Хронические миелопролиферативные заболевания

Профессор кафедры клинической лабораторной диагностики

Заведующая центром лабораторных исследований ГУЗ Иркутская ордена «ЗНАК ПОЧЕТА» областная клиническая больница, д. м.н., Т.С. Белохвостикова

Bcr-abl – негативные хронические миелопролиферативные заболевания

атипичные ХМПЗ

классические ХМПЗ

- **Эссенциальная тромбоцитемия**
- **Полицитемия vera**
- **Миелофиброз с миелоидной метаплазией**

Молекулярные признаки

- **FIP1L – PDGFRA –позитивные эозинофильные нарушения**
- **PDGFRB- реарранжированные ХМПЗ**
- **C-kit мутационно-позитивный системный мастоцитоз**

Клиникопатологические признаки

- **Гиперэозинофильный синдром**
- **Хронический эозинофильный лейкоз**
- **Системный мастоцитоз**
- **Хронический миеломоноцитарный лейкоз**
- **Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз**
- **Хронический нейтрофильный лейкоз**
- **Неклассифицируемый миелопролиферативный синдром**

A.Pardanani, A.Tefferi 2004.

Хронические миелопролиферативные заболевания (ХМПЗ)

ХМПЗ –это клональные заболевания, происходящие из плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки.

Результатом клональной экспансии является усиленная пролиферация патологического гемопоэза и появление группы взаимосвязанных синдромов, обусловленных той или иной доминирующей клеточной линией.

Общие свойства ХМПЗ:

КЛИНИЧЕСКИЕ /ЛАБОРАТОРНЫЕ

- гиперпродукция одного или более форменных элементов крови при отсутствии определенных стимулов
- Тромбозы и геморрагии
- Экстрамедуллярный гемопоэз
- трансформация в острый лейкоз или развитие миелофиброза

КОСТНОМОЗГОВЫЕ

- Участие плюрипотентной гемопоэтической клетки – предшественницы
- Гиперклеточность костного мозга и дисплазия мегакариоцитов
- Независимое от факторов роста формирование колоний in vitro

КАРИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ

- Хромосомные аномалии –1,8,9, 13q,20q .
- Повышенная экспрессия PRV-1гена, уменьшенная экспрессия на тромбоцитах белка cMPL, мутация JAK2 (V617F)

Трудности диагностики ХМПЗ:

- Сходство клинико-гематологических проявлений между собой.
- Смена клинических проявлений в процессе течения болезни.
- Сложности в дифференциальной диагностике (клинической и патогистологической) форм ХМПЗ при отсутствии четких цитогенетических и молекулярных маркеров.
- Недостаточность клинических исследований, испытаний миелосупрессивных препаратов

→ *приводит к значительной разнице в подходах к диагностике и лечению ХМПЗ.*

ХМПЗ

Общий диагностический подход на первом этапе :

1. *Терапевтический статус*

- Сосудистые осложнения
- Увеличение печени и селезенки

2. *Показатели гемограммы*

- Преимущественная пролиферация 1-2 или всех ростков кроветворения
- 1-2-3-ростковая цитопения + спленомегалия (продвинутая или терминальная стадия заболевания)

3. *Показатели миелограммы*

- Исключение бластной трансформации
- Исключение Ph-позитивности

4. *Гистоморфологическая характеристика трепаната*

- Дифференцированная оценка для установления конкретной формы нарушения

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ)

ЭТ – клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся костномозговой гиперплазией мегакариоцитарного ростка и сопутствующим увеличением числа тромбоцитов.

Диагностические критерии ВОЗ 2008 для эссенциальной тромбоцитемии

- 1. Тромбоциты >/= 450 х 10 /л
- 2. Пролиферация больших мегакариоцитов со зрелой морфологией. Отсутствие или небольшая гранулоцитарная /эритроидная пролиферация
- 3. Отсутствие критериев ВОЗ для ХМЛ, ИП, ПМФ, МДС или других миелоидных опухолей
- 4. Выявление JAK2V617F или других маркеров клональности *или отсутствие* реактивного тромбоцитоза

Диагноз эссенциальной тромбоцитемии ***требует наличия всех четырех*** *критериев*

Истинная полицитемия (ИП)

ИП - клональное нарушение с вовлечением гемопоэтической стволовой клетки, что приводит к автономной пролиферации эритроидной, миелоидной и мегакариоцитарной клеточных линий. Увеличенная эритроидная пролиферация обычно более выраженная, чем другие клеточные линии и появляется независимо от уровня эритропоэтина.

Диагностические критерии ВОЗ 2008 для истинной полицитемии

- 1. Гемоглобин >180 г/л (муж) , > 165 г/л (жен)
- Гемоглобин или гематокрит > 99% (с учетом стандарта для возраста, пола,нахождения на высоте)
- Или - продолжающееся нарастание уровня гемоглобина не связанное с коррекцией препаратами железа
- Или – повышение массы эритроцитов >25% от установленной нормы

- 2. Выявление JAK2617F мутации или похожих мутаций

малые критерии

- 1. Трехлинейная пролиферация в костном мозге
- 2. Низкий или субнормальный уровень сывороточного эритропоэтина
- 3. Рост эндогенных эритроидных колоний

Диагноз ИП *требует наличия 2 больших + 1 малого или первого большого + 2 малых критериев*

Сублейкемический миелоз (ИМФ)

ИМФ это хроническое миелопролиферативное заболевание с клональным гемопоэзом и вторичной (неклональной) гиперпролиферацией фибробластов (стимулированных ростовыми факторами (PDGF, bFGF, TGF-β) из миелоидных клеток, в основном неопластических мегакариоцитов) с увеличением синтеза коллагена.

Все это ведет к образованию костномозгового фиброза и эстрамедуллярного гемопоэза в селезенке и других органах.

Клинико-патологические критерии (ECP)для диагностики сублейкемического миелоза

Клинические критерии

А1. Отсутствие других субтипов миелопролиферативных заболеваний ХМЛ или МПЗ.

А2. Ранние клинические стадии

- ✔ гемоглобин не менее 120г/л (анемия, 1ст.)
- ✔ умеренная спленомегалия или (по УЗИ более 11см)
- ✔ тромбоцитемия более 400, 600 или 1000×10^9/л

А3. Промежуточная клиническая стадия

- ✔ гемоглобин не более 100г/л (анемия 2ст.)
- ✔ лейко-эритробластическая картина крови или эритроциты в форме капли
- ✔ спленомегалия
- ✔ отсутствие неблагоприятных признаков *

А4. Продвинутая клиническая стадия.

- ✔ гемоглобин менее 100г/л (анемия 3ст.) + 1 или больше наличие неблагоприятных признаков *

ХМПЗ

Гистологические критерии

B1 Мегакариоцитарная и гранулоцитарная миелопролиферация и относительная редукция эритроидных предшественников. Аномальные кластеры, увеличение атипичных гигантских мегакариоцитов.

Стадии идиопатического миелофиброза (ИМФ)

MF0 префибротическая ст., отсутствие ретикулинового фиброза MF1

MF1 ранняя стадия ИМФ. Небольшой ретикулиновый фиброз.

MF2 явные проявления ИМФ. Повышение ретикулинового и/или коллагенового фиброза

MF3 явный ИМФ. Коллагеновый фиброз-остеосклероз(эндофитное формирование костей)

Диагностические критерии ВОЗ 2008 для первичного миелофиброза (сублейкемического миелоза)

- 1. Мегакариоцитарная пролиферация и атипия + ретикулиновый и/или коллагеновый фиброз
- В отсутствии ретикулинового фиброза , мегакариоцитарные изменения + повышенная клеточность к.м., гранулоцитарная пролиферация. Часто снижение эритропоэза (т.е. префибротический первичный миелофиброз)

- 2. Отсутствие критериев ВОЗ для ХМЛ, ИП, МДС или других миелоидных опухолей

- 3. Выявление JAK2V617F или других маркеров клональности или отсутствие признаков реактивного костномозгового фиброза

- 1. Лейкоэритробластоз
- 2. Повышенный уровень ЛДГ
- 3. Анемия
- 4. Спленомегалия

малые критерии

Диагноз ПМФ/СЛМ ***требует наличия всех трех больших и 2 малых критериев***

ХМПЗ

Рекомендации по циторедуктивной терапии истинной полицитемии

PVSG (2004г)

Больные с низким риском развития тромбоза (возраст менее 60 лет , без тромбозов в анамнезе) – **флеботомия** *(гематокритом менее 45%)* **+ аспирин н.д.** (осторожно при числе tr> 1500×10^9/л)

Показания к циторедуктивной терапии:

1. Толерантность к флеботомии
2. Стойкий тромбоцитоз
3. Прогрессирующая спленомегалия

Выбор циторедуктивной терапии:

1. <40 лет - **ИФН-альфа (**вторая линия **– анагрелид+ флеботомия)**
2. >40 лет **– Гидреа (**вторая линия **– анагрелид+ флеботомия;** более пожилым пациентам –**миелосан.**

У всех учитывать наличие кардиоваскулярных факторов риска!

Определение клинической резистентности и непереносимости гидроксимочевины (HU) при эссенциальной тромбоцитемии

(Barosi G . Leukemia.2007)

- Тромбоциты > 600 х10/л через 3 мес приема максимально переносимой дозы гидреа
- Тромбоциты > 400 х10/л + снижение лейкоцитов < 2,5 х10/л при любой дозе гидреа
- Тромбоциты > 400 х10/л + снижение гемоглобина < 100 г/л при любой дозе гидреа
- Появление побочных эффектов (язвы на коже и слизистых, лихорадка)

Вывод – переход на альтернативные методы терапии (анагрелид)

Роль Интерферона-альфа в терапии истинной полицитемии

Период наблюдения 3-84 мес.

- Доза ИФН-альфа составляла: 3-35млн. МЕ/нед.
- На фоне терапии ИФН-альфа отмечалось снижение эритроцитоза, лейкоцитоза и тромбоцитоза
- Снижение частоты кровопусканий **82%**
- Полная и частичная регрессия спленомегалии **77%**
- 23 б-х после индукции оставались в ремиссии без лечения в течение 34-71 нед. в зависимости от стадии заболевания
- При развитии рецидива применение ИФН-альфа способствовало индукции второй ремиссии

Вывод: ИФН-альфа ингибирует рост аномального клона у больных истинной полицитемией, что приводит к редукции клинических симптомов.

Ann. Hematol.,2000

Анализ 60 больных ИП, ЭТ и СЛМ , леченных препаратами ИФН-альфа

Phase II study (E5487): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group

- Уменьшение гематокрита менее 45% без флеботомии у 50% б.
- Уменьшение размеров селезенки у 82% больных.
- ***ЭТ*** ответившие **-88,2%** (n=17; полный ответ -1б., частичный ответ -14 б-х)

  ИП ответившие **-41,7%** (n=12;. полный ответ -1б, частичный ответ -4 б-х)

  СЛМ ответившие **3,2%** (n= 31; полный ответ 0б., частичный ответ -1б.)
- *Причины отмены-* ***побочные действия*** *в* ***55%*** *случаев*.

Radin A.I. et al. Cancer 2003 1;98 (1) :100-9

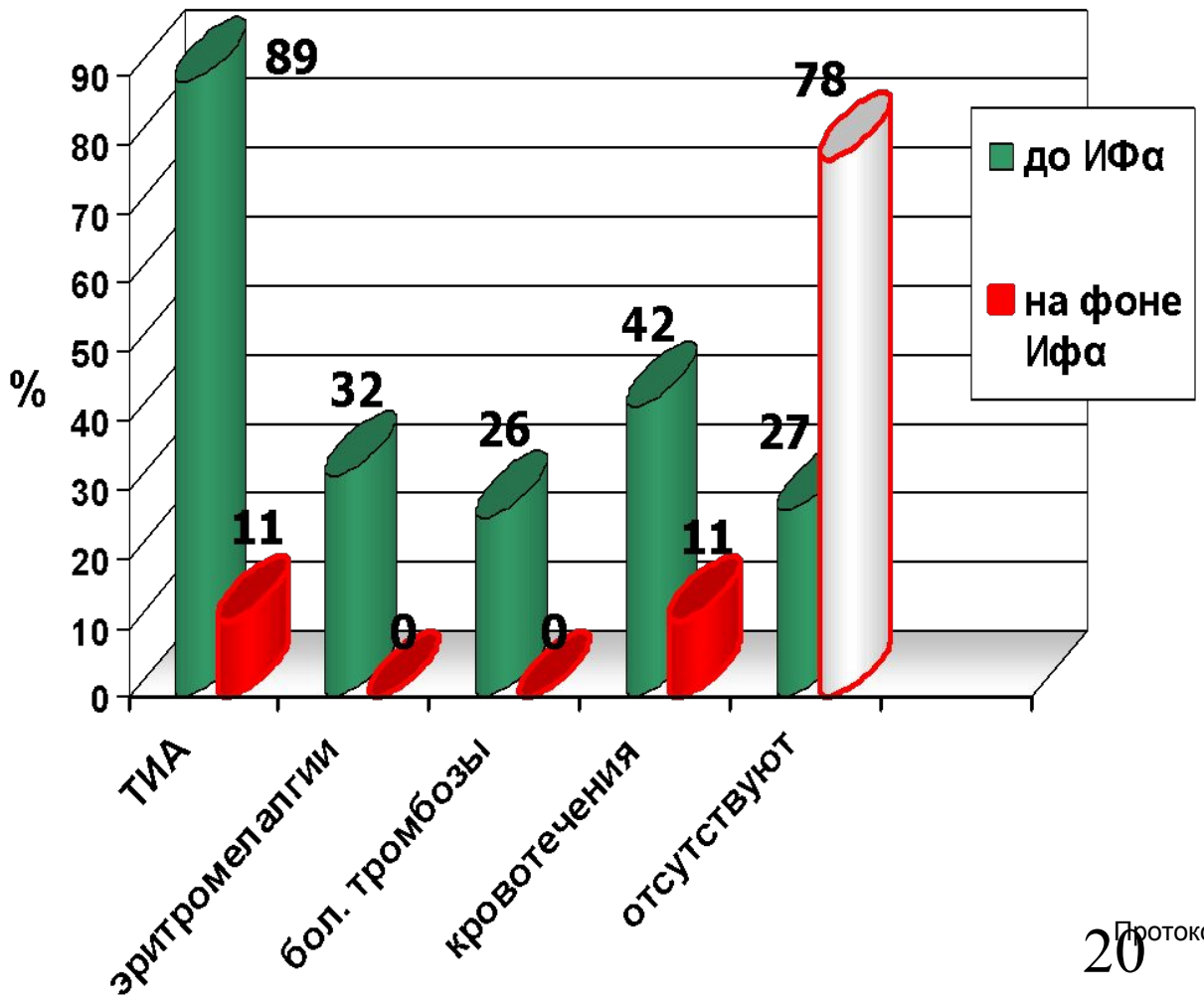
ИФН-альфа (ИнтронА):

- Обладает иммуномодулирующим и противовирусным действием.
- Прямое подавляющее действие на пролиферацию гемопоэтических предшественников и фибробласты костного мозга.
- Является антагонистом действия ростовых факторов (PDGF, TGF-β, βFGF) и др. цитокинов, предотвращая развитие миелофиброза.
- Не обладает лейкомогенностью и тератогенностью.
- Вызывает стойкие, полные ремиссии.

Основная проблема – частота *побочных реакций,* *что* обусловливает неадекватность терапии и отмену препарата.

Возможно, **комбинированная терапия**, имея различные точки приложения, сможет позволить усилить контроль за пролиферацией с меньшими побочными эффектами

Соотношение тромбогеморрагических осложнений у 19 (73%) б-х ХМПЗ, до и на фоне терапии Интроном А



Протокол ГНЦ РАМН «ХМП32003»

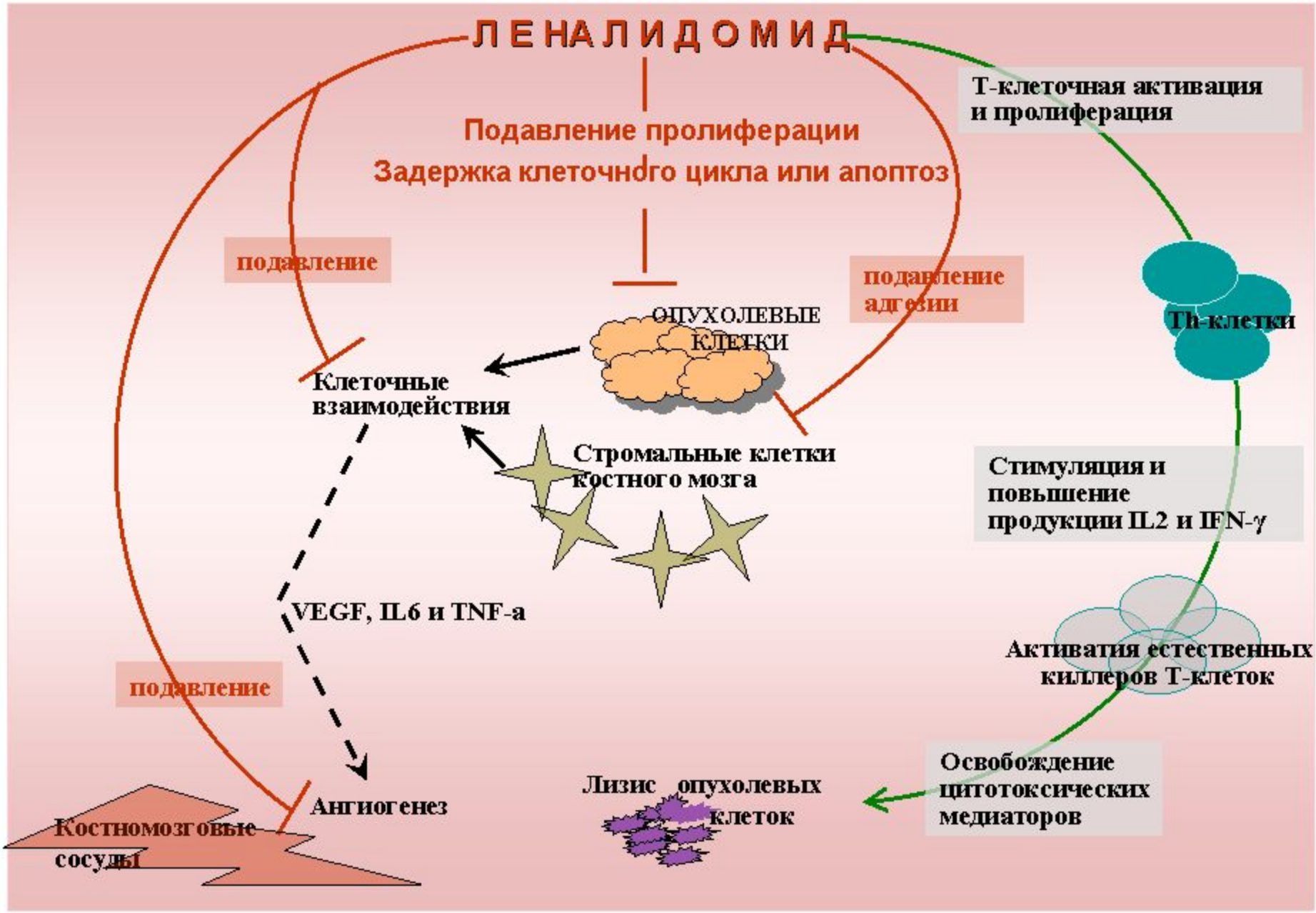
ЭССЕНЦИАЛЬНАЯ ТРОМБОЦИТЕМИЯ

Анализ исходов 155 беременностей у 86 пациенток в соответствии с терапевтическим подходом

Терапевтический подход	*Успешное родоразрешение*	*Невынашивание беременности*
Наблюдение	59%	41%
Аспирин (75-100 мг/с)	75%	25%
Рекомбинантный ИФНα	**100%**	**0%**

Griesshamer M. et al, Semin.Thromb Hemost, 2003

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛЕНАЛИДОМИДА ПРИ МИЕЛОФИБРОЗЕ



ХМПЗ И ТРОМБОЗЫ

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ТРОМБОЗОВ У Б-Х ХМПЗ:

- Повышенная вязкость крови
- Гипертомбоцитоз (активация тромбоцитов)
- Высокий уровень гематокрита
- Тромбозы в анамнезе
- Мутации генов – МТГФР (C677T); фактора V (A506G) (Лейден) и протромбина (G20210A)
- **Гипергомоцистеинемия ?!**

ГОМОЦИСТЕИН И ТРОМБОЗЫ

ГГЦ:

- вызывает активацию тромбоцитов, моноцитов;
- оказывает токсическое действие на клетки эндотелия, клетки сосудов гладких мышц;
- ингибирует действие антикоагулянтов;
- усиливает прокоагулянтные пути in vitro.

Р А З В И Т И Е Т Р О М Б О З О В

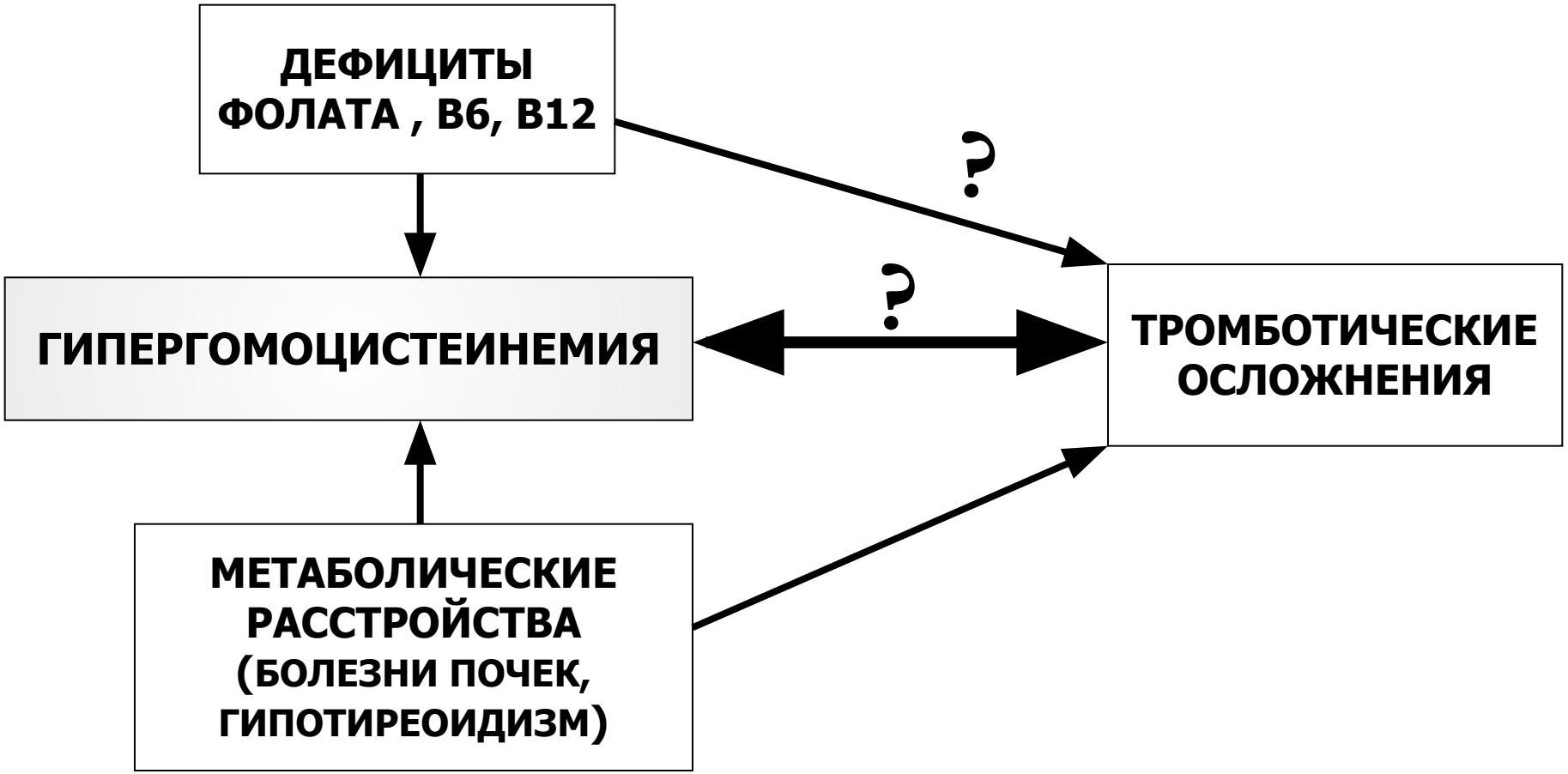
ГОМОЦИСТЕИН

Гомоцистеин (ГЦ) это содержащая серу аминокислота, являющаяся промежуточным продуктом обмена метионина в организме.

Нормальная концентрация ГЦ в крови от **5-15 мкмоль/л**

ГОМОЦИСТЕИН И ТРОМБОЗЫ

ВОЗМОЖНЫЕ ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ И ТРОМБОТИЧЕСКИМИ ОСЛОЖНЕНИЯМИ



КОНЦЕНТРАЦИЯ ГОМОЦИСТЕИНА В КРОВИ ДО И ПОСЛЕ ВИТАМИНОТЕРАПИИ

Группы больных	Уровень гомоцистеина мкмоль/л (M ±m)	
	До витаминотерапии	После витаминотерапии
ХМПЗ с тромбозами	**28 ± 5,2**	**16 ± 4,7**
Негематологические больные с тромбозами	**18,5 ± 2,1**	**14 ± 2,9**

Лечение : (фолиевая кислота от 2-5мг в день + витамин В12)

Достоверное различие между средними концентрациями ГЦ до и после лечения, **p< 0,001**

ХМПЗ И ТРОМБОЗЫ

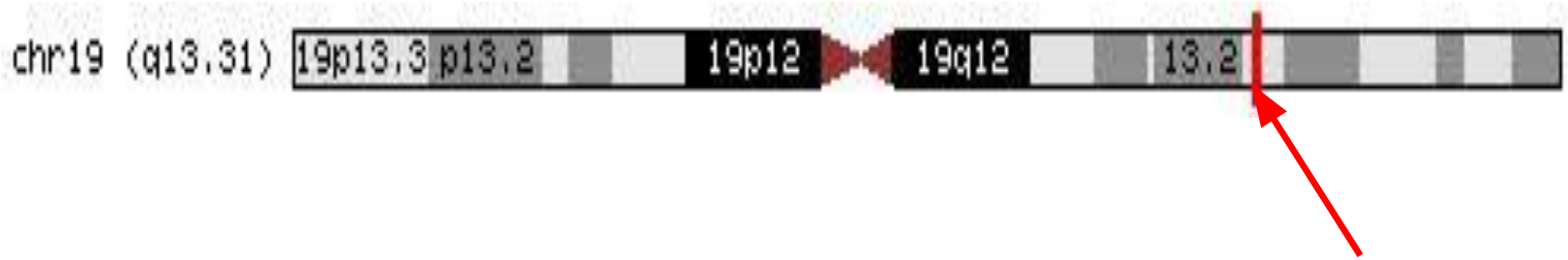
- Показано, что ГГЦ является высоко значимым, независимым фактором риска тромботических осложнений у б-х ХМПЗ

- Необходимо выявлять и лечить ГГЦ, особенно у больных ХМПЗ с высоким риском тромботических осложнений

- Лечение фолиевой кислотой в дозе 2-5мг в день и/или витамином В12 0,5-1,0мг в день является доступным, безопасным и эффективным способ достижения нормальной концентрации ГЦ у б-х ХМПЗ

НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЭРИТРЕМИИ И ВТОРИЧНОГО ЭРИТРОЦИТОЗА

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ mRNA ГЕНА PRV-1



ген PRV-1

Ген PRV-1 гиперэкспрессируется в зрелых гранулоцитах у 98-99% пациентов с диагнозом эритремия

(Temerinac et al., Blood,2000)

МУТАЦИЯ ГЕНА ТИРОЗИНКИНАЗЫ JAK2 V617F

5’ATGTGTCTGT3’ Cys Val / Phe Cys 5’ 5’ATGTTTCTGT3’

норма ATGT(G/T)TCTGT3’ патология

Мутация Jak2 выявляется в зрелых гранулоцитах у 99-100% пациентов с диагнозом эритремия.

(Levine et al.,Cancer Cell, 2005; James et al. Nature, 2005)

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ - ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 И МУТАЦИИ JAK2 ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИКИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭРИТРЕМИИ

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

- **Установить частоту выявления гиперэкспресии гена PRV-1 и мутации Jak2V617F у пациентов относящихся к группе хМПЗ, а так же пациентов с диагнозом вторичного эритроцитоза и здоровых доноров**
- **Исследовать в динамике уровень экспрессии гена PRV-1 на фоне проведения цитостатической терапии у пациентов с диагнозом эритремии**
- **Определить частоту совпадения гиперэкспресии гена PRV-1, мутации Jak2V617F с ростом эндогенных эритропоэтин-независимых колоний и низким уровнем эритропоэтина**

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ ВОШЕДШИХ В ИССЛЕДОВАНИЕ

В исследование вошли 69 пациентов с установленным диагнозом хронических Ph- миелопролиферативных заболеваний

Эритремия	**n= 46 человек**
Эссенциальная тромбоцитемия	**n= 15 человек**
Идиопатический миелофиброз	**n= 8 человек**

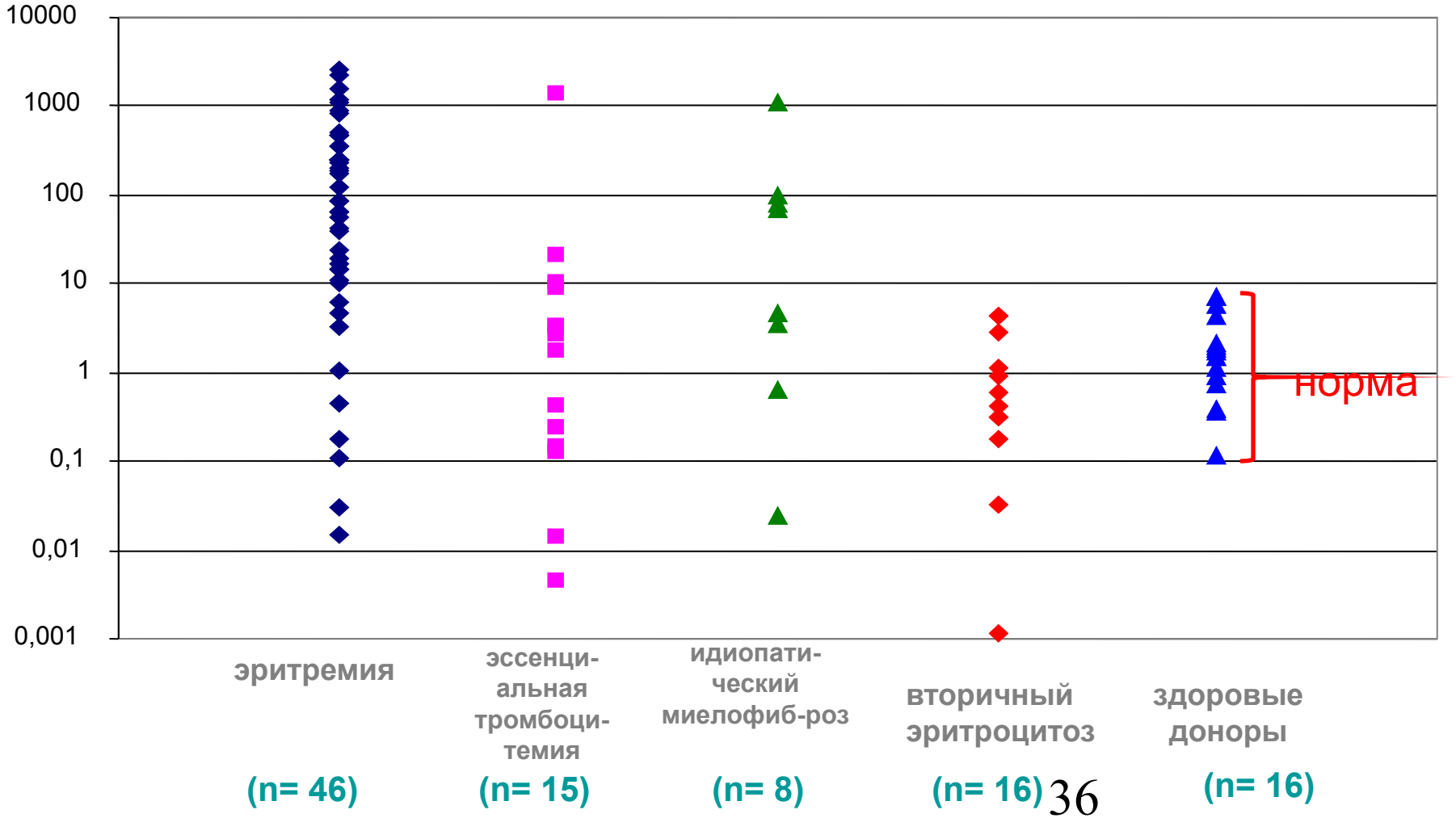
<u>В качестве контрольной группы были включены</u>

Здоровые доноры	**n= 16 человек**
Пациенты с диагнозом вторичного эритроцитоза	**n= 16 человек**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ Ph-МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

1. Экспрессия гена PRV-1
2. Мутация Jak2V617F
3. Рост эндогенных эритропоэтин-независимых колоний (ЭЭК)
4. Уровень эритропоэтина

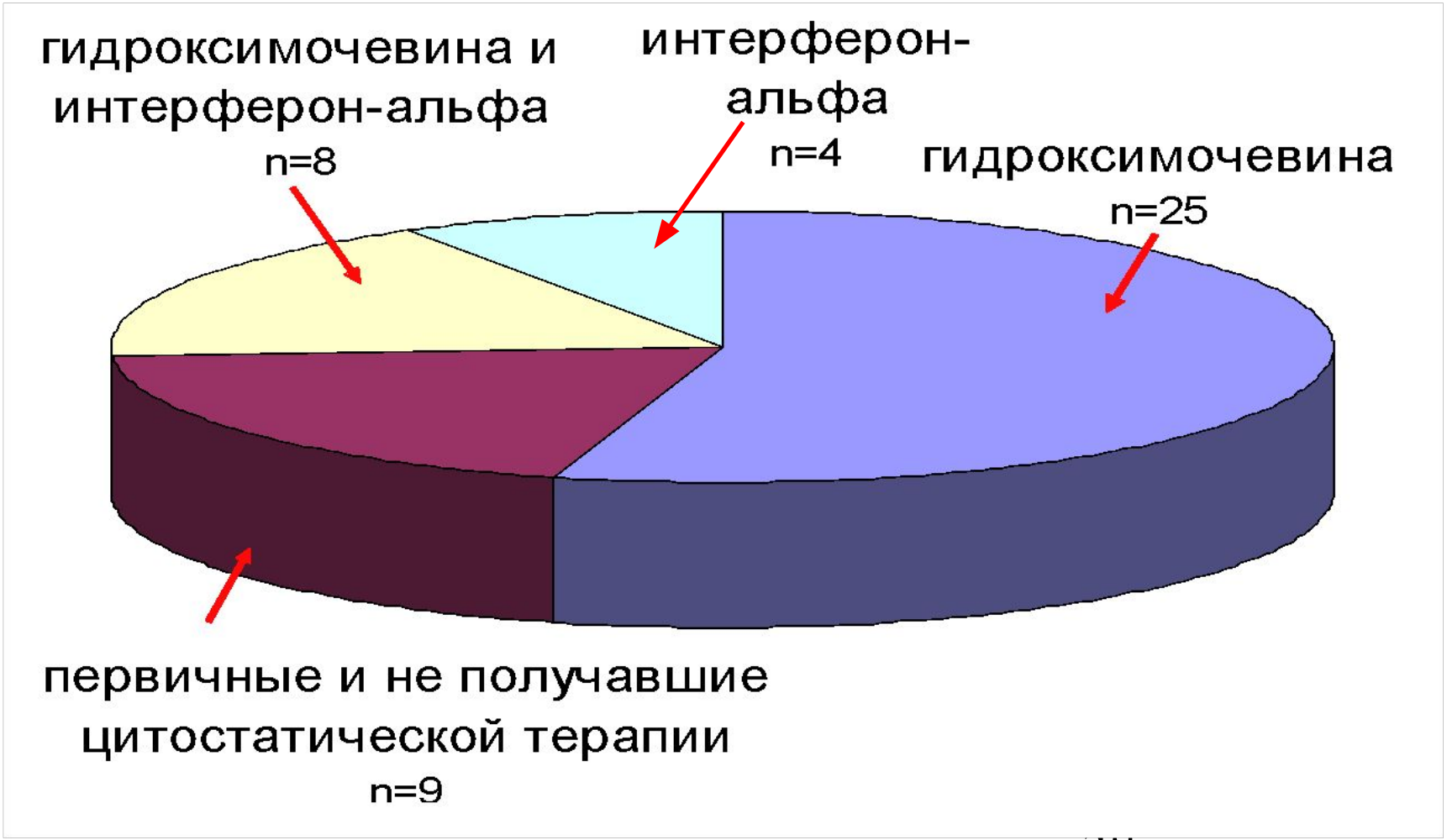
Роль гена PRV-1 в дифференциальной диагностике между эритремией и вторичными эритроцитозами, а также внутри группы хронических Ph-миелопролиферативных заболеваний



УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 У ПАЦИЕНТОВ С УСТАНОВЛЕННЫМ ДИАГНОЗОМ ХРОНИЧЕСКОГО Ph-МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

	Гиперэкспрессия гена PRV-1
1. Эритремия (n=46)	37/46 (80%)
2. Эссенциальная тромбоцитемия (n=16)	7/15 (47%)
3. Идиопатический миелофиброз (n=8)	6/8 (75%)
4. Вторичный эритроцитоз (n=16)	не обнаружена
5. Здоровые доноры (n=16)	не обнаружена

ВАРИАНТЫ ТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ (n=46)

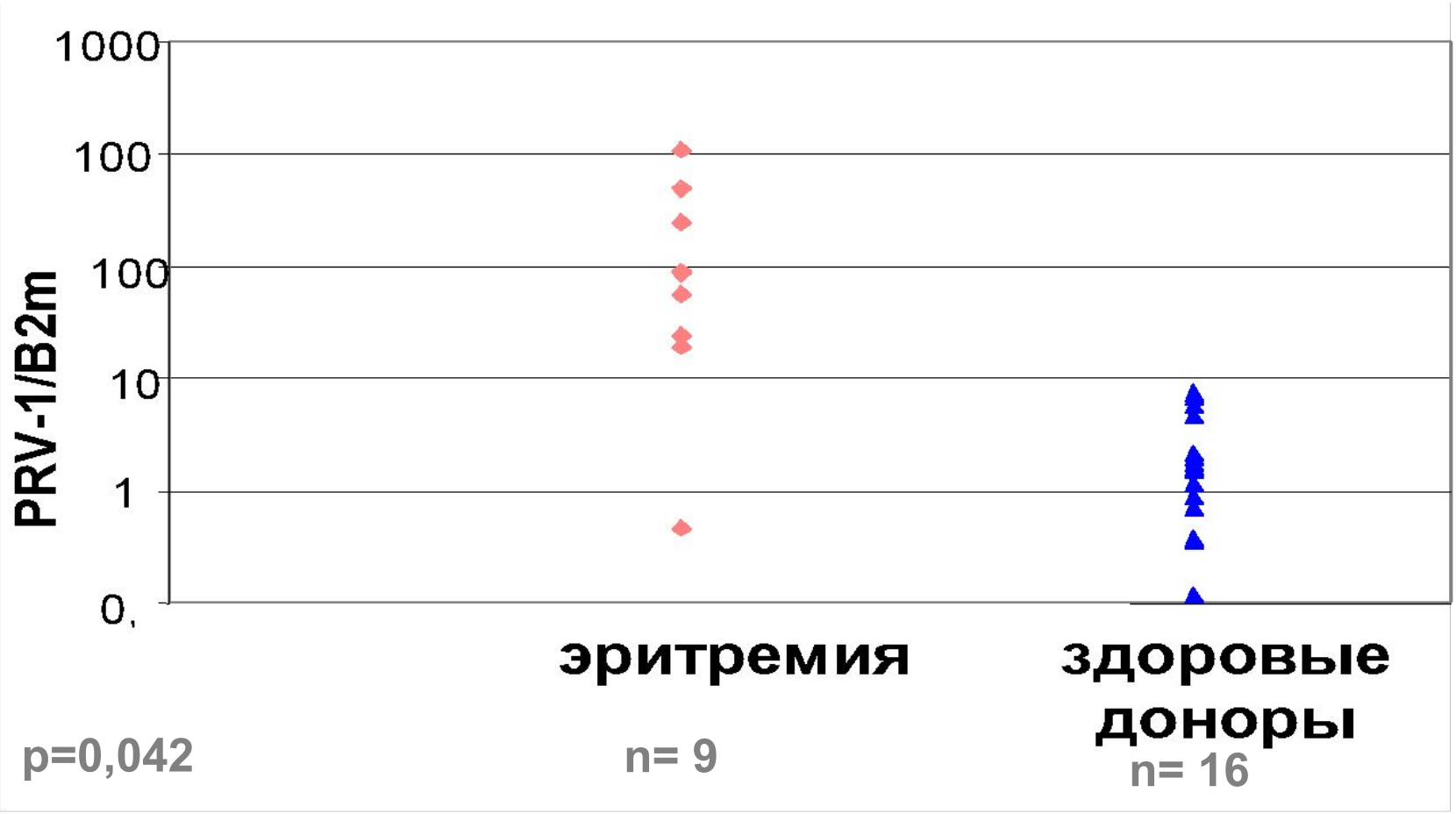


РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

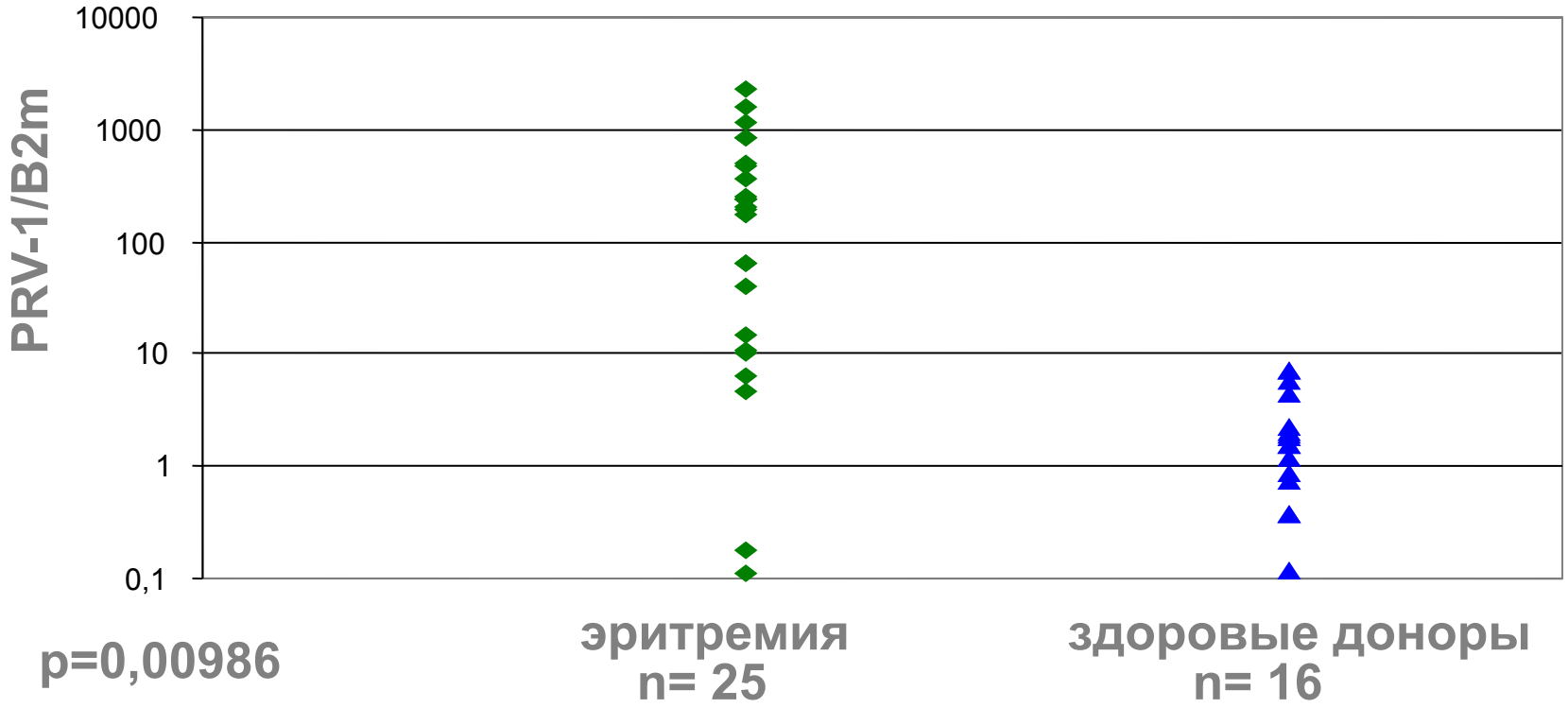
	Полная ремиссия	Частичная ремиссия	Отсутствие ремиссии
первичные и не получавшие цитостатической терапии (n=9)	0		9
моно терапия гидроксимочевиной (n=25)	0	6	19
гидроксимочевина в сочетании с IFN- α (n=8)	2	4	2
моно терапия IFN- α (n=4)	2	2	

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ PRV-1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

(ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫХ И НЕ ПОЛУЧАВШИХ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ)



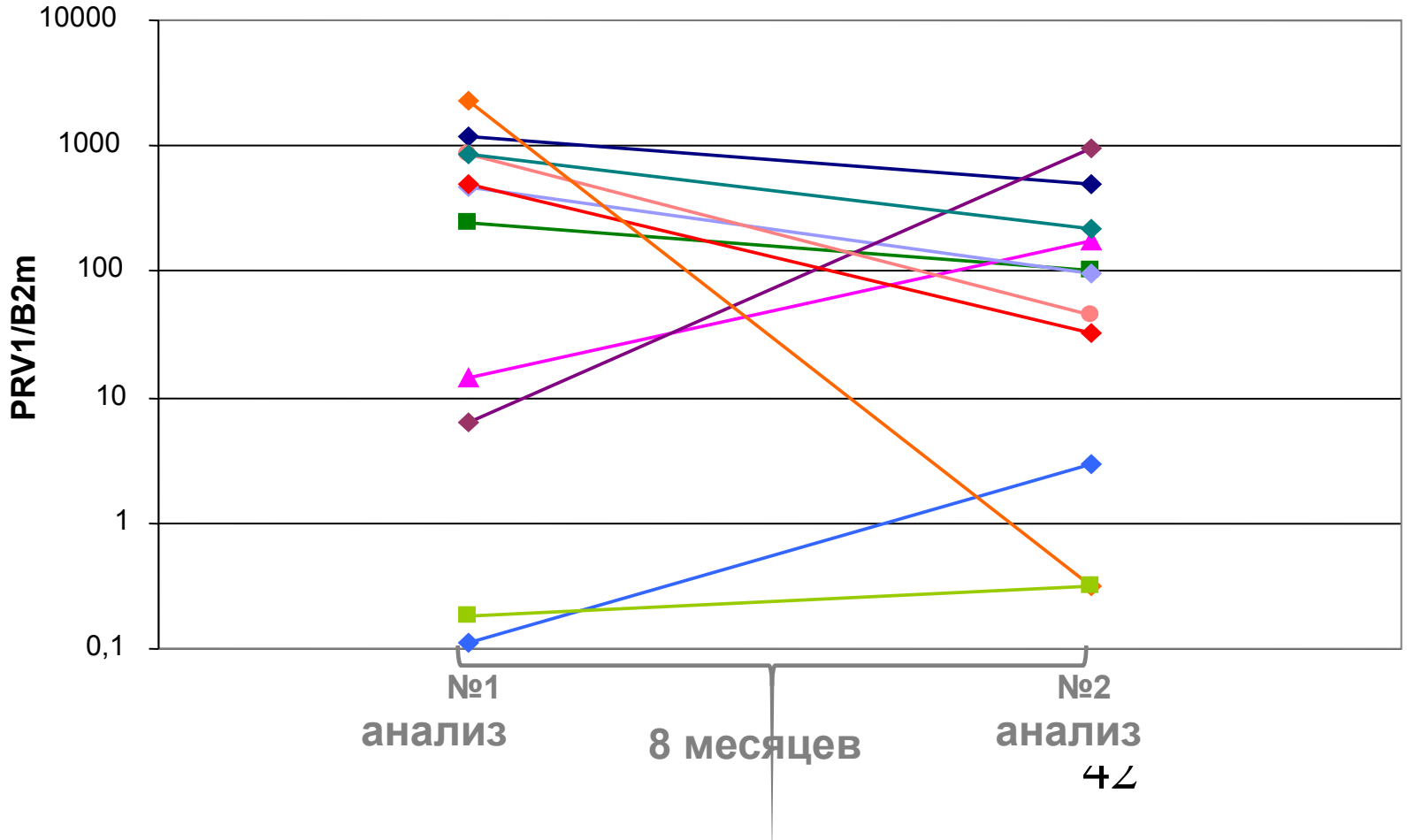
УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ, ЛЕЧЕНЫХ ГИДРОКСИМОЧЕВИНОЙ



ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ PRV-1 ОБНАРУЖЕНА У 21/25 ПАЦИЕНТОВ

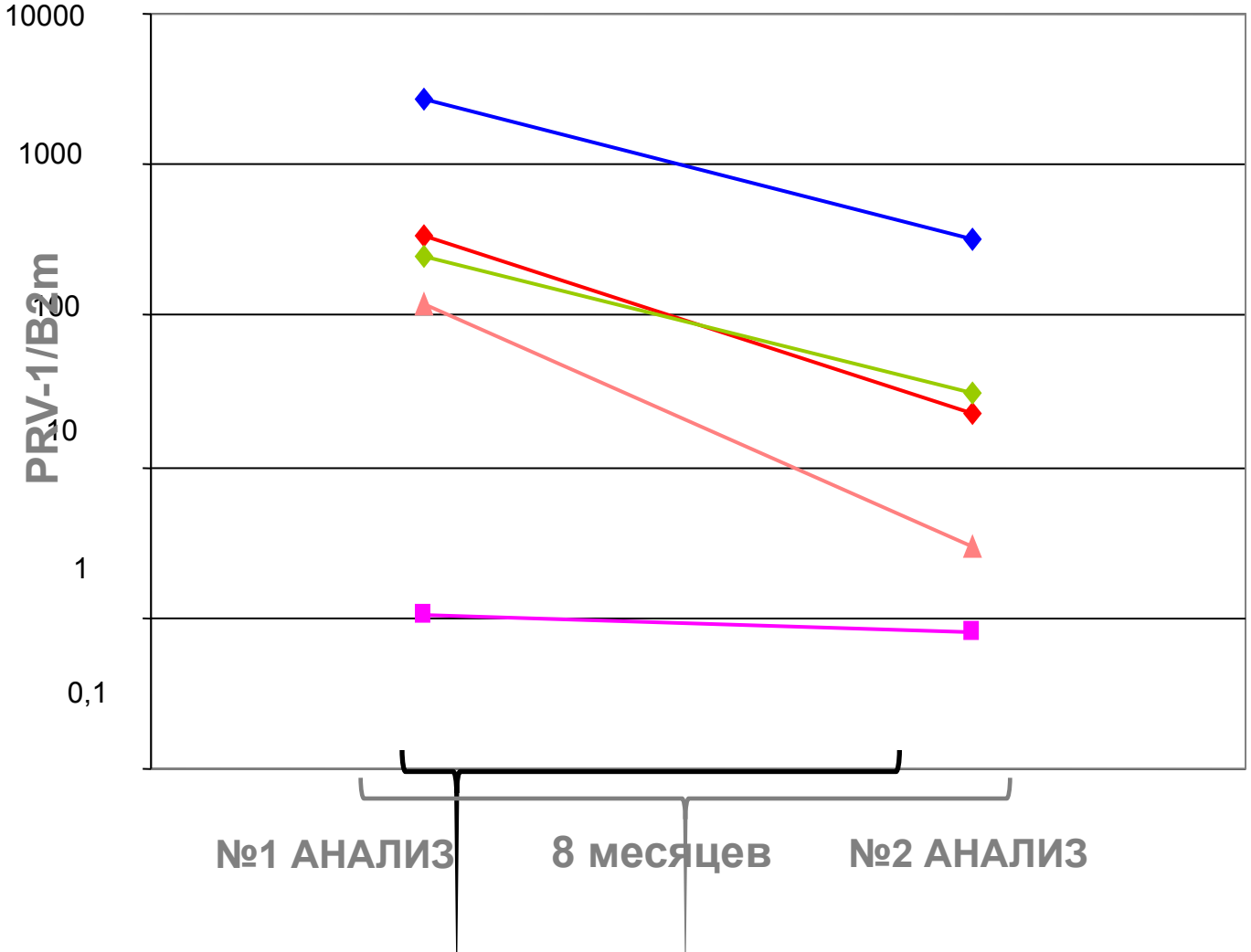
УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ МОНОТЕРАПИЮ ГИДРОКСИМОЧЕВИНОЙ

(ИССЛЕДОВАНИЕ В ДИНАМИКЕ)



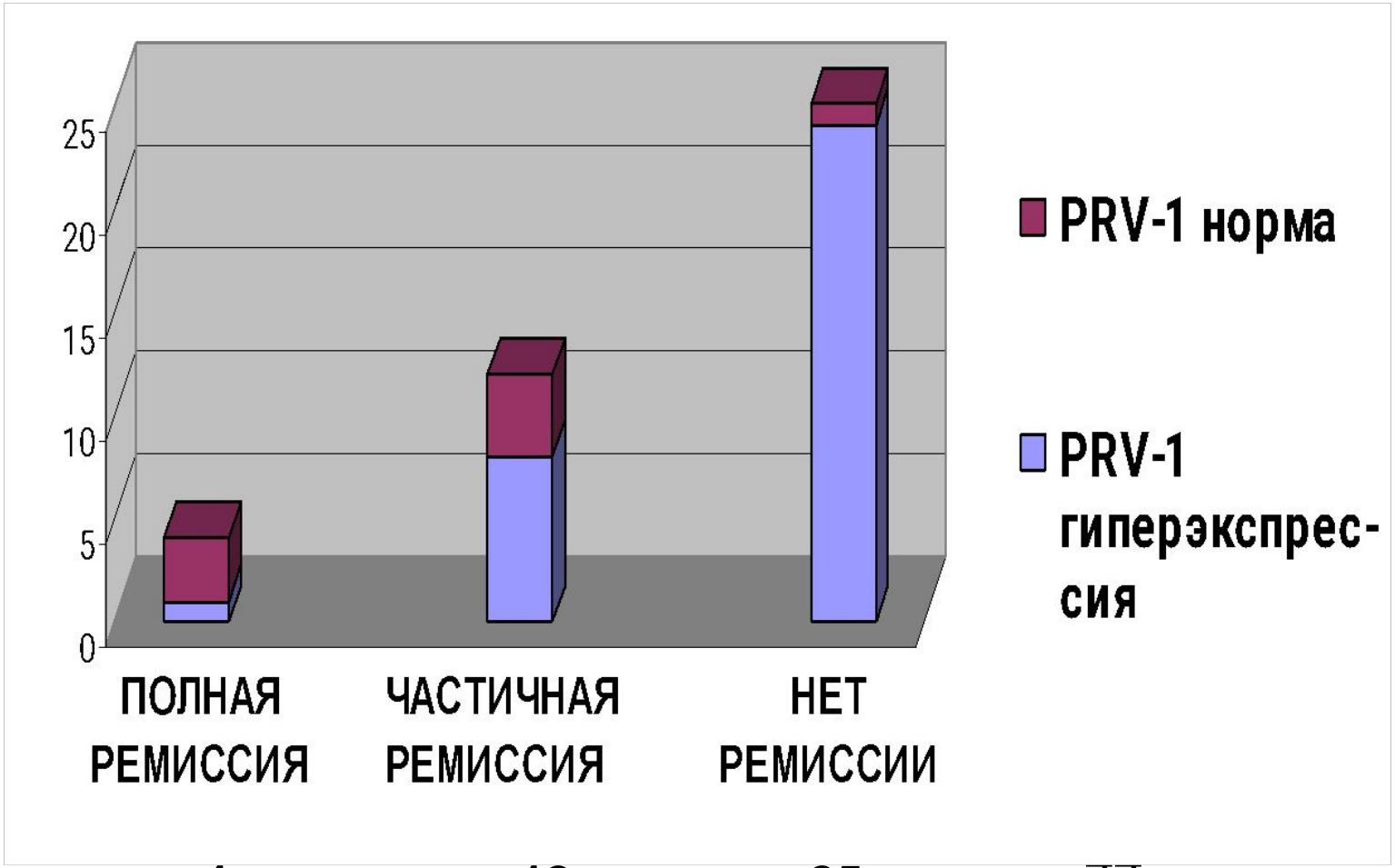
УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 У БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ГИДРОКСИМОЧЕВИНУ В СОЧЕТАНИИ С IFN- α

(ИССЛЕДОВАНИЕ В ДИНАМИКЕ)



СОПОСТАВЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRV-1 И КЛИНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ БОЛЬНЫХ ЭРИТРЕМИЕЙ

НЕЗАВИСИМО ОТ ПРОВОДИВШЕЙСЯ ТЕРАПИИ



n=4 n=12 n=25

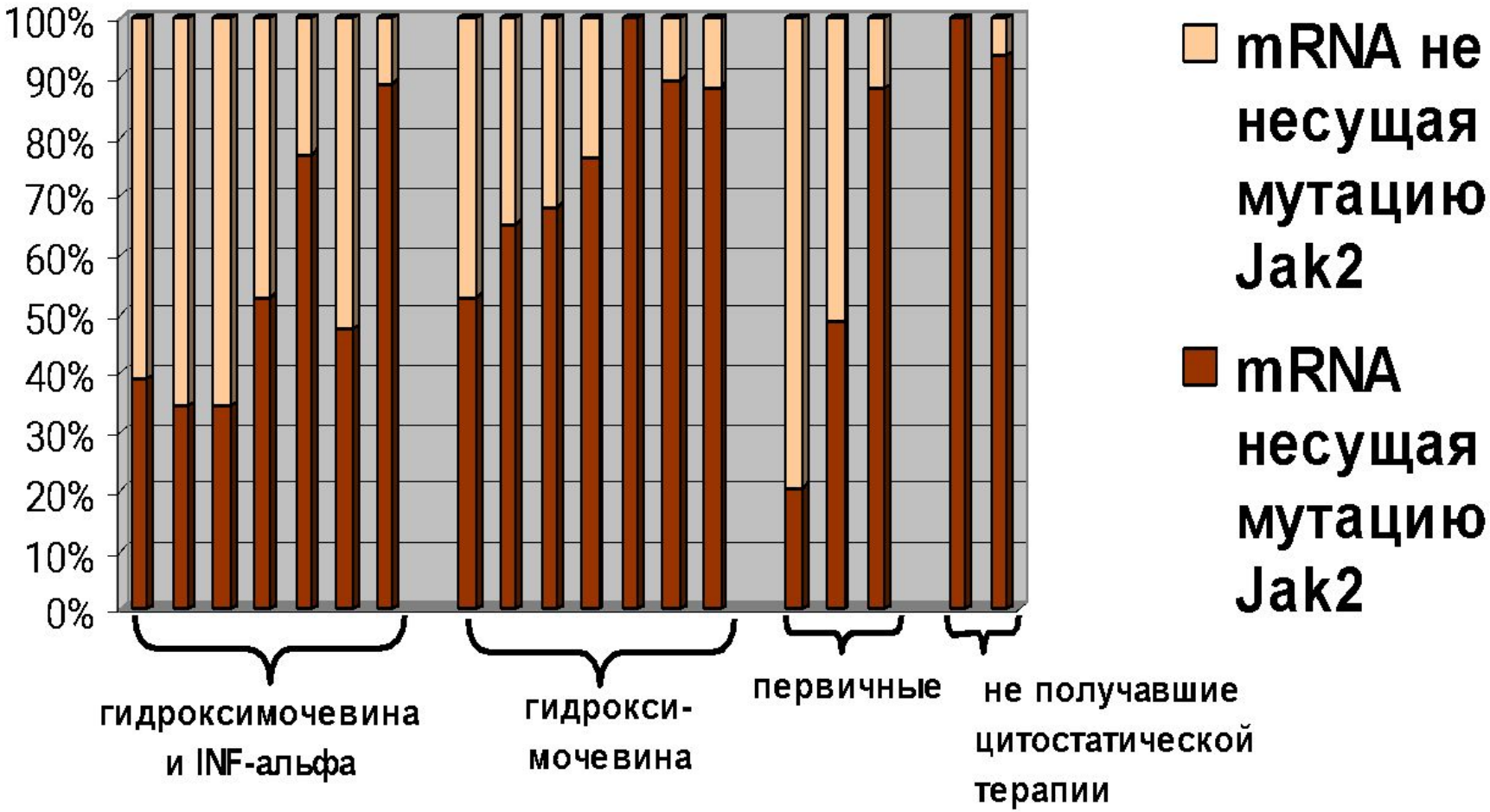
Значение мутации гена Jak2V617F в дифференциальной диагностике между пациентами с диагнозом эритремия и вторичными эритроцитозами

Для определения наличия мутации Jak2V716F обследовано 22 пациента с диагнозом эритремия, 3 здоровых доноров, 6 пациентов с диагнозом вторичного эритроцитоза.

У всех пациентов 22/22 с диагнозом эритремии была выявлена мутация Jak2V716F.

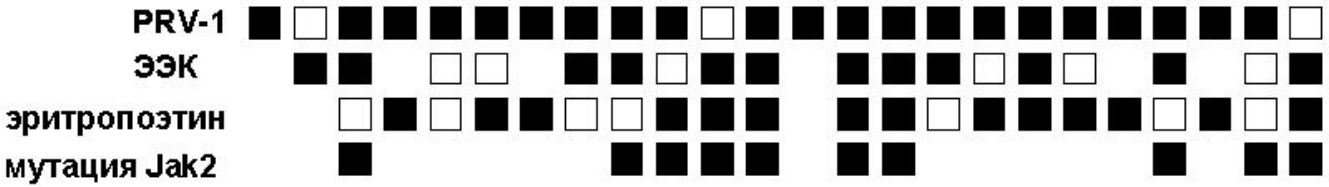
У здоровых доноров, а так же пациентов с диагнозом вторичного эритроцитоза, она отсутствовала.

Соотношение mRNA Jak2 несущих и не несущих мутацию V617F у пациентов с эритремией

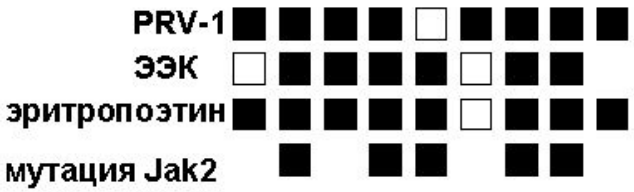


Сочетание молекулярных маркеров у пациентов с диагнозом эритремии

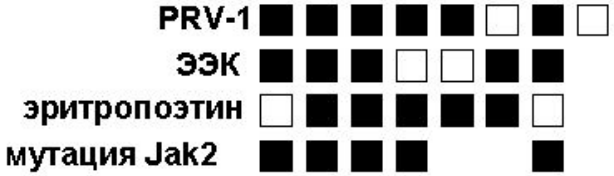
гидроксимочевина



первичные пациенты и без цитостатической терапии



интерферон и гидроксимочевина



монотерапия интерфероном

□ отсутствие маркера

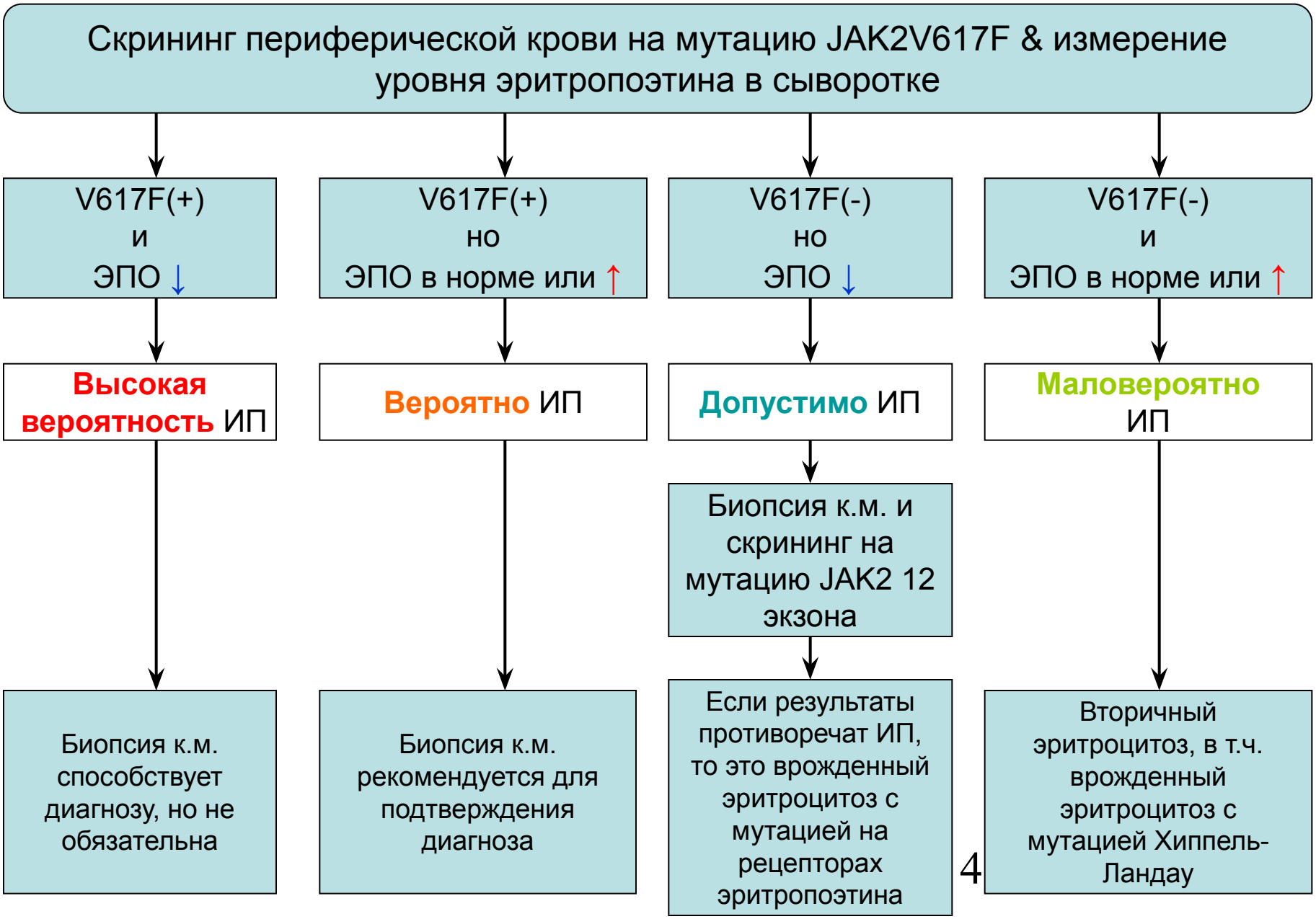
■ наличие маркера

PRV-1/ЭЭК – 19 из 37 пациентов (51%)

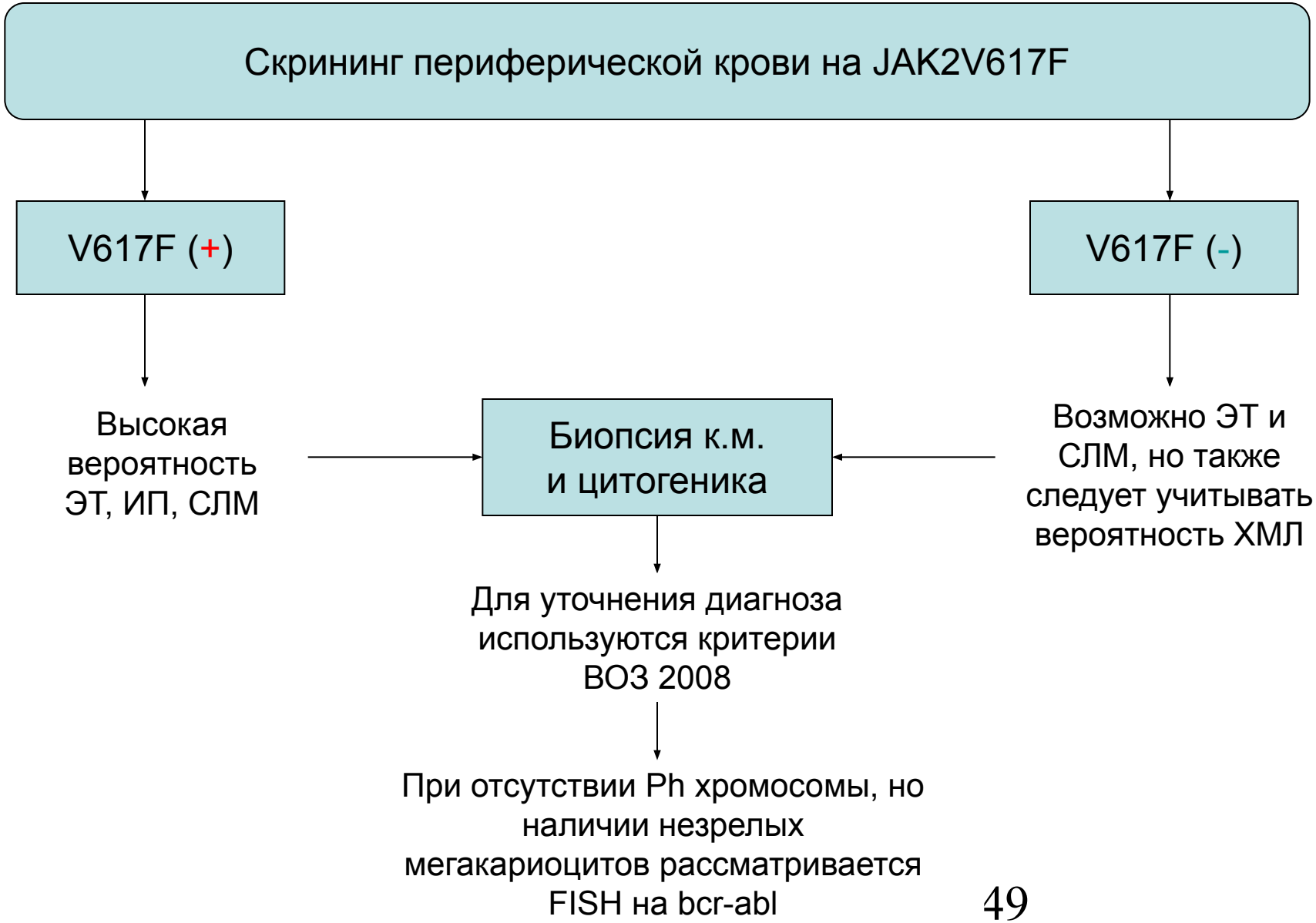
PRV-1/ЭЭК/мутация Jak2 – 15 из 22 пациентов (68%)

PRV-1/ЭЭК/эритропоэтин – 12 из 36 пациентов (33%)

Диагностический алгоритм для предполагаемой истинной полицитемии (ИП)

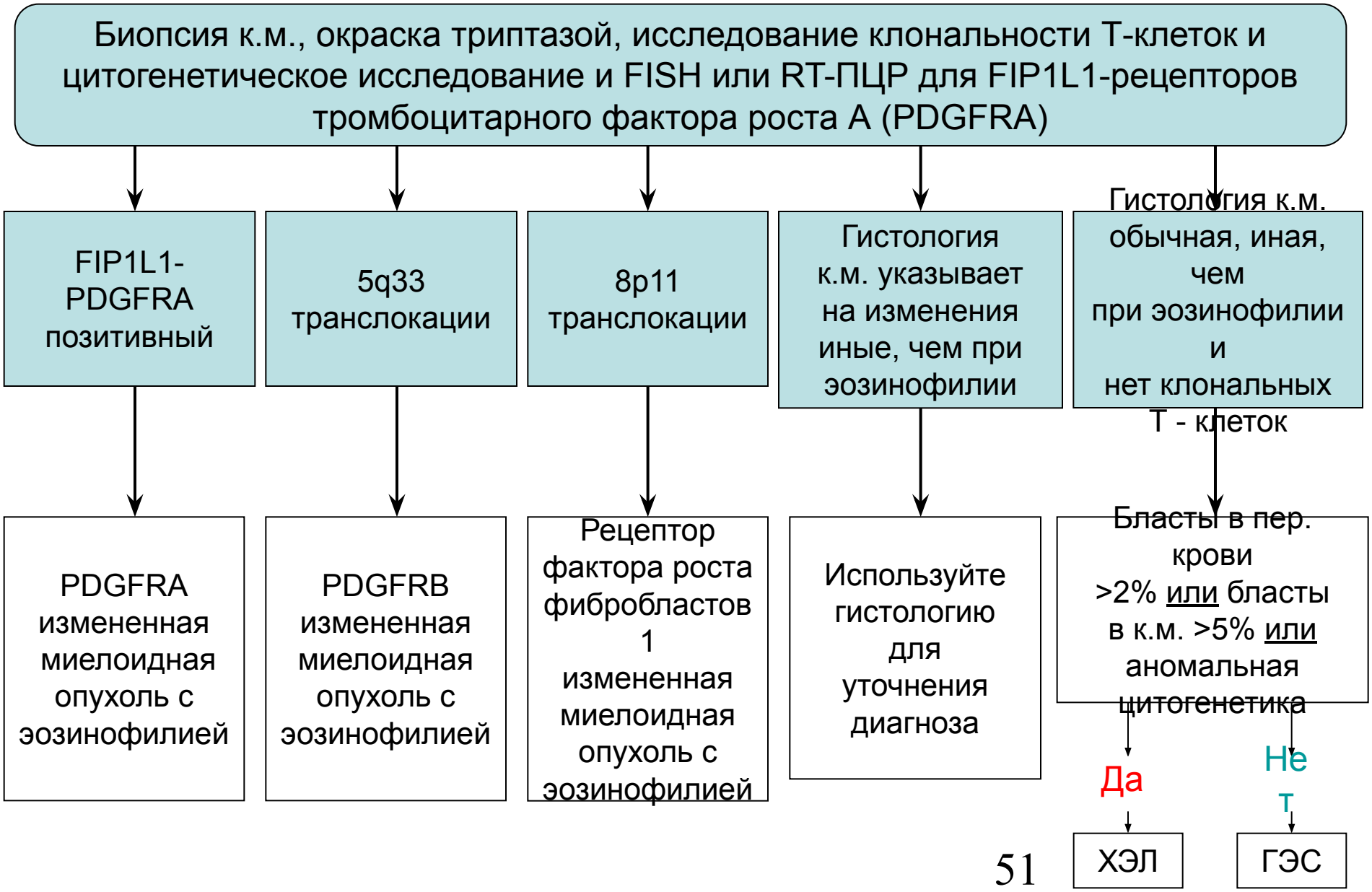


Диагностический алгоритм предполагаемой эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ)



Диагностический алгоритм для предполагаемого сублейкемического миелоза (СЛМ)

Биопсия к.м., окрашивание ретикулина, цитогенетика и скрининг на JAK2V617F мутацию

- Ph хромосома (+) → **ХМЛ**
- V617F (+) или del(13q) → Есть вероятность СЛМ, используйте гистологическое исследование для исключения других миелоидных опухолей
- Другие цитогенетические нарушения → Возможен СЛМ, а также МДС или другие миелоидные опухоли
- Цитогенетика в норме и V617F (-) → При наличии незрелых мегакариоцитов сделайте FISH на bcr-abl или гистологию к.м. для уточнения диагноза

Диагностический алгоритм для первичной эозинофилии
(число эозинофилов в крови ≥ 1.5 x 10^9 $л^{-1}$)