ ТА ПРОГНОЗ ПЕРЕБІГУ МІЄЛОДИСПЛАСТИЧНОГО СИНДРОМУ НА ПІДСТАВІ ВРАХУВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ ВНУТРІШНЬОЯДЕРНОГО БІЛКА КІ-67

(Представлено член-кор. НАМН України М. І. Лісяним)

Метою роботи було оцінити ефективність лікування та визначити прогноз перебігу мієлодиспластичного синдрому (МДС) на основі клініко-гематологічних показників та динаміки експресії внутрішньоядерного білка Кі-67 субстратними клітинами периферичної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ). Проведено аналіз клініко-лабораторних даних та результатів цитогенетичного і імунофенотипового дослідження у хворих на МДС. Лікування цитостатичними препаратами знижує кількість Кі-67-позитивних клітин мієлоїдного походження в ПК та КМ хворих на МДС. У пацієнтів із повною відповіддю на терапію цитостатичними препаратами визначається менший відсоток Кі-67-позитивних клітин мієлоїдного походження як в ПК, так і в КМ, ніж у хворих на МДС зі стабілізацією процесу та невдачею лікування. У пацієнтів із МДС з частковою відповіддю на терапію цитостатичними препаратами також спостерігається менше середнє значення Кі-67-позитивних клітин мієлоїдного походження в ПК, порівняно з хворими зі стабілізацією процесу. Отримані результати можливо використовувати можливість прогнозування перебігу МДС на підставі визначення маркера проліферативної активності Кі-67, як додаткового предиктора формування відповіді на лікування як цитостатичними, так і імуномодулюючими препаратами.

Ключові слова: мієлодиспластичний синдром, рефрактерна анемія з надлишком бластів (МДС РАНБ І і РАНБ ІІ), внутрішньоядерний маркер проліферативної активності Кі-67, цитостатики, талідамід.

Мієлодиспластичний синдром (МДС) — це гетерогенна група захворювань, що мають клональне походження, характеризуються неефективним гемопоезом, клінічно проявляються цитопенією у периферичній крові, гіпер- та дисплазією кісткового мозку, рефрактерністю до терапії та високим ризиком трансформації у гостру лейкемію, переважно мієлоїдного походження [3, 6, 9].

Специфічних діагностичних маркерів захворювання на поточний момент не існує, тому діагноз встановлюють шляхом виключення інших захворювань, що мають спільні з МДС ознаки.

Диференціальна діагностика МДС є, як правило, трудомісткою, тривалою, високо витратною та не забезпечує від діагностичних помилок. Складність діагностики та прогнозування МДС вимагає активного пошуку тригерів розвитку захворювання, діагностичних та прогностичних його маркерів.

Оскільки, специфічною ознакою патогенезу МДС є співіснування клітин, що перебувають в активній фазі клітинного циклу та в процесі апоптозу, — дослідження експресії Кі-67, одного із відомих маркерів проліферації, є перспективним та актуальним [1, 12].

Н. В. Горяїнова — в. о. директора інституту, д.м.н.

Н. М. Третяк — головн. н.с. відділення захворювань системи крові, д. м. н., професор

А. І. Гордієнко — зав. лабораторії онкогематології, д.б.н.

В. О. Кубарова — н.с. лабораторії онкогематології

О. В. Басова — с.н.с. відділення захворювань системи крові, к. м. н.

Г. С. Стародуб — н.с. відділення захворювань системи крові, к.м.н.

А. А. Бортнік — н.с. відділу науково-медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи.

© Н. В. Горяїнова, Н. М. Третяк, А. І. Гордієнко, В. О. Кубарова, О. В. Басова, Г. С. Стародуб, А. А. Бортнік, 2019.

Проліферативна активність вважається провідним фактором як в механізмі злоякісної трансформації клітин, так і в біологічній поведінці вже існуючої клітини. Активно проліферуючі злоякісні клітини є “фракцією зростання” новоутворення, а, як відомо, маркер клітинної проліферації протеїн Ki-67, належить до регуляторних білків клітинного циклу. Експресія антигену Ki-67 збігається з початком мітотичного циклу і вміст його змінюється в залежності від стадії мітозу [5, 7]. Ki-67 секретується в клітинах під час мітозу та зникає, коли вони переходять у стан спокою або під час репарації ДНК. Антитіла до протеїну Ki-67 використовують для оцінки проліферативної активності багатьох новоутворень. Індекс Ki-67 є незалежним показником прогнозування рецидивів і виживання хворих на рак.

Отже, зважаючи на те, що Ki-67 є одним із загальновідомих маркерів проліферації, що експресуються у клітинах, які діляться, та відсутній у фазі G₀ клітинного циклу, дослідження експресії Ki-67 використовують для прогнозування клінічного перебігу таких захворювань, як лімфоми, пухлини молочної та підшлункової залоз, легень, гіпофіза, шлунка, товстого кишківника, нервової системи, ендометрія [10, 11]. Виявлено достовірне зменшення 5-ти річної виживаності у 2 рази в групі пацієнтів з ендометріальною стромальною саркомою матки, клітини якої експресували Ki-67, порівняно з пацієнтами, клітини пухлин у яких були Ki-67 негативними [8].

В гематології оцінка проліферативної активності лімфоїдних клітин при лімфопроліферативних новоутвореннях є важливим показником у діагностиці варіанта захворювання та визначенні ступеня злоякісності [4]. Дослідження показали, що вивчення експресії білка Ki-67 має прогностичну цінність та дозволяє виявити початок прогресування В-клітинного хронічного лімфолейкозу (В-ХЛЛ) ще за 1-3 місяці до появи клініко-лабораторного підтвердження [2].

За даними деяких авторів, мієлоїдні неоплазії також супроводжуються зростанням відсотка Ki-67-позитивних клітин, експресія білка Ki-67 значно зростає у пацієнтів із МДС та гострої лейкемії (ГЛ), у порівнянні з особами без даної патології, а також з хворими на апластичну анемію. Так, у когорті здорових добровольців та пацієнтів з АА кількість Ki-67-позитивних клітин дорівнювала (16,8 ± 3,6) % і (5,1 ± 2,9) %, відповідно, а у хворих на МДС та ГЛ — (25,3 ± 10,1) % та (30,5 ± 10,4) %, відповідно. Зауважимо, що різниця між відсотком Ki-67-позитивних клітин у зразках КМ хворих на МДС та ГЛ не досягла статистичної значущості.

Доведено, що відсоток Ki-67-позитивних клітин однаковий при анемії Фанконі, МДС, рефрак-

терній анемії з надлишком бластів ІІ (РАНБ ІІ), та гострих мієлобластних лейкозах (ГМЛ), проте вищий, ніж при АА та МДС РАНБ І.

Отже, низка досліджень вказує на те, що інтенсивність ядерної експресії Ki-67 при гематологічній патології позитивно корелює з проліферативним потенціалом патологічного процесу.

Більший відсоток Ki-67-позитивних клітин асоціюється з агресивнішими формами МДС, зокрема з РАНБ ІІ. Доведено, що в групі хворих на МДС РАНБ ІІ визначається більший відсоток Ki-67-позитивних клітин ($p = 0,04$), клітин у S-фазі ($p = 0,04$) та вища клітинність кісткового мозку ($P = 0,005$), ніж у пацієнтів із МДС нижчого ступеню агресивності. Тобто, наведені факти дають підставу припустити, що інтенсивність експресії наведеного маркеру тим вища, чим ближча трансформація МДС в ГМЛ.

Встановлено наявність певних кореляційних зв'язків між інтенсивністю експресії Ki-67 та експресією маркерів виживаності пухлинного клону. Зокрема, відсоток Ki-67-позитивних клітин у КМ корелює з підвищеним рівнем експресії в них молекули Bcl-2, що асоціюється з редукцією апоптозу та виникненням проонкогенних мутацій, а також еволюцією процесу в ГМЛ. Підвищена експресія такого маркеру клітинної проліферації Ki-67 асоціюється навіть зі спадковими гематологічними синдромами, які є предикторами виникнення мієлопроліферативних неоплазій. Гематологічні неоплазії з вищим мієлопроліферативним потенціалом клональних клітин, характеризуються значно більшою експресією Ki-67. Разом з тим на сьогоднішній день зустрічаються лише поодинокі дослідження, що висвітлюють окремі аспекти проліферативної активності гемопоетичних клітин при МДС.

Беручи до уваги, що МДС це злоякісне захворювання крові, яке майже у 100% випадків протягом певного часового періоду трансформується у гостру лейкемію, здебільшого мієлоїдного спрямування, виявлення та вивчення маркерів проліферативної активності клітин кісткового мозку залишається актуальною проблемою.

Метою нашого дослідження було оцінити ефективність лікування та визначити прогноз перебігу МДС на основі клініко-гематологічних показників та динаміки експресії внутрішньоядерного білка Ki-67 субстратними клітинами периферичної крові (ПК) та кісткового мозку (КМ).

Обстежені та методи. Проведено аналіз клініко-лабораторних даних та результатів цитогенетичного і імунофенотипового дослідження хворих на МДС РАНБ І та РАНБ ІІ.

Для запобігання можливої упередженості щодо відбору певних клінічних випадків у дослідження включали хворих за госпітально-орієнтованим принципом. Отже, в аналіз увійшли хворі на МДС, котрі перебували на лікуванні або були консультовані у відділенні захворювань системи крові ДУ “Інститут гематології та трансфузіології НАНМ України”, в першому та другому гематологічних відділеннях Київської міської клінічної лікарні № 9 або перебували на обліку в консультативній поліклініці інституту.

Діагноз хворим встановлювали на підставі клінічних даних та обов’язкових лабораторних обстежень. Були використані загальноклінічні, спеціальні гематологічні, біохімічні методи дослідження. Загальноклінічні дослідження включали: об’єктивне обстеження з констатацією клінічних проявів захворювання, цитоморфологічне дослідження ПК з визначенням вмісту гемоглобіну, рівня еритроцитів, лейкоцитів, тромбоцитів та підрахунком лейкограми у паноптично забарвлених мазках за методом Мей-Грюнвальд-Гімза. Спеціальні гематологічні дослідження складались із: цитоморфологічного дослідження КМ, отриманого шляхом проведення стерильної пункції, з підрахунком мієлограми та оцінкою диспластичних змін гемопоєзу; цитохімічного дослідження кісткового мозку із визначенням кільцеподібних сидеробластів (реакція за *Perls*), гістологічне дослідження гемопоєзу та його мікрооточення шляхом проведення трепанобіопсії. При описі препаратів звертали увагу на: стан усіх паростків гемопоєзу, наявність лейкоемічної інфільтрації, стан ретикулінових та колагенових волокон, стан кісткової тканини, ступінь пошкодження ендосту, щільність розміщення судин тощо.

Методом проточної лазерної цитометрії визначали імунофенотиповий профіль пухлинних клітин кісткового мозку. Інші лабораторні дослідження включали: визначення заліза сироватки, феритин-зв’язуючої здатності сироватки, рівня трансферину, рівня еритропоєтину сироватки, біохімічне дослідження крові (визначення креатиніну, білірубину з фракціями, трансамінази, лактатдегідрогенази), загальний аналіз сечі тощо.

Цитогенетичне дослідження проводили в клітинах кісткового мозку. Для цитогенетичних досліджень препарати метафазних хромосом готували за загально визнаною методикою і фарбували за GTG-методом. Виявлені хромосомні аномалії описували згідно міжнародної номенклатури *ISCN 2013*.

Проводили обстеження, необхідні для диференційної діагностики з іншими захворюваннями (виключення солідних пухлин, гепатитів, гемобластозів, хронічних інфекцій, ВІЛ та ін.

Усім пацієнтам верифікація діагнозу МДС та РАНБ II, а також ГМЛ, що трансформувалась із МДС, проводилась відповідно РАНБ I до ВООЗ критеріїв мієлоїдних неоплазій та гострих лейкемій 2008 р.

Критеріями виключення із дослідження були:

- тяжка ниркова недостатність (кліренс креатиніну < 30 мл/хв);
- тяжка печінкова недостатність (АЛТ та АСТ у 5 разів вище норми);
- виражена серцева недостатність;
- декомпенсований цукровий діабет;
- супутнє онкологічне захворювання;
- зловживання алкоголем, наркотичними речовинами.

В цілому у дослідженні було обстежено 81 хворого на МДС, із них у групу первинно верифікованого МДС РАНБ I включено 54 пацієнти, а в групу первинно діагностованого МДС РАНБ II — 27 осіб.

Оскільки поширеність підтипів захворювання відрізняється між собою, кількість хворих у кожній групі, які включені у дослідження, неоднакова.

Група хворих на МДС РАНБ I представлена 31 (57,4 %) чоловіками та 23 (42,6 %) жінками, а на МДС РАНБ II — 14 (51,8 %) чоловіками та 13 (48,2 %) жінками. Вік хворих на МДС РАНБ I та РАНБ II коливався від 39 до 80 років та від 45 до 77 років, відповідно, а його медіани становив $(67,0 \pm 11,2)$ років та $(66,7 \pm 8,4)$ років, відповідно.

Тривалість захворювання на МДС РАНБ I та РАНБ II на час включення в обстеження пацієнтів варіювала від 4 до 30 міс та від 3 до 25 міс, відповідно. Медіана загального клінічного спостереження за випадками МДС РАНБ I та РАНБ II становила 15,0 міс

За період спостереження у 21 (38,8 %) із 54 пацієнтів із МДС РАНБ I мієлодиспластичний процес трансформувався в МДС РАНБ II, а у 12 (44,4 %) із 27 хворих на МДС РАНБ II ГМЛ. Різниця між частотою виникнення першого епізоду прогресії захворювання, що зафіксовано під час дослідження, між хворими на РАНБ I та РАНБ II не виявлено ($P = 0,669$). Медіана клінічного спостереження за хворими на МДС РАНБ I та РАНБ II без прогресії дорівнювала 17,0 міс (25-перцентиль — 13,0 міс та 75-перцентиль — 19,3 міс) та 11,2 міс. Медіана трансформації МДС РАНБ I у МДС РАНБ II становила 14,0 міс, а МДС РАНБ II у ГМЛ — 8,0 міс.

Проведено аналіз загальноклінічних даних, зокрема анамнезу хворих, їх скарг та результатів фізикального обстеження. У пацієнтів фіксували ініціальну дату верифікації МДС РАНБ I та РАНБ II, а також, за наявності, дату першого епізоду

трансформації захворювання в МДС РАНБ II та ГМЛ відповідно.

У всіх хворих реєстрували факт наявності або відсутності таких клінічних симптомів, як нічне профузне спітіння, підвищення температури тіла вище 37,5 °С впродовж не менше 2-х тижнів без ознак інфекції або біль у кістках — осалгії, які є загальноприйнятим еквівалентом субфібрилітету, зазначеним в рекомендаціях оцінки перебігу МДС, втрата ваги більше ніж на 10% маси тіла за останні 6 місяців. Також під час дослідження клінічних випадків фіксували наявність наступних анемічних симптомів — загальна слабкість, запаморочення, тромбоцитопенічний синдром — присутність в анамнезі маткових, носових кровотеч, кровоточивість ясен, а також суб'єктивних ознак гепатолієнального синдрому — швидке насичення їжею та зниження апетиту.

Серед даних фізикального обстеження під час статистичного аналізу враховували наявність гематом чи геморагічної висипки на шкірі та видимих слизових оболонках, а також гепато- та спленомегалії, які визначали пальпаторно.

Крім того, проведено аналіз лабораторно-гематологічних даних, зокрема цитоморфологічного дослідження крові з підрахунком лейкограми та мієлограми хворих на МДС. Під час аналізу враховували, яка саме специфічна терапія ініціально була призначена хворим на МДС РАНБ I — цитостатична або імуномодуюча талідомідом. Всім пацієнтам з МДС РАНБ II проводилась терапія цитостатичними засобами. Звертали увагу на факт трансфузійної залежності.

Повну відповідь на терапію констатували за наявності у КМ пацієнта кількості бластів $\leq 5\%$ та відсутності ознак перманентної клітинної дисплазії мієлоїдного паростку, а також за присутності в ПК гемоглобіну ≥ 110 г/л, тромбоцитів $\geq 100 \cdot 10^9$ /мл, нейтрофілів $\geq 1,0 \cdot 10^9$ /мл та відсутності бластів.

Часткову відповідь верифікували за наявності у пацієнта усіх критеріїв повної відповіді, за винятком кількості бластів у КМ, що становила $\geq 5\%$, проте з їх зниженням, порівняно з до терапевтичним етапом, $\geq 50\%$.

Стабілізація захворювання встановлювалась за відсутності критеріїв, необхідних для констатування часткової відповіді та для прогресії захворювання впродовж 8 тижнів.

Відсутність відповіді — невдача на терапії — визначалась за фактом смерті або прогресії на лікуванні, що характеризувалась зростанням рівня цитопенії або збільшенням в КМ бластів, прогресії в більш просунуту стадію МДС, ніж спостерігалась до терапії.

Прогресія МДС верифікувалась за збільшенням кількості бластів у КМ $\geq 50\%$ або наявності

одного з наступних показників: зменшення кількості тромбоцитів або гранулоцитів щонайменш на 50% від максимального рівня, визначеного під час ремісії/ відповіді на терапію, або редукції рівня гемоглобіну ≥ 20 г/л, або появи залежності від трансфузій.

Внутрішньоядерний маркер проліферації Ki-67 у гемопоетичних клітинах визначали за допомогою моноклональних антитіл з набору *PE Mouse Anti-Human Ki-67 Set* (BD Pharmingen, США).

Усі цитофлюориметричні дослідження проводили на проточному лазерному цитометрі *FACScan* (Becton Dickinson, США) з аргонним лазером при довжині хвилі 488 нм. Даний прилад дозволяє враховувати 5 параметрів для кожної клітини: 2 параметри світлорозсіювання — пряме світлорозсіювання (FSC), яке характеризує внутрішньоклітинну структуру клітини, а також 3 параметри флуоресценції (в залежності від застосування флуорохромів).

Аналіз даних проточної цитометрії проводили за допомогою програмного забезпечення *LYSYS II Ver. 1.1* (Becton Dickinson, США), *WinMDI 2.8* (Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, США) та *free FCS-reader* (Шороп Є. Авт. свід. № 38745 від 23.06.11 р.)

Для статистичної обробки отриманих даних використано: тести Стьюдента, Фішера, Пуассонівське розподілення, метод Каплана-Мейєра, модель Кокса, а також ROC-криві. Цифрові дані аналізували за допомогою програмного забезпечення пакету *Statistica 10.0* (StatSoft, США), *MedCalc 12.5.00* (MedCalc Software, Ostend, Бельгія) та за допомогою програми "Excel" з пакету "Microsoft Office 2010".

Результати та їх обговорення. Проведено аналіз клініко-гематологічних та цитоморфологічних показників 81 хворого на МДС РАНБ I та 30 пацієнтів із МДС РАНБ II.

У всіх хворих на МДС РАНБ I, які були включені в дослідження, функціональний статус відповідав *ECOG 1* та *ECOG 2* (*Eastern Cooperative Oncology Group* — шкала оцінки загального стану онкологічного хворого).

У групі МДС РАНБ II усі пацієнти мали функціональний статус на рівні *ECOG 2* та *ECOG 3*.

Поміж симптомів, що враховувались у нашому дослідженні, перші три позиції в групі хворих на МДС РАНБ I на момент верифікації ім діагнозу займали: загальна слабкість, збільшення розміру печінки, що визначено пальпаторно, та запаморочення, а в когорті пацієнтів із МДС РАНБ II — загальна слабкість, запаморочення, геморагічний синдром та втрата ваги на 10% за останні 6 місяців.

При аналізі показників ПК виявлено статистично значимо більшу абсолютну кількість еритроцитів та, на межі статистичної доведеності ($P = 0,074$), відносно більшу кількість міелоцитів у пацієнтів із МДС РАНБ I, порівняно з хворими на МДС РАНБ II.

Натомість у хворих на МДС РАНБ II на момент верифікації ім діагнозу в ПК визначено більшу відносну кількість бластів та проміелоцитів, ніж у пацієнтів із МДС РАНБ I.

Поміж усіх показників мієлограми у групі хворих на МДС РАНБ II констатовано тільки більше середнє значення загального відсотку бластів та мієлобластів у порівнянні з когортою пацієнтів із МДС РАНБ I.

Основні показники мієлограми у хворих на МДС РАНБ I та РАНБ II представлені в табл. 1.

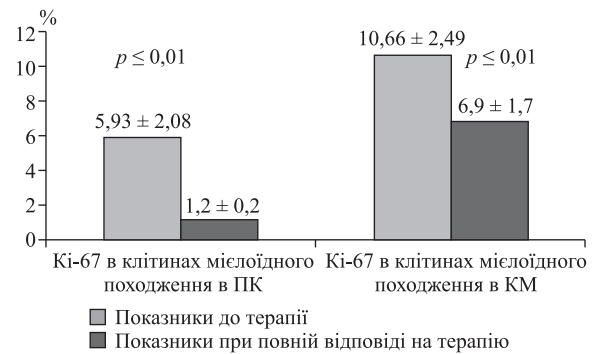
Таблиця 1
Показники мієлограми у хворих на МДС РАНБ I та РАНБ II, % ($M \pm m$)

Показник	МДС РАНБ I $n = 54$	МДС РАНБ II $n = 27$	P
Бласти та мієлобласти	$8,49 \pm 1,53$	$17,05 \pm 1,01$	0,001
Проміелоцити	$6,31 \pm 4,23$	$5,08 \pm 3,51$	0,340
Міелоцити	$8,87 \pm 4,38$	$6,16 \pm 2,37$	0,039
Метаміелоцити	$7,01 \pm 3,72$	$6,33 \pm 3,58$	0,551
Палочкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли	$37,59 \pm 13,48$	$40,54 \pm 11,23$	0,473
Еозинофіли	$1,20 \pm 1,32$	$0,95 \pm 0,49$	0,523
Базофіли	$0,67 \pm 0,83$	$1,12 \pm 0,82$	0,084
Лімфоцити	$20,23 \pm 7,23$	$21,29 \pm 5,99$	0,631
Моноцити	$6,83 \pm 4,77$	$4,29 \pm 1,86$	0,088
Плазматичні клітини	$2,44 \pm 2,09$	$1,09 \pm 0,89$	0,877

У більшості обстежуваних хворих на МДС клітинність кісткового мозку була підвищена, переважно за рахунок клітин еритроїдного ряду з наявністю мегалобластодібних форм і мегакаріоцитарного паростка, клітини якого були представлені у вигляді мікроформ, зустрічалися голядерні і без'ядерні форми. У 20 хворих відмічали збільшення кількості лімфоїдних клітин різного ступеня вираженості. Збільшення кількості клітин гранулоцитарного паростка спостерігали у 17-и пацієнтів. Часто виявляли наявність незрілих форм і розташування їх у центральних відділах кістковомозкових порожнин, що не є характерним для нормального гемопоєзу, а патогномонічним для МДС.

У рамках дослідження особливостей експресії Ki-67 у хворих на МДС РАНБ I при лікуванні імунотерапевтичним препаратом (талідомідом) визначено відсоток даного маркера проліферації в субстратних

клітинах у 54 хворих із різним рівнем відповіді на терапію. Встановлено, що лікування талідомідом знижує кількість Ki-67-позитивних клітин в ПК та КМ хворих на МДС РАНБ I, порівняно з їхнім рівнем в ініціальному періоді (рисунок).



Експресія Ki-67 субстратними клітинами у хворих на МДС РАНБ I до та після терапії талідомідом.

Показано, що у пацієнтів із повною відповіддю на терапію талідомідом визначається менший відсоток Ki-67-позитивних клітин як в ПК, так і в КМ, ніж у хворих на МДС РАНБ I із частковою відповіддю, стабілізацією процесу та невдачею лікування імунотерапевтичним засобом. У свою чергу, у пацієнтів із МДС РАНБ I з частковою відповіддю на терапію талідомідом також спостерігалось менше середнє значення Ki-67-позитивних клітин в ПК та КМ, порівняно з хворими зі стабілізацією процесу та невдачею лікування.

Натомість у хворих зі стабілізацією процесу на терапії талідомідом, визначено менший середній відсоток Ki-67-позитивних клітин тільки в КМ, ніж в осіб із невдачею на ній, проте не в зразках ПК ($p = 0,602$).

Означені вище статистичні знахідки доводять гіпотезу щодо меншої клональної мієлопроліферативної активності при МДС у хворих із кращим рівнем відповіді на терапію імунотерапевтичними засобами, ніж у пацієнтів із гіршою ефективністю терапії. Експресія Ki-67 клітинами попередниками мієлоїдного паростка у хворих на МДС РАНБ I у залежності від рівня відповіді на терапію талідомідом представлена в табл. 2.

Визначено, що дискримінаційно значущим, із відмінним рівнем ефективності, для прогнозування повної відповіді на терапію талідомідом при МДС РАНБ I є відсоток Ki-67-позитивних клітин в ПК $\leq 1,2\%$ (ППК = 1,00), а в КМ — $\leq 6,9\%$ (ППК = 1,00).

Відсоток Ki-67-позитивних клітин у зразках ПК та КМ пацієнтів із МДС РАНБ I $> 6,3\%$ та $> 9,8\%$ відповідно є прогностичним маркером для визначення невдачі лікування імунотерапевтичним засобом.

Таблиця 2

Динаміка експресії Ki-67 клітинами попередниками мієлоїдного паростку у хворих на МДС РАНБ I в залежності від відповіді на терапію талідомідом % ($M \pm m$)

Клітини	Повна відповідь (n = 7)	Часткова відповідь (n = 8)	Стабілізація (n = 3)	Відсутність відповіді (n = 9)
Ki-67-позитивні субстратні клітини в ПК	0,95 ± 0,17	(6,86 ± 0,54)*	(8,83 ± 0,40)*#	(9,07 ± 0,73)*#
Ki-67-позитивні субстратні клітини в КМ	6,61 ± 0,24	(9,61 ± 1,64)*	(15,66 ± 0,15)*#	(16,44 ± 0,69)*# ^α

Примітки: * — $P < 0,05$ порівняно з відсотком Ki-67-позитивних клітин у хворих із повною відповіддю на терапію, # — $P < 0,05$ між відсотком Ki-67-позитивних клітин у хворих із частковою відповіддю на терапію; $^{\alpha}$ — $P < 0,05$ між відсотком Ki-67-позитивних клітин у хворих зі стабілізацією на терапії.

Зважаючи на те, що тільки пацієнти з невдачею на терапії талідамідом прогресували протягом періоду клінічного спостереження, відсоток Ki-67-позитивних клітин у зразках ПК та КМ пацієнтів із МДС РАНБ I > 6,3 % і > 9,8 % відповідно, є також прогностичним маркером для оцінки ймовірності прогресії захворювання в РАНБ II при лікуванні імунomodулятором протягом 10,00 міс.

Крім того, за час клінічного спостереження у 9 (33,33 %) із 27 пацієнтів із МДС РАНБ I відбулась прогресія захворювання в РАНБ II.

При порівнянні кумулятивної виживаності, а також її медіани у хворих на МДС РАНБ I із відсотком Ki-67-позитивних клітин у ПК > 6,3 %, а в КМ — > 9,8 %, спостерігався загальний коротший період безпрогресивної кумулятивної виживаності.

Медіана виживаності у пацієнтів із МДС РАНБ I та відсотком Ki-67 позитивних клітин менше ніж 6,3% у ПК дорівнює 24,0 міс; (25-перцентиль — 12,0 міс та 75-перцентиль — 26,0 міс), а у хворих із більшим їх відсотком — 9,0 міс (25-перцентиль та 75-перцентиль дорівнює 8,0 міс та 11,0 міс) ($P = 0,0003$). Розраховано, що у хворих на МДС РАНБ I із меншим ніж 9,8 % Ki-67 позитивних клітин в КМ виживаність без прогресії в РАНБ II становить 22,0 міс (25-перцентиль — 21,0 міс та 75-перцентиль — 26,0 міс), натомість у пацієнтів із більшим їх показником складає 8,5 міс (25-перцентиль та 75-перцентиль дорівнює 8,0 міс та 15,0 міс) ($P = 0,021$).

Динаміку експресії маркера проліферації Ki-67 досліджено у 32 хворих на МДС РАНБ I та 12 пацієнтів із МДС РАНБ II, які лікувались цитостатичними засобами. Порівняно інтенсивність експресії Ki-67 субстратними клітинами у хворих на МДС РАНБ I до та після терапії. Основним методом лікування для всіх хворих була хіміотерапія малими дозами циторабіну по 10 мг/м² двічі на добу підшкірно до 14 діб кожного місяця впродовж, щонайменше, 3-4 міс. Повну ремісію отримано у 4 осіб, часткову — у 9 пацієнтів, стабілізацію процесу — у 6 та прогресування захворювання — у 13 хворих.

Аналізи отриманих даних свідчать, що лікування цитостатичними препаратами знижує кількість Ki-67-позитивних клітин в ПК та КМ хворих на МДС РАНБ I та РАНБ II. У пацієнтів із повною відповіддю на терапію цитостатичними препаратами визначається менший відсоток Ki-67-позитивних клітин мієлоїдного походження в ПК, так і в КМ, ніж у хворих на МДС РАНБ I зі стабілізацією процесу та невдачею лікування (табл. 3). Водночас, у пацієнтів із МДС РАНБ I та частковою відповіддю на терапію цитостатиками спостерігалось менше середнє значення Ki-67-позитивних клітин в ПК, порівняно з хворими зі стабілізацією процесу, а також у ПК та КМ, ніж у осіб із невдачею на лікуванні (табл. 4).

Таблиця 3

Експресія Ki-67 субстратними клітинами у хворих на МДС РАНБ I і РАНБ II до та після терапії цитостатичними засобами, % ($M \pm m$)

Показник	До терапії цитостатиками	Після терапії цитостатиками	P
МДС РАНБ I, n = 32			
Ki-67-позитивні субстратні клітини в ПК	6,05 ± 1,17	4,11 ± 0,37	0,0005
Ki-67-позитивні субстратні клітини в КМ	10,82 ± 2,68	8,65 ± 0,23	0,001
МДС РАНБ II, n = 12			
Ki-67-позитивні субстратні клітини в ПК	11,40 ± 2,70	3,18 ± 0,03	≤ 0,0001
Ki-67-позитивні субстратні клітини в КМ	16,56 ± 1,93	10,61 ± 2,63	≤ 0,0001

У хворих на МДС РАНБ II, які частково відповіли на терапію цитостатиками визначався менший відсоток Ki-67 позитивних клітин в ПК та КМ, ніж в осіб, у яких відсутня відповідь на неї (табл. 5).

За допомогою дискримінаційного аналізу визначено, який саме рівень експресії Ki-67 клітинами

Таблиця 4

Експресія Ki-67 субстратними клітинами у хворих на МДС РАНБ I в залежності від рівня відповіді на терапію цитостатичними препаратами, % ($M \pm m$)

Показник	Повна відповідь ($n = 4$)	Часткова відповідь ($n = 9$)	Стабілізація ($n = 6$)	Відсутність відповіді ($n = 13$)
Ki-67-позитивні субстратні клітини в ПК	1,47 \pm 0,08	2,46 \pm 0,91	(5,06 \pm 1,22)*	(5,22 \pm 1,37)*
Ki-67-позитивні субстратні клітини в КМ	6,20 \pm 0,19	9,61 \pm 1,74	9,18 \pm 1,37	(10,04 \pm 2,87)*

Примітки: * — $P < 0,001$ порівняно з з повною відповіддю на терапію.

міелоїдного походження є предиктивним щодо прогресії МДС РАНБ I у РАНБ II та МДС РАНБ II у ГМЛ протягом 15,5 міс (25-перцентиль — 14,5 міс та 75-перцентиль — 19,5 міс) і 16,0 міс (25-перцентиль — 14,0 міс та 75-перцентиль — 18,0 міс) відповідно, а також щодо оцінки відповіді на терапію.

Таблиця 5

Експресія Ki-67 субстратними клітинами у хворих на МДС РАНБ II в залежності від рівня відповіді на терапію цитостатичними препаратами, % ($M \pm m$)

Показник	Часткова відповідь на терапію, $n = 7$	Відсутність відповіді на терапію, $n = 5$	P
Ki-67-позитивні субстратні клітини в ПК	2,23 \pm 0,55	4,91 \pm 1,21	0,002
Ki-67-позитивні субстратні клітини в КМ	6,42 \pm 1,58	9,60 \pm 2,05	0,010

Визначено дискримінаційну кількість Ki-67-позитивних клітин у зразках КМ та ПК для предикції рівня відповіді на лікування цитостатиками. Підтверджено, що для прогнозування повної відповіді на терапію цитостатичними засобами при МДС РАНБ I дискримінаційно значущим, із дуже добрим та добрим рівнем ефективності, є відсоток Ki-67-позитивних клітин в ПК $\leq 2,4\%$ (ППК = 0,84), а в КМ $\leq 8,3\%$ (ППК = 0,75) відповідно. Відсоток Ki-67-позитивних клітин у зразках ПК та КМ пацієнтів із МДС РАНБ I $> 4,3\%$ (ППК = 0,85) та $> 9,8\%$ (ППК = 0,83) відповідно, є прогностичним маркером для передбачення невдачі на лікуванні цитостатичним препаратом із дуже добрим рівнем ефективності.

Протягом періоду клінічного спостереження у 21 (65,62%) із 32 пацієнтів із МДС РАНБ I захворювання прогресувало в РАНБ II.

За допомогою дискримінаційного аналізу визначено, що відсоток Ki-67-позитивних клітин в ПК $> 2,4\%$ та КМ $> 3,4\%$ є прогностично значущим щодо прогресії захворювання на терапії цитостатичними засобами.

Визначено, що за наявності у ПК пацієнтів із МДС РАНБ I на терапії цитостатичними засобами Ki-67-позитивних клітин $\leq 2,4\%$ спостерігається у 7,9 рази вищий рівень виживаності (HR = 7,97; 95% ДІ = 1,95-31,95, $p = 0,003$), ніж у хворих з більшим значенням показника.

Таким чином, у нашому дослідженні показано, що лікування цитостатичними препаратами знижує кількість Ki-67-позитивних клітин міелоїдного походження в ПК та КМ хворих на МДС РАНБ I та РАНБ II. Також доведено, що в пацієнтів із повною відповіддю на терапію цитостатичними препаратами визначається менший відсоток Ki-67-позитивних клітин міелоїдного походження як в ПК, так і в КМ, ніж у хворих на МДС РАНБ I зі стабілізацією процесу та невдачею лікування. У свою чергу, у пацієнтів із МДС РАНБ I з частковою відповіддю на терапію цитостатиками також спостерігається менше середнє значення Ki-67-позитивних клітин міелоїдного походження в ПК, порівняно з хворими зі стабілізацією процесу, а також у ПК та КМ, ніж в осіб із невдачею лікування. Натомість у хворих зі стабілізацією процесу на терапії цитостатичними препаратами, порівняно з особами із невдачею, на даній терапії визначено тільки тенденцію, на межі статистичної значущості ($p = 0,052$), щодо меншого середнього відсотку Ki-67-позитивних клітин лише в КМ, проте не в зразках ПК.

Означені вище статистичні знахідки доводять гіпотезу щодо меншої клональної активності у хворих на МДС із кращим рівнем відповіді на терапію цитостатичними засобами, ніж у пацієнтів із гіршою відповіддю на терапію.

У хворих на МДС РАНБ II, які частково відповіли на терапію цитостатиками, визначалось нижче значення відсотку Ki-67-позитивних клітин міелоїдного походження в ПК та КМ.

У дослідженні визначено дискримінаційну кількість Ki-67-позитивних клітин у зразках КМ та ПК для предикції рівня відповіді на лікування цитостатиками. Підтверджено, що для прогнозування повної відповіді на терапію цитостатичними засобами при МДС РАНБ I дискримінаційно значущим, із дуже добрим та добрим рівнем ефектив-

ності, є відсоток Ki-67-позитивних клітин в ПК $\leq 2,4\%$ (ППК = 0,84), а в КМ — $\leq 8,3\%$ (ППК = 0,75). Відсоток Ki-67-позитивних клітин у зразках ПК та КМ пацієнтів із МДС РАНБ I $> 4,3\%$ (ППК = 0,85) та $> 9,8\%$ (ППК = 0,83) відповідно, є прогностичним маркером невдачі лікування цитостатичним препаратом із дуже добрим рівнем ефективності.

Також за допомогою дискримінаційного аналізу було визначено прогностично значущий рівень відсотку Ki-67-позитивних клітин в ПК та КМ щодо прогресії на терапії цитостатичними засобами МДС РАНБ I протягом 15,5 міс (25-перцентиль — 14,5 міс та 75-перцентиль-19,5 міс) в РАНБ II, що складає $> 2,4\%$ та $> 3,4\%$ відповідно. Проте не виявлено предиктивно значущого рівня відсотку Ki-67-позитивних клітин в ПК та КМ щодо прогресії на терапії цитостатичними засобами МДС РАНБ II протягом 16,0 міс (25-перцентиль — 14,0 міс та 75-перцентиль-18,0 міс) у ГМЛ.

Наступним кроком дослідження було порівняння кумулятивної виживаності, а також її медіани у хворих на МДС РАНБ I із $> 2,4\%$ і $> 3,4\%$ Ki-67-позитивних клітин у ПК та КМ відповідно. Так, за наявності менше $2,4\%$ Ki-67-позитивних клітин у зразках ПК та менше $3,4\%$ в зразках КМ, що були отримані на початку першої лінії специфічної терапії, спостерігається довший період безпрогресивної кумулятивної виживаності ніж у пацієнтів із більшою їх кількістю.

Розраховано, що медіана виживаності в хворих на МДС РАНБ I із відсотком Ki-67-позитивних клітин у ПК $\leq 2,4\%$ (18,5 міс проти 14,18 міс) та у зразках КМ $\leq 3,4\%$ (26,0 міс проти 15,00 міс) більша, ніж у хворих із вищим їх рівнем.

Визначено, що за наявності у зразках ПК пацієнтів із МДС РАНБ I на терапії цитостатичними

засобами Ki-67-позитивних клітин $\leq 2,4\%$, спостерігається у 7,92 рази вищий рівень виживаності, ніж у хворих з більшим значенням показнику.

Проведення кореляційного аналізу між рівнем експресії Ki-67 на клітинах мієлоїдного походження та показниками периферичної крові, і мієлограми дозволило встановити, що тільки у хворих на МДС РАНБ II на момент верифікації діагнозу визначається наявність потужного прямого кореляційного зв'язку відсотка Ki-67 позитивних клітин в зразках ПК ($r = 0,993$, $p \leq 0,00001$) та КМ ($r = 0,993$, $p \leq 0,00001$) з кількістю бластів КМ.

Проведеним дослідженням встановлено, що у хворих на МДС РАНБ I при терапії талідомідом, порівняно з пацієнтами, які отримували цитостатичні препарати, спостерігалась більша медіана безпрогресивної виживаності (19,00 міс; 25-перцентиль — 12,00 міс та 75-перцентиль — 27,00 проти 15,00 міс; 25-перцентиль — 12,00 міс та 75-перцентиль — 18,00 міс; $p = 0,044$) та в 0,49 рази (HR = 0,49; 95 % ДІ = 0,26-0,93, $p = 0,049$) нижча ймовірність прогресії захворювання.

Крім того, у групі хворих на МДС РАНБ I, що лікувались талідомідом знижується частота трансфузійної залежності, порівняно з її частотою в групі пацієнтів на цитостатичній терапії (7 із 27 осіб проти 30 із 56 осіб, $p = 0,020$).

Ризик залежності від трансфузій при застосуванні цитостатичних засобів у хворих на МДС РАНБ I в 1,43 рази.

Таким чином, встановлено можливість прогнозування перебігу МДС РАНБ I та РАНБ II на підставі визначення маркера проліферативної активності Ki-67, як додаткового предиктора формування відповіді на лікування як цитостатичними, так і імуномодуючими препаратами.

Список використаної літератури

1. Aster J. C., Stone R. M. Clinical manifestations and diagnosis of the myelodysplastic syndromes [Електронний ресурс]. — Ресурс доступу: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-the-myelodysplastic-syndromes> — (viewed on Februar 05, 2017). — Title from the screen.
2. Barreyro L., Will B., Barthold B. et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS // *Blood*. — 2012 — **20**. — P. 1290-1298.
3. Bejar R., David R. Recent developments in myelodysplastic syndromes // *Blood*. — 2014. — **124**. — P. 2793-2803.
4. Elias H. K., Schinke C., Bhattacharyya S. et al. Stem and progenitor cell alterations in myelodysplastic syndromes // *Oncogene*. — 2014. — **33**, № 44. — P. 5139-5150.
5. Glenthøj A., Due Orskov A., Hansen J. W. et al. Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — **17**, № 6. — P. 944.
6. Greenberg L. P., Tuechler H., Schanz J. et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes // *Blood*. — 2012. — **120**, № 12. — P. 2454-2465.
7. Hamdi W., Ogawara H., Handa H. et al. Clinical significance of regulatory T cells in patients with myelodysplastic syndrome // *Eur. J. Haematol.* — 2009. — **82**, № 3. — P. 201-207.
8. Huang L., Garcia-Manero G., Jabbour E. et al. Persistence of immunophenotypically aberrant CD34⁺ myeloid progenitors is frequent in bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms treated with hypomethylating

- agents [Електронний ресурс]. — Режим доступу: // <http://jcp.bmj.com/content/early/2016/04/15/jclinpath-2016-203715> (viewed on Februar 05, 2017). — Title from the screen.
9. *Malcovati L., Hellstrom-Lindberg E., Bowen D.* et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net // *Blood*. — 2013. — **122**, № 17. — P. 2943-2964.
 10. *Salvino M. A., Medeiros L. A., Moura A.* et al. HLA and Aplastic Anemia: associations In Large Brazilian Cohorts // *Blood*. — 2013. — **122**. — P. 1237.
 11. *Sauntharajah Y., Nakamura R., Nam J. M.* et al. HLA DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome // *Blood*. — 2002. — **100**. — P. 1570-1574.
 12. *Visconte V., Tiu R. V., Rogers H.* Pathogenesis of myelodysplastic syndromes: an overview of molecular and non-molecular aspects of the disease // *Blood Res*. — 2014. — **49**, № 4. — P. 216-227.

Одержано 20.12.2018

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА С УЧЕТОМ ЭКСПРЕССИИ ВНУТРИЯДЕРНОГО БЕЛКА KI-67

**Н. В. Горяинова, Н. Н. Третьяк, А. И. Гордиенко, В. А. Кубарова, О. В. Басова,
Г. С. Стародуб, А. А. Бортник**

Государственное учреждение “Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины”, 04060 Киев

Целью работы была оценка эффективности лечения и определить прогноз течения миелодиспластического синдрома (МДС) основываясь на клинико-гематологических показателях и динамике экспрессии внутриядерного белка Ki-67 субстратными клетками периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ). Проведен анализ клинико-лабораторных данных и результатов цитогенетического и иммунофенотипического исследования у больных на МДС. Лечение цитостатиками уменьшает количество Ki-67-положительных клеток миелоидного происхождения в ПК и КМ больных с МДС. У пациентов с полным ответом на терапию цитостатиками определяется меньший процент Ki-67-положительных клеток миелоидного происхождения как в ПК, так и в КМ, нежели у больных со стабилизацией процесса и безуспешным лечением. У пациентов с МДС с частичным ответом на терапию цитостатиками также наблюдается меньшее среднее значение Ki-67-положительных клеток миелоидного происхождения в ПК, в сравнении с больными со стабилизацией процесса. Полученные результаты можно использовать для прогнозирования течения МДС на основе определения маркера пролиферативной активности Ki-67, как дополнительного предиктора формирования ответа на лечение как цитостатиками, так и иммуномодулирующими препаратами.

MYELODYSPLASTIC SYNDROME CURRENT ACCOUNTING FOR THE EXPRESSION OF THE PROTEIN KI-67

**N. V. Goriainova, N. M. Tretiak, A. I. Gordienko, V. A. Kubarova, O. V. Basova,
G. S. Starodub, A. A. Bortnik**

State institution “Institute of Hematology and Transfusiology of the NAMS of Ukraine”, 04060 Kiev

The aim of the work was to evaluate the effectiveness of treatment and determine the prognosis of myelodysplastic syndrome (MDS) based on clinical and hematological parameters and the dynamics of expression of the intranuclear Ki-67 protein by peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) cells. The analysis of clinical and laboratory data and the results of cytogenetic and immunophenotypic studies in patients with MDS. Treatment with cytostatics reduces the number of Ki-67-positive myeloid cells in PB and BM of patients with MDS. In patients with a complete response to cytostatic therapy, a smaller percentage of Ki-67-positive myeloid cells is determined in both PB and BM, than in patients with process stabilization and unsuccessful treatment. Patients with MDS with a partial response to cytostatic therapy also have a lower average value of Ki-67-positive myeloid cells in PB, compared with patients with stabilization of the process. The obtained results can be used to predict the course of MDS based on the determination of the proliferative marker of Ki-67, as an additional precursor to the formation of a response to treatment with both cytostatic drugs and immunomodelling drugs.