

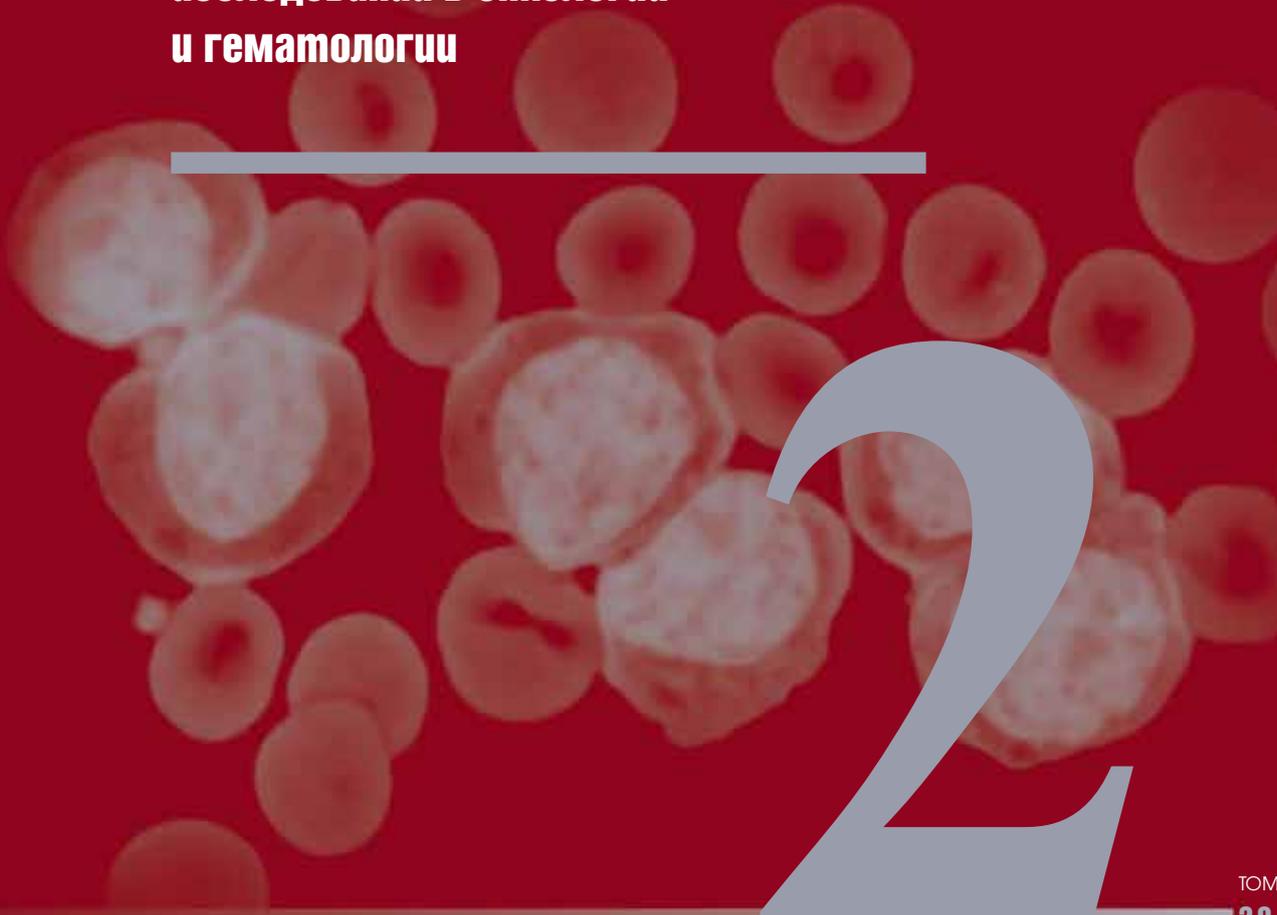
ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Болезнь Кастлемана

Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости

Теория и практика клинических исследований в онкологии и гематологии



2

ДВОЙНОЙ УДАР ПО БОЛЕЗНИ

- Высокая частота и длительность ремиссий у пациентов с ХЛЛ, в том числе рефрактерных к флударабину^{1,2}
- На три года большая выживаемость без прогрессирования, в сравнении с R-СНОР у пациентов с и-НХЛ и ЛЗМ³
- Быстрый ответ на терапию и длительная ремиссия у пациентов с ММ⁴
- Не требуется коррекции дозы у пациентов с хронической почечной недостаточностью⁵

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз / иНХЛ – индолентные неходжкинские лимфомы / ЛЗМ – лимфома зоны мантии / ММ – множественная миелома

1. Knauf W. et al., British Journal of Haematology, 2012, 159, 67–77. 2. Fischer K. et al. J Clin Oncol 29: 3559–3566. 2011. 3. Rummel et al., Lancet. 2013 Apr 6; 381(9873): 1203–10. 4. Pönisch et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2006 Apr; 132(4): 205–12. 5. Pönisch et al., J Cancer Res Clin Oncol. 2012 Aug;138(8): 1405–12.

РУ ЛСР-006546/10 от 08.07.2010 г. Информация для специалистов здравоохранения. Имеются противопоказания, перед назначением необходимо ознакомиться с инструкцией grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx

Представительство частной компании с ограниченной ответственностью
«Астеллас Фарма Юроп Б.В.» (Нидерланды) г. Москва
Россия, 109147, Москва, ул. Марксистская, 16 • Тел. +7 495 737 07 55

Реклама. RUS/BEN/01.2015/1/Tamion/489

Журнал «Онкогематология» включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов, в которых публикуются основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

С 2006 года журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.

С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

С 2015 года электронная версия журнала представлена в ведущих российских и мировых электронных библиотеках, в том числе EBSCO.

ОНКОГЕМАТОЛОГИЯ

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.oncohematology.abvpress.ru

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Самочатова Елена Владимировна, заслуженный врач России, д.м.н., профессор, заведующая отделом клинических исследований ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Афанасьев Борис Владимирович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, директор Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, заведующий кафедрой гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Птушкин Вадим Вадимович, д.м.н., профессор, заместитель главного врача по гематологии ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы», заведующий отделом кооперированных исследований в гематологии/онкологии подростков и взрослых ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Румянцева Юлия Васильевна, д.м.н., заведующая отделом исследования лимфопролиферативных заболеваний ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ПОМОЩНИК ОТВЕТСТВЕННОГО СЕКРЕТАРЯ

Петрова Галина Дмитриевна, младший научный сотрудник отделения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 0 5 Г .

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор В.Е. Ефремова
Корректор А.В. Лукина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Руководитель проекта
А.Г. Барычева, +7 (965) 319-10-53,
alla@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных технологий
и массовых коммуникаций
ПИ № ФС77-36928 от 21 июля 2009 г.

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Онкогематология»
обязательна.

Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.

В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Онкогематология. 2016. Том 11.
№ 2. 1–62
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 3000 экз.

www.oncohematology.abvpress.ru

2^{Том 11}
'16

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алейникова Ольга Витальевна, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, врач-гематолог высшей квалификационной категории (Минск, Республика Беларусь)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, академик РАЕН, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. Н.Ф. Владимирского», главный гематолог Московской области (Москва, Россия)

Дубровин Михаил Михайлович, д.м.н., профессор, отдел ядерной медицины, Детский исследовательский госпиталь Св. Иуды (Мемфис, США)

Карачунский Александр Исаакович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

Криволапов Юрий Александрович, д.м.н., профессор, член панели патологов Европейской сети исследования лимфом, член Европейской рабочей группы исследования костного мозга, заведующий патологоанатомическим отделением клинической молекулярной морфологии Клиники им. Э.Э. Эйхвальда ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Менделеева Лариса Павловна, д.м.н., заместитель генерального директора по науке и инновациям — директор НИИ гематологии и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Мякова Наталья Валерьевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва, Россия)

Никитин Евгений Александрович, д.м.н., руководитель дневного стационара городского гематологического центра ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

Паровичникова Елена Николаевна, д.м.н., руководитель отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Пonomarev Владимир Борисович, д.м.н., отделение радиологии Онкологического центра им. Слоана-Кеттеринга (Нью-Йорк, США)

Рукавицын Олег Анатольевич, д.м.н., профессор, начальник Гематологического центра ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко», главный гематолог госпиталя (Москва, Россия)

Усс Анатолий Леонидович, д.м.н., профессор, главный гематолог Министерства здравоохранения Республики Беларусь, член Комитета по трансплантации Совета Европы и Европейской группы по трансплантации костного мозга, руководитель Республиканского центра гематологии и трансплантации костного мозга (Минск, Республика Беларусь)

Фечина Лариса Геннадиевна, заслуженный врач РФ, заместитель главного врача по онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1, руководитель Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Крыжановский Олег Игоревич, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний онкологического центра «Alta Bates» (Калифорния, США)

Лукина Елена Алексеевна, д.м.н., профессор, руководитель научно-клинического отделения редких заболеваний, ведущий научный сотрудник отделения химиотерапии лейкозов и патологии эритронов ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России (Москва, Россия)

Поддубная Ирина Владимировна, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующая кафедрой онкологии ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последилового образования» Минздрава России на базе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Россиев Виктор Анатольевич, к.м.н., врач высшей категории, заведующий гематологическим отделением Самарской областной клинической больницы им. М.И. Калинина (Самара, Россия)

Румянцев Александр Григорьевич, д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, главный внештатный специалист детской гематолог Минздрава России, член правления Союза педиатров (Москва, Россия)

Румянцев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины ГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Минобрнауки России (Москва, Россия)

Талаев Александр Гаврилович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО «Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России на базе ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница», главный детский патологоанатом г. Москвы (Москва, Россия)

The journal "Oncohematology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses).

In 2006, journal was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI). Since 2015, the journal's electronic version has been available in the leading Russian and international electronic libraries, including EBSCO

ONCOHEMATOLOGY

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

www.oncohematology.abvpress.ru

EDITOR-IN-CHIEF

Samochatova Elena V., Honored Doctor of the Russian Federation, MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES OF EDITOR-IN-CHIEF

Afanasiev Boris V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Director of Raisa Gorbacheva Memorial Institute of Children Oncology, Hematology and Transplantation, Head of the Department of Haematology, Transfusion and Transplantation at Acad. I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Ptushkin Vadim V., MD, PhD, Professor, Deputy Chief Physician for hematology of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Care Department; Head of Department of Cooperated Research in Adolescents/Adults Hematology/Oncology in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE SECRETARY

Rumyantseva Yulia V., MD, PhD, Head of Department of Lymphoproliferative Diseases Studies in Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ASSISTANT TO EXECUTIVE SECRETARY

Petrova Galina D., Junior Research Fellow in Department of Intensive Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2005

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor V.E. Efremova
Proofreader A.V. Lukina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

Subscription & Distribution Service

I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Project Manager
A.G. Barycheva, 8-965-319-10-53,
alla@abvpress.ru

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (ИИ No. ФС77-36928 dated 21 July 2009).

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Onkogematologiya".

The editorial board is not responsible for advertising content.

The authors' point of view given in the articles may not coincide with the opinion of the editorial board.

2 Vol. 11
'16

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Onkogematologiya. 2016.
Volume 11. No 2. 1-62
© PH "ABV-Press", 2016
Pressa Rossii catalogue index:
42167
Printed at the Mediicolor LLC

3,000 copies

www.oncohematology.abvpress.ru

EDITORIAL BOARD

Aleynikova Olga V., Associate Member of the National Academy of Science of the Republic of Belarus, Professor, Director of Republican Research and Medical Center for Oncology, Hematology and Immunology, Physician of the Highest Qualification Grade (Minsk, Republic of Belarus)

Golenkov Anatoly K., MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Natural Sciences, Head of Department of Clinical Hematology and Immune Therapy in N.F. Vladimirsky Moscow Region Research Clinical Institute, Chief Hematologist of Moscow Region (Moscow, Russia)

Dobrovin Mikhail, MD, PhD, Nuclear Medicine Division, St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA)

Karachunsky Alexander I., MD, PhD, professor, Deputy General Director – Director of the Institute of Oncology, Radiology and Nuclear Medicine of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Krivolapov Yuri A., MD, PhD, Professor, Member of Pathologists Panel of European Lymphomas Research Group, Member of European Bone Marrow Research Group, Head of Anatomico-Pathological Department of Clinical Molecular Morphology of E.E. Eichwald Clinics, I.I. Mechnikov North-West State Medical University of Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia)

Mendeleeva Larisa P., MD, PhD, Deputy General Director for Science and Innovation – Director of the Research Institute of Hematology and Transplantation of Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Myakova Natalya V., MD, PhD, Professor, Head of Oncohematology Department of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Nikitin Evgeny A., MD, PhD, Head of the Day Hospital in Hematology Center of S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Health Care Department (Moscow, Russia)

Parovichnikova Elena N., MD, PhD, Head of Department of Chemotherapy of Hematological Malignancy, Hematopoiesis Depression and Bone Marrow Transplantation in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ponomarev Vladimir B., MD, PhD, Department of Radiology Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (New York, USA)

Rukavitsyn Oleg A., MD, PhD, Professor, Head of Hematology Center of N.N. Burdenko General Military Clinical Hospital, Chief Hematologist of the Hospital (Moscow, Russia)

Uss Anatoly L., MD, PhD, Professor, Chief Hematologist of Ministry of Health of the Republic of Belarus, Member of Transplantology Committee of the Council of Europe and European Bone Marrow Transplantation Group, Head of Republican Center for Hematology and Bone Marrow Transplantation (Minsk, Republic of Belarus)

Fechina Larisa G., Honored Doctor of the Russian Federation, Deputy Chief Physician for Oncology and Hematology of Regional Children's Clinical Hospital № 1, Head of Center of Children's Oncology and Hematology (Yekaterinburg, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Kryjansky Oleg I., MD, PhD, Director of Malignant Hematology Program Comprehensive Cancer Center "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, CA, USA)

Lukina Elena A., MD, PhD, Professor, Head of Clinical Research Department of Rare Diseases, Leading Researcher of the Department of Leukemia Chemotherapy and Erythron Pathology in Hematology Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Poddubnaya Irina V., MD, PhD, Corresponding Member of Russian Academy of Science, Professor, Head of Oncology Department of Russian Medical Postgraduate Academy of Ministry of Health of Russia on the basis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Rossiev Viktor A., MD, PhD, Highest Grade Doctor, Head of Hematology Department in M.I. Kalinin Samara Regional Clinical Hospital (Samara, Russia)

Rumyantsev Alexander G., MD, PhD, professor, Academician of Russian Academy of Sciences, General Director of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Professor of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia; Chief Pediatric Hematologist of Ministry of Health of Russia; Board Member of the Union of Pediatricians of Russia (Moscow, Russia)

Roumiantsev Sergey A., MD, PhD, professor, Deputy General Director – Director of School of Molecular and Experimental Medicine of Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev of Ministry of Health of Russia; Head of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in Pirogov Russian National Research Medical University; Head of Translational and Regenerative Medicine Department of Moscow Institute of Physics and Technology (State University) of Ministry of Education and Science of Russia (Moscow, Russia)

Talalaev Alexander G., MD, PhD, Professor, Head of Pathology Department in Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Health of Russia based in Morozov Children's Municipal Clinical Hospital, Chief Children's Pathologist of Moscow (Moscow, Russia)

ЖУРНАЛЫ

www.oncurology.abvpress.ru
ОНКОУРОЛОГИЯ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

www.ogph.abvpress.ru
**Опухоли ГОЛОВЫ
и ШЕИ**
ежеквартальный
научно-практический
рецензируемый
журнал

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
ОПУХОЛИ
ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ
маммология | гинекология
www.ojrs.abvpress.ru

ОНКО
ГЕМАТОЛОГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
www.oncohematology.abvpress.ru

УСПЕХИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ОНКОЛОГИИ
Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://amo.abvpress.ru/jour>
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Онкологическая
КОЛОПРОКТОЛОГИЯ
ИЗДАНИЕ
для специалистов в области
онкологии и лечения
колоректального рака
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
<http://ok.abvpress.ru>

РУССКИЙ
ЖУРНАЛ
**ДЕТСКОЙ
НЕВРОЛОГИИ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
www.rjcn.ru

**АНДРОЛОГИЯ
И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Российский
Биотерапевтический
Журнал**
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal
ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Нервно-мышечные
БОЛЕЗНИ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ
www.nmb.elpub.ru


**РАНЫ
и
РАНЕВЫЕ
ИНФЕКЦИИ**

Журнал имени
проф. Б.М. Косточкина

ГАЗЕТЫ

Онкология Сегодня
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

Урология сегодня
специализированное издание для урологов
www.urologytoday.ru
Выпуск с 2004 года

Наши издания доступны в печатной форме, на сайтах издательства,
а также в мобильных приложениях  **iOS**

PUBLISHERS HOUSE

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

| | |
|--|----|
| <i>А.Л. Меликян, Е.К. Егорова</i> Болезнь Кастлемана (обзор литературы) | 8 |
| <i>Е.А. Зеркаленкова, О.И. Илларионова, А.Н. Казакова, Н.И. Пономарева, Л.В. Байдун, Е.Ю. Осипова, М.Э. Дубровина, А.М. Попов, Т.В. Конюхова, С.А. Плясунова, Н.В. Мякова, А.А. Масчан, Ю.В. Ольшанская</i> Смена линейной дифференцировки в рецидиве острого лейкоза с перестройкой гена MLL (KMT2A). Обзор литературы и описание случаев | 21 |
| <i>Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова, Е.В. Голуб, В.В. Цепенко, А.А. Даниленко, В.В. Павлов</i> Динамическое молекулярно-цитогенетическое наблюдение за больными хроническим лимфоцитарным лейкозом с неблагоприятным прогнозом | 30 |
| <i>М.С. Фоминых, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина, В.Ю. Удальева, К.М. Абдулкадыров</i> Комбинированный режим терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с бластным кризом миелофиброза | 37 |

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ
НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

| | |
|--|----|
| <i>А.С. Вдовин, А.М. Постовская, Н.А. Быкова, Д.С. Романюк, А.Х. Алиева, П.Р. Ефимова, С.А. Шитиков, У.Л. Джулакян, Г.А. Ефимов</i> Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости | 40 |
|--|----|

ПРИГЛАШЕНИЕ К ОБСУЖДЕНИЮ

| | |
|---|----|
| От редакции | 51 |
| <i>Н.В. Жуков</i> Теория и практика клинических исследований в онкологии и гематологии | 52 |

КОНФЕРЕНЦИИ, СИМПОЗИУМЫ, СОВЕЩАНИЯ

| | |
|---|----|
| III Конгресс гематологов России | 60 |
|---|----|

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

- A.L. Melikyan, E.K. Egorova*
Castleman disease (literature review) 8
- E.A. Zerkalenkova, O.I. Illarionova, A.N. Kazakova, N.I. Ponomareva,
 L.V. Baydun, E.Yu. Osipova, M.E. Dubrovina, A.M. Popov, T.V. Konyukhova,
 S.A. Plyasunova, N.V. Myakova, A.A. Maschan, Yu.V. Olshanskaya*
**Lineage switch in relapse of acute leukemia with rearrangement
 of mll gene (kmt2a). literature review and case reports 21**
- T.G. Shkavrova, G.F. Mikhailova, E.V. Goloub,
 V.V. Tsepenco, A.A. Danilenko, V.V. Pavlov*
**Molecular cytogenetic follow-up of chronic lymphocytic leukemia patients
 with unfavorable prognosis. 30**
- M.S. Fominykh, V.A. Shuvaev, I.S. Martynkevich, L.B. Polushkina,
 V.Yu. Udal'eva, K.M. Abdulkadyrov*
**Combination therapy with ruxolitinib plus low-dose cytarabine
 or mercaptopurine in patients with blast-phase myelofibrosis. 37**

BASIC RESEARCH

- A.S. Vdovin, A.M. Postovskaya, N.A. Bykova, D.S. Romanyuk, A.K. Alieva,
 P.R. Yefimova, S.A. Shitikov, H.L. Julhakyan, G.A. Efimov*
Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods. 40

INVITATION TO COMMENT

- Editorial 51**
- N.V. Zhukov*
Theory and practice of clinical trials in oncology and hematology 60

CONGRESSES, CONFERENCES, SYMPOSIA

- III Congress of hematologists of Russia 60**

Болезнь Кастлемана (обзор литературы)

А.Л. Меликян, Е.К. Егорова

ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4а

Контакты: Анаит Леоновна Меликян anoblood@mail.ru

Болезнь Кастлемана (ангиофолликулярная гиперплазия лимфатических узлов) — редкое доброкачественное лимфопролиферативное заболевание с длительным бессимптомным течением, ассоциированное с широким спектром аутоиммунных и онкологических заболеваний и риском развития неходжкинской лимфомы. Редкая встречаемость данного заболевания и разнообразие клинического течения не позволяют провести полноценные и последовательные исследования по изучению его этиологии и патогенеза, разработать стандартные методы терапии. В последние годы число пациентов с болезнью Кастлемана в Российской Федерации увеличилось, и это требует ее распознавания среди неопухолевых и опухолевых лимфаденопатий. Статья посвящена обзору данных о клинических и гистологических вариантах болезни Кастлемана, концепциях ее патогенеза, классификации и лечения.

Ключевые слова: болезнь Кастлемана, интерлейкин-6, герпес-вирус человека 8-го типа

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-08-20

Castleman disease (literature review)

A.L. Melikyan, E.K. Egorova

National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow, 125167, Russia

Castleman disease (angiofollicular hyperplasia of lymph nodes) — a rare benign lymphoproliferative disease with prolonged asymptomatic course, associated with a wide variety of autoimmune and oncological diseases and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. The rare occurrence of this disease and a variety of clinical course did not allow for a complete and consistent research on the etiology and pathogenesis and the standard therapies development. In recent years, the number of patients with Castleman disease in the Russian Federation has increased, which requires its recognition among non-neoplastic and neoplastic lymphadenopathy. The article provides an overview about clinical and histological variants of Castleman's disease, its pathogenesis concepts, classification and treatment.

Key words: Castleman disease, interleukin-6, human herpesvirus type 8

Введение

В 1954 г. на клинико-патологической конференции, проходившей в Массачусетском общем госпитале, патолог В. Castleman представил описание интересного клинического случая. У 41-летнего мужчины в течение 13 лет наблюдались слабость и эпизоды рецидивирующей лихорадки, впоследствии появился сухой кашель. В ходе очередного обследования по поводу вышеописанных жалоб было выявлено большое новообразование переднего средостения, тесно прилегающее к сосудам и перикарду. Было выполнено радикальное удаление данного новообразования. Гистологическая картина опухоли не укладывалась ни в одну из известных в то время нозологий. Необычность состояла в увеличении числа вторичных фолликулов, наличии гиалиноза в зародышевых центрах (ЗЦ) фолликулов, гиперваскуляризации и выраженном плазмцитозе ткани опухоли. Проведенное хирургическое лечение привело к излечению пациента [1]. Впоследствии в 1956 г. было выделено новое заболевание, получившее название в честь своего первооткрывателя «болезнь Кастлемана» (БК) [1, 2].

Случаи с подобной гистологической картиной, но разными клиническими симптомами, стали накапли-

ваться. В 1972 г. А. Keller, L. Hochholzer и В. Castleman, проанализировав клинические и гистологические данные 182 больных, выделили 2 гистологических варианта болезни: гиалино-васкулярный вариант (ГВВ), встречающийся в 91 % случаев, и плазмклеточный вариант (ПКВ). По их данным, локализация опухоли может быть различной, однако в 70 % случаев она обнаруживается в грудной клетке, чаще всего в корне легкого, рядом с крупными сосудами или в средостении. У 11 % больных образование выявлялось в забрюшинном пространстве и только у 4 % — в периферических лимфатических узлах (ЛУ). Остальные 15 % случаев составили редкие локализации, такие как миндалины, орбита, лимфоидная ткань носоглотки и языка [3]. Авторами было показано, что ГВВ в большинстве случаев подразумевает локальное поражение, и опухолевое образование растет медленно, годами, достигая в результате значительных размеров. Симптомы заболевания редки и зависят от локализации опухоли: при вовлечении в патологический процесс ЛУ средостения пациенты жалуются на кашель, одышку, сердцебиение, кровохарканье; при локализации ЛУ в забрюшинном пространстве — боли в животе, диспептические расстройства или нарушение функции мочевых

путей. Радикальное хирургическое удаление опухоли приводит к излечению. ПКВ характеризуется наличием выраженных конституциональных симптомов (похудение, потливость, лихорадка), гепатоспленомегалии, генерализованной периферической лимфаденопатии и изменениями лабораторных показателей (анемия, гипергаммаглобулинемия, увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ), уровня С-реактивного белка (СРБ) и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)). Данный вариант болезни требует проведения специфической терапии [3].

Классификация БК. Первая классификация БК основывалась на морфологических признаках и выделяла 2 варианта: ГВВ и ПКВ [3].

Типичная гистологическая картина при БК ГВВ характеризуется нарушением структуры ЛУ за счет увеличения количества фолликулов и гиперваскуляризации интерфолликулярных зон. Фолликулы, как правило, маленькие, образованы трансформированными атрофичными гиалинизированными ЗЦ, окруженными широкой зоной мантии, состоящей из малых лимфоцитов и внешне часто напоминающей концентрическую структуру наподобие слоев луковицы (рис. 1а). Митозы отсутствуют. К центру такого измененного фолликула подходит 1 или несколько сосудов. При малом увеличении гиалинизированный фолликул и подходящий к нему сосуд выглядят как леденец на палочке (рис. 1б). ЗЦ аномальных фолликулов малоклеточные, состоят из единичных лимфоцитов и фолликулярных дендритических клеток (ФДК), имеются депозиты гиалина. В межфолликулярных зонах определяется повышенное количество кровеносных сосудов, в основном посткапиллярных венул, представленных гиперплазированными эндотелиальными клетками (рис. 2). Среди сосудов обнаруживаются рассеянные или располагающиеся группами малые лимфоциты, плазмциты и плазмцитоподобные моноциты. Синусы не растянуты, иногда слабо различимы [1, 2, 4].

При иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании клетки ЗЦ редуцированных фолликулов – CD20⁻, CD21⁺, CD23⁺. Количество Т-лимфоцитов (CD3⁺, CD45RO⁺) в фолликулах и межфолликулярных зонах меньше нормы. Межфолликулярные пространства состоят из CD68⁺ плазматических клеток, S-100⁺ -интердигитальных дендритных клеток и кровеносных сосудов (CD31⁺ (рис. 3), VIII-фактор⁺ [5]).

ПКВ имеет отличную от ГВВ гистологическую картину. Структура ЛУ нарушена за счет гиперплазированных фолликулов с расширенными ЗЦ, окруженными узкой мантийной зоной, состоящей из малых лимфоцитов (рис. 4а). Зародышевые центры расширены, активны, встречаются макрофаги. Мантийная зона резко сужена, местами отсутствует, состоит из зрелых лимфоцитов. Межфолликулярные зоны и мозговой слой характеризуются гиперплазией по фолликулярному типу с присутствием широких пласта-

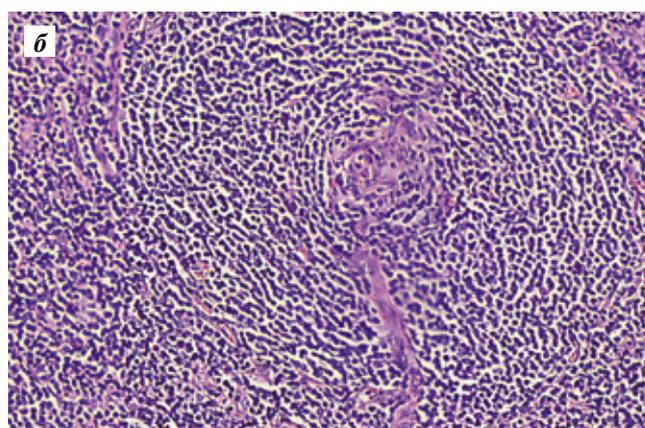
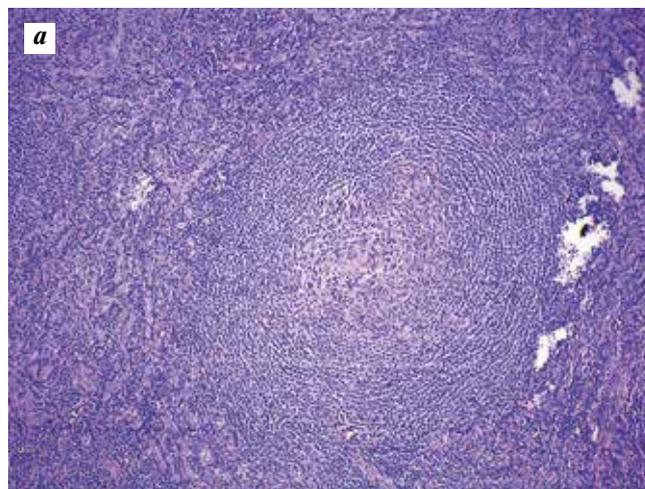


Рис. 1. Лимфатический узел, гиалино-васкулярный вариант: а – регрессивно трансформированный фолликул с ровными рядами расширенной мантийной зоны – «луковица на разрезе»; б – регрессивно трансформированный фолликул с гиалинозом стенки питающего сосуда капиллярного типа – «леденец на палочке». Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

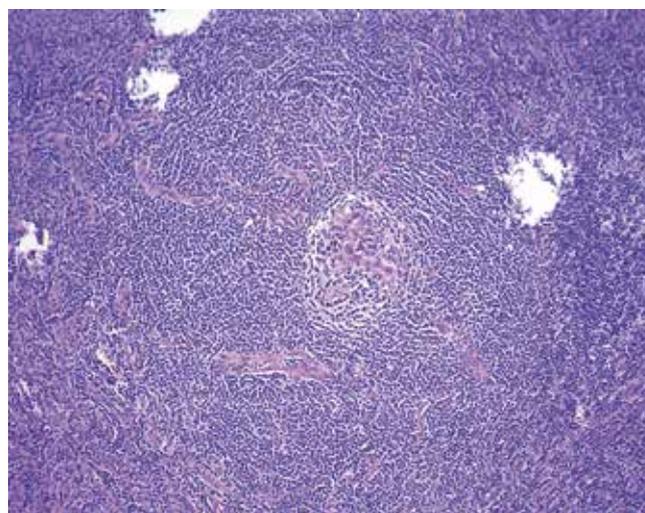


Рис. 2. Лимфатический узел, гиалино-васкулярный вариант. Лимфоидное истощение с фолликулярными дендритическими клетками в редуцированном фолликуле. Васкуляризация и фиброз стромы межфолликулярных пространств. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

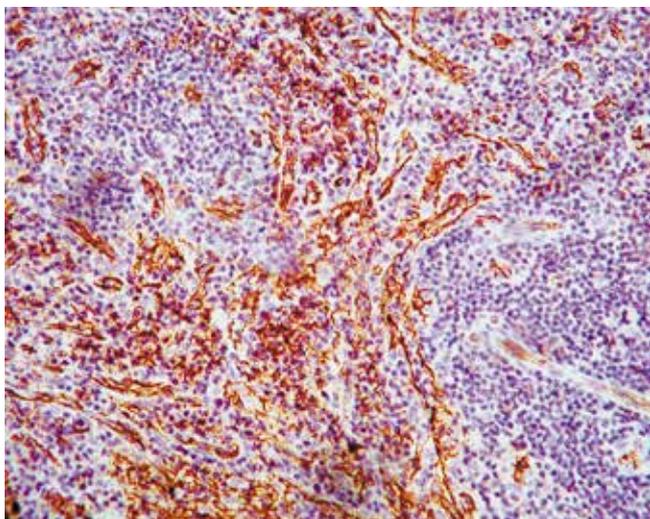


Рис. 3. Лимфатический узел, гиалино-васкулярный вариант. Экспрессия CD31 эндотелиоцитами кровеносных сосудов. Иммуноферментный метод. $\times 200$

тических клеток, представленных зрелыми и незрелыми формами, могут встречаться атипичные и двухъядерные формы, тельца Рассела (рис. 4б). Между плазматическими клетками межфолликулярных пространств встречаются иммунобласты, плазмоцитоподобные моноциты, лимфоциты и гистиоциты. Синусы могут быть расширены [2, 3, 4].

При ИГХ-исследовании гиперплазированные фолликулы представлены CD20⁺-В-лимфоцитами (рис. 5), межфолликулярные пространства – CD68⁺, CD138⁺-плазматическими клетками с экспрессией поликлональных иммуноглобулинов (Ig) [5].

Таким образом, А. Keller и соавт. описали основные клинические особенности БК и дали четкие гистологические критерии ее классическим морфологическим вариантам – ГВВ и ПКВ [3]. Некоторые авторы выделяют 3-й гистологический вариант болезни – смешанно-клеточный. Дальнейшие исследования БК показали, что ее локальные формы имеют менее выраженные клинические симптомы, излечиваются хирургическим удалением опухоли и имеют благоприятный прогноз, тогда как генерализованные характеризуются наличием выраженных клинических симптомов, изменениями в лабораторных показателях, более агрессивным течением и худшим прогнозом [6, 7].

Эти данные позволили разделить БК на 2 клинических варианта: локальный (уницентрический) и генерализованный (мультицентрический) [6, 7]. Локальный вариант БК является наиболее распространенной формой заболевания, связан с одним ЛУ или цепочкой ЛУ одной анатомической зоны, и характеризуется, как правило, гиалино-васкулярной морфологией. Мультицентрический вариант, или мультицентрическая болезнь Кастлемана (МБК), встречается реже, протекает более агрессивно, характеризуется смешанно-клеточной или плазмноклеточной морфологией и требует проведения цитостатического лечения (см. таблицу).

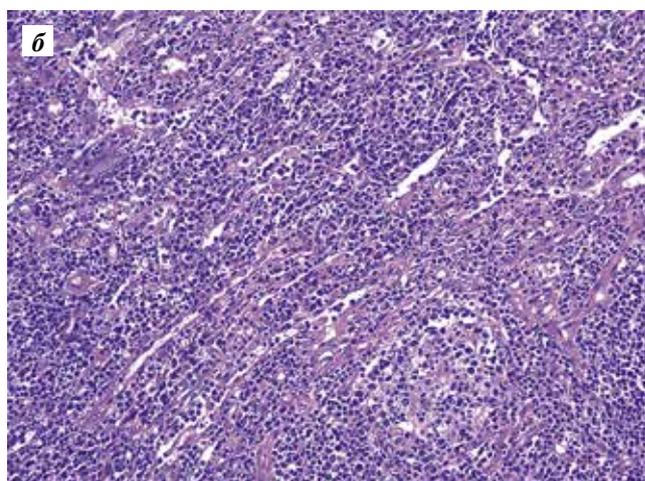
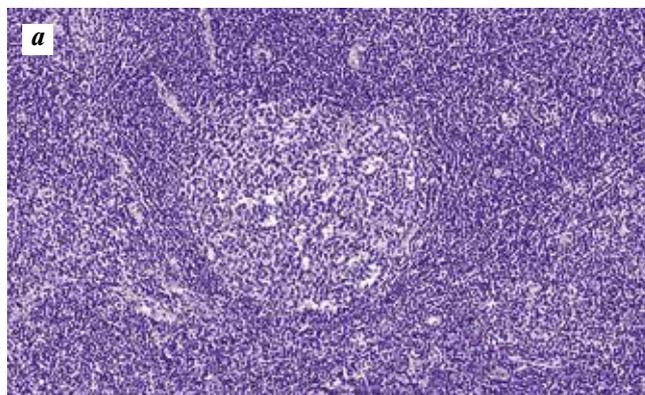


Рис. 4. Лимфатический узел, плазмноклеточный вариант: а – гиперплазированный фолликул с узкой зоной мантии. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$; б – пласты плазматических клеток в межфолликулярной зоне. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

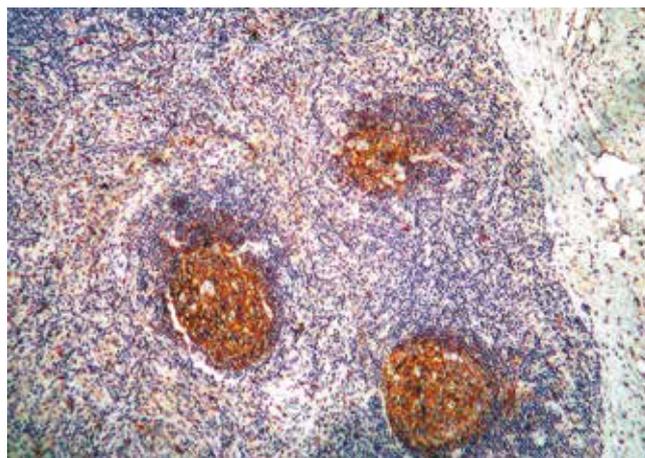


Рис. 5. Лимфатический узел. Плазмноклеточный вариант. Экспрессия CD20 В-лимфоцитами гиперплазированных фолликулов. Иммуноферментный метод. $\times 100$

Однако данная клиническая классификация утратила свою актуальность в связи с выявлением нового патогенетического агента – герпес-вируса человека 8-го типа (HHV-8). Впервые HHV-8 был обнаружен у группы пациентов, имевших сопутствующий БК РОEMS-

Клиническая классификация болезни Кастлемана [11]

| Показатель | Локальная (уницентрическая) | Генерализованная (мультицентрическая) |
|------------------------------------|--|---|
| Возраст, лет | От 40 | От 60 |
| Клинические симптомы | Нет или редко конституциональные симптомы | Частые конституциональные симптомы, аутоиммунные проявления, РОEMS-синдром |
| Органомегалия | Редко | Часто |
| Локализация | Лимфатические узлы средостения или брюшной полости | Генерализованная: периферические, медиастинальные и забрюшинные лимфатические узлы |
| Изменения лабораторных показателей | Иногда анемия, ускорение СОЭ и увеличение концентрации СРБ, гипергаммаглобулинемия | Часто анемия, тромбоцитопения, тромбоцитоз, лейкоцитоз, ускорение СОЭ, увеличение концентрации СРБ и количества ЦИК, гипергаммаглобулинемия, следовая моноклональная секреция |
| Морфологическая картина | Гиалино-васкулярная, редко плазмноклеточная или смешанно-клеточная | Плазмноклеточная или смешанно-клеточная, редко гиалино-васкулярная |
| Связь с ВИЧ | Нет | Иногда |
| Связь с HHV-8 | Нет | Да |
| Терапия | Радикальное хирургическое удаление, лучевая терапия на остаточное образование | Системная цитостатическая терапия с переменным успехом |
| Развитие лимфомы | Редко | Часто |
| Клиническое течение | Благоприятное | Неблагоприятное |

Примечание. СОЭ – скорость оседания эритроцитов, СРБ – С-реактивный белок, ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы, ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, HHV-8 – герпес-вирус человека 8-го типа.

синдром (полинейропатия, органоmegалия, эндокринопатия, наличие моноклональной секреции и изменений кожи и ее придатков). Морфологическая картина в ЛУ напоминала таковую при ПКВ, но имелось отличие: в мантийной зоне присутствовали плазмобласты с одним или несколькими ядрышками (рис. 6). Исследование N. Durin и его коллег показало, что данный вариант связан с HHV-8 и развитием плазмобластной лимфомы [8]. Поэтому в настоящее время авторы предпочитают классифицировать БК согласно гистопатогенному типу в противоположность традиционной уницентрической/мультицентрической модели [7, 9–14]

Современная гистопатогенетическая классификация болезни Кастлемана

1. Гиалино-васкулярный локальный вариант.
2. Плазмноклеточный локальный вариант.
3. Мультицентрический вариант, или МБК.
4. HHV-8-ассоциированный плазмобластный вариант.

Этиология и патогенез болезни Кастлемана

Происхождение БК в разное время объяснялось по-разному. Одной из первых была теория «дистопированной» вилочковой железы, или тимомы, поскольку наиболее частой локализацией опухоли было сре-

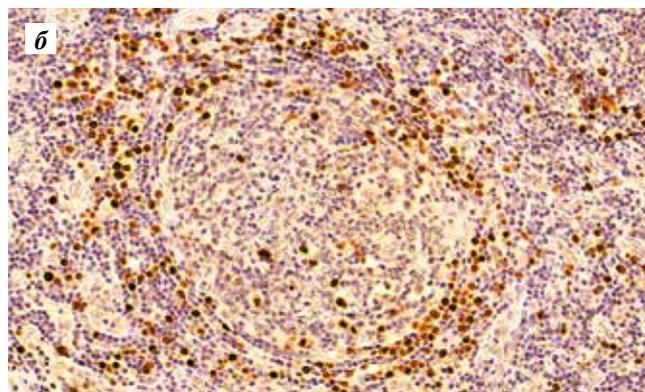
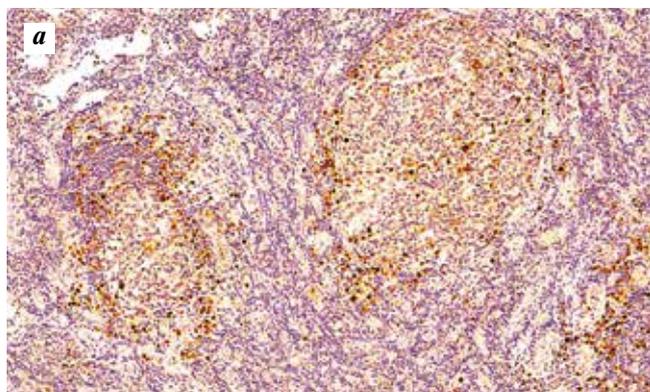


Рис. 6. Лимфатический узел, плазмноклеточный вариант. Ядерная экспрессия LANA-1 HHV-8-лимфоцитами зоны мантии. Иммуноферментный метод. $\times 100$ (а), $\times 200$ (б)

достение или корень легкого и гистологически группы «голых» ФДК напоминали тельца Гассала в тимусе. Однако ИГХ-исследования не подтвердили общность тимических лимфоцитов и лимфоцитов, пораженных при БК ЛУ [2, 5].

Следующая теория предполагала, что БК – это гамартома или доброкачественная сосудистая опухоль ЛУ, из-за обилия сосудов в интерфолликулярных зонах. Она также не нашла гистологического и ИГХ-подтверждения [5].

Некоторые авторы полагали, что БК – это вариант вялотекущей неходжкинской лимфомы. Большое ретроспективное исследование было выполнено D.M. Menke и другими специалистами из клиники Майо. Они изучили 51 случай, соответствовавший классическим гистологическим критериям БК. Выполненное развернутое ИГХ-исследование позволило выделить ряд особенностей, подтвердивших, что субстратом заболевания являются поликлональные неопухольевые лимфоциты и, хотя морфологическое сходство ГВВ и ПКВ небольшое, это все же варианты одной болезни [5]. Еще одно исследование выполнил J. Soulier с коллегами – они изучили 46 биологических образцов (сыворотка крови, ЛУ и костный мозг) у 34 пациентов с БК, 20 из которых были ВИЧ-отрицательны. В исследовании использовали метод иммуноблоттинга (исследование реаранжировки генов тяжелой цепи иммуноглобулина – В-клональность) и полимеразную цепную реакцию (определение Т-клеточной клональности). Изменения были выявлены только в 4 случаях, в 2 из которых имелось сочетание с В-клеточной лимфомой, а в 2 других, возможно, был минимальный опухолевый клон. Данное исследование подтвердило, что изменения, возникающие в ЛУ при БК, имеют поликлональный характер и не могут быть отнесены к неходжкинским лимфомам [15].

Работы о роли интерлейкина-6 (IL-6) в патогенезе БК появились в конце 1990 годов. Ряд исследователей предположили, что такие клинические проявления болезни, как лихорадка, потливость, похудение и генерализованный тип поражения ЛУ, могут быть связаны с длительным (хроническим) воздействием на организм человека каких-либо биологических агентов. Исследование сыворотки крови пациентов с МБК на содержание различных цитокинов выявило высокий уровень IL-6. Изучение IL-6 показало, что он играет ключевую роль в иммунном ответе, гемопоэзе и формировании острофазовой реакции. IL-6 продуцируют различные типы клеток: макрофаги, Т- и В-лимфоциты, фибробласты, эндотелиальные, эпидермальные и микроглиальные клетки, хондроциты, остециты [16, 17].

Широкий спектр действия IL-6 опосредован активацией его трансмембранных рецепторов – комплекса белков IL-6, IL-6R (IL-6R/CD126/gp80) и gp130, участвующих в активации сигнальных путей JAK-STAT и MAPK [18].

Было выявлено, что IL-6 принимает участие в патогенезе различных воспалительных, аутоиммунных

и онкологических заболеваний, а именно множественной миеломы [19], ревматоидного артрита [20], БК [21], мезангиопролиферативного гломерулонефрита [22], псориаза, саркомы Капоши [23], сепсиса и остеопороза.

В 1989 г. группа К. Yoshizaki провела исследование, целью которого было изучение экспрессии IL-6 клетками ЗЦ реактивных ЛУ в зависимости от морфологического варианта БК и выявление ее корреляции с уровнем IL-6 в сыворотке крови. ИГХ-исследование с анти-IL-6 моноклональным антителом показало присутствие IL-6 в фолликулах ЛУ в 2 случаях БК и его отсутствие в 2 нормальных ЛУ. Оба случая БК протекали с системными проявлениями (лихорадка, потливость и т. п.), и оказалось, что имеется прямая связь между уровнем IL-6 в сыворотке крови и наличием клинических симптомов у пациентов с БК. Удаление пораженных ЛУ при локальном вовлечении привело к нормализации уровня сывороточного IL-6. В отличие от хронических воспалительных заболеваний, сопровождающихся гиперпродукцией IL-6 клетками ЗЦ гиперплазированных фолликулов, при БК не было выявлено увеличения синтеза других воспалительных цитокинов, кроме IL-6. Таким образом, авторы сделали вывод, что дизрегуляция экспрессии IL-6 при БК может быть первичным звеном в этиологии данного заболевания [21].

M.V. Leger и соавт. проанализировали экспрессию гена IL-6 и других цитокинов при различных вариантах БК [24]. В исследование было включено 7 пациентов с БК, у 4 была локальная форма, у 3 – мультицентрическая. Продукцию IL-6 изучали ИГХ-методом и методом гибридизации *in situ* с учетом различных вариантов заболевания. Гиперэкспрессия гена IL-6 в центрах фолликулов при БК является специфичным феноменом, так как ген IL-6 не экспрессируется в фолликулах нормальных [21] и гиперплазированных узлов или в фолликулах других лимфоидных органов. Таким образом, дизрегуляция экспрессии гена IL-6 у пациентов с локальной формой БК коррелирует с присутствием клинических симптомов. Другие цитокины, кроме IL-6, не гиперэкспрессируются в этих случаях, и БК стала единственным заболеванием, при котором выявлялась селективная гиперэкспрессия гена IL-6 [24].

При всех вариантах БК ее клинические и лабораторные проявления являются результатом гиперпродукции цитокинов (в первую очередь IL-6), которые тесно контактируют с пролиферирующими кровеносными сосудами и активируют лимфоциты В-клеточной линейной направленности [21, 24].

Выявленная ассоциация между уровнем IL-6 в сыворотке крови и клиническими проявлениями заболеваний вызвала интерес к изучению биохимических механизмов контроля продукции IL-6 с целью поиска функциональных агонистов и антагонистов как потенциальных терапевтических агентов в лечении IL-6-ассоциированных болезней [16, 25, 26].

Наличие системных симптомов и периферической лимфаденопатии, а также частое присутствие крупных одноядерных клеток с множественными ядрышками, напоминающих клетки Рид-Штернберга [1, 3], в мантийной зоне фолликулов пораженных ЛУ позволило специалистам предположить связь БК и вирусной инфекции, в первую очередь вируса Эпштейна–Барр (EBV). Исследования показали, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) EBV может быть обнаружена в ЛУ при БК, однако ее наличие никак не влияет на присутствие клинических симптомов и вариант болезни [27], что является аргументом против возможной роли EBV в развитии БК.

В 1994 г. Y. Chang Y. и соавт. сообщили, что при исследовании участков кожи, пораженных саркомой Капоши, у ВИЧ-положительного больного были обнаружены 2 новых фрагмента вирусной ДНК [28]. Новый вирус получил название ассоциированного с саркомой Капоши герпес-вируса (KSHV) или HHV-8. HHV-8 является новым гамма-герпес-вирусом, членом семейства *Rhadinovirus*. Эпидемиологические исследования ясно показали, что HHV-8-инфекция распространена во всем мире, хотя имеются огромные различия в показателях серопозитивности различных человеческих популяций.

Полная вирусная частица HHV-8 составляет 150–200 нм в диаметре и состоит из капсида и оболочки [29], сходных с иными герпес-вирусами человека (рис. 7). Геном HHV-8 состоит из линейной и двухспиральной ДНК приблизительно 170 kbp в длину [30], которая кодирует более 80 вирусных белков. Как и у других герпес-вирусов, вирусные гены HHV-8 были разделены на литические и латентные гены (рис. 8).

Литические гены кодируют белки с нормальными функциями, и в ходе их литической реактивации происходят активация каскада нижестоящих генов и стимуляция микроокружения для репликации вируса,

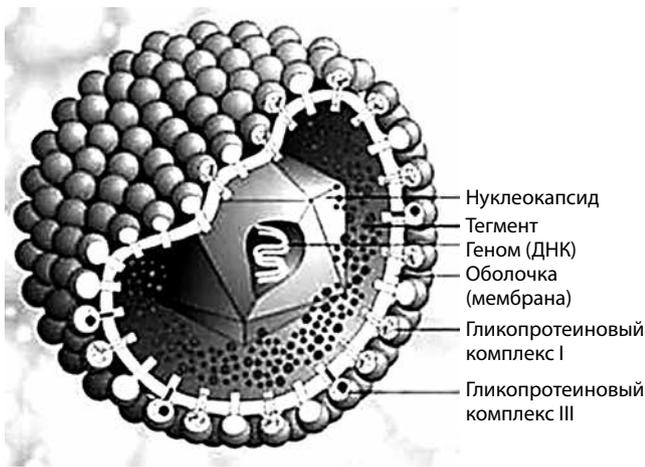


Рис. 7. Геном герпес-вируса человека 8-го типа (Ablashi D. V, Chatlynne L.G, Whitman J. E., Jr., Cesarman E. Spectrum of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus, or Human Herpesvirus 8, Diseases. Clin Microbiol Rev 2002;15(3): 439–64).

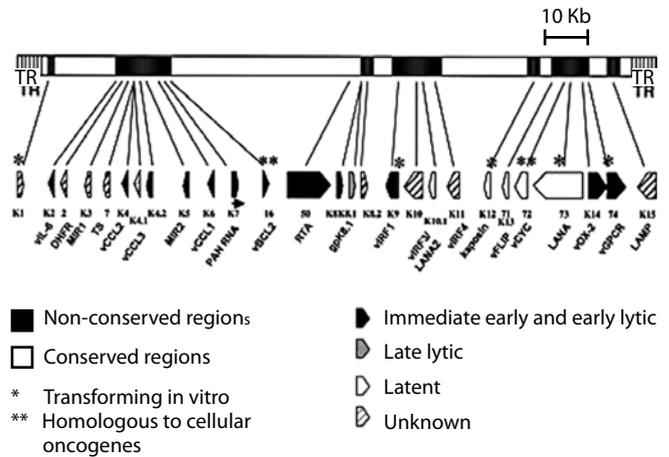


Рис. 8. Возможная модель патогенеза болезни Каптелмана и точки приложения таргетных препаратов (El-Osta H. E., Kurzrock R. Castlemann's Disease: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. Oncologist 2011 Apr; 16(4):497–51) 1

метаболизма нуклеиновых кислот и модуляции клеточных функций [27, 28].

Подробно изучен латентный белок ORF73 (LANA-1, LNA или LNA-1 – латентный ядерный антиген), наиболее часто выявляемый в KSHV-инфицированных клетках при МБК. Белок LANA-1, связываясь с белком p53, препятствует апоптозу клеток, зараженных HHV-8 [31].

HHV-8, как и другие герпес-вирусы, имеет двухфазный жизненный цикл с преобладающим на протяжении всей жизни циклом латентной инфекции и типичным коротким циклом литической реактивации, т. е. вызывает пожизненное латентное носительство. Члены семейства гамма-герпес-вирусов HHV-8 и EBV обладают умением включать клеточную пролиферацию и трансформацию, за что получили название онкогенных вирусов [32].

HHV-8-связанные заболевания – МБК, саркома Капоши и первичная лимфома серозных оболочек (PEL) – могут быть ассоциированы с сетью вирусных цитокинов [33]. Среди вирусных цитокинов, кодируемых HHV-8, K2, или вирусный интерлейкин-6 (vIL-6), – один из наиболее важных белков в патогенезе заболеваний, связанных с KSHV-инфекцией. В частности, считается, что vIL-6 является ключевым в патогенезе саркомы Капоши и МБК [34]. vIL-6 отличается от человеческого IL-6 (hIL-6) тем, что может напрямую связываться с gp130 и активировать JAK-STAT-сигнальный путь, что уникально для vIL-6, в отличие от других цитокинов этой группы. Кроме того, было показано, что vIL-6 стимулирует экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), это ведет к увеличению проницаемости капилляров и скоплению жидкости, что бывает при PEL, а также к повышенному неоангиогенезу и росту эндотелиальных клеток, что характерно для МБК [35, 36].

При БК vIL-6 продуцируется трансформированными лимфоцитами мантийной зоны, латентно инфици-

цированными HHV-8 [9]. Исследование D.M. Menke и др. показало, что при ГВВ и ПКВ имеются различия в возможности обнаружить ген HHV-8 vIL-6 и геном HHV-8 и в частоте экспрессии HHV-8 vIL-6 и генома HHV-8. Было выявлено, что экспрессия гена HHV-8 vIL-6 чаще, чем выявление генома HHV-8, ассоциировалось с риском развития лимфомы и низкой выживаемостью при ПКВ. Авторы показали, что HHV-8 может инфицировать иммунофенотипически характерные популяции В-лимфоцитов мантийной зоны (CD20⁺, CD45RA⁺), которые играют важную роль в патогенезе БК [37]. HHV-8-vIL-6-положительные трансформированные лимфоциты (плазмобласты) мантийной зоны при плазмоклеточном варианте болезни могут вызывать развитие интерфолликулярной плазмобластной лимфомы как у ВИЧ-отрицательных, так и у ВИЧ-положительных пациентов [37].

Таким образом, патогенез БК – сложный многоэтапный процесс. Многие авторы считают, что основным патогенным цитокином при БК является IL-6, и первичным его источником в ЛУ служат ФДК, продуцирующие IL-6 при ПКВ, что в случаях ГВВ сопровождается системными симптомами. И именно hIL-6, а не HHV-8-vIL-6 является главным цитокином, экспрессирующимся у ВИЧ-отрицательных пациентов [24]. И выработка hIL-6, а не HHV-8-vIL-6 обуславливает наличие системных симптомов болезни, включая РОEMS-синдром, как при HHV-8-отрицательной, так и при HHV-8-положительной БК, поскольку системные симптомы (в том числе синдром РОEMS) исчезают после анти-hIL-6 терапии [38].

Клиническая картина различных вариантов болезни Кастлемана

Гиалино-васкулярный локальный вариант встречается в 70 % случаев, одинаково часто поражаются мужчины и женщины, средний возраст заболевших составляет 40 лет. Однако в работе N. Talat было показано, что при данном варианте женщины страдают чаще [14]. В патологический процесс, как правило, вовлекается 1 или цепочка расположенных рядом ЛУ. Пораженные ЛУ увеличены, размером от 1 до 25 см, в среднем 6–7 см. Первоначально считали, что наиболее часто при данном варианте болезни поражаются ЛУ средостения, однако в последующих исследованиях было показано, что поражение шейных, подмышечных и забрюшинных ЛУ встречается так же часто. Значительно реже при ГВВ поражаются абдоминальные и ЛУ малого таза [2, 3, 7, 9–12, 14]. Большинство случаев ГВВ не сопровождается клиническими проявлениями, однако в 10 % могут присутствовать конституциональные симптомы (лихорадка, потливость, похудение, кожный зуд) и изменения в лабораторных анализах (анемия, тромбоцитоз, увеличение СОЭ и повышение уровня СРБ) [3]. Как правило, пациенты самостоятельно обнаруживают у себя увеличенные периферические ЛУ, но в связи с отсутствием жалоб за

медицинской помощью они обращаются лишь при их значительном увеличении. Выявление опухолевой массы в средостении или забрюшинном пространстве при отсутствии симптомов сдавления окружающих тканей (кашель, одышка, боли) чаще всего происходит случайно при прохождении профилактических осмотров. По данным магнитно-резонансной (МРТ) или компьютерной томографии (КТ) опухолевая масса обычно выявляется в виде солидного образования, с четкими, достаточно ровными контурами, интенсивно и гомогенно накапливающего контрастное вещество, как в артериальную, так и в венозную фазу [39]. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) при БК неинформативна, так как не позволяет провести полную дифференциальную диагностику для исключения злокачественного образования [40]. Диагноз ГВВ БК может быть установлен на основании классической гистологической картины в пораженном ЛУ, полученном путем эксцизионной биопсии. Выполнение тонкоигольной биопсии ЛУ в этих случаях не оправдано, так как получение «столбика» неизмененных клеток может привести к неудаче в постановке диагноза (это применимо и к остальным вариантам БК). Считают, что в патогенезе ГВВ основную роль играет активация пролиферации ФДК, ведущая к их дисплазии [41]. Уровень дисплазии ФДК коррелирует с экспрессией рецептора эпидермального фактора роста (EGF). Увеличение экспрессии EGF в перифолликулярных фибробластах стимулирует трансформацию ФДК, а увеличение экспрессии VEGF способствует выраженной васкулярной пролиферации, характерной для данного варианта БК. В редких случаях чрезмерная дисплазия ФДК может привести к трансформации ФДК и развитию опухолей из ФДК [41]. Радикальное хирургическое удаление новообразования приводит к излечению [7].

Плазмоклеточный локальный вариант встречается в 10–20 % случаев БК, характеризуется поражением цепочки ЛУ, хотя встречается и изолированное поражение единственного ЛУ [3]. Наиболее часто поражаются ЛУ брюшной полости, но могут вовлекаться ЛУ и других локализаций: периферические, забрюшинного пространства, средостения и малого таза [6, 7]. Заболевают пациенты среднего возраста независимо от пола. Однако в отличие от ГВВ при ПКВ у большинства больных присутствуют системные симптомы (потливость, субфебрилитет, слабость) и имеются изменения лабораторных данных. В 80–90 % случаев встречаются увеличение СОЭ и анемия. Выявляемые при КТ и МРТ изменения схожи с таковыми при ГВВ [39, 40]. Окончательный диагноз ПКВ устанавливается на основании клинических симптомов и наличия соответствующей морфологической и ИГХ-картины в удаленном ЛУ. Лечение этого варианта также хирургическое, в неоперабельных случаях возможно применение до- или послеоперационной лучевой терапии [7].

МБК – редкий вариант БК, встречающийся в старшей возрастной группе (медиана возраста составляет

50–60 лет), характеризующийся большим разнообразием клинических проявлений и в большинстве случаев неблагоприятным прогнозом. Первоначально считали, что этим вариантом болезни чаще страдают женщины, однако дальнейшие исследования не выявили доминантности в соотношении полов заболевших [42]. Данный вариант болезни характеризуется наличием выраженных конституциональных симптомов: лихорадки в 100 % случаев, в 50 % – похудения; часто имеются болевой синдром, кожный зуд, одышка, диспептические расстройства. МБК сопровождается периферической лимфаденопатией и органомегалией: гепатомегалия всегда сочетается со спленомегалией и встречается в 63 % случаев, изолированная спленомегалия отмечается у 33–79 % больных [7, 42]. Изменения лабораторных показателей при МБК более выражены и разнообразнее, чем при локальных вариантах: анемия, тромбоцитоз, тромбоцитопения, лейкоцитоз, увеличение СОЭ, концентрации СРБ, поликлональная гипергаммаглобулинемия (более 90 % случаев), увеличение количества ЦИК, гиперпротеинемия, гипоальбуминемия, билирубинемия и увеличение уровня трансаминаз (аспартатаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза) в сыворотке крови – у 1/3 пациентов [7, 43]. Не отмечено характерных рентгенологических особенностей при МБК. Выявляемые при КТ, МРТ, ПЭТ и скинтиграфии изменения неспецифичны и могут встречаться при ряде других заболеваний – онкогематологических, аутоиммунных [39, 40]. Клиническое течение данного варианта заболевания различно: от агрессивного до вялотекущего, с периодами относительного благополучия и эпизодами обострений. МБК может осложняться развитием анасарки (асцит, плеврит, перикардит), аутоиммунной гемолитической анемии и иммунной тромбоцитопении [7].

HHV-8-положительная (плазмобластная) БК – крайне редкий вариант, у ВИЧ-отрицательных пациентов описаны единичные случаи, тогда как у ВИЧ-положительных обнаруживается почти в 100 % случаев, т. е. встречается у иммунокомпрометированных людей. Клиническое течение сходно с таковым при МБК, однако, имеет быстро прогрессирующий характер, без периодов стабилизации [7, 43]. Диагноз устанавливается по морфологической картине биопсированного ЛУ, для которой характерно присутствие в межфолликулярной зоне плазмобластов, инфицированных HHV-8 (как правило, они содержат LANA-1 HHV-8 и экспрессируют цитоплазматические IgM и λ -рестриктированные легкие цепи). Первоначально IgM λ -рестриктированные плазмобласты монотипичны, но поликлональны, однако при трансформации болезни они могут формировать скопления и приводить к моноклональным пролиферациям, в первую очередь к HHV-8-положительной плазмобластной лимфоме с неблагоприятным прогнозом [3, 4, 7]. Также HHV-8-положительный вариант БК в 84 % случаев сочетается с РОEMS-синдромом, и вероятность инфицирования HHV-8 у боль-

ных с МБК и РОEMS-синдромом в 5 раз выше, чем у пациентов с РОEMS-синдромом без БК [44]. Высокая агрессивность данного варианта заболевания требует проведения цитостатической терапии с применением противовирусных препаратов или без него.

Существует ряд ассоциированных с БК состояний, часть из которых является результатом иммунного конфликта самого заболевания, а другие – признаками наличия 2-й болезни, требующей дополнительной диагностики и лечения. БК может сочетаться с амилоидозом [45], системными аутоиммунными заболеваниями, множественной миеломой, болезнью Ходжкина (описаны единичные случаи) и неходжкинскими лимфомами (данная связь встречается чаще у ВИЧ-положительных больных с вероятностью от 23 до 37 %) [46], РОEMS-синдромом (в 11–24 % случаев) [47], заболеваниями кожных покровов (пемфигус), саркомой Капоши (в 13 %) [48] и ВИЧ-инфекцией [49]. Развитие ВИЧ-положительной МБК возможно при любом уровне CD4-клеток. До настоящего времени не разработаны стандартные варианты терапии, применяются различные схемы моно- и полихимиотерапии (ПХТ) в сочетании с противовирусной терапией (высокоактивная антиретровирусная терапия) или без нее. Прогноз у таких пациентов неблагоприятный, средняя продолжительность жизни в одном из крупных исследований составила 14 мес [49].

Дифференциальный диагноз МБК труден, так как помимо обязательной эксцизионной биопсии ЛУ необходимо исключение всего спектра сопутствующей патологии. Выполнение хирургического удаления ЛУ в данном случае не приводит к излечению, и этот вариант БК требует проведения специфической цитостатической терапии.

Терапия болезни Капслемана

Первоначально терапия БК включала хирургические методы, циторедуктивное и лучевое воздействия, лечение по протоколам лимфопролиферативных заболеваний. Постепенное изучение патогенеза заболевания и выявление новых вирусных агентов позволило исследователям применять при различных вариантах БК более направленную терапию. Существует множество методов лечения БК: стероиды, химиотерапия, комбинированная химиотерапия, противовирусные препараты, интерферон α , антитело к IL-6 (силтуксимаб), антитело к рецептору IL-6 (тоцилизумаб) и моноклональное антитело к CD20 (ритуксимаб). Однако рекомендации по лечению БК давать довольно сложно, так как нет стандартной терапии, а в литературе описаны только единичные истории болезни или небольшие последовательности случаев.

Терапия локальных вариантов БК, как ГВВ, так и ПКВ, включает радикальное хирургическое удаление пораженных ЛУ. Исследования таких случаев показали высокую эффективность удаления опухолевого образования – отсутствие рецидивов при ГВВ

и редкую их частоту при ПКВ [2, 3]. Описаны случаи успешного применения лучевой терапии в качестве предоперационной подготовки при больших размерах пораженных ЛУ (средостение или забрюшинное пространство), с целью уменьшения размера и/или постоперационного лечения при частичном удалении опухоли. Возможно использование лучевой терапии в сочетании с глюкокортикостероидами и/или ПХТ в неоперабельных случаях [50, 51].

Терапия МБК сложна, так как хирургическое удаление одного или нескольких ЛУ (спленэктомия) не показали значимого или длительного улучшения состояния. Применение лучевой терапии в качестве единственного метода лечения при МБК не показано из-за низкой эффективности [50, 51]. Использование различных курсов ПХТ, иммуномодулирующей терапии, противовирусной и эпигенетической терапии показало разную эффективность. Исследования эффективности противоопухолевых агентов проводили на небольших группах пациентов, поэтому информация об ответе, его продолжительности и побочных эффектах неоднородна и затрудняет интерпретацию данного лечения [51].

В качестве монотерапии для лечения пациентов с МБК применяли хлорамбуцил, кортикостероидные гормоны, циклофосфамид, 2-хлордезоксиаденозин, кармустин, винкристин, блеомицин, этопозид, доксорубин. Применение в качестве монотерапии глюкокортикостероидов не оправдано, так как они лишь приводят к кратковременному улучшению общего самочувствия, а их длительный прием сопровождается увеличением риска бактериальной инфекции и другими осложнениями (остеопороз и т. д.) [51].

Первое время для лечения МБК применяли комбинации и курсы ПХТ, используемые для лечения неходжкинской лимфомы, с достижением полных и частичных ремиссий. Наиболее распространенные курсы, описанные в литературе, — СНОР (циклофосфан, преднизолон, винкристин, доксорубин) и CVAD (циклофосфан, дексаметазон, винбластин, адриамицин). В 2 исследованиях была показана 67 % эффективность курса CVAD и 50 % курса СНОР в достижении ремиссии, длящейся от 1 года до 10 лет [51]. Применяли и другие комбинации химиопрепаратов: хлорамбуцил + преднизолон, циклофосфамид + преднизолон, циклофосфамид + прокарбазин, CVP (циклофосфамид, винкристин, преднизолон), ABVD (адриамицин, блеомицин, винбластин, дакарбазин), высокие дозы мелфалана с последующей аутологичной трансплантацией стволовых клеток. Из-за редкости заболевания и небольшого числа единообразно пролеченных больных нельзя с уверенностью сказать, какой из предложенных курсов ПХТ наиболее эффективен [51, 52].

Изучение патогенеза заболевания позволило работать и начать применять при лечении МБК различные эпигенетические агенты [25, 26].

Иммуномодуляторы. Значительный клинический эффект был достигнут в ряде случаев МБК при лече-

нии препаратами интерферона α (реаферон, интрон, роферон и т. п.), обладающими иммунорегулирующим и противовирусным свойствами. Первоначально интерферон α применяли у ВИЧ-инфицированных пациентов [53], однако в дальнейшем были описаны случаи и успешного лечения ННВ-8-положительных больных, а также пациентов с МБК без доказанного инфицирования ННВ-8. Интересно, что в большинстве случаев интерферон α хорошо переносится и может вызывать долгосрочную полную ремиссию [53]. Точный механизм лечебного воздействия интерферона α неизвестен, но, вероятнее всего, он блокирует механизм активации рецептора ИЛ-6, подавляет репликацию ННВ-8 и регулирует экспрессию человеческого лейкоцитарного антигена класса 1 на инфицированных ННВ-8 вирусом клетках, что ведет к усилению клеточного разрушения.

Полностью трансретининовая кислота (АТРА) имеет антипролиферативные свойства и может блокировать в клетке ИЛ-6-зависимые сигнальные пути [54]. Возможно, эти свойства АТРА могут быть использованы при лечении МБК, в качестве монотерапии и в сочетании с другими цитостатическими агентами. В настоящее время в литературе описан 1 случай успешного применения АТРА в лечении МБК у пациентки с ВИЧ и ННВ-8-инфекциями [54].

Талидомид как иммуномодулирующий препарат используется в настоящее время для лечения плазмочелочных заболеваний, таких как множественная миелома, в патогенезе которых гиперпродукция ИЛ-6 играет ключевую роль. Небольшие исследования применения талидомида у пациентов с МБК, как ВИЧ-положительных, так и ВИЧ-отрицательных, с или без ННВ-8, показали его высокую эффективность. Она может быть обусловлена избирательным снижением уровня экспрессии ИЛ-6, фактора некроза опухоли и нарушением выработки ИЛ-6 [55].

Моноклональные антитела. Анти-CD20-моноклональное антитело (ритуксимаб) — химерное моноклональное антитело, обладающее избирательной активностью в отношении CD20⁺-В-лимфоцитов, действующее путем активации комплементзависимого цитотоксического пути и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Изучение биоптатов ЛУ пациентов с БК показало, что плазматические клетки в мантийной зоне некоторых пациентов с мультицентрическим вариантом болезни экспрессируют поверхностный маркер CD20 [5]. Впервые ритуксимаб был использован в лечении ВИЧ- и ННВ-8-положительных пациентов с МБК. В настоящее время терапия ритуксимабом эффективна как у ВИЧ-отрицательных, так и у ВИЧ-положительных пациентов. В исследовании L. Gérard и соавт. 24 пациентам с ВИЧ-инфекцией ритуксимаб назначали в стандартной дозе 375 мг/кв² поверхности тела, внутривенно капельно 1 раз в неделю в течение 4 нед. Через 2 мес в 92 % случаев была достигнута устойчивая ремиссия, которая сохранялась

в 71 % случаев в течение года. Из побочных эффектов данной терапии отмечались незначительные инфекции и умеренное обострение кожных поражений у пациентов с саркомой Капоши [56]. Еще 1 исследование эффективности ритуксимаба со схожей методикой включало 21 больного с плазмобластным вариантом МБК и ВИЧ-инфекцией. В 67 % случаев был получен частичный ответ, в 29 % – стабилизация заболевания. Причем общая 2-летняя выживаемость составила 95 %, а выживаемость без прогрессирования – 92 и 79 % через 1 и 2 года соответственно. При этом в крови отмечалось снижение вирусной нагрузки ННВ-8, а также уровней IL-6 и IL-10. Однако у 4 из 11 пациентов с саркомой Капоши отмечалось прогрессирование кожных поражений [57]. Поэтому ряд специалистов не рекомендует применять ритуксимаб у пациентов с активными кожными поражениями при сопутствующей саркоме Капоши.

Таким образом, ритуксимаб может использоваться в лечении БК как в качестве монотерапии, так и в сочетании с другими химиотерапевтическими агентами [56, 57], а также применяться для купирования аутоиммунных осложнений [58] или РОEMS-синдрома.

Анти-IL-6-моноклональные антитела. Учитывая важную роль IL-6 в патогенезе БК, предположили о возможной эффективности в качестве лекарственного средства анти-IL-6-моноклональных антител. Первое исследование было проведено J. T. Beck и его коллегами [59], которые сообщили об успешном применении мышинового анти-IL-6-моноклонального антитела VE-8 у пациента с МБК и повышенным уровнем IL-6 в сыворотке крови. Успех заключался в быстром регрессе клинических и лабораторных проявлений. Однако на 84-й день терапии лечение было остановлено в связи с рецидивом заболевания, который, вероятно, был связан с коротким периодом полувыведения мышинового моноклонального антитела и его нейтрализацией человеческими антимышиными антителами. Для преодоления этого было разработано химерное моноклональное антитело с большим периодом полураспада и меньшей степенью иммуногенности – силтуксимаб. Промежуточные результаты I фазы исследования применения силтуксимаба у ВИЧ- и ННВ-8-отрицательных пациентов в дозе 12 мг/кг массы тела 1 раз в неделю были опубликованы F. Van Rhee [25]. Терапия хорошо переносилась, не было выраженной токсичности, и в 78 % случаев был достигнут положительный клинический эффект, а в 52 % – противоопухолевый. Однако данный препарат не рекомендован к применению у ННВ-8-положительных больных. Несмотря на эффективность, терапия анти-IL-6-моноклональным антителом не приводит к достижению длительной ремиссии, в большинстве случаев ее прекращение сочетается с возвратом болезни.

Первым препаратом в группе **моноклональных антител к рецептору IL-6** стал атлизумаб – частично мышиноое, частично человеческое моноклональное ан-

титело. Терапия семи ВИЧ- и ННВ-8-отрицательных пациентов путем внутривенного введения лекарства в течение 1 или 2 нед привела к исчезновению симптомов и нормализации лабораторных данных более чем на 2 мес. Однако прерывание лечения привело к быстрому рецидиву, а повторное введение препарата оказалось неэффективным [60]. Следующим препаратом в группе гуманизированных моноклональных антител к рецептору IL-6 стал тоцилизумаб. Исследование N. Nishimoto по использованию тоцилизумаба в дозе 8 мг/кг/массы тела 1 раз в 2 нед внутривенно капельно у 28 ВИЧ-отрицательных пациентов с МБК показало исчезновение конституциональных симптомов, нормализацию лабораторных показателей и уменьшение лимфаденопатии. В связи с хорошей переносимостью и отсутствием выраженных побочных эффектов 27 пациентов продолжали получать лечение более 3 лет [26]. Дальнейшие исследования тоцилизумаба подтвердили его эффективность в отношении пациентов с МБК (ВИЧ- и ННВ-8-отрицательной) за счет уменьшения в сыворотке крови количества IL-6 и свободного рецептора к IL-6, а также снижения выработки эндогенного IL-6 вследствие блокады IL-6R [26].

Ингибиторы протеасом. Бортезомиб (велкейд), был зарегистрирован в 2003 г. как препарат выбора в терапии множественной миеломы. Применение велкейда у пациентов с БК привело к снижению уровня IL-6 в сыворотке крови и, как следствие, к положительному клиническому ответу на лечение. Опыт использования бортезомиба в виде моно- или ПХТ при БК недостаточен, в литературе встречаются описания единичных случаев [61].

Рекомбинантный антагонист рецептора IL-1 – анакинра, зарегистрированный в США как препарат выбора при лечении ревматоидного артрита, также эффективен в отношении других IL-6-связанных заболеваний – болезни Стилла, системного ювенильного ревматоидного артрита. Считают, что IL-1 активирует NF-κB-путь при связывании с рецептором к IL-1, что приводит к увеличению синтеза провоспалительных белков, участвующих в патогенезе БК, особенно IL-6. Введение рекомбинантного антагониста рецептора к IL-1 приводит к уменьшению выработки IL-6. Анакинра была успешно применена в лечении 13-летнего мальчика с рефрактерной МБК [62] и 62-летнего мужчины [63].

Антивирусные препараты. Высокая степень литической репликации ННВ-8 при МБК может теоретически обеспечить высокую чувствительность инфицированных В-лимфоцитов к противовирусным агентам. В исследованиях *in vitro* ганцикловир, фоскарнет и цидофовир оказались единственными препаратами, обладающими активностью против ННВ-8. Однако результаты применения данных препаратов у больных с МБК и ВИЧ-инфекцией оказались неоднозначными [64, 65]. Возможно, исследования *in vitro* не полностью отражают степень противовирусного эффекта, поэто-

му необходимы расширенные клинические испытания для определения лекарства, обладающего максимальным воздействием на HHV-8.

Предложения по выбору терапии БК носят общий характер и предлагают врачу опираться на свой опыт. Так, для ВИЧ-отрицательных пациентов возможно длительное инициирующее лечение моноклональным антителом к рецептору IL-6 до получения полного клинического ответа. В случае отсутствия эффекта целесообразно применение моно- или ПХТ в комплексе с ритуксимабом или без него. В рефрактерных случаях могут быть использованы любые другие препараты, показавшие эффективность по данным литературы, или аутологичная трансплантация стволовых клеток [33, 46].

Заключение

БК является редким лимфопролиферативным заболеванием неизвестной этиологии, которая должна быть включена в дифференциальный диагноз при неопухолевых и опухолевых лимфаденопатиях. БК следует классифицировать на 3 клинико-морфологических варианта: локальный гиалино-вазкулярный, локальный плазмоклеточный и МБК. Дифференциальная диагностика последнего варианта требует обязательного исследования на инфицированность HHV-8 и ВИЧ, а также исключения всех сопутствующих заболеваний, поскольку БК может сопровождаться развитием лимфомы Ходжкина и неходжкинских лимфом, саркомы Капоши, опухоли из ФДК, амилоидоза, что имеет важное прогностическое и терапевтическое значение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Castleman B., Thowne V.W. Case records of the Massachusetts General Hospital Weekly Clinicopathological Exercises: Case 40011. *New Engl J Med.* 1954;250:26–30. DOI: 10.1056/NEJM195401072500107; PMID: 13111435.
2. Castleman B., Iverson L., Menendez V.P. Localized mediastinal lymphnode hyperplasia resembling thymoma. *Cancer* 1956;9(4):822–30. DOI: 10.1002/1097-0142(195607/08)9:4; PMID: 13356266.
3. Keller A.R., Hochholzer L., Castleman B. Hyaline-vascular and plasma cell types of giant lymph node hyperplasia of the mediastinum and other locations. *Cancer* 1972;29(3):670–83. DOI: 10.1002/1097-0142(197203)29:3; PMID: 4551306.
4. Ioachim H.L. Castleman's disease. In: Ioachim H.L., Howard R. *Ioachims lymph node pathology.* JB Lippincott Co, 2006.
5. Menke D.M., Tiemann M., Camoriano J.K. et al. Diagnosis of Castleman's disease by identification of an immunophenotypically aberrant population of mantle zone B lymphocytes in paraffin-embedded lymph node biopsies. *Am J Clin Pathol* 1996;105(3):268–76. DOI: 10.1093/ajcp/105.3.268; PMID: 8602606.
6. Frizzera G. Castleman's disease and related disorders. *Semin Diagn Pathol* 1988;5(4):346–64. PMID: 2464187.
7. Меликян А.Л., Егорова Е.К., Ковригина А.М. и др. Клинико-морфологические особенности различных вариантов болезни Кастлемана. *Терапевтический архив* 2015;87(7):64–71 [Melikyan A.L., Egorova E.K., Kovrigina A.M. et al. Clinical and morphological features of different types of Castleman's disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archives*, 2015;87(7): 64–71. (In Russ.)]. DOI:10.17116/terarkh201587764-71; PMID: 26390727.
8. Dupin N., Diss T.L., Kellam P. et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 2000;95(4):1406–12. PMID: 10666218.
9. Casper C. The aetiology and management of Castleman disease at 50 years: translating pathophysiology to patient care. *Br J Haematol* 2005;129(1):3–17. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05311.x; PMID: 15801951.
10. Kim J.E., Kim J.C., Park I.A. et al. Clinicopathologic study of Castleman's disease in Korea. *J Korean Med Sci* 2000;15(4):393–8. DOI: 10.3346/jkms.2000.15.4.393; PMID: 10983686.
11. Saeed-Abdul-Rahman I., Al-Amri A.M. Castleman disease. *Korean J Hematol* 2012;47(3):163–177. DOI: 10.5045/kjh.2012.47.3.163; PMID: 23071471.
12. Cronin D.M., Warnke R.A. Castleman disease: an update on classification and the spectrum of associated lesions. *Adv Anat Pathol* 2009;16(4):236–246. DOI: 10.1097/PAP.0b013e3181a9d4d3; PMID: 19546611.
13. El-Osta H.E., Kurzrock R. Castleman's disease: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Oncologist* 2011;16(4):497–511. DOI: 10.1634/theoncologist.2010-0212; PMID: 21441298.
14. Talat N., Schulte K.M. Castleman's disease: systematic analysis of 416 patients from the literature. *Oncologist* 2011;16(9):1316–24. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0075; PMID: 21765191.
15. Soulier J., Grollet L., Oksenhendler E. et al. Molecular analysis of clonality in Castleman's disease. *Blood* 1995;86(3):1131–8. PMID: 7620166.
16. Akira S., Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1–78. PMID: 8379461.
17. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22(5):347–52. DOI: 10.1093/intimm/dxq030; PMID: 20410258.
18. Skiniotis G., Boulanger M.J., Garcia K.C. et al. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12(6):545–51. DOI: 10.1038/nsmb941; PMID: 15895091.
19. Bataille R., Jourdan M., Zhang X.G. et al. IL-6 is a potent growth factor for plasma cells and is elevated in overt myeloma and plasma cell leukemia. *J Clin Invest* 1989;84:2008–2011. DOI: 10.1172/JCI114392; PMID: 2592570.
20. O'Shea J.J., Murray P.J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008;28(4):477–87. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.03.002; PMID: 18400190.
21. Yoshizaki K., Matsuda T., Nishimoto N. et al. Pathogenic significance of interleukin-6(IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 1989;74(4):1360–7. PMID: 2788466.
22. Horii Y., Muraguchi A., Iwano M. et al. Involvement of interleukin-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 1989;143(12):3949–55. PMID: 2592764.
23. Miles S.A., Rezai A.R., Salazar-González J.F. et al. AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(11):4068–72. PMID: 1693429.
24. Leger-Ravet M.B., Peuchmaur M., Devergne O. et al. Interleukin-6 gene expression in Castleman's disease. *Blood* 1991;78(11):2923–30. PMID: 1954381.
25. Van Rhee F., Fayad L., Voorhees P. et al. Siltuximab, a novel anti-interleukin-6 monoclonal antibody, for Castleman's disease. *J Clin Oncol* 2010;28(23):3701–8.

- DOI: 10.1200/JCO.2009.27.2377; PMID: 20625121.
26. Nishimoto N., Terao K., Mima T. et al. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6(IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood* 2008;112(10):3959–64. DOI: 10.1182/blood-2008-05-155846; PMID: 18784373.
27. Corbellino M., Poiriel L., Aubin J.T. et al. The role of human herpesvirus 8 and Epstein – Barr virus in the pathogenesis of giant lymph node hyperplasia(Castleman's disease). *Clin Infect Dis* 1996;22(6):1120–1. DOI: 10.1093/clinids/22.6.1120; PMID: 8783733.
28. Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S. et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266(5192):1865–9. DOI: 10.1126/science.7997879; PMID: 7997879.
29. Orenstein J.M., Alkan S., Blauvelt A. et al. Visualization of human herpesvirus type 8 in Kaposi's sarcoma by light and transmission electron microscopy. *AIDS* 1997;11(5):35–45. PMID: 9108935.
30. Renne R., Lagunoff M., Zhong W. et al. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol* 1996;70(11):8151–4. PMID: 8892944.
31. Hu J., Renne R. Characterization of the minimal replicator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent origin. *J Virol* 2005;79(4):2637–42. DOI: 10.1128/JVI.79.4.2637–2642.2005; PMID: 15681465.
32. Damania B. Oncogenic gamma-herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(8):656–68. DOI: 10.1038/nrmicro958; PMID: 15263900.
33. Du M.Q., Bacon C.M., Isaacson P.G. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 and lymphoproliferative disorders. *J Clin Pathol* 2007;60(12):1350–7. DOI: 10.1136/jcp.2007.047969; PMID: 18042691.
34. Cai Q., Verma S.C., Lu J. et al. Molecular biology of Kaposi's sarcoma herpesvirus and related oncogenesis. *Adv Virus Res* 2010;78:87–142. DOI: 10.1016/B978-0-12-385032-4.00003-3; PMID: 21040832.
35. Sakakibara S., Tosato G. Viral interleukin-6: role in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-associated malignancies. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31(11):791–801. DOI: 10.1089/jir.2011.0043; PMID: 21767154.
36. Foss H.D., Araujo I., Demel G. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol* 1997;183(1):44–50. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199709)183:1; PMID: 9370946.
37. Menke D.M., Chadburn A., Cesarman E. et al. Analysis of the human herpesvirus 8 (HHV-8) genome and HHV-8 vIL-6 expression in archival cases of castleman disease at low risk for HIV infection. *Am J Clin Pathol* 2002;117(2):268–75. DOI: 10.1309/7243-AV50-KJ28-V6J9; PMID: 11863223.
38. Foussat A., Fior R., Girard T. et al. Involvement of human interleukin-6 in systemic manifestations of human herpesvirus type 8 – associated multicentric Castleman's disease. *AIDS* 1999;13(1):150–2. PMID: 10207568.
39. Ko S.F., Hsieh M.J., Ng S.H. et al. Imaging spectrum of Castleman's disease. *AJR Am J Roentgenol.* 2004;182(3):769–75. PMID: 14975984.
40. Reddy M.P., Graham M.M. FDG positron emission tomographic imaging of thoracic Castleman's disease. *Clin Nucl Med* 2003;28(4):325–6. PMID: 12642717.
41. Меликян А.Л., Егорова Е.К., Карагулян С.Р. и др. Развитие опухоли из фолликулярных дендритных клеток при гиалино-васкулярном варианте болезни Кастлемана. *Терапевтический архив* 2009;7:75–77. [Melikyan A.L., Egorova E.K., Karagulyan S.R. et al. The development of follicular dendritic cells tumors in hyaline-vascular type of Castleman's disease. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archives* 2009;7:75–77 (In Russ.)].
42. Peterson B.A., Frizzera, G. Multicentric Castleman's disease. *Semin Oncol* 1993;20(6):636–47. PMID: 8296200.
43. Suda T., Katano H., Delsol G. et al. HHV-8 infection status of AIDS-unrelated and AIDS-associated multicentric Castleman's disease. *Pathol Int* 2001;51(9):671–9. DOI: 10.1046/j.1440-1827.2001.01266.x; PMID: 11696169.
44. Belec L., Mohamed A.S., Authier F.J. et al. Human herpesvirus 8 infection in patients with POEMS syndrome-associated multicentric Castleman's disease. *Blood* 1999;93(11):3643–53. PMID: 10339470.
45. Verbrugge W., Maes B.D., Knockaert D.C. Localised plasma-cell type Castleman's disease and AA-amyloidosis cured by resection. A case report and review of the literature. *Acta Clin Belg* 2005;60(1):22–7. DOI: 10.1179/acb.2005.006; PMID: 15981701.
46. Haque S., van Kirk R. Three patients with both Hodgkin's lymphoma and Castleman's disease: Clinicopathologic correlations and lack of association with HHV-8. *Indian J Med Paediatr Oncol* 2009;30(2):76–9. DOI: 10.4103/0971-5851.60052; PMID: 20596307.
47. Dispenzieri A. POEMS syndrome. *Blood* 2007;21(6):285–99. DOI: 10.1016/j.blre.2007.07.004; PMID: 17850941.
48. Kaplan L.D. Human herpesvirus-8: Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease, and primary effusion lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:103–8. DOI: 10.1182/asheducation-2013.1.103; PMID: 24319170.
49. Oksenhendler E., Duarte M., Soulier J. et al. Multicentric Castleman's disease in HIV infection: a clinical and pathological study of 20 patients. *AIDS* 1996;10(1):61–7. PMID: 8924253.
50. Miranda F.A., Faria V.H., Arruda G.V. et al. Radiation therapy in the treatment of unicentric Castleman's disease. *J Bras Pneumol* 2013;39(1):116–8. DOI: 10.1590/S1806-37132013000100019; PMID: 23503497.
51. Chronowski G.M., Ha C.S., Wilder R.B. et al. Treatment of unicentric and multicentric Castleman disease and the role of radiotherapy. *Cancer* 2001;92(3):670–6. PMID: 11505414.
52. Ogita M., Hoshino J., Sogawa Y. et al. Multicentric Castleman disease with secondary AA renal amyloidosis, nephrotic syndrome and chronic renal failure, remission after high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation. *Clin Nephrol* 2007;68(3):171–6. PMID: 17915620.
53. Nord J.A., Karter D. Low dose interferon-alpha therapy for HIV-associated multicentric Castleman's disease. *Int J STD AIDS* 2003;14(1):61–2. PMID: 12590797.
54. Rieu P., Droz D., Gessain A., Grünfeld J.P., Hermine O. Retinoic acid for treatment of multicentric Castleman's disease. *Lancet* 1999;354(9186):1262–3. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)03957-4; PMID: 10520638.
55. Lee F.C., Merchant S.H. Alleviation of systemic manifestations of multicentric Castleman's disease by thalidomide. *Am J Hematol* 2003;73(1):48–53. DOI: 10.1002/ajh.10310; PMID: 12701121.
56. Gérard L., Bérezné A., Galicier L. et al. Prospective study of rituximab in chemotherapy-dependent human immunodeficiency virus associated multicentric Castleman's disease: ANRS 117 Castleman B Trial. *J Clin Oncol* 2007;25(22):3350–3356. DOI: 10.1200/JCO.2007.10.6732; PMID: 17664482.
57. Bower M., Powles T., Williams S. et al. Brief communication: Rituximab in HIV-associated multicentric Castleman disease. *Ann Intern Med* 2007;47(12): 836–9. DOI: 10.7326/0003-4819-147-12-200712180-00003; PMID: 18087054.
58. Ocio E.M., Sanchez-Guijo F.M., Diez-Campelo M. et al. Efficacy of rituximab in an aggressive form of multicentric Castleman disease associated with immune phenomena. *Am J Hematol* 2005;78(4):302–5. DOI: 10.1002/ajh.20283; PMID: 15795923.
59. Beck J.T., Hsu S.M., Wijdenes J. et al. Brief report: Alleviation of systemic manifestations of Castleman's disease by monoclonal anti-interleukin-6 antibody. *N Engl J Med* 1994;330:602–605. DOI: 10.1056/NEJM199403033300904; PMID: 8302342.
60. Nishimoto N., Kanakura Y., Aozasa K., et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 2005;106(8):2627–32. DOI:

10.1182/blood-2004-12-460; PMID: 15998837.

61. Sobas M.A., Alonso Vence N., Dias Arias J. et al. Efficacy of bortezomib in refractory form of multicentric Castleman disease associated to POEMS syndrome(MCD-POEMS variant). *Ann Hematol* 2010;89(2):217–9. DOI: 10.1007/s00277-009-0795-6; PMID: 19636554.
62. Galeotti C., Tran T.A., Franchi-Abella S. et al. IL-1 RA Agonist(anakinra)

in the treatment of multifocal Castleman disease: Case report. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:920–924. DOI: 10.1097/MPH. 0b013e31818ab31f; PMID: 19131781.

63. El-Osta H., Janku F., Kurzrock R. Successful treatment of Castleman’s disease with interleukin-1 receptor antagonist (anakinra). *Mol Cancer Ther* 2010;9:1485–1488. DOI: 10.1158/1535–7163.MCT-10-0156; PMID: 20501803.

64. Casper C., Nichols W.G., Huang M. L. et al. Remission of HHV-8 and HIV-associated multicentric Castleman disease with ganciclovir treatment. *Blood* 2004;103(5):1632–1634. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1721; PMID: 14615380.
65. Berezne A., Agbalika F., Oksenhendler E. Failure of cidofovir in HIV-associated multicentric Castleman disease. *Blood* 2004;103(11):4368–4369. DOI: 10.1182/blood-2004-01-0158; PMID: 15155471.

Смена линейной дифференцировки в рецидиве острого лейкоза с перестройкой гена *MLL* (*KMT2A*). Обзор литературы и описание случаев

Е.А. Зеркаленкова¹, О.И. Илларионова¹, А.Н. Казакова¹, Н.И. Пономарева², Л.В. Байдун²,
Е.Ю. Осипова¹, М.Э. Дубровина¹, А.М. Попов¹, Т.В. Конохова¹, С.А. Плясунова¹,
Н.В. Мякова¹, А.А. Масчан¹, Ю.В. Ольшанская¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

² ФГБУ «Российская детская клиническая больница Минздрава России»; Россия, 119571, Москва, Ленинградский проспект, 117

Контакты: Елена Александровна Зеркаленкова ezerkalenkova@gmail.com

Смена линейной дифференцировки — редкое явление, при котором в рецидиве острого лейкоза наблюдается переход из лимфоидного фенотипа в миелоидный или наоборот. В настоящей работе представлены описания 4 клинических случаев острого лимфобластного лейкоза с перестройкой гена *MLL* (*KMT2A*), в рецидиве заболевания продемонстрировавших миелоидный фенотип.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, переключение фенотипа, перестройка гена *KMT2A*, иммунофенотип

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-21-29

Lineage switch in relapse of acute leukemia with rearrangement of *MLL* gene (*KMT2A*). literature review and case reports

E.A. Zerkalenkova¹, O.I. Illarionova¹, A.N. Kazakova¹, N.I. Ponomareva², L.V. Baydun², E. Yu. Osipova¹, M.E. Dubrovina¹,
A.M. Popov¹, T.V. Konyukhova¹, S.A. Plyasunova¹, N.V. Myakova¹, A.A. Maschan¹, Yu.V. Olshanskaya¹

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, 117997 Moscow, Samory Mashela str., 1;

²Russian Children Clinical Hospital, 119571 Moscow, Leninskiy pr., 117

Lineage switch is a rare phenomenon in which a transition from lymphoid to myeloid was observed in relapse of acute leukemia, or vice versa. This paper presents the four clinical case reports of acute lymphoblastic leukemia with *MLL* gene rearrangement (*KMT2A*) with myeloid phenotype in relapse.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, acute myeloid leukemia, lineage switch, *KMT2A* gene rearrangement, immunophenotyping

Введение

Острые лейкозы — самые распространенные злокачественные заболевания детского возраста. Они характеризуются неконтролируемой клональной пролиферацией гемопоэтических клеток различных линий. Несмотря на значительные успехи терапии, в 15–20 % случаев острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) и в 30–60 % острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) развиваются рецидивы заболевания [1–9]. При этом популяция бластных клеток в рецидиве, как правило, относится к той же линии дифференцировки (лимфоидной или миелоидной), что и изначально. Однако в ряде случаев наблюдается смена линейной принадлежности лейкоза («переключение» фенотипа, lineage switch) — явление, при котором бластные клетки в дебюте заболевания отвечают морфологическим, цитохимическим и иммунологическим критериям одной линии дифференцировки, а в рецидиве — другой [10].

Рецидивы со сменой линейной принадлежности встречаются чаще у детей, чем у взрослых [11]. Большинство описанных случаев переключения — это переход из ОЛЛ в ОМЛ. Другие типы переключений встречаются редко [12]. Известно, что наиболее часто переключение линий происходит при лейкозах с перестройкой гена *KMT2A* (lysine (K)-specific methyltransferase 2A; ранее известен как *MLL* — mixed lineage leukemia) — около 50 % опубликованных случаев [12].

В настоящей статье приведены описания 4 пациентов с рецидивом ОЛЛ и переключением линейности, обследованных в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева и получавших лечение в этом Центре или в Российской детской клинической больнице Минздрава России.

Клинический случай 1

Пациент Р.А., заболел в возрасте 17 мес. При обследовании выявлены гепато- и спленомегалия, инфильтрация правой орбиты, гиперлейкоцитоз 121,26 тыс/мкл. Иммунофенотип бластной популяции костного мозга соответствовал ОЛЛ, В1-варианту с коэкспрессией CD15 и NG2 (рис. 1). Особенности иммунофенотипа бластной популяции позволяли предположить перестройку гена *KMT2A*. По данным миелограммы – ОЛЛ, L1/L2-вариант (рис. 2а). В ликворе отмечался цитоз 53/мм³, бластные клетки 80 %. Цитогенетическое исследование выявило клон 46, XY, t(4;11)(q21;q23) [10]. При исследовании методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescent in situ hybridization, FISH) с зондом Kreatech *KMT2A/AFF1* t(4;11) Fusion (Kreatech, Нидерланды) подтверждена транслокация t(4;11)(q21;q23) (рис. 2б). Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) была обнаружена экспрессия химерного транскрипта *KMT2A-AFF1*. Дополнительное исследование с зондом Vysis LSI MLL показало, что наряду с ядрами средних размеров, в которых наблюдалось классическое распределение сигналов, присутствовало 3–4 % крупных рыхлых ядер с распределением сигналов, соответствующих родственному минорному субклону (рис. 2б). На основании проведенного обследования был поставлен диагноз: ОЛЛ, нейрорлейкоз, В1-иммуновариант с коэкспрессией CD15, t(4,11)(q21;q23)/*KMT2A-AFF1*, экстрамедуллярное поражение в области правой орбиты, 1-й острый период. Ребенку была начата терапия по программе лечения лимфобластных лейкозов ОЛЛ-МВ-2008. На 36-й день индукции была достигнута ремиссия, и терапия была продолжена согласно выбранному протоколу.

Через 4 мес терапии констатирован рецидив заболевания. Данные морфологического и цитохимического исследований свидетельствовали о моноцитарной

природе бластной популяции (рис. 2в). Иммунофенотип бластных клеток существенно изменился по сравнению с первично диагностированным (см. рис. 1). Не была выявлена экспрессия В-линейных антигенов, в то время как появились маркеры миелоидной линии дифференцировки (см. таблицу, рис. 1). При стандартном кариотипировании был обнаружен клон 57–80, XY,+X,+Y,+1,+1,+1,+2,+2,+3,+3,t(4;11),+der(4)t(4;11)q21;q23)+4,+5,+6,+7,+7,+8,+8,+9,+9,+10,+10,der(11)t(4;11)(q21;q23),+13,+14,+15,+16,+17,+iso(17q),+18,+18,+19,+20,+20,+20,+21,21,+22,+mar, представлявший собой дубликацию исходного клона с дополнительными перестройками (рис. 2з). При исследовании методом FISH распределение сигналов было таким же, как в минорной популяции клеток, присутствовавших в дебюте заболевания. Методом ПЦР-РВ была обнаружена экспрессия химерного транскрипта *KMT2A-AFF1*.

Таким образом, был диагностирован рецидив лейкоза с трансформацией в ОМЛ. Пациенту был проведен протокол терапии 2-й линии с применением антраклинов и нуклеозидных аналогов (блок с клофарабинном по индивидуальному плану и 2 блока FLAM), однако заболевание оказалось рефрактерным к химиотерапии и пациент погиб.

Клинический случай 2

Пациент А.К., заболел в возрасте 4 лет. В общем анализе крови выявлен гиперлейкоцитоз 563 тыс/мкл, 95 % бластов. В миелограмме – тотальная инфильтрация бластными клетками с морфологическими чертами лимфоидной линии дифференцировки. Также выявлялась популяция бластных клеток с морфологическими чертами миелоидной линии дифференцировки (азурофильные гранулы), составляющих до 3 %. По данным цитохимического исследования в этой популяции миелобластов наблюдалась положительная реакция на ми-

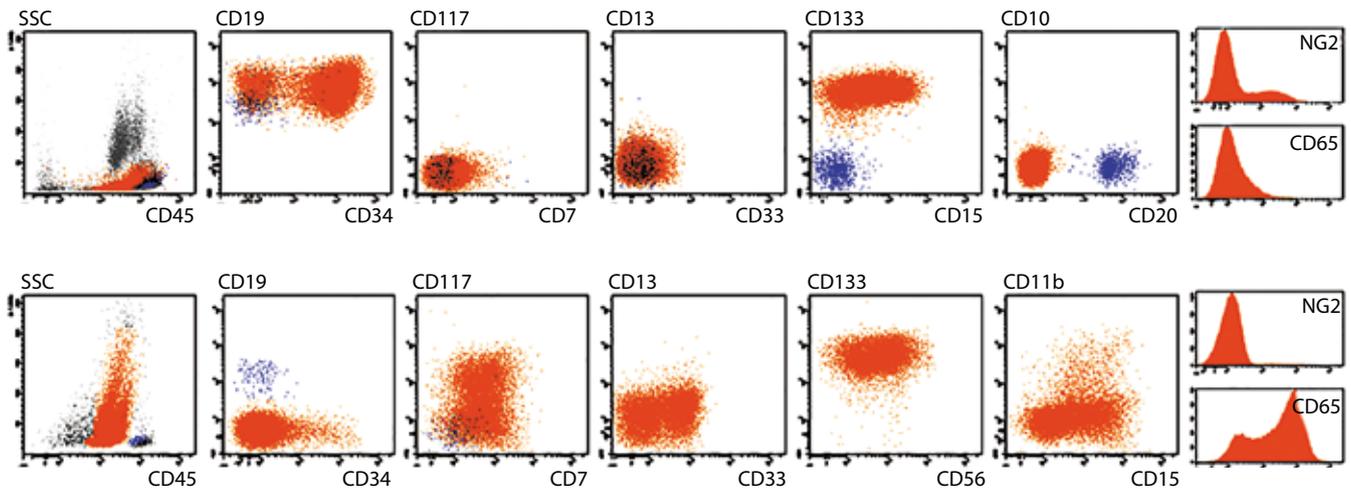


Рис. 1. Результаты иммунофенотипирования бластных клеток в КМ пациента Р.А. на момент инициальной диагностики (верхний ряд) и при рецидиве (нижний ряд). Бласты выделялись по интенсивности экспрессии (CD45) и значению параметра бокового светорассеяния (SSC). Опухолевые клетки отмечены оранжевым цветом, нормальные В-лимфоциты – синим. Пояснения в тексте.

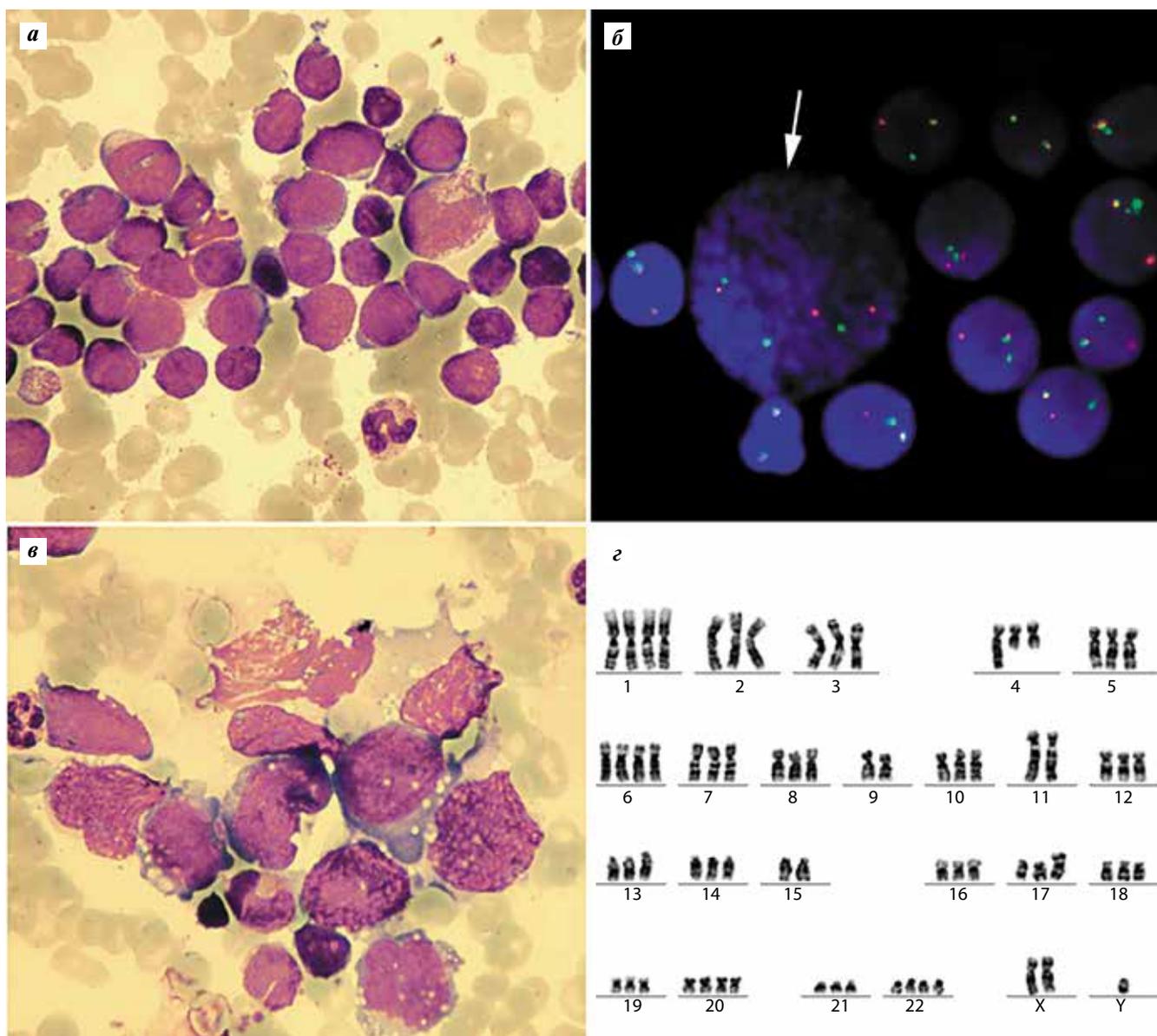


Рис. 2. Пациент Р.А.: а – морфологическое исследование костного мозга в дебюте заболевания, морфология элементов соответствует ОЛЛ, L1/L2; б – исследование методом FISH в дебюте заболевания (зонд Vysis LSI MLL), стрелкой отмечено гиперплоидное ядро; в – морфологическое исследование костного мозга в рецидиве заболевания, морфология элементов соответствует ОМЛ; г – стандартное кариотипирование костного мозга в рецидиве заболевания, гиперплоидный клон с транслокацией $t(4;11)(q21;q23)$

елопероксидазу и положительная реакция на липиды (рис. 3а). По результатам иммунофенотипирования был диагностирован В1-вариант ОЛЛ с коэкспрессией CD15 и CD65, а также экспрессией NG2-антигена (рис. 3). Стандартное кариотипирование выявило клон 46,XY,t(4;11)(q21;q23). Транслокация $t(4;11)(q21;q23)$ подтверждена методом FISH с зондом Kreatech KMT2A/AFF1 $t(4;11)$ Fusion (Kreatech, Нидерланды). Методом ПЦР-РВ была выявлена экспрессия химерного транскрипта *KMT2A-AFF1*. Пациенту была начата терапия по протоколу ОЛЛ-МВ-2008, группа высокого риска. По данным обследования на 36-й день терапии была достигнута ремиссия.

На фоне проведения терапии у пациента сохранялись положительные значения минимальной остаточной

болезни – нормализованное число копий *KMT2A-AFF1* составило 3,9 % от контрольного гена *ABL* через 7 мес от начала заболевания. При этом в миелограмме сохранялась морфологическая ремиссия.

Через 8 мес от начала заболевания в миелограмме было выявлено 25,5–34,0 % бластных клеток, морфологически и цитохимически соответствующих ОМЛ (рис. 3б). По данным иммунофенотипирования, бластная популяция ярко экспрессировала миелоидные и моноцитарные маркеры дифференцировки (рис. 4). Таким образом, у пациента был диагностирован 1-й ранний рецидив со сменой линейной дифференцировки. Пациенту был проведен противорецидивный блок с клофарабином, идарубицином, цитозаром, а также блок НАМ с добавлением бортезомиба. В контрольной

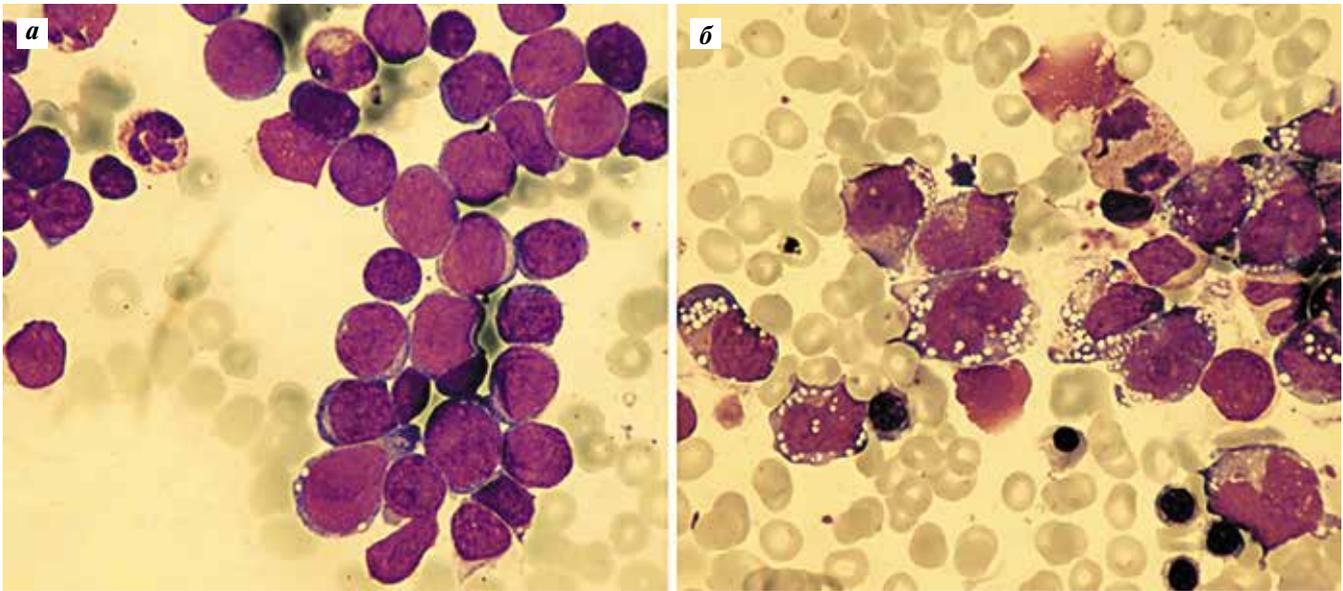


Рис. 3. Пациент А.К.: а – морфологическое исследование костного мозга в дебюте заболевания, морфология элементов соответствует ОЛЛ, L1; б – морфологическое исследование костного мозга в рецидиве заболевания, морфология элементов соответствует ОМЛ

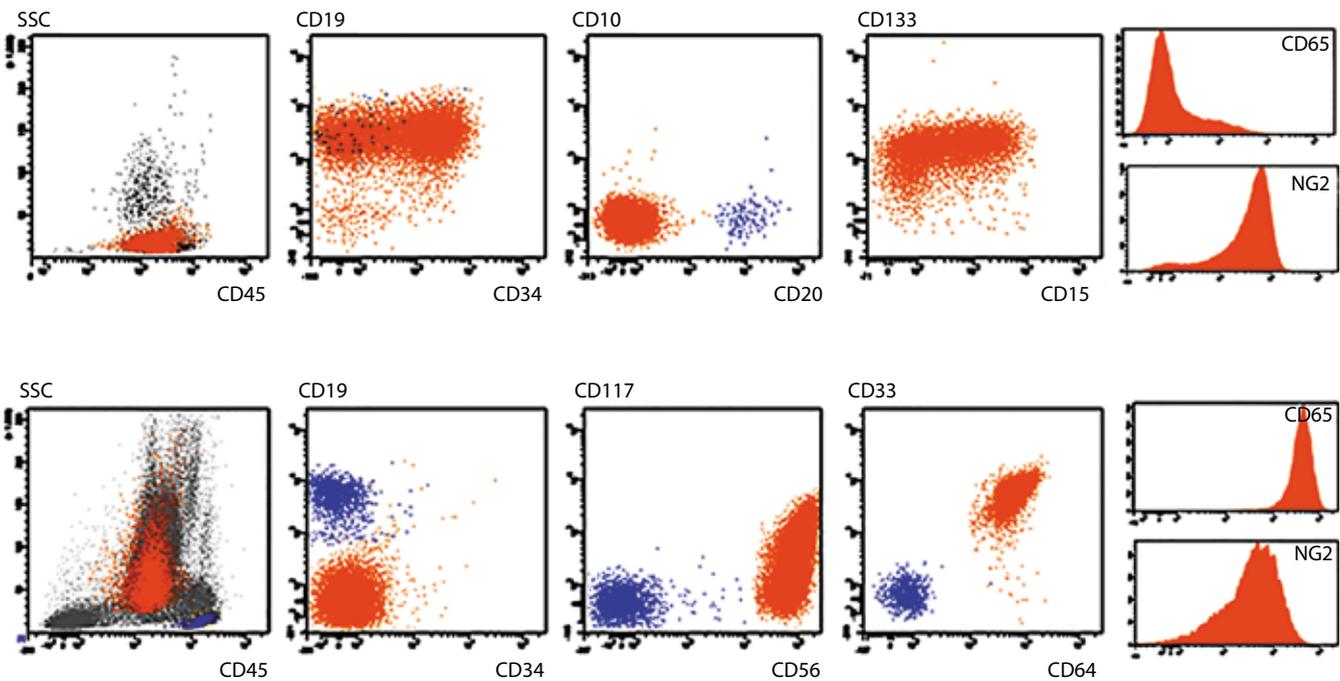


Рис. 4. Результаты иммунофенотипирования бластных клеток в костном мозге пациента А. К. на момент инициальной диагностики (верхний ряд) и при рецидиве (нижний ряд). Бласты выделялись по интенсивности экспрессии (CD45) и значению параметра бокового светорассеяния (SSC). Опухолевые клетки отмечены оранжевым цветом, нормальные В-лимфоциты – синим. Пояснения в тексте

миелограмме была выявлена тотальная бластная инфильтрация (98 %), соответственно, констатировано рефрактерное течение заболевания после проведенной полихимиотерапии 3-й линии.

Клинический случай 3

Пациент И.Л., заболел в возрасте 8 мес, когда на коже головы появилось объемное образование, увеличились все лимфатические узлы шеи и околоушная слюнная железа слева. Изменений в общем анализе

крови выявлено не было. В возрасте 10 мес в миелограмме было выявлено 27,6 % бластных клеток. По результатам проведенного морфологического и цитохимического обследования поставлен диагноз ОЛЛ. Иммунофенотипирование показало, что бластные клетки экспрессируют антигены, ассоциированные с В-линейной дифференцировкой, Т-линейные антигены, а также миелоидный антиген CD33 (см. таблицу). Коэкспрессия антигена NG2 позволила предположить перестройку гена *KMT2A*. При исследовании методом

Характеристика пациентов со сменой линии дифференцировки в рецидиве острого лейкоза

| № случая, пол | 1 случай – Р.А., муж | | 2 случай – А.К., муж | | 3 случай – И.Л., муж | | 4 случай – И.Г., жен | |
|--------------------------------|---|--|--|--|--|--|---|---|
| | Инициально | Рецидив | Инициально | Рецидив | Инициально | Рецидив | Инициально | Рецидив |
| Возраст | 1 год 5 мес | 1 год 9 мес | 3 года 8 мес | 4 года 5 мес | 8 мес | 1 год 5 мес | 2 года 3 мес | 3 года 8 мес |
| Диагноз | ОЛЛ | ОМЛ | ОЛЛ | ОМЛ | ОЛЛ | ОМЛ, М7 | ОЛЛ | ОМЛ |
| Иммунофенотип* | CD19+, CD22+, cytCD79a+, CD34+, CD133+, CD15+, NG2+ | CD33+, CD65+, CD123+, CD7+, CD56+, CD133+ | CD19+, CD22+, cytCD79a+, CD34+, CD133+, CD15+, CD65+, NG2+ | CD33+, CD11a+, CD11c+, CD11b+, CD64+, CD65+, CD117+, CD4+, NG2+, CD56+ | CD19+, CD22+, cytCD79a+, CD2+, CD4+, CD7+, CD33+, NG2+ | CD33+, CD41+, CD42a+, CD61+ | CD19+, CD22+, cytCD79a+, CD15+, CD33+, NG2+ | CD33+, CD11a+, CD11c+, CD11b+, CD64+, CD65+, CD15+, CD4+, NG2+ |
| Кариотип | 46, XY, t(4;11)(q21; q23) [7] | 57–80, XY,+X, +Y,+1,+1,+1,+2,+2,+3,+3, t(4;11)(q21;q23),+der(4) t(4;11)(q21;q23), +4,+5,+6,+7,+7,+8,+8,+9,+9,+10,+10,+der(11) t(4;11)(q21;q23),+13,+14,+15,+16,+17,+iso(17q), +18,+18,+19,+20,+20,+20,+21,21,+22,+mar [cp10] | 46, XY, t(4;11)(q21; q23) [3] | Не делали | Нет митозов | 48, Y, der(X), t(6;11)(q27;q23), der(10)(del(10q)), +19,+mar [6] | Нет материала | 56, XX,+4,+5,+8, t(9;11)p21;q23), +9,+10,+11,+12,+13,+17,+19 [3]/46, XX [5] |
| FISH | t(4;11) – 90 % | пер. KMT2A – 80 % | t(4;11) – 90 % | пер. KMT2A – 80 % | t(6;11) – 90 % | t(6;11) – 90 % | t(9;11) – 90 % | t(9;11) – 80 % |
| ПЦР в режиме реального времени | KMT2A-AFF1 106 % | KMT2A-AFF1 76,2 % | KMT2A-AFF1 2472 % | KMT2A-AFF1 4,5 % | KMT2A-MLLT4 61 % | KMT2A-MLLT4 9 % | Нет материала | KMT2A-MLLT3 49 % |

*Суммарный иммунофенотип показан в виде перечисления антигенов, экспрессия которых считалась положительной (более 20 % позитивных клеток для мембранных маркеров и более 10 % положительных клеток – для внутриклеточных).

FISH с зондом Vysis LSI MLL (Abbott Molecular, США) перестройка гена *KMT2A* была подтверждена. При стандартном кариотипировании митозов получить не удалось. При исследовании методом FISH с зондом Kreatech *KMT2A/MLLT4* t(6;11) Fusion (Kreatech, Нидерланды) была обнаружена транслокация t(6;11)(q27;q23) (рис. 5а). Наличие транскрипта *KMT2A-MLLT4* подтверждено методом ПЦР-РВ.

Пациенту было начато лечение по протоколу ALL-BFM-2000. Через 13 мес после начала заболевания в миелограмме было выявлено 39 % бластных клеток. По результатам иммунофенотипирования на бластных клетках обнаружилась экспрессия антигенов, ассоциированных с мегакариоцитарной дифференцировкой – CD41a и CD61. По сравнению с первичным иммунофенотипом отсутствовала экспрессия антигена NG2 и В-линейно-ассоциированных антигенов, за исключением слабой экспрессии в цитоплазме CD79a. Цитогенетическое исследование костного мозга выявило клон 48,Y,der(X),t(6;11)(q27;q23),der(10)(del(10q)), +19,+mar (рис. 5б), в составе которого наличие транслокации

t(6;11)(q27;q23) было подтверждено методом FISH с зондом Kreatech *KMT2A/MLLT4* t(6;11) Fusion (Kreatech, Нидерланды). Наличие транскрипта *KMT2A-MLLT4* было подтверждено методом ПЦР-РВ. Все это дало повод констатировать рецидив с трансформацией в острый мегакариоцитарный лейкоз. Была начата терапия по протоколу AML-BFM-2004, по схеме AIE+HAM. Далее была продолжена терапия по протоколу для группы высокого риска, блок AI, после чего в миелограмме обнаружили тотальную инфильтрацию бластными клетками. Через 3 мес после начала лечения была проведена трансплантация гемопоэтических стволовых клеток от родственного HLA-совместимого донора. На 28-й день от трансплантации в костном мозге обнаружилось 35 % бластных клеток, диагностировано прогрессирование основного заболевания.

Клинический случай 4

Пациентка И.Г., заболела в возрасте 2 года 3 мес с повышения температуры тела до фебрильных цифр.

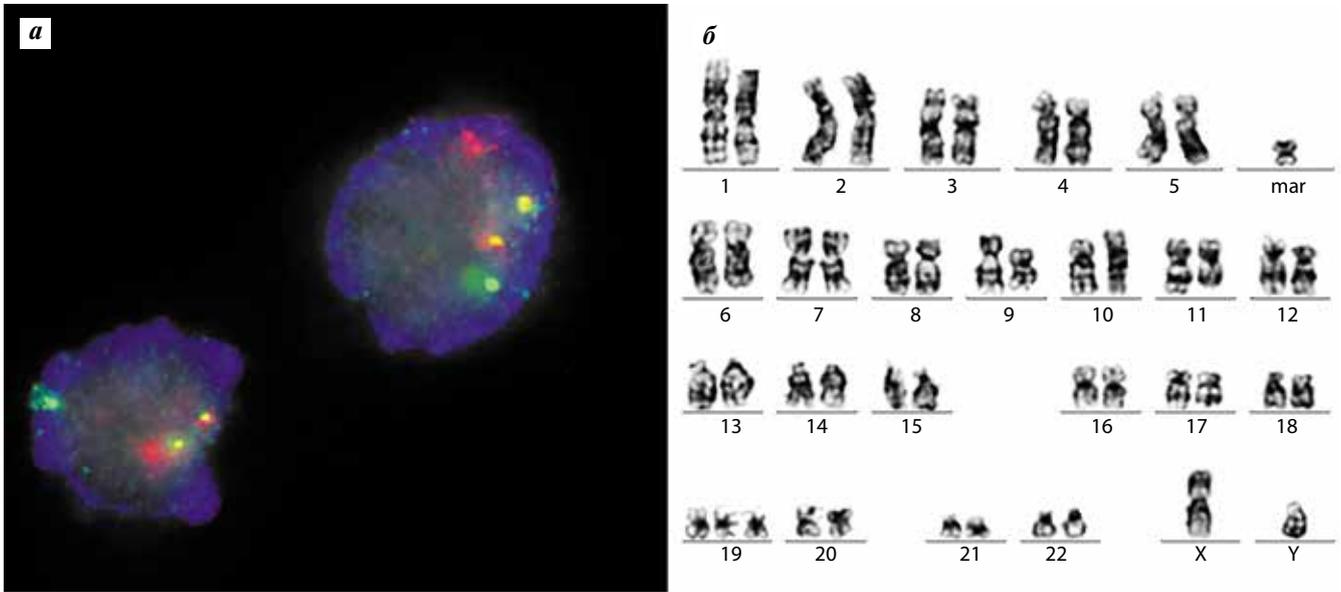


Рис. 5. Пациент И.Л.: а – исследование методом FISH в дебюте заболевания (зонд Kreatech KMT2A/MLLT4 t(6;11) Fusion); б – стандартное кариотипирование костного мозга в рецидиве заболевания, кариотип 48, Y, der(X), t(6;11)(q27; q23), der(10)(del(10q)), +19, +mar

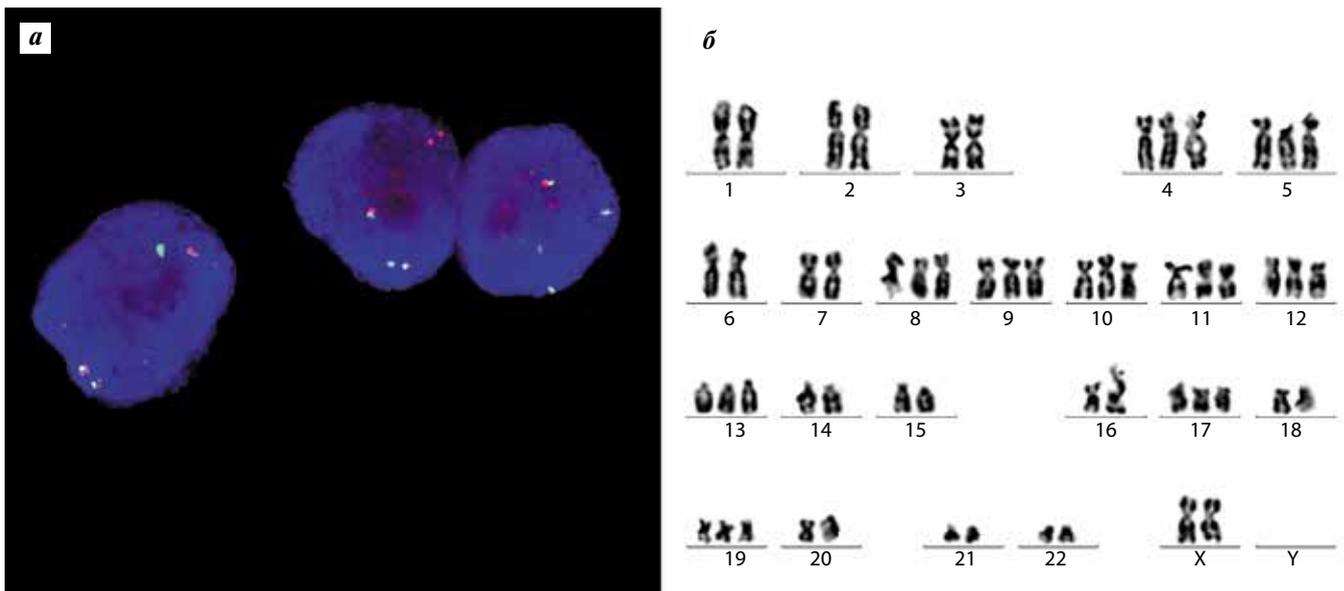


Рис. 6. Пациентка И.Г.: а – FISH-исследование на инициальных морфологических препаратах (зонд Kreatech KMT2A/MLLT3 t(9;11) Fusion); б – стандартное кариотипирование костного мозга в рецидиве заболевания

В общем анализе крови была выявлена анемия (гемоглобин 65 г/л), тромбоцитопения (39 тыс/мкл), лейкоциты 8,4 тыс/мкл, бластные клетки 25 %. В миелограмме – тотальная бластная инфильтрация, морфология элементов L2. По результатам иммунофенотипирования диагностирован ОЛЛ из В-предшественников с коэкспрессией миелоидных антигенов CD15 и CD33, а также NG2-антигена (см. таблицу). Особенности иммунофенотипа позволяли предположить перестройку гена *KMT2A*. При исследовании методом FISH с зондом Kreatech KMT2A/MLLT3 t(9;11) Fusion (Kreatech, Нидерланды) была обнаружена транслокация t(9;11)(p21;q23) (рис. 6а). Молекулярно-биологическое ис-

следование не проводили. Пациентке была начата химиотерапия по протоколу ОЛЛ-МВ-2008, стандартная группа риска, фаза индукции. На 36-й день терапии была достигнута клинико-гематологическая ремиссия.

Через 17 мес после начала лечения в общем анализе крови выявлены гиперлейкоцитоз 35 тыс/мкл, тромбоцитопения 68 тыс/мкл, 62 % бластных клеток. По месту жительства пациентке была повторно проведена фаза индукции протокола ОЛЛ-МВ-2008. На 84-й неделе от начала заболевания при иммунологическом исследовании в костном мозге выявлено 42 % бластных клеток, экспрессирующих антигены, ассоциированные с миело-

моноцитарной линией дифференцировки (см. таблицу). Дополнительно на части клеток выявлены яркая экспрессия NK-ассоциированного антигена CD56 и слабая экспрессия В-линейного антигена CD19. Ретроспективный пересмотр миелограммы от 71 нед выявил тотальную инфильтрацию костного мозга бластными клетками с морфологическими признаками моноцитарной линии дифференцировки. По результатам морфологического и цитохимического исследования диагностирован ОМЛ, М5.

Таким образом, был констатирован рецидив В-линейного ОЛЛ с переключением иммунофенотипа в ОМЛ с коэкспрессией CD56. Проведено цитогенетическое исследование, обнаружена транслокация t(9;11)(p21;q23) в составе гиперплоидного клона, подтвержденная методом FISH с зондом Kreatech KMT2A/MLLT3 t(9;11) Fusion (Kreatech, Нидерланды) (рис. 6в, г). Наличие транскрипта *KMT2A-MLLT3* было подтверждено методом ПЦР-РВ. Был проведен противорецидивный блок химиотерапии для ОМЛ – FLAI. Однако заболевание оказалось резистентным к проводимой терапии: через 2 мес после диагностики рецидива в костном мозге наблюдалась тотальная бластная инфильтрация.

Обсуждение

Смена линии дифференцировки в рецидиве острого лейкоза – довольно редкое явление. К настоящему моменту в литературе описано более 25 случаев переключения иммунофенотипа у пациентов младше 18 лет [12–21], причем у 5 из них наблюдался врожденный острый лейкоз. Имеются сообщения, что в группе пациентов с врожденными лейкозами, у которых в рецидиве наблюдается смена линейной принадлежности, частота встречаемости перестроек гена *KMT2A* составляет 40 % [22, 23]. Более того, в половине известных из литературы случаев смены линейной принадлежности наблюдалась перестройка гена *KMT2A*.

У всех описанных в настоящей статье пациентов была обнаружена перестройка гена *KMT2A* в составе транслокаций t(4;11)(q21;q23) (2 случая), t(9;11)(p21;q23) и t(6;11)(q27;q23) (по 1 случаю). Лейкозы с перестройкой гена *KMT2A* чаще встречаются у детей раннего возраста [24, 25], что также соответствует нашим данным: возраст инициального диагноза составлял 8 мес, 17 мес, 2 года 3 мес, 3 года 8 мес. Высокий инициальный лейкоцитоз, в целом характерный для лейкозов с перестройкой гена *KMT2A* [26], присутствовал в 2 случаях (пациенты Р.А. и А.К.).

Все описанные в настоящей статье пациенты продемонстрировали переключение из ОЛЛ в ОМЛ. По данным E. Dorantes-Acosta и R. Pelayo [12], таких пациентов было большинство (13 из 18), также описано еще 6 таких случаев [13–18]. При этом известно, что среднее время от инициального диагноза до рецидива составило 18 мес в группе переключений из ОЛЛ в ОМЛ и 1 год в группе переключений из ОМЛ в ОЛЛ [12]. Для наших пациентов это время оказалось меньше:

всего у 1 пациента развился рецидив через 17 мес, для остальных это время составило 4, 7 и 9 мес. Сводные данные о пациентах приведены в таблице.

Прогноз у пациентов со сменой варианта лейкоза в целом плохой – по данным M.C. Fernandez и его коллег, 10 из 18 пациентов умерли, причем прогноз не зависел от типа переключения [23]. Во всех наблюдаемых нами случаях рецидивы заболевания были рефрактерны к проводимой терапии.

Механизм смены линейной принадлежности лейкоза изучен недостаточно. Для его объяснения было предложено несколько моделей, основанных на высокой пластичности гемопоэтических клеток-предшественников. Современные исследования в области кроветворения говорят о том, что дифференцировка этих клеток может идти в нескольких направлениях и быть обратной в зависимости от внутренних и внешних факторов.

Согласно одной из предложенных моделей, в костном мозге могут обнаруживаться нормальные ранние В-лимфо-миелоидные и другие би- и олиголинейные предшественники. Долгое время считалось, что стволовая кроветворная клетка может делиться с образованием 2 типов предшественников – общего лимфоидного и общего эритроидно-миелоидного. В 2001 г. была предложена новая схема гемопоэза, согласно которой при делении стволовой кроветворной клетки образуются общий миело-лимфоидный и общий эритроидно-миелоидный предшественники [27–29]. В пользу этой схемы говорят данные о том, что у части эритроидных, Т-клеточных и В-клеточных предшественников сохраняется способность к миелоидной дифференцировке [30, 31]. Именно такие олиголинейные предшественники могут служить мишенью лейкозной трансформации [32].

Другая возможность заключается в дедифференцировке и репрограммировании клеток за счет нарушений в генах репликации и репарации ДНК, генах-регуляторах клеточного цикла, генах различных транскрипционных факторов [33]. Эксперименты на мышиных моделях показали, что в лейкозах, вызываемых химерным геном *KMT2A-MLLT1*, стволовые лейкозные клетки образуются из двух источников – долгоживущих стволовых клеток крови и короткоживущих гранулоцитарно-моноцитарных предшественников. При этом транскрипционный профиль клеток не зависел от исходной популяции, подвергавшейся онкогенной трансформации [34]. Поскольку транскрипционный профиль у острых лейкозов с перестройкой гена *KMT2A* похож на таковой у ранних гемопоэтических предшественников [35–37], было высказано предположение, что перестройка гена *KMT2A* сообщает даже достаточно зрелым клеткам состояние «стволовости», в котором может осуществиться смена направления дифференцировки. Переход к незрелому состоянию в клетках, экспрессирующих перестроенный ген *KMT2A*, осуществляется с помощью двух механизмов – генетического и эпигенетического. Среди нарушений на уровне ге-

нома описаны изменения копийности транскрипционных факторов «стволовости» (*MYC*, *TCF3*, *RBI*, *CDKN1A*) [38]. В процессе дедифференцировки важное значение могут иметь также эпигенетические изменения, такие как метилирование/демети́лирование ДНК и эктопическая экспрессия транскрипционных факторов в результате ремоделирования хроматина [39]. Аберрантное демети́лирование было показано для семейства *HOX*-генов. Известно, что эти гены интенсивно экспрессируются в стволовой кроветворной клетке, и их экспрессия снижается в более зрелых предшественниках. На модели knock-in мышей, экспрессирующих химерный ген *KMT2A-SH3GL1* только в гемопоэтических клетках, была показана высокая способность химерного белка ингибировать метилирование в *HOX*-локусах. Это приводит к гипометилированию генов семейства *HOX* и значительному повышению их экспрессии, что сообщает трансформированным клеткам незрелый фенотип [40].

Согласно 3-й модели, среди стволовых лейкозных клеток изначально существует олигоклональность. Лейкозы с перестройкой гена *KMT2A* могут демонстрировать билинейный характер. Бластная популяция также может быть вообще без особенностей [26].

Одним из подходов к изучению клональной эволюции является выявление соматических мутаций. Хотя в случаях острых лейкозов с перестройкой гена *KMT2A* у детей количество соматических мутаций одно из самых малых среди всех известных злокачественных новообразований, в исследовании Andersson и его коллег [41] с помощью высокопроизводительного секвенирования удалось ретроспективно сравнить спектр мутаций у 2 пациентов в дебюте заболевания и в рецидиве. Оказалось, что у обоих пациентов изначально имелось несколько родственных клонов, встречающихся с разной частотой (от 6,25 до 50 %). В рецидиве (через 3 года для обоих пациентов) наименьший из клонов выростал и вытеснял все остальные. Кроме того,

он приобретал дополнительные мутации. Таким образом, существование клональной эволюции не вызывает сомнений.

Следует также отметить, что один из клонов в дебюте заболевания может быть представлен очень малым числом клеток и не определяться при диагностике [42]. Данные, полученные на ксенографтных моделях острого лейкоза с экспрессией гена *KMT2A-AFF1*, говорят о том, что рецидив в большинстве случаев выходит из минорного субклона, уже присутствующего в дебюте заболевания [43]. Присутствие значительного числа минорных субклонов с различными профилями дифференцировки при лейкозах с перестройками гена *KMT2A* может объяснять как смену линии в рецидиве заболевания, так и частое развитие рецидивов у этой группы больных, и частую резистентность к полихимиотерапии. Проводимая химиотерапия в этом случае может выступать фактором селекции клонов [44].

Однако остается неясным, является ли переключение линии дифференцировки свойством определенных типов острых лейкозов или же это побочный и потому случайный продукт общей пластичности и нестабильности генома лейкозной клетки. По всей видимости, ряд перестроек (с вовлечением таких генов, как *KMT2A*, *TLX3*, *PICALM*) возникает в сравнительно ранних предшественниках гемопоэза.

Заключение

Смена линейной принадлежности в рецидиве острого лейкоза — редкое явление, ставящее перед врачом ряд важных вопросов. В первую очередь необходимо исключить развитие индуцированного (вторичного) лейкоза, для этого обязательно проведение цитогенетического и молекулярно-биологического исследования. Впрочем, вторичные лейкозы, как правило, возникают позже, в то время как для лейкозов с перестройкой гена *KMT2A* характерны ранние рецидивы. Вопрос о выборе терапии для таких пациентов также остается нерешенным.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Pui C.H., Mullighan C.G., Evans W.E. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there?. *Blood* 2012;120(6):1165–74. DOI: 10.1182/blood-2012-05-378943; PMID: 22730540.
2. Hunger S.P., Lu X., Devidas M. et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol.* 2012;30(14):1663–9. DOI: 10.1200/JCO.2011.37.8018; PMID: 22412151.
3. Conter V., Arico M., Basso G. et al. Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2010;24(2):255–64. DOI: 10.1038/leu.2009.250; PMID: 20016536.
4. Moricke A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257; PMID: 20010625.
5. Sander A., Zimmermann M., Dworzak M. et al. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric AML: results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2010;24(8):1422–8. DOI: 10.1038/leu.2010.127; PMID: 20535146.
6. Vora A., Goulden N., Wade R. et al., Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(3):199–209. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70600-9; PMID: 23395119.
7. Burnett A.K., Hills R.K., Milligan D. et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(4):369–77. DOI: 10.1200/JCO.2010.31.4310; PMID: 21172891.

8. Burnett A.K., Russell N.H., Hills R.K. et al. Optimization of chemotherapy for younger patients with acute myeloid leukemia: results of the medical research council AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(27):3360–8. DOI: 10.1200/JCO.2012.47.4874; PMID: 23940227.
9. Ribeiro R.C., Razzouk B.I., Pounds S. et al. Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* 2005;19(12):2125–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2403872; PMID: 16281077.
10. Stass S., Mirro J., Melvin S. et al. Lineage switch in acute leukemia. *Blood* 1984;64(3):701–6. PMID: 6590097.
11. Chung H.J., Park C.J., Jang S. et al. A case of lineage switch from acute lymphoblastic leukemia to acute myeloid leukemia. *Korean J Lab Med*. 2007;27(2):102–5. DOI: 10.3343/kjlm.2007.27.2.102; PMID: 18094559.
12. Dorantes-Acosta E., Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity?, *Bone Marrow Res* 2012;2012:406–796. DOI: 10.1155/2012/406796; PMID: 22852088.
13. Paganin M., Buldini B., Germano G. et al. A case of T-cell acute lymphoblastic leukemia relapsed as myeloid acute leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2016;5(3), [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/pbc.26054; PMID: 27149388.
14. Э.Г. Бойченко, А.М. Попов, Т.А. Макарова и др. Острый лимфобластный лейкоз из ранних предшественников Т-клеток. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2015;14(1):38–44. [Boychenko E.G., Popov A.M., Makarova T.A. et al. Acute lymphoblastic leukemia from early T-cell precursor. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii* = *Pediatric hematology/oncology and immunopathology* 2015;14(1):38–44 (In Russ.)
15. Rayes A., McMasters R. L., O'Brien M.M. Lineage switch in MLL-rearranged infant leukemia following CD19-directed therapy. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63(6):1113–5. DOI: 10.1002/pbc.25953; PMID: 26914337.
16. Fallah Azad V., Hedayati Asl A.A., Tashvighi M. et al. CD7 aberrant expression led to a lineage switch at relapsed childhood acute pre-B lymphoblastic leukemia. *Med Mol Morphol*. 2016;49(1):53–6. DOI: 10.1007/s00795-015-0117-0; PMID: 26242204.
17. Hutter C., Attarbaschi A., Fischer S. et al. Acute monocytic leukaemia originating from MLL–MLLT3-positive pre-B cells. *Br J Haematol*. 2010;150(5):621–3. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2010.08239.x; PMID: 20497176.
18. Winter S.S., Greene J.M., McConnell T.S. et al. Pre-B acute lymphoblastic leukemia with b3a2(p210) and e1a2(p190) BCR-ABL fusion transcripts relapsing as chronic myelogenous leukemia with a less differentiated b3a2(p210) clone. *Leukemia* 1999;13(12):2007–11. PMID: 10602422.
19. Oh S.H., Park T.S., Kim H.R. et al. Chronic myelogenous leukemia showing biphenotypic blast crisis followed by lineage switch to B lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(11):195–8. DOI: 10.1016/j.leukres.2009.04.026; PMID: 19446879.
20. Germano G., Pigazzi M., del Giudice L. et al. Two consecutive immunophenotypic switches in a child with MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2006;91(5):ECR09. PMID: 16709517.
21. Bierings M., Szczepanski T., van Wering E.R. et al. Two consecutive immunophenotypic switches in a child with immunogenetically stable acute leukaemia. *Br J Haematol*. 2001;113(3):757–62. DOI: 10.1046/j.1365–2141.2001.02772.x; PMID: 11380467.
22. Bresters D., Reus A.C., Veerman A.J. et al. Congenital leukaemia: the Dutch experience and review of the literature. *Br J Haematol* 2002;117(3):513–24. DOI: 10.1046/j.1365–2141.2002.03459.x; PMID: 12028017.
23. Fernandez M.C., Weiss B., Atwater S. et al. Congenital leukemia: successful treatment of a newborn with t(5;11)(q31; q23). *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21(2):152–7. PMID: 10206463.
24. Killick S., Matutes E., Powles R.L. et al. Outcome of biphenotypic acute leukemia. *Haematologica* 1999;84(8):699–706. PMID: 10457405.
25. Owaidah T.M., Al Beihany A., Iqbal M.A. et al. Cytogenetics, molecular and ultrastructural characteristics of biphenotypic acute leukemia identified by the EGIL scoring system. *Leukemia* 2006;20(4):620–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2404128; PMID: 16437134.
26. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, ed. S.S. H., et al. 2008, Lyon: IARC.
27. Katsura Y., Kawamoto H. Stepwise lineage restriction of progenitors in lymphomyelopoiesis. *Int Rev Immunol*. 2001;20(1):1–20. PMID: 11342295.
28. Katsura Y. Redefinition of lymphoid progenitors. *Nat Rev Immunol* 2002;2(2): 127–32. DOI: 10.1038/nri721; PMID: 11910894.
29. Kawamoto H. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol* 2006;27(4):169–75. DOI: 10.1016/j.it.2006.02.004; PMID: 16515884
30. Kawamoto H., Katsura Y. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* 2009;30(5):193–200. DOI: 10.1016/j.it.2009.03.001; PMID: 19356980.
31. Bell J.J., Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T-cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 2008;452(7188):764–7. DOI: 10.1038/nature06840; PMID: 18401411.
32. Pui C.H., Raimondi S.C., Behm F.G. et al. Shifts in blast cell phenotype and karyotype at relapse of childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 1986;68(6):1306–10. PMID: 2946333.
33. Messina M., Chiaretti S., Iacobucci I. et al. AICDA expression in BCR/ABL1-positive acute lymphoblastic leukaemia is associated with a peculiar gene expression profile. *Br J Haematol* 2011;152(6):727–32. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2010.08449.x; PMID: 21623761.
34. Cozzio A., Passegue E., Ayton P.M. et al. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* 2003;17(24):3029–35. DOI: 10.1101/gad.1143403; PMID: 14701873.
35. Eppert K., Takenaka K., Lechman E.R. et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* 2011;17(9):1086–93. DOI: 10.1038/nm.2415; PMID: 21873988.
36. Gentles A.J., Plevritis S.K., Majeti R. et al. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA* 2010;304(24):2706–15. DOI: 10.1001/jama.2010.1862; PMID: 21177505.
37. Valk P.J., Verhaak R.G., Beijnen M.A. et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004;350(16):1617–28. DOI: 10.1056/NEJMoa040465; PMID: 15084694.
38. Strauss R., Hamerlik P., Lieber A. et al. Regulation of stem cell plasticity: mechanisms and relevance to tissue biology and cancer. *Mol Ther* 2012;20(5):887–97. DOI: 10.1038/mt.2012.2; PMID: 22314288.
39. Wernig M., Meissner A., Foreman R. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448(7151):318–24. DOI: 10.1038/nature05944; PMID: 17554336.
40. Ng R.K., Kong C.T., So C.C. et al. Epigenetic dysregulation of leukaemic HOX code in MLL-rearranged leukaemia mouse model. *J Pathol* 2014;232(1):65–74. DOI: 10.1002/path.4279; PMID: 24122813.
41. Andersson A.K., Ma J., Wang J. et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330–7. DOI: 10.1038/ng.3230; PMID: 25730765.
42. Weir E.G., Ali Ansari-Lari M., Batista D.A. et al. Acute bilineal leukemia: a rare disease with poor outcome. *Leukemia* 2007;21(11):2264–70. DOI: 10.1038/sj.leu.2404848; PMID: 17611554.
43. Bardini M., Woll P.S., Corral L. et al. Clonal variegation and dynamic competition of leukemia-initiating cells in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement. *Leukemia* 2015;29(1):38–50. DOI: 10.1038/leu.2014.154; PMID: 24798483.
44. Panzer-Grumayer E.R., Cazzaniga G., van der Velden V.H. et al. Immunogenotype changes prevail in relapses of young children with TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia and derive mainly from clonal selection. *Clin Cancer Res* 2005;11(21):7720–7. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-05-1239; PMID: 16278392

Динамическое молекулярно-цитогенетическое наблюдение за больными хроническим лимфоцитарным лейкозом с неблагоприятным прогнозом

Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова, Е.В. Голуб, В.В. Цепенко, А.А. Даниленко, В.В. Павлов

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России;
Россия, 249036, Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Татьяна Геннадьевна Шкаврова shkavrova@mail.ru

В данном пилотном исследовании представлены результаты длительного (до 74 мес) динамического наблюдения за 16 больными хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), у которых при первом исследовании методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации клеток (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) были выявлены *del17p13* или *del11q22*. Показано, что для прогноза течения заболевания имеет значение не только наличие делеций *17p13* или *11q22*, но и процент aberrантных клеток с этими нарушениями. Высокая частота (более 70 %) клеток с делецией *17p13* является цитогенетическим маркером неблагоприятного течения ХЛЛ и низкой продолжительности жизни, в то время как низкая частота таких клеток может быть предиктором прогрессирования заболевания, но при эффективном лечении это не отражается на выживаемости больных ХЛЛ. Наличие более 70 % клеток с *del11q22* свидетельствует о необходимости раннего начала лечения. Также было выявлено, что доля клеток с маркерными aberrациями при ХЛЛ у одного и того же человека может меняться (в том числе снижаться до контрольного уровня) как в результате лечения, так и без него. После завершения адекватной программы лечения больных процент aberrантных клеток достоверно снижается, а при рецидиве и/или прогрессировании, как правило, достигает первоначального уровня. Соотношение между субклонами клеток с различными маркерными нарушениями в процессе лечения и после его окончания может меняться, возможно появление новых субклонов лейкозных клеток. Проведение FISH-исследования при ХЛЛ может дать больше полезной информации, чем просто отнесение больного к определенной группе прогноза при постановке диагноза, поскольку на прогноз течения заболевания могут влиять не только качественные показатели (есть или нет нарушения), но и количественные (% клеток с нарушением). Учитывая широкий спектр вариантов течения ХЛЛ и возможность клональной эволюции, выполнение динамического FISH-анализа может быть полезным инструментом при данном заболевании.

Ключевые слова: хронический лимфоцитарный лейкоз, интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация клеток, *del17p13*, *del11q22*, динамическое наблюдение

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-30-36

Molecular cytogenetic follow-up of chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis

T.G. Shkavrova, G.F. Mikhailova, E.V. Goloub, V.V. Tsepenko, A.A. Danilenko, V.V. Pavlov

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4, Korolev St., Obninsk, 249036, Kaluga Region, Russia

In this pilot study results of prolonged (up to 74 month) follow-up of 16 CLL patients with *del17p13* or *del11q22* in the first I-FISH analysis have been presented. It was shown that the presences of *del17p13* or *del11q22* as well as the rate of the aberrant cells having those abnormalities are significant for the prognosis and clinical course of CLL. The high rate (more than 70 %) of cells with *17p13* deletion means very unfavorable cytogenetic marker and indicates the short survival. On the other hand the low rate of cells with *17p13* deletion may predict disease progression but in case of effective treatment there are no effects on the patient's survival. The high rate (more than 70 %) of cells with *del11q22* indicates the early requiring for treatment. It was revealed the frequency of cells with marker aberrations may change in the same patient including decreasing to the control level as result of treatment and without it too. The frequency of aberrant cells decreases significantly after the finishing of appropriated treatments program and usually returns to its previous level in case of relapse and/or progression of disease. The subclones' ratio between different marker abnormalities could vary during treatment and after its ending. It's also possible the occurrence of new leukemic cells subclones. Taking in consideration the wide range of clinical CLL course and the possibility of the clonal evolution, the FISH-analysis should be as integral part of clinical practice both during the CLL staging and the next patient's follow-up.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia (CLL), interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH), *del17p13*, *del11q22*, follow-up

Введение

Ежегодно в странах Европы, США и России диагноз «хронический лимфоцитарный лейкоз» (ХЛЛ) устанавливают впервые у 3–5 человек на 100 тыс. населения [1, 2]. Несмотря на значительные достижения в понимании молекулярных механизмов возникновения и течения этого заболевания, множество вопросов все еще остаются нерешенными. Распространенность ХЛЛ, многочисленные молекулярно-генетические изменения, выявляемые как в начале заболевания, так и при его прогрессировании, вариабельность клинического течения, ответа на терапию и результатов лечения, оцененных по продолжительности общей выживаемости, дают основание для планирования и реализации персонализированных терапевтических программ.

За последние 2 десятилетия многочисленные клинические исследования позволили значительно изменить подходы к терапевтической стратификации больных ХЛЛ в соответствии с прогнозом. Тем не менее заболевание все еще остается неизлечимым, что побуждает к проведению дальнейших исследований.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на выявлении молекулярно-генетических нарушений, играющих ключевую роль в патогенезе ХЛЛ. Использование молекулярно-цитогенетического метода интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (interphase fluorescence *in situ* hybridization, I-FISH) с ДНК-зондами к 17p13, 11q22, 13q14 и Cep12 позволяет выявлять эти цитогенетические нарушения в лимфоцитах более чем у 80 % больных ХЛЛ [3, 4]. Информация, которую дает метод I-FISH, может быть использована лечащим врачом для стратификации больных по группам риска, выбора тактики лечения, оценки эффективности проводимой терапии и прогноза течения заболевания.

Целью данной работы был анализ нарушений локусов 17p13 и 11q22 при динамическом наблюдении у больных ХЛЛ с неблагоприятным прогнозом. Результаты, представленные в статье, являются частью исследовательской работы, проводимой с целью формирования банка биологических образцов больных ХЛЛ и накопления фактического материала по изучению динамики молекулярно-цитогенетических маркеров. Полученные предварительные результаты позволяют говорить о целесообразности проведения подобных исследований.

Материалы и методы

В исследование включены 16 пациентов (11 мужчин и 5 женщин) с ХЛЛ, находящихся в процессе лечения или постклинического наблюдения, у которых при первичном I-FISH-исследовании были выявлены del17p13 или del11q22. Повторные I-FISH-анализы были выполнены при плановом обследовании в процессе наблюдения до начала терапии, после проведения лечения, при рецидиве/прогрессировании заболевания. Схемы лечения, адекватные периоду течения

ХЛЛ, были подобраны индивидуально. Период времени между проведением первого и последнего FISH-анализа колебался от 4 до 74 мес. Возраст обследованных на момент проведения первого FISH-анализа варьировал от 47 до 76 лет (медиана 59 лет).

Контрольную группу составили 5 клинически здоровых доноров (3 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 39 до 85 лет (медиана 62 года).

Образцы венозной крови (4–6 мл) забирали при помощи вакуумной системы, содержащей Li-гепарин в концентрации 12–30 МЕ на 1 мл крови. Затем цельную кровь разбавляли 1:1 средой RPMI-1640 и выделяли лимфоциты при помощи сепарационной среды LMS (MP Biomedicals, США). Клеточную суспензию (20–30 мкл) наносили на сухие предварительно очищенные предметные стекла. В работе был использован коммерческий многоцветный набор прямомеченных ДНК-зондов (Vysis, США), состоящий из 2 проб: LSI p53/LSI ATM и LSI D13S319/LSI 13q34/Cep 12. Пред- и постгибридизационные отмывки проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к ДНК-зондам. Для денатурации и гибридизации использовали гибридайзер HYBrite (Vysis, США).

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager A-2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Aqua (Vysis, США). В каждом случае анализировали не менее 200 интерфазных клеток с четкими сигналами.

При определении границ нормы для каждой из проб многоцветного зонда анализировали 1000 интерфазных ядер от каждого из 5 здоровых доноров. Граница нормальных значений: для трисомии хромосомы 12 < 3 %, del 13q14 < 6 %, del 13q34 < 9 %, del 11q23 < 4 %, del 17p13 < 7 %.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2007. Достоверность различий оценивали по t-критерию. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

У 16 больных ХЛЛ проведено 42 I-FISH-анализа: 10, 3, 2 и 1 человек были обследованы 2, 3, 4 и 5 раз соответственно. Интервал времени между обследованиями варьировал от 3 до 46 мес. Первый I-FISH-анализ у 7 человек был выполнен при установлении диагноза ХЛЛ, у 9 человек – спустя 7–128 мес от даты установления диагноза.

Делеция 17p13

Делеция 17p13 считается самым неблагоприятным цитогенетическим маркером, свидетельствующим о плохом прогнозе и резистентности к стандартной терапии. Медиана выживаемости больных с этим нарушением составляет 32 мес [3, 5]. Эта маркерная абберрация выявляется у 2–6 % больных ХЛЛ при установлении ди-

агноза (*de novo* делеция) или в дебюте заболевания, но может появиться и в процессе развития болезни, особенно у пациентов, уже получивших химиотерапию. В работе [6] было показано, что при рецидивирующем или резистентном ХЛЛ доля пациентов с del17p увеличивается до 30 %. Тем не менее в ряде работ установлено, что у части больных с этим нарушением прогноз не является неблагоприятным. В исследовании [7] обнаружено, что пациенты, имевшие от 5 до 20 % клеток с del17p13, ответили на лечение так же, как и пациенты без этой делеции, в то время как больные с высокой частотой aberrантных клеток – лишь в 13 % случаев. Были выявлены достоверные различия и по медиане общей выживаемости между больными с низким и высоким содержанием клеток с потерей локуса 17p13. Однако при дальнейшем наблюдении за этими пациентами первоначальные результаты не были подтверждены, а частота клеток с del17p13, ниже которой больные имели благоприятный прогноз, была установлена на уровне 10 % [8]. В работах [9, 10] также было показано, что у части пациентов с del17p13 болезнь может протекать бессимптомно в течение длительного периода. Авторы сделали вывод, что потеря 17p13 является предиктором только прогрессирования заболевания, но не выживаемости больных.

При первичном FISH-анализе нами было установлено, что у 5 из 8 пациентов с del17p13 частота aberrантных клеток была высокой (74 % и выше), а у 3 больных – низкой (не более 20 %) (табл. 1). У 2 из 8 пациентов (П1 и П3) del17p13 была единственной, у остальных – сочеталась с del13q14. Кроме того, у па-

циента П4 была выявлена и нехарактерная для ХЛЛ моносомия хромосомы 12 в 78 % клеток.

У всех больных с высокой частотой клеток с del17p13 были клинические показания к безотлагательному началу цитостатической терапии. Пациенту П5 лечение не проводили из-за сопутствующих заболеваний. У этого пациента частота клеток с del17p13 через 8 мес со времени 1-го FISH-исследования не отличалась от первоначальной (74 и 80 % соответственно), а еще через 5 мес больной умер от прогрессии ХЛЛ. Продолжительность жизни этого пациента со времени установления диагноза ХЛЛ составила 13 мес (табл. 2).

Пациентам П1, П2, П4 после завершения терапии 1-й линии было выполнено повторное I-FISH-исследование. У всех больных наблюдалось снижение количества клеток с del17p13: у пациента П2 – на 30 %, у пациентов П1 и П4 – до нормальных значений. Пациенту П3 I-FISH проводили сразу по завершении лечения и через 13 и 24 мес в связи с прогрессированием ХЛЛ. После лечения 1-й линии все цитогенетические маркеры оказались в пределах нормальных значений, при 1-й прогрессии частота клеток с del17p13 достигла первоначального уровня (96 %), при 2-й – несколько снизилась (72 %), еще через 2 мес у больного была констатирована трансформация ХЛЛ в В-клеточную диффузную крупноклеточную лимфому.

Непосредственными причинами смерти большинства пациентов с ХЛЛ являются инфекционные и аутоиммунные осложнения (аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунная тромбоцитопения). Лишь у небольшой части больных (2–8 %) ХЛЛ трансформируется в более агрессивную В-клеточную диффуз-

Таблица 1. Результаты динамического молекулярно-цитогенетического наблюдения за больными с делецией 17p13

| Код пациента | Пол | Возраст, лет | Выявленная маркерная aberrация ¹ | Частота клеток с маркерной aberrацией в разные сроки обследования, % (время от постановки диагноза) | | | |
|--------------|-----|--------------|---|---|---|------------------------------|----------------------|
| | | | | FISH 1 | FISH 2 | FISH 3 | FISH 4 |
| П1 | Ж | 49 | del17p13 | 93,0 ± 1,8* (30 мес) | Норма ^{2**} (38 мес) | – | – |
| П2 | М | 60 | del17p13 del13q14 | 89,0 ± 3,1* 82,0 ± 3,8* (28 мес) | 62,0 ± 3,4** 43,0 ± 3,5** (32 мес) | – | – |
| П3 | М | 49 | del17p13 | 88,0 ± 2,3 (0 мес) | Норма ^{2**} (3 мес) | 95,5 ± 1,5* (13 мес) | 71,5 ± 3,2* (24 мес) |
| П4 | М | 47 | del17p13 del13q14 | 77,5 ± 3,0* 13,0 ± 2,4* (28 мес) | Норма ^{2**} Норма ^{2**} (33 мес) | – | – |
| П5 | М | 76 | del17p13 del13q14 | 73,5 ± 3,2 72,5 ± 3,2 (0 мес) | 79,5 ± 2,9 82,0 ± 2,7 (8 мес) | – | – |
| П6 | М | 57 | del17p13 del13q14: | 18,0 ± 2,7 89,0 ± 2,2 (7 мес) | 75,5 ± 3,0* 84,0 ± 2,6* (53 мес) | – | – |
| П7 | Ж | 70 | del17p13 del13q14 | 11,5 ± 2,3 58,0 ± 3,5 (128 мес) | Норма* 77,5 ± 3,0* (160 мес) | – | – |
| П8 | Ж | 59 | del17p13 del13q14 | 8,5 ± 2,0 72,5 ± 3,2 (0 мес) | 9,3 ± 1,7 77,0 ± 3,0 (31 мес) | Норма 76,5 ± 3,0 (48 мес) | – |

¹Частота достоверно превышает нормальные значения ($p < 0,05$); ²del17p13 < 7%, del13q14 < 6%; *рецидив/прогрессирование; **после лечения.

ную крупноклеточную лимфому (синдром Рихтера) [11]. В нашем исследовании событием, приведшим к смерти пациентов П1 и П4, были аутоиммунные осложнения, пациентов П2 и П3 – синдром Рихтера. Продолжительность жизни этих больных после установления диагноза ХЛЛ составила 42, 41, 40 и 33 мес соответственно (см. табл. 2). Таким образом, выживаемость больных ХЛЛ с большей долей клеток с del17p13 не превысила 42 мес.

Низкая (не более 20 %) частота клеток с del17p13 при первичном I-FISH-анализе была зарегистрирована у 3 пациентов (П6, П7 и П8) (см. табл. 1). Необходимость начала терапии у пациента П6 была определена через 20 мес от даты установления диагноза, у пациента П7 – с момента установления диагноза.

У пациента П6 при первичном I-FISH-анализе, проведенном через 7 мес со времени установления диагноза ХЛЛ, частота клеток с del17p13 составляла 18 %, при повторном I-FISH-анализе, выполненном через 46 мес в связи с рецидивом ХЛЛ, увеличилась до 76 %, в то время как частота клеток с сопутствующей del13q14, преимущественно биаллельной, не изменилась, составив 89 и 84 % соответственно. Таким образом, у этого больного мы наблюдали клональную эволюцию, при которой потенциально несущественный субклон клеток с del17p13 стал значимым. Клональная эволюция свидетельствует об ухудшении прогноза в процессе прогрессирования заболевания [12, 13].

Первый FISH-анализ у пациента П7 был выполнен через 128 мес со времени установления диагноза, повторный – при прогрессировании, спустя 32 мес. Было обнаружено, что процент клеток, имеющих del17p13, снизился с 11,5 % до нормальных значений, а клеток с сопутствующей del13q14 достоверно увеличился с 58 до 78 % ($p < 0,05$). Через 3 мес у больного было констатировано прогрессирование ХЛЛ, приведшее к смерти (период наблюдения – 163 мес) (см. табл. 2).

У пациента П8 клинические показания к началу терапии отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения, в процессе которого I-FISH-анализ был выполнен трижды: при установлении диагноза и спустя 31 и 48 мес. При первых 2 обследованиях частота клеток с del17p13 была достоверно выше контрольного уровня, составляя 8,5 и 9,3 % соответственно ($p < 0,05$). При последнем I-FISH-анализе у пациента наблюдалось достоверное снижение этого показателя до нормального уровня ($p < 0,05$), а частота клеток с сопутствующей del13q14 оставалась постоянной на протяжении всего периода наблюдения, находясь в пределах 73–77 %. Спонтанное исчезновение клона с небольшой частотой del17p13 наблюдали и авторы работы [12].

Таким образом, больные ХЛЛ, имеющие низкую долю клеток с del17p13, могут быть отнесены к подгруппе неблагоприятного прогноза, однако при адекватной терапевтической тактике это обстоятельство не приводит к сокращению общей выживаемости.

Делеция 11q22

Делеция 11q22 также считается неблагоприятным прогностическим фактором. Это нарушение наблюдается у 13–31 % больных ХЛЛ [14, 15]. По данным литературы [3] у 50 % больных с del11q22 необходимость начала лечения возникает в течение 24 мес от времени установления диагноза ХЛЛ, а медиана выживаемости составляет 78 мес. Как и в случае с del17p13, на время до начала лечения и выживаемость больных влияет количество клеток с этим нарушением. В работе [16] было показано, что через 3 года наблюдения после проведения первичного FISH-анализа в группе больных, имевших менее 25 % aberrантных клеток с del11q22, 66 % пациентов все еще не нуждались в лечении. В то же время в группе больных с частотой aberrантных клеток, превышавшей 25 %, 73 % пациентов уже получали лечение. В этих группах медиана времени до начала терапии составила 40 и 14 мес со-

Таблица 2. Данные по времени начала терапии, числу рецидивов, времени наблюдения и общей выживаемости больных с делецией 17p13

| Код пациента | Частота делеций, % (время от постановки диагноза) | Время до начала терапии, мес | Число рецидивов/ прогрессирований | Время наблюдения, мес | Общая выживаемость, мес |
|--------------|--|---------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| П1 | 93,0 ± 1,8* (30 мес) | 0 | 2 | 42 | 42 |
| П2 | 89,0 ± 3,1* (28 мес) | 0 | 2 | 40 | 40 |
| П3 | 88,0 ± 2,3 (0 мес) | 0 | 2 | 33 | 33 |
| П4 | 77,5 ± 3,0* (28 мес) | 0 | 1 | 41 | 41 |
| П5 | 73,5 ± 3,2 (0 мес) | Лечение не проводилось | – | 13 | 13 |
| П6 | 18,0 ± 2,7 (7 мес) | 20 | 1 | 58 | Н |
| П7 | 11,5 ± 2,3 (128 мес) | 0 | 2 | 163 | 163 |
| П8 | 8,5 ± 2,0 (0 мес) | Лечение не требовалось | 0 | 80 | Н |

Примечания. *Рецидив/прогрессирование; Н – не может быть оценена, так как выживаемость рассчитывается от даты начала лечения до смерти от любой причины или до даты последней явки больного.

ответственно. В исследовании [17], проведенном на 196 первичных больных с del11q22, частота aberrантных клеток, явившаяся пограничной относительно различия как по времени до начала лечения, так и по общей выживаемости, составила 58 %.

В нашем исследовании у всех больных, у которых del11q22 была основным патогенетическим маркером, частота aberrантных клеток колебалась в пределах 55–98 % (табл. 3). Необходимость начала лечения по клиническим показаниям определена у всех больных, причем у 7 из 8 пациентов, имевших более 73 % клеток с del11q22, лечение было начато в течение 5 мес со времени установления диагноза (табл. 4), у больного П16, имевшего 55 % клеток с del11q22, — спустя 21 мес. Следует отметить, что при первичном I-FISH-анализе только у 2 из 8 пациентов (П15 и П16) del11q22 была единственной, у остальных — сочеталась с del13q14.

Пациенту П9 первое I-FISH-исследование было выполнено после окончания очередного курса лечения (40 мес после установления диагноза ХЛЛ), при этом частоты всех молекулярно-цитогенетических маркеров были в пределах нормальных значений. Повторно I-FISH провели через 21 мес, при констатации прогрессии ХЛЛ, далее еще 2 анализа с интервалами в 3 мес — после завершения курса лечения и при оче-

редном прогрессировании заболевания. Частота клеток с del11q22 составила 98, 68 и 93 % соответственно, а одновременно выявленная частота клеток с del13q14–90, 70 и 89 % соответственно. Еще через 3 мес больной умер от прогрессирования ХЛЛ. Продолжительность жизни составила 69 мес после установления диагноза ХЛЛ.

У пациента П10 I-FISH-анализ был выполнен 3 раза, при возникновении рецидивов заболевания, — через 88, 101 и 111 мес от времени установления диагноза. Обнаружено, что частота клеток с del11q22 была высокой при всех обследованиях и составляла 90, 82 и 81 % соответственно, тем не менее при повторных обследованиях была достоверно ниже, чем при первом ($p < 0,05$). В то же время частота клеток с del13q14 достоверно увеличивалась, составляя 23, 42 и 56 % соответственно ($p < 0,05$). Продолжительность жизни этого пациента со времени установления диагноза ХЛЛ составила 121 мес.

У пациента П11 первичный I-FISH-анализ был проведен при установлении диагноза ХЛЛ, повторный — через 44 мес, при возникновении рецидива. Частота клеток с del11q22 достоверно снизилась с 83 до 58 % ($p < 0,05$), в то время как доля клеток с del13q14 достоверно увеличилась с 28 до 44 % ($p < 0,05$), т. е. соотношение между субклонами изменилось. Пациенту был

Таблица 3. Результаты динамического молекулярно-цитогенетического наблюдения за больными с делецией 11q22

| Код пациента | Пол | Возраст, лет | Выявленная маркерная aberrация ¹ | Частота клеток с маркерной aberrацией в разные сроки обследования, % (время от постановки диагноза) | | | | |
|--------------|-----|--------------|---|---|--|--|---|---|
| | | | | FISH 1 | FISH 2 | FISH 3 | FISH 4 | FISH 5 |
| П9 | М | 59 | del11q22 del13q14 | Норма ^{2**} Норма ^{**} (40 мес) | 98,4 ± 0,8* 90,4 ± 1,9* (61 мес) | 67,5 ± 3,7** 70,0 ± 3,6** (64 мес) | 92,5 ± 1,9* 88,5 ± 2,3* (67 мес) | — |
| П10 | М | 50 | del11q22 del13q14 | 89,5 ± 2,2* 23,0 ± 3,0* (88 мес) | 82,0 ± 2,7* 42,0 ± 3,5* (101 мес) | 80,5 ± 2,8* 56,5 ± 3,5* (111 мес) | — | — |
| П11 | М | 54 | del11q22 del13q14 | 82,5 ± 2,7 28,0 ± 3,2 (0 мес) | 58,0 ± 3,5* 44,0 ± 3,5* (44 мес) | — | — | — |
| П12 | Ж | 68 | del11q22 del13q14 | 81,5 ± 2,7* 94,0 ± 1,7* (18 мес) | 80,5 ± 2,8* 84,0 ± 3,7* (42 мес) | — | — | — |
| П13 | Ж | 75 | del11q22 del13q14 del13q34 | 81,0 ± 2,8 79,0 ± 2,9 51,5 ± 3,5 (0 мес) | Норма ^{**} Норма ^{**} Норма ^{**} (7 мес) | Норма Норма Норма (34 мес) | — | — |
| П14 | М | 67 | del11q22 del13q14 | 76,5 ± 3,0* 78,0 ± 2,9* (63 мес) | 15,5 ± 2,6** 15,5 ± 2,6** (73 мес) | 80,5 ± 2,8* 67,0 ± 3,3* (83 мес) | 28,0 ± 3,2** 32,5 ± 3,3** (131 мес) | 61,0 ± 3,4** 74,5 ± 3,1** (137 мес) |
| П15 | М | 66 | del11q22 del13q14 | 72,5 ± 3,2 Норма (0 мес) | 76,5 ± 3,0* 14,5 ± 2,5* (31 мес) | — | — | — |
| П16 | М | 50 | del11q22 | 55,0 ± 3,5 (0 мес) | 25,0 ± 3,5 (12 мес) | — | — | — |

¹Частота достоверно превышает нормальные значения ($p < 0,05$); ²del11q23 < 4 %, del13q14 < 6 %, del13q34 < 9 %; *рецидив/прогрессирование; **после лечения.

Таблица 4. Данные по времени начала терапии, числу рецидивов, времени наблюдения и общей выживаемости больных с делецией 11q22

| Код пациента | Частота делеций, % (время от постановки диагноза) | Время до начала терапии, мес | Число рецидивов/ прогрессивирований | Время наблюдения, мес | Общая выживаемость, мес |
|--------------|--|---------------------------------|--|--------------------------|----------------------------|
| П9 | 98,4 ± 0,8* (61 мес) | 0 | 4 | 69 | 69 |
| П10 | 89,5 ± 2,2* (88 мес) | 0 | 3 | 121 | 121 |
| П11 | 82,5 ± 2,7 (0 мес) | 0 | 1 | 80 | Н |
| П12 | 81,5 ± 2,7* (18 мес) | 5 | 3 | 52 | Н |
| П13 | 81,0 ± 2,8 (0 мес) | 3 | 0 | 43 | Н |
| П14 | 76,5 ± 3,0* (63 мес) | 0 | 3 | 145 | Н |
| П15 | 72,5 ± 3,2 (0 мес) | 5 | 1 | 38 | Н |
| П16 | 55,0 ± 3,5 (0 мес) | 21 | 0 | 48 | Н |

Примечания. *Рецидив/прогрессирование; Н – не может быть оценена, так как выживаемость рассчитывается от даты начала лечения до смерти от любой причины или до даты последней явки больного.

проведен курс противоопухолевой терапии, и при последнем наблюдении (80 мес после установления диагноза) он находился в ремиссии заболевания. По данным литературы, при ХЛЛ клональная эволюция может быть неоднородной: от одиночных клонов, стабильных в течение продолжительного времени, до переключения доминантности соотношения между субклонами опухолевых клеток после проведения терапии [13].

Пациенту П12 I-FISH-анализ был выполнен дважды, при возникновении рецидивов, – через 18 и 42 мес от времени установления диагноза. Частота клеток с del11q22 оставалась постоянной (82 и 81 % соответственно), а частота клеток с del13q14 (преимущественно биаллельной) была высокой, но достоверно ниже первоначальной – 94 и 84 % соответственно ($p < 0,05$). В настоящее время (спустя 52 мес от даты установления диагноза ХЛЛ) больной находится в процессе проведения противорецидивной терапии.

У пациента П13 первичный I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза: частота клеток с del11q22 составила 81 %, а с del13q14 – 79 %. Повторные I-FISH-анализы, выполненные через 7 и 34 мес – после окончания курса лечения и в постклиническом периоде, – показали, что все молекулярно-цитогенетические маркеры ХЛЛ находились в пределах нормальных значений. При последнем визите (через 43 мес после установления диагноза ХЛЛ) у больного констатировано сохранение ремиссии.

У пациента П14 I-FISH анализ проводился 5 раз. Первое исследование было выполнено спустя 63 мес после установления диагноза, при развитии рецидива. Доля клеток с del11q22 и del13q14 составила 77 и 78 % соответственно. После проведенной терапии произошло достоверное снижение обоих показателей до 16 % ($p < 0,05$). Третье исследование проведено при наступлении очередного рецидива ХЛЛ. Частота клеток с del11q22 и del13q14 составила 81 и 67 % соответственно, т. е. показатели достоверно выросли по срав-

нению с предыдущим исследованием ($p < 0,05$). По сравнению с первичными данными частота клеток с del11q22 вернулась к своему первоначальному значению, а частота клеток с del13q14 достоверно уменьшилась ($p < 0,05$). Четвертый I-FISH анализ был выполнен спустя 48 мес после окончания очередного курса терапии. Доля клеток с del11q22 и del13q14 вновь достоверно снизилась, составив 28 и 33 % соответственно ($p < 0,05$). Пятое I-FISH-исследование было выполнено в процессе терапии при очередном прогрессировании заболевания, при этом частота клеток с del11q22 и del13q14 составила 61 и 75 % соответственно, что достоверно превышало результаты предыдущего исследования ($p < 0,05$).

Таким образом, в разные сроки обследования у получавшего лечение пациента может меняться не только доля клеток с маркерными aberrациями, но и соотношение между ними. Аналогичные данные были получены и другими исследователями, наблюдавшими леченых больных ХЛЛ в течение длительного периода [12, 13].

У пациента П15 1-й I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза ХЛЛ, 2-й – через 31 мес, при развитии рецидива: доля клеток с del11q22 составила 73 и 77 % соответственно. Доля клеток с del13q14 была в пределах нормы при 1-м исследовании, при повторном составила 15 %, т. е. достоверно превысила норму ($p < 0,05$), что свидетельствовало о появлении нового субклона опухолевых клеток. В настоящее время больной проходит очередной курс терапии по поводу прогрессирования заболевания.

У пациента П16 1-й I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза, повторный – через год. В течение этого периода противоопухолевое лечение не проводилось. Установлено, что частота клеток с del11q22 в качестве единственного нарушения достоверно снизилась с 55 до 25 %, оставаясь выше нормальных значений ($p < 0,05$). В настоящее время пациент после курса терапии ХЛЛ находится в ремиссии. Таким образом,

у больных, не получавших противоопухолевое лечение, также могут наблюдаться существенные колебания частоты клеток с маркерными абберациями хромосом.

Заключение

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие предварительные выводы:

- высокая частота (более 70 %) клеток с del17p13 является цитогенетическим маркером неблагоприятного течения ХЛЛ и низкой продолжительности жизни;
- низкая частота клеток с del17p13 может быть предиктором прогрессирования ХЛЛ, что при эффективном лечении не отражается на выживаемости больных;
- высокая частота (более 70 %) клеток с del11q22 свидетельствует о необходимости раннего начала лечения;
- частота абберантных клеток с del17p13 или del11q22 после лечения достоверно снижается, а при рецидиве и/или прогрессировании, как правило, достигает первоначального уровня;

- при отсутствии лечения ХЛЛ частота абберантных клеток может существенно меняться или даже снижаться до контрольного уровня;
- соотношение между субклонами клеток с различными маркерными нарушениями в процессе лечения и после его окончания может меняться, возможно появление новых субклонов лейкозных клеток.

Таким образом, проведение FISH-исследования при ХЛЛ может дать больше полезной информации, чем просто отнесение больного к определенной группе прогноза при постановке диагноза, поскольку на прогноз течения заболевания могут влиять не только качественные показатели (есть или нет нарушения), но и количественные (% клеток с нарушением). Динамическое молекулярно-цитогенетическое наблюдение за больными ХЛЛ позволяет отслеживать изменения в характере течения заболевания. Учитывая широкий спектр вариантов течения ХЛЛ и возможность клональной эволюции, выполнение динамического FISH-анализа может быть полезным инструментом при данном заболевании.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Eichhorst B., Dreyling M., Robak T. et al. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 6):vi50–4. DOI: 10.1093/annonc/mdr377.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2015. 236 с. ПЕРЕВОД
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343(26):1910–6.
- Davids M.S., Vartanov A., Werner L. et al. Controversial fluorescence *in situ* hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort. *Br J Haematol* 2015;170(5):694–703. DOI: 10.1111/bjh.13498.
- Delgado J., Espinet B., Olivera A.C. et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol* 2012;157(1):67–74. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2011.09000. x.
- Stilgenbauer S., Zenz T., Winkler D. et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(24):3994–4001. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.1128.
- Catovsky D., Richards S., Matutes E. et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370(9583):230–9.
- Oscier D., Wade R., Davis Z. et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 2010;95(10):1705–12. DOI: 10.3324/haematol.2010.025338.
- Tam C.S., Shanafelt T.D., Wierda W.G. et al. *De novo* deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M.D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009;114(5):957–64. DOI: 10.1182/blood-2009-03-210591.
- El-Ghannaz A.M., Abdelwahed E., Mostafa N.N., Mansour D.A. *De novo* deletion 17p13.1 as a predictor for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Exp Med* 2015;15(4):493–9. DOI: 10.1007/s10238-014-0317-2.
- Müller-Hermelink H.K., Montserrat E., Catovsky D. et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO classification of tumour of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. P. 179–82.
- Janssens A., Van Roy N., Poppe B. et al. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence *in situ* hybridization study and review of the literature. *Br J Haematol* 2012;89(1):72–80. DOI: 10.1111/j.1600–0609.2012.01790. x.
- Ojha J., Secreto C., Rabe K. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is characterized by mutations in CLL putative driver genes and clonal heterogeneity many years before disease progression. *Leukemia* 2014;28(12):2395–8. DOI: 10.1038/leu.2014.226.
- Lai Y.Y., Huang X.J. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence *in situ* hybridization: a multicenter study. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(16):2417–22.
- Yang S.M., Li J.Y., Gale R.P., Huang X.J. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology. *Blood Rev* 2015;29(3):205–13. DOI: 10.1016/j.blre.2014.12.001.
- Marasca R., Maffei R., Martinelli S. et al. Clinical heterogeneity of *de novo* 11q deletion chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol* 2013;31(2):88–95. DOI: 10.1002/hon.2028.
- Jain P., Keating M., Thompson P.A. et al. High fluorescence *in situ* hybridization percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome. *Am J Hematol* 2015;90(6):471–7. DOI: 10.1002/ajh.23978.

Комбинированный режим терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с бластным кризом миелофиброза

М.С. Фоминых, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина, В.Ю. Удальева, К.М. Абдулкадыров

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 191024, Санкт-Петербург, 2-я Советская ул., 16

Контакты: Михаил Сергеевич Фоминых m.s.fominyh@gmail.com

Медиана выживаемости при бластной трансформации миелофиброза составляет от 3 до 6 мес. Тактика терапии определяется возрастом пациентов и сопутствующей патологией. Химиотерапия по схемам лечения острых лейкозов приносит временный эффект у небольшой части больных. Первый ингибитор янус-киназ — руксолитиниб — продемонстрировал высокую клиническую эффективность у больных в хронической фазе миелофиброза. В статье приводится собственный опыт применения комбинированного режима терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с бластным кризом миелофиброза. Этот режим терапии продемонстрировал обнадеживающие результаты. Зарегистрированы удовлетворительная переносимость и возможность применения приведенной схемы лечения у этой категории пациентов.

Ключевые слова: миелофиброз, первичный миелофиброз, бластный криз, руксолитиниб, комбинированный режим терапии

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-37-39

Combination therapy with ruxolitinib plus low-dose cytarabine or mercaptopurine in patients with blast-phase myelofibrosis

M.S. Fominykh, V.A. Shuvaev, I.S. Martynkevich, L.B. Polushkina, V.Yu. Udal'eva, K.M. Abdulkadyrov

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency; 16 2nd Sovetskaya St., Saint Petersburg, 191024, Russia

Patients with myelofibrosis in blast-phase commonly have a median overall survival of only 3–6 months. Given the older median age of onset and heavy pretreatment, intensive chemotherapy often is not appropriate and has low efficacy with high toxicity. Ruxolitinib (a JAK1/2 inhibitor) has provided significant clinical benefits in patients with chronic phase myelofibrosis. We report our experience of treating blast-phase myelofibrosis patients with the combination therapy of ruxolitinib plus low dose mercaptopurine or low-dose cytarabine. The cases presented here demonstrated the feasibility and tolerability of combination continuous ruxolitinib treatment with mercaptopurine or low-dose cytarabine for patients with blast-phase myelofibrosis. The efficacy of these combination regimens is encouraging.

Key words: myelofibrosis, primary myelofibrosis, blast-phase, ruxolitinib, combination treatment regimen

Введение

При развитии бластной трансформации миелофиброза (МФ) прогноз, как правило, неблагоприятный, медиана выживаемости составляет от 3 до 6 мес [1, 2]. Тактика терапии определяется возрастом пациентов и сопутствующей патологией. При сохранном общесоматическом статусе может быть предпринята попытка проведения курсовой химиотерапии по схемам лечения острых лейкозов, которая приносит временный эффект у небольшой части больных. Пожилым больным с наличием существенной коморбидности и осложнениями МФ целесообразно проведение сдерживающей паллиативной монохимиотерапии и назначение малых доз глюкокортикостероидов. Данные мероприятия направлены на торможение роста опухоли и купирование осложнений (переливание гемокомпонентов, лечение инфекционных осложнений и проч.) в целях улучшения качества жизни больного. Учитывая, что

большинство пациентов к моменту развития бластного криза (БК) имеют низкий общесоматический статус (ECOG 3–4 балла) и сильную предлеченность, проведение высокодозной химиотерапии очень ограничено, а токсичность, которая развивается после лечения, зачастую приводит к фатальным осложнениям [3].

Руксолитиниб (ингибитор янус-киназ) стал первым таргетным препаратом, продемонстрировавшим высокую клиническую эффективность у больных с МФ: уменьшение размеров селезенки, снижение интенсивности симптомов опухолевой интоксикации и увеличение общей выживаемости. Однако руксолитиниб в ходе клинических исследований применяли только у больных в хронической фазе МФ [4].

В последние годы появились первые сообщения о применении руксолитиниба у пациентов с БК МФ. А. Mwirigi и соавт. в 2014 г. опубликовали результаты применения 5-азациитидина или малых доз цитозара

в комбинации с руксолитинибом у больных с БК миело-пролиферативных новообразований (МПН). В ходе применения этого комбинированного режима у 3 пациентов были получены обнадеживающие результаты с увеличением общей выживаемости [5]. R. Deviller и соавт. представили собственный опыт применения руксолитиниба и интенсивной химиотерапии с последующей аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) у 5 больных с БК МПН [6]. К сожалению, подавляющая часть пациентов с БК МФ старше 60 лет и имеет высокий индекс коморбидности, и проведение алло-ТГСК у этой группы больных очень ограничено.

Мы представляем собственный опыт применения комбинированного режима терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у 2 пациентов с БК МФ.

Клинический случай 1

Пациентка 73 лет, диагноз первичного МФ установлен в октябре 2012 г. (DIPSS — высокий риск, CALR (*ins5*) — позитивный, мутация гена *ASXL1* отсутствовала, гемотрансфузионная зависимость, нормальный кариотип, ECOG 2–3 балла). В течение года больная получала терапию гидроксикарбамидом. Прогрессирование заболевания в БК развилось в июле 2013 г. — в костном мозге 56 % бластных клеток (в крови — 81 %), спленомегалия (8 см ниже левой реберной дуги) и конституциональные симптомы. Курс терапии по схеме «5 + 2» (цитозар 200 мг/м²/день × 5 дней + идарубицин 12 мг/м²/день × 2 дня) был неэффективен, уровень бластов в костном мозге увеличился до 70 % и осложнился развитием тромбоцитопении IV степени (15 × 10⁹/л). Назначение руксолитиниба (5 мг 2 раза в день, постоянный прием) и меркаптопурина (50 мг 1 раз в день, каждые 28 дней) привело к исчезновению симптомов опухолевой интоксикации, уменьшению размеров селезенки и снижению потребности в гемотрансфузиях. Согласно критериям ответа для БК МПН максимальный достигнутый эффект оценивался как частичный ответ [7]. Из осложнений, которые наблюдались в ходе лечения: на 6-м месяце терапии развилась внебольничная пневмония (с разрешением после проведенной антибактериальной терапии). Суммарно пациентка получала такой режим комбинированной терапии в течение 10 мес и внезапно умерла дома (возможно, от бактериальной инфекции) спустя 13 мес от момента прогрессирования заболевания.

Клинический случай 2

Пациентка 62 лет с начальным диагнозом истинной полицитемии, которая впоследствии трансформировалась в постполицитемический МФ, *JAK2-V617F*-позитивный (DIPSS — риск промежуточный-1). В ходе лечения истинной полицитемии больная в течение 20 лет получала гидроксикарбамид, интерферон-α, бусульфан и меркаптопурин. В течение последнего года до момента трансформации (август 2015 г.) проводилась терапия гидроксикарбамидом без должного эффекта (отсутствие гематологического ответа). В момент прогрессии в БК у пациентки в костном мозге наблюдался бластоз до 77 % (в крови — 33 %), массивная спленомегалия (16 см ниже левой реберной дуги), нормальный кариотип, обнаружена мутация гена *ASXL1*, появились симптомы опухолевой интоксикации и гемотрансфузионная зависимость (эритроцитсодержащие среды). В течении недели после верификации БК была инициирована индукционная терапия по схеме «7 + 3» (цитозар 200 мг/м²/день × 7 дней + идарубицин 12 мг/м²/день × 3 дня), которая оказалась неэффективна и осложнилась тяжелым сепсисом (*Pseudomonas aeruginosa*). После разрешения инфекционных осложнений и восстановления гемопоэза была начата комбинированная терапия малыми дозами цитозара (20 мг подкожно 2 раза в день в течение 5 дней, каждые 28 дней) и руксолитиниба (20 мг 2 раза в день, постоянный прием). Это привело к драматическому улучшению состояния: уменьшение интенсивности симптомов опухолевой интоксикации, редукция размеров селезенки до 80 % (в сравнении с размерами на момент БК МФ), снижение гемотрансфузионной зависимости. В общей сложности больной было проведено 5 комбинированных курсов терапии без осложнений с достижением стабилизации заболевания. Пациентка умерла спустя 9 мес от даты развития БК от острой дыхательной недостаточности без прогрессирования основного заболевания (в результате двусторонней внебольничной сегментарной пневмонии неуточненной бактериальной этиологии).

Представленные клинические случаи продемонстрировали удовлетворительную переносимость и возможность применения комбинированного режима терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с БК МФ. Несмотря на малое количество наблюдений, этот режим терапии показал обнадеживающие результаты. У пациентов было зарегистрировано снижение интенсивности конституциональных симптомов и уменьшение размеров селезенки с возможностью достижения ответов с минимальными осложнениями и токсичностью. Мы планируем в дальнейшем применять этот комбинированный режим лечения.

Заключение

Представленные клинические случаи продемонстрировали удовлетворительную переносимость и возможность применения комбинированного режима терапии руксолитинибом и малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с БК МФ. Несмотря на малое количество наблюдений, этот режим терапии показал обнадеживающие результаты. У пациентов было зарегистрировано снижение интенсивности конституциональных симптомов и уменьшение размеров селезенки с возможностью достижения ответов с минимальными осложнениями и токсичностью. Мы планируем в дальнейшем применять этот комбинированный режим лечения.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Mesa R.A., Li C.Y., Ketterling R.P. et al. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105(3):973–7.
2. Tam C.S., Nussenzweig R.M., Popat U. et al. The natural history and treatment outcome of blast phase BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2008;112(5):1628–37. DOI: 10.1182/blood-2008-02-138230.
3. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза. *Вестник гематологии* 2013;9(3):44–78. [Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Criteria for diagnosis and modern methods of treatment of primary myelofibrosis. *Vestnik gematologii = Journal of Hematology* 2013; 9(3):44–78. (In Russ.)].
4. Verstovsek S., Mesa R.A., Gotlib J. et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 2012;366(9):799–807. DOI: 10.1056/NEJMoa1110557.
5. Mwirigi A., Galli S., Keohane C. et al. Combination therapy with ruxolitinib plus 5-azacytidine or continuous infusion of low dose cytarabine is feasible in patients with blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2014;167(5):714–6. DOI: 10.1111/bjh. 13046.
6. Devillier R., Raffoux E., Rey J. et al. Combination therapy with ruxolitinib plus intensive treatment strategy is feasible in patients with blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2016;172(4):628–30. DOI: 10.1111/bjh. 13516.
7. Mascarenhas J., Heaney M.L., Najfeld V. et al. Proposed criteria for response assessment in patients treated in clinical trials for myeloproliferative neoplasms in blast phase(MPN-BP): formal recommendations from the post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemia consortium. *Leuk Res* 2012;36(12):1500–4. DOI: 10.1016/j.leukres. 2012.08.013.

Сравнительный анализ методов генотипирования минорных антигенов гистосовместимости

А.С. Вдовин¹, А.М. Постовская^{1,2}, Н.А. Быкова¹, Д.С. Романюк¹, А.Х. Алиева³, П.Р. Ефимова^{1,2},
С.А. Шитиков², У.Л. Джулакян¹, Г.А. Ефимов¹

¹ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Россия, 119991, Москва, ул. Ленинские Горы, 1;

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики Российской академии наук»; Россия, 123182, Москва, площадь академика И.В. Курчатова, 2

Контакты: Григорий Александрович Ефимов grigory@efimov.info

Для определения различий донора и реципиента по минорным антигенам гистосовместимости при трансплантации могут быть использованы разнообразные подходы. В настоящей работе нами был проведен сравнительный анализ методов генотипирования, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), для четырех минорных антигенов. Три метода: аллель-специфичная ПЦР, анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов и ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan продемонстрировали 100% достоверность результатов генотипирования при сравнении с секвенированием по Сэнгеру для всех изученных полиморфизмов. Метод анализ кривых плавления оказался неприменимым для генотипирования одного минорного антигена (HA-1), имеющего сцепленный синонимичный полиморфизм. Полученная информация может быть использована при выборе метода для крупномасштабного генотипирования в клинической практике.

Ключевые слова: минорные антигены гистосовместимости, однонуклеотидные полиморфизмы, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, генотипирование, аллельная дискриминация.

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-40-50

Comparative analysis of minor histocompatibility antigens genotyping methods

A.S. Vdovin¹, A.M. Postovskaya^{1,2}, N.A. Bykova¹, D.S. Romaniuk¹, A.K. Alieva³, P.R. Yefimova^{1,2},
S.A. Sheetikov², H.L. Julhakyann¹, G.A. Efimov¹

¹National Research Center for Hematology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation;
4 Novy Zyikovskiy pr., Moscow, 125167, Russia;

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Goryi St., Moscow, 119991, Russia;

³The Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences; 2, Kurchatova Sq., Moscow, 123182, Russia

The wide range of techniques could be employed to find mismatches in minor histocompatibility antigens between transplant recipients and their donors. In the current study we compared three genotyping methods based on polymerase chain reaction (PCR) for four minor antigens. Three of the tested methods: allele-specific PCR, restriction fragment length polymorphism and real-time PCR with TaqMan probes demonstrated 100% reliability when compared to Sanger sequencing for all of the studied polymorphisms. High resolution melting analysis was unsuitable for genotyping of one of the tested minor antigens (HA-1) as it has linked synonymous polymorphism. Obtained data could be used to select the strategy for large-scale clinical genotyping.

Keywords: minor histocompatibility antigen, single nucleotide polymorphism, allogeneic hematopoietic stem cells transplantation, genotyping, allelic discrimination

Введение

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) широко применяется для лечения гемобластозов. При алло-ТГСК клетки иммунной системы пациента уничтожаются методом предтрансплантационного кондиционирования и заменяются клетками иммунной системы донора [1]. Помимо восстановления кроветворения, трансплантация за счет иммунного ответа донорских Т-клеток против клеток хозяина приводит к элиминированию остаточных опухолевых клеток. Аллореактивность против злокаче-

ственного клона получила название реакции «трансплантат против опухоли» (РТПО). Однако зачастую в ходе посттрансплантационного иммунного ответа поражаются и здоровые ткани пациента (реакция «трансплантат против хозяина», РТПХ). Оба эти эффекта имеют одинаковую природу и зависят от совместимости донора и реципиента по главному комплексу гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС) и минорным антигенам гистосовместимости (Minor Histocompatibility Antigens, MiHA). Главный комплекс гистосовместимости — группа поверхностных белков,

чей основной функцией является презентация внутриклеточных (МНС I класса) и внеклеточных (МНС II класса) антигенов Т-лимфоцитам. Гены, кодирующие эти белки (Human Leukocyte Antigen, HLA), высокополиморфны [2], т. е. полное совпадение по этим генам у неродственных людей – редкое событие. В то же время существенное различие по аллелям МНС при трансплантации стволовых клеток крови влечет за собой выраженную и потенциально летальную РТПХ [3]. По этой причине были созданы специальные банки для подбора доноров, совместимых по аллелям МНС. Но даже полное совпадение по генам МНС не может полностью предотвратить аллореактивность. Впервые РТПХ при HLA-идентичной ТГСК была описана в 1970 годы [4]. Мишени аллореактивных Т-клеток получили название Минорных антигенов. Потребовалось почти 20 лет, чтобы охарактеризовать MiHA на молекулярном уровне [5]. Выяснилось, что это пептиды, презентируемые на поверхности клеток реципиента в контексте общего с донором аллеля МНС. Тот факт, что они вызывают иммунный ответ, указывает на то, что они не были представлены в ходе негативного отбора в тимусе донора.

Причина существования MiHA – полиморфизм человеческого генома [6]. Небольшие различия в белковых последовательностях между индивидуумами приводят к различным наборам пептидов, получающимся вследствие расщепления белков протеасомой, и в конечном итоге к разным наборам пептидов, представленным на поверхности клеток в МНС. Известно всего несколько MiHA, обусловленных структурными вариантами генома (делеция гена) [7], тогда как происхождение большинства MiHA вызвано присутствием однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), благодаря которым два гомологичных пептида донора и реципиента отличаются друг от друга лишь 1 аминокислотой [8]. Из-за диплоидности генома необходимыми условиями возникновения MiHA являются гомозиготность донора по одному (неиммуногенному) аллелю и присутствие хотя бы одного варианта альтернативного (иммуногенного) аллеля у донора. Количество таких комбинаций полиморфизмов в каждой паре донор–реципиент велико – более 3000 [9], однако не все потенциально иммуногенные комбинации приводят к появлению иммунного ответа на MiHA [10]. На сегодняшний день идентифицированы около 50 полиморфизмов, связанных с MiHA, иммуногенность которых подтверждена экспериментально [8]. Различие, различие донора и реципиента (пациента) по этим полиморфизмам указывает на мишени аллореактивного ответа в данной паре донор–пациент, что позволяет изучить влияние конкретных MiHA на РТПО и РТПХ.

Описание свойств MiHA позволит предсказывать уровень иммунного ответа при алло-ТГСК и своевременно корректировать курс лечения. В перспективе предсказание мишеней аллореактивности позволит селективно модифицировать трансплантат [11].

Генотипирование полиморфизмов методом аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) было описано для минорных антигенов HA-1 [12], HA-2 [13] и HA-3 [14]. В этом методе используются два прямых праймера, комплементарных своим 3'-концом к одному или другому аллельному варианту ОНП гена MiHA, и один общий обратный праймер. Одну и ту же пробу анализируют в двух параллельных реакциях с помощью двух пар праймеров, затем результат ПЦР визуализируют при помощи гель-электрофореза. Аллельная дискриминация обеспечивается тем, что присоединение полимеразой нуклеотидов к 3'-концу праймера происходит при полном связывании праймера на 3'-конце, т. е. при полной комплементарности в месте ОНП. Однако на практике различие в один нуклеотид не всегда достаточно для обеспечения избирательного синтеза полимеразой, что может затруднять аллельную дискриминацию [15]. Еще одним фактором, важным для последующего клинического применения, является возможность проведения анализа для максимального числа полиморфизмов одновременно. Одновременного типирования нескольких MiHA методом АС-ПЦР существуют ограничения: так как специфичность реакции амплификации достигается за счет того, что 3'-конец одного из праймеров приходится на целевой полиморфизм, число возможных вариантов праймеров сильно ограничено, соответственно, ограничены и свойства олигонуклеотидов. Вариант параллельного типирования на 10 аутосомных MiHA методом АС-ПЦР был описан ранее [16] (табл. 1).

В данной работе мы исследовали применимость альтернативных методов генотипирования для одновременного анализа MiHA-полиморфизмов.

Метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) основан на способности эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) специфически узнавать определенные последовательности ДНК и расщеплять обе нити ДНК в месте или рядом с местом узнавания [17]. Для генотипирования ОНП должен находиться в сайте узнавания рестриктазы, при этом один из аллельных вариантов должен приводить к исчезновению сайта. Это означает, что для каждого гена MiHA требуется подбирать свою рестриктазу. Аллельная дискриминация проводится путем наработки фрагментов, содержащих исследуемый ОНП, методом ПЦР и последующей их инкубации со специфичной рестриктазой. Затем длина получившихся продуктов рестрикции анализируется агарозным гель-электрофорезом. Этот метод дешев и не требует синтеза специальных флуоресцентных зондов, а существующее на сегодняшний день разнообразие эндонуклеаз рестрикции позволяет подобрать специфичные рестриктазы для почти любого полиморфизма.

Метод плавления в высоком разрешении (ПВР) основан на различии термостабильности двухцепочечных фрагментов ДНК с полностью комплементарными нитями и фрагментов с одним или несколькими

Таблица 1. Проанализированные минорные антигены гистосовместимости

| МiNA | Идентификатор полиморфизма в dbSNP | Частота в популяции | Ген | Расположение | Хромосома | Нуклеотид | Аминокислота | Пептид | Аллель МНС | Иммуногенность | Тканеспецифичность |
|--------|------------------------------------|---------------------|--------|--------------|-----------|-----------|--------------|---------------------|-------------|----------------|------------------------|
| HA-1 | rs1801284 | 0,404752 | HMHA1 | экзон | 19 | A | H | VL <u>H</u> DDLLEA | HLA-A*02:01 | да | Миелоидная, лимфоидная |
| | | G | | | | R | VLRDDLLEA | нет | | | |
| | | 0,404752 | | | | A | H | KECVL <u>H</u> DDL | HLA-B*40:01 | да | |
| | | 0,595248 | | | | G | R | KECVLRDDLL | | нет | |
| HA-2 | rs61739531 | 0,863019 | MYO1G | экзон | 7 | G | V | YIGEVLV <u>S</u> Y | HLA-A*02:01 | да | Миелоидная, лимфоидная |
| | | 0,136981 | | | | A | M | YIGEVLV <u>S</u> M | | нет | |
| ACC-1Y | rs1138357 | 0,352037 | BCL2A1 | экзон | 15 | A | Y | DYLQ <u>Y</u> VLQI | HLA-A*24:02 | да | Миелоидная, лимфоидная |
| ACC-1C | | 0,647963 | | | | G | C | DYLQ <u>C</u> VLQI | | да | |
| ACC-2 | rs3826007 | 0,203474 | BCL2A1 | экзон | 15 | A | D | KEFED <u>D</u> IINW | HLA-B*44:03 | да | Миелоидная, лимфоидная |
| | | 0,796526 | | | | G | G | KEFED <u>G</u> IINW | | нет | |

Примечания. Жирным шрифтом и подчеркиванием выделены варианты аминокислоты.

неспаренными нуклеотидами. В качестве способа детекции используют интеркалирующие флуоресцентные красители, интенсивность свечения которых возрастает на порядок при включении в образуемые двухцепочечные фрагменты ДНК. За амплификацией исследуемого участка следуют постепенное нагревание проб и регистрация флуоресценции в реальном времени. Ожидается, что образцы, в которых сформировались гетеродуплексы, раньше начнут денатурировать, образуя отдельные нити и высвобождая краситель, при этом из-за свойств красителя свечение в образце понижается. По результатам серии измерений программой формируются кривые плавления двухцепочечных фрагментов [18, 19]. При этом различие лишь по одному нуклеотиду при длине фрагмента до 300 пар оснований вносит достаточные изменения в форму кривой плавления. Сравнивая кривые плавления контролей и образцов, можно определить гетерозиготу и оба гомозиготных варианта. Этот метод генотипирования образцов не требует дополнительных манипуляций (обработка рестриктазами, электрофоретический анализ).

Генотипирование ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan — метод, требующий специальных составных олигонуклеотидов — TaqMan-зондов, двумя концами конъюгированных с флуоресцентными красителями: сигнальным флуорофором на 5'-конце и гасящим флуорофором на 3'-конце. Спектр излучения сигнальной метки совпадает со спектром поглощения гасителя,

поэтому, когда обе молекулы связаны вместе олигонуклеотидом, свет сигнальной молекулы поглощается гасящим флуорофором. В такой ПЦР-РВ используются четыре олигонуклеотида: два праймера для амплификации, фланкирующие область полиморфизма, и два аллель-специфичных TaqMan-зонда, связанные с двумя различными красителями, детектируемыми в разных флуоресцентных каналах. Зонды отличаются на один нуклеотид и комплементарны участку, непосредственно окружающему ОНП. На этапе элонгации в ходе ПЦР Taq-полимераза с 5'-экзонуклеазной активностью, двигаясь от праймера, может наткнуться на зонд, связавшийся с этой же нитью в месте полиморфизма. В этом случае полимеразы расщепляет этот зонд и сигнальная метка разобщается с гасителем, в результате чего возникает флуоресцентный сигнал, который далее нарастает за счет экспоненциального накопления продуктов ПЦР и, соответственно, возрастающего количества сайтов связывания и расщепления зондов. При правильно подобранной температуре реакции не полностью комплементарный зонд связывается менее стабильно, поэтому флуоресценция от другого красителя не наблюдается или ее рост значительно замедлен. В результате оба аллеля могут быть обнаружены в ходе одной реакции в одной пробирке в режиме ПЦР-РВ, что требует минимальных временных затрат. Зная соответствующий красителю TaqMan-зонда аллель, можно по графикам роста флуоресценции раз-

делить тестируемые образцы на гомо- и гетерозиготы. Наглядно разделить аллели можно, если построить двумерный график на основе данных флуоресценции для обоих красителей с одного из поздних циклов ПЦР-РВ.

Для сравнительного исследования были выбраны следующие MiHA: HA-1, HA-2, ACC-1 и ACC-2. При выборе мы учитывали клиническую важность: соответствующие этим MiHA полиморфизмы часто встречаются в популяции (следовательно, возникновение иммуногенной комбинации генотипов донора и реципиента высоко вероятно). Аллели HLA, представляющие эти MiHA, также относятся к наиболее распространенным (см. табл. 1), кроме того, ранее был разработан протокол AC-ПЦР для этих MiHA [16]. Помимо этого, данные MiHA специфичны для гемопоэтических клеток, что делает их перспективными с точки зрения разделения эффектов РТПО и РТПХ. Так, для HA-1, HA-2 и ACC-1 было показано, что появление специфичных к ним Т-клеток предшествует ремиссии после инфузии лимфоцитов донора [20, 21].

Материалы и методы

Выделение геномной ДНК. Геномная ДНК была выделена из крови 10 здоровых доноров с помощью набора WizardGenomic DNA Purification Kit (Promega, США) согласно протоколу производителя.

Подготовка контрольных матриц. Для контроля всех методов анализа ОНП были сконструированы плазмиды, содержащие фрагменты геномной ДНК с обоими аллельными вариантами исследуемых ОНП. Для этого с тотальной ДНК доноров, с помощью рекомбинантной полимеразы Pfu (Thermo Scientific, США) нарабатывались фрагменты ДНК, содержащие изучаемые ОНП. Полученные фрагменты очищались электрофоретически в 1,5 % агарозном геле, для выделения ДНК из геля использовался Gene Jet Gel Extraction Kit

(Thermo Scientific, США). Фрагменты лигировались в вектор pJET1.2 с помощью CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США) по тупым концам. Компетентные клетки штамма *E. coli* штамма DH5α, полученные кальциевым способом, трансформировали полученными плазмидами методом теплового шока. После отбора на селективном агаре колонии культивировались ночь в инкубаторе при 37°C, затем плазмидную ДНК выделяли с помощью GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США). Все полученные контрольные матрицы были проверены секвенированием по Сэнгеру (Евроген) [22].

АС-ПЦР. Условия амплификации искомым фрагментов геномной ДНК методом аллель-специфичной ПЦР, состав смеси ПЦР и последовательности праймеров (табл. 2) с небольшими изменениями были заимствованы из ранее опубликованной работы [16]. ПЦР-смесь содержала 80 нг геномной ДНК, 0,25 Ед. Taq-полимеразы (ThermoScientific, США), 0,01 % желатина, 0,2 мМ dNTP (ThermoScientific, США), по 0,5 мкМ праймеров (Евроген, Россия), 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3) и 6 % сахарозы (S7903, Sigma-Aldrich, Германия). Для увеличения выхода ПЦР концентрация праймеров для HA-1 была удвоена. Концентрация dNTP была снижена с 0,8 мМ до 0,2 мМ, поскольку исходная концентрация значительно превышала оптимальную и ингибировала реакцию. Цикл амплификации начинался с 2 мин при 94°C, затем 10 циклов: 10 с на 94°C и 60 с на 65°C, далее 20 циклов проходили при следующих условиях: 10 с на 94°C, 50 с на 61°C, 30 с на 72°C. Образцы были проанализированы при помощи электрофореза на 2 % агарозном геле.

Подбор праймеров для ПВР и TaqMan-ПЦР. Подбор праймеров, фланкирующих полиморфные регионы (см. табл. 2), производился с использованием программ Beacondesigner 7.0 и Primer 3 [23]. Во избежание попадания праймеров на другие ОНП, для каждого

Таблица 2. Последовательности праймеров для аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

| MiHA | Аллельный вариант (вариантная аминокислота) | Прямой праймер | Обратный праймер |
|-------|---|--------------------------|---------------------------------|
| HA-1 | H | CTTAAGGAGTGTGTGCTGCA | ACTCCTACACATCCCTCAGA |
| HA-1 | R | CTTAAGGAGTGTGTGTTGCG | |
| HA-2 | V | ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG | GCTCCTGGTAGGGGTTTCAС |
| HA-2 | M | | GCTCCTGGTAGGGGTTTCAT |
| ACC-1 | Y | CATTGCCTCAACAGCTTCAAG | GGTTGTGGTATCTGTAGG <u>G</u> CGT |
| ACC-1 | C | | GGTTGTGGTATCTGTAGG <u>G</u> CGC |
| ACC-2 | D | GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCGA | CAGCCTCCGTTTTGCCTTATC |
| ACC-2 | G | GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCGG | |

Примечание. Приведены 5'-3'-последовательности олигонуклеотидов. Жирным шрифтом выделены аллель-специфичные нуклеотиды на 3'-конце, подчеркиванием – дополнительные замены, внесенные для увеличения специфичности полимеразной цепной реакции.

ОНП были взяты фланкирующие нуклеотидные последовательности из генома человека версии hg38 (UCSCGenomeBrowser — <http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg38/database/>), на которых отмечались варианты нуклеотидных полиморфизмов из базы данных dbSNP версии 142 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/snp/database>), встречающиеся более чем в 1 % человеческой популяции. Проверка на специфичность подобранных праймеров к исследуемым областям генома проводилась с помощью ресурса Primer-Blast, NCBI.

ПЦРФ. Фрагменты, содержащие исследуемые ОНП, амплифицировались с помощью ПЦР. В реакционную смесь входили 1,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ dNTP, 0,5 мкМ прямого праймера, 0,5 мкМ обратного праймера, Taq-полимераза (ThermoScientific, США), буфер для Taq-полимеразы с KCl (ThermoScientific, США) и 10 нг геномной ДНК. Контрольные пробы содержали 0,5 нг контрольной матрицы. ПЦР проходила при следующих температурных условиях: 95 °С – 5 мин, 30 циклов; 95 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 8 сек, 72 °С – 5 мин.

После завершения реакции амплификации непосредственно в ПЦР-смесь добавляли соответствующие эндонуклеазы: для HA1 и HA2 – 2 Ед. FatI (СибЭнзим, Россия), ACC1 – 10 Ед. RsaI (СибЭнзим, Россия), ACC2 – 10 Ед. SfaNI (СибЭнзим, Россия). Рестрикция проходила в течение 30 минут при 37 °С. Получившиеся фрагменты разделялись в 10 % полиакриламидном геле, приготовленном на однократном TBE буфере. Для визуализации гель помещали в раствор бромистого этидия (0,5 мкг/мл) и инкубировали, перемешивая, 15 минут. Анализ аллельных вариантов проводили по наличию фрагментов ДНК определенной длины (табл. 3).

ПЦР-РВ с использованием технологии TaqMan. Для амплификации фрагментов геномной ДНК, содержащих изучаемые полиморфизмы, методом ПЦР-РВ использовались подобранные, как описано выше, праймеры, приведенные в таблице 4. Подбор TaqMan-

зондов, комплементарных полиморфному региону, производился с использованием программ Beacon Designer 7.0 и Primer3 [23]. Использовались флуоресцентные красители – FAM и HEX и гаситель флуоресценции BHQ1.

Список использованных флуоресцентных зондов (выделен нуклеотид, комплементарный соответствующему полиморфизму):

HA1-G: 5' – FAM-TGGCTCTCACCGTCACGCAACACA-BHQ1-3'

HA1-A: 5' – HEX-TGGCTCTCACCGTCATGCAACACA-BHQ1-3'

HA2-C: 5' – FAM-TGGTGTCCGTGAACCCCTAC-BHQ1-3'

HA2-T: 5' – HEX-TGGTGTCCATGAACCCCTAC-BHQ1-3'

ACC1-C: 5' – FAM-CTATCTGCAGTGCGTCCTACAGAG-BHQ1-3'

ACC1-T: 5' – HEX-CTATCTGCAGTACGTCCTACAGAG-BHQ1-3'

ACC2-C: 5' – FAM-AGTTTGAAGACGGCATCAT-TAACTGG-BHQ1-3'

ACC2-T: 5' – HEX-AGTTTGAAGACGACATCAT-TAACTGG-BHQ1-3'.

ПЦР-РВ проводили на приборе CFX96 (BioRad, США). В состав 25 мкл реакционной смеси входили 10 нг ДНК, по 400 нМ прямого и обратного праймеров, по 100 нМ каждого из двух зондов, qPCRmix-HS (Евроген, Россия), содержащий HSTaq ДНК-полимеразу, смесь нуклеотидтрифосфатов, Mg²⁺ и реакционный буфер. Каждый образец анализировался в трех повторностях. Цикл амплификации начинался с 60 сек при 50 °С, затем 300 сек – 95 °С, далее 40 циклов: 95 °С – 10 сек, 62,5 °С – 20 сек, 72 °С – 30 сек. Аллельная дискриминация ОНП производилась при помощи программного обеспечения BioRad CFXManager 3.1.

Метод ПВР. Для амплификации фрагментов геномной ДНК, содержащих изучаемые полиморфизмы, методом ПВР использовались праймеры (таблица 4), подобранные и проанализированные с использованием алгоритма программы Primer3 [23]. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 80–100 пар нуклеотидов и включал в себя полиморфизм. Реакция ПЦР-РВ проводилась в смеси Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США) при рекомендованных производителем условиях, после чего снималась кривая плавления полученного продукта. Кривые плавления были проанализированы при помощи программного обеспечения Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США), присутствие аллельных вариантов в пробах определялось по кластеризации кривых плавления образцов с кривыми, полученными на контрольных матрицах.

Секвенирование по Сэнгеру

ПЦР-амплификация кодирующих MiHA участков проводилась Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразой (Thermo Scientific, США).

Таблица 3. Длина фрагментов при типировании методом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

| МиНА | Аллель | Рестриктаза | Наличие сайта рестрикции | Длина фрагментов с учетом липких концов п. н. |
|------|--------|-------------|--------------------------|---|
| HA1 | A | FatI | + | 85 и 54 |
| | G | | - | 135 |
| HA2 | G | | - | 135 |
| | A | | + | 100 и 39 |
| ACC1 | A | RsaI | + | 47 и 69 |
| | G | | - | 116 |
| ACC2 | A | SfaNI | - | 126 |
| | G | | + | 70 и 60 |

Таблица 4. Последовательности праймеров, использованных для генотипирования (в направлении 5'–3')

| МиНА | Ал- лель | Прямой праймер | Обратный праймер | Фрагмент, п. н. | Метод |
|-------|-------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|---|
| HA-1 | H | CTTAAGGAGTGTGTGCTGCA <u>A</u> | ACTCCTACACATCCCTCAGA | 190 | АС-ПЦР |
| | R | CTTAAGGAGTGTGTGTTGC <u>G</u> | | | |
| | H, R | GTCGTCGAGGACATCTCCC | TCTGGCTCTGTCTTCCACC | 135 | TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру |
| | H, R | GCTGAGGGCCTTGAGAACT | CTTGGGTCTGGCTCTGTCTT | 96 | ПВР |
| HA-2 | V | ACAGTCTCTGAGTGGCTCAG | GCTCCTGGTAGGGGTTCA <u>C</u> | 271 | АС-ПЦР |
| | M | | GCTCCTGGTAGGGGTTCA <u>T</u> | | |
| | V, M | CACAGCATAGAGATGGGGTG | CGCATCTACACCTACATCGG | 135 | TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру |
| | V, M | AGGGGCAGCTCCTGGTAG | TGTGTCCAGGTTTCGAGAAGG | 84 | ПВР |
| ACC-1 | Y | CATTGCCTCAACAGCTTCAAG | GGTTGTGGTATCTGTAGGGCG <u>T</u> | 137 | АС-ПЦР |
| | C | | GGTTGTGGTATCTGTAGGGCG <u>C</u> | | |
| | Y, C | CCACCAGGCAGAAGATGACA | GGACGTTTTGCTTGGACCTG | 116 | TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру |
| | Y, C | AGCACTCTGGACGTTTTGCT | CAGGCTGGCTCAGGACTATC | 81 | ПВР |
| ACC-2 | D | GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCG <u>A</u> | CAGCCTCCGTTTTGCCTTATC | 197 | АС-ПЦР |
| | G | GATGGAAAAGGAGTTTGAAGGCG <u>G</u> | | | |
| | D, G | CGTAGACACTGCCAGAACACTATT | CGTAGAAGTTTCTT GATGAGAATACCTTC | 126 | TaqMan ПЦР, ПДРФ, секвенирование по Сэнгеру |
| | D, G | CCGTAGACACTGCCAGAACA | TGGTTACAATTCTTCCCCAGT | 87 | ПВР |

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция, АС-ПЦР – аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов. Подчеркиванием отмечены аллель-специфичные нуклеотиды.

Плазмиды рJET и продукты ПЦР секвенировались в компании «Евроген» (Москва).

Для амплификации исследуемого фрагмента и его секвенирования применялись те же праймеры, что и для ПЦР-РВ. Для секвенирования плазмиды рJET применялись универсальные праймеры для этой плазмиды («Евроген», Россия): прямой праймер рJET – CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC, обратный праймер – AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG.

Результаты секвенирования анализировались с помощью программного обеспечения CLC Genomics Workbench (QIAGEN, Германия) и Geneious Pro (Biomatters, Новая Зеландия).

Результаты и обсуждение

Образцы ДНК от 10 доноров были протипированы с использованием 5 методов. Результаты АС-ПЦР (рис. 1), ПДРФ (рис. 2), ПЦР-РВ с использованием зондов TaqMan (рис. 3) и секвенирования по Сэнгеру совпали (табл. 5).

Секвенирование по Сэнгеру выступало в данном случае как контроль качества типирования. Полученные результаты говорят о надежности указанных методов. Выбор между ними зависит от области применения типирования по МиНА, которая, в свою очередь, определяет оптимальное сочетание временных и финансовых затрат, простоты и прочих параметров.

АС-ПЦР и ПДРФ – наиболее дешевые из всех описанных методов, однако они проигрывают по показателю затрачиваемого на анализ времени. В обоих случаях для получения конечного результата требуется разделение продуктов ПЦР при помощи электрофореза. АС-ПЦР осложняется тем, что на каждый образец требуется ставить 2 реакции. Кроме того, поскольку один из праймеров для АС-ПЦР строго привязан к полиморфизму, это осложняет подбор условий для унифицированного типирования одновременно большой панели МиНА. Этот метод обычно применяется для определения аллельных вариантов при исследовании отдельных МиНА, но не подходит для масштаб-

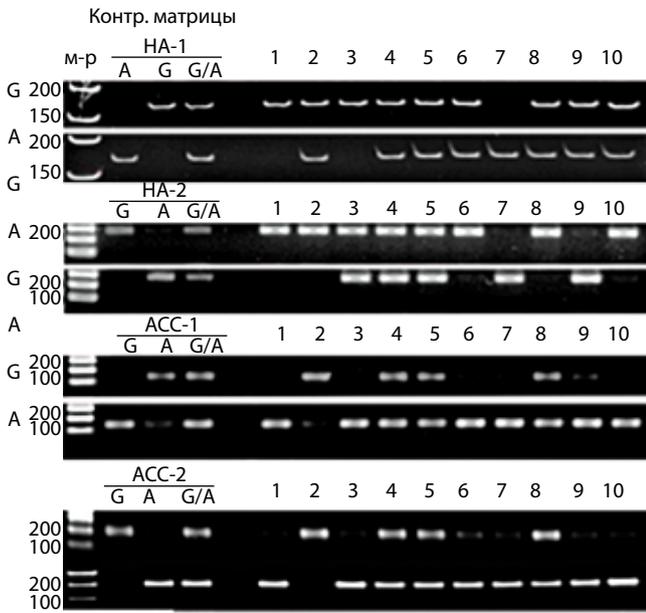


Рис. 1. Типирование образцов ДНК при помощи аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

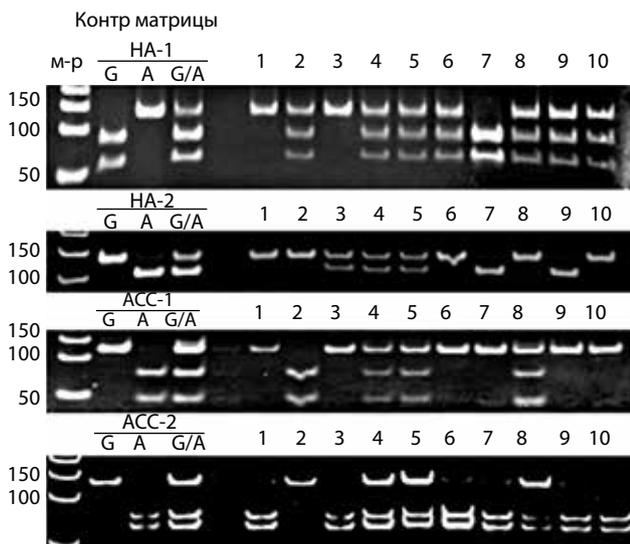


Рис. 2. Типирование образцов ДНК при помощи анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов

ного типирования, что потенциально востребовано в клинике.

ПДРФ помимо электрофоретического анализа включает еще одну дополнительную стадию – реакцию рестрикции. При типировании панелей MiNA возникает необходимость использования большого набора эндонуклеаз, что не только увеличивает время анализа, но и повышает вероятность ошибки. Кроме того, для эффективной работы некоторых рестриктаз может потребоваться этап очистки ДНК после амплификации и/или большее время инкубации. Необходимость электрофоретического анализа для АС-ПЦР и ПДРФ также создает угрозу контаминации рабочего пространства и реагентов продуктами ПЦР, особенно

при регулярном проведении типирования, что может послужить причиной ложно-положительных результатов.

Метод ПЦР-РВ с использованием флуоресцентных зондов TaqMan требует минимальных затрат по времени и позволяет получить результат типирования сразу после проведения ПЦР. После отработки условий этот метод возможно масштабировать для типирования большого числа доноров на целые панели MiNA. Ограничением является лишь относительно высокая стоимость реагентов.

Метод анализа кривых плавления показал надежные результаты только для 3 из 4 исследуемых MiNA: HA-2, ACC-1 и ACC-2. В случае HA-1 обработка результатов позволяет отличить только гомозиготные образцы от гетерозиготных (рис. 4). Для всех MiNA в изучаемом полиморфизме пара G/C в одном аллельном варианте заменяется на A/T в другом. Такие замены являются наиболее распространенными среди ОНП, и обычно разница в энергии связывания между ними позволяет детектировать изменения в кривых плавления.

Более редкие замены G/C на C/G и A/T на T/A определить гораздо труднее, и это не всегда удается. Для полиморфизма rs3764653, дающего начало антигену HA-1, ситуация осложняется еще и тем, что всего в 3 нуклеотидах от него находится сцепленный полиморфизм rs1801284, таким образом, замена G/C на A/T в rs3764653 всегда сопровождается заменой T/A на C/G в rs1801284, что не дает значительного изменения в энергии связывания. Тем не менее такой случай не относится к числу распространенных, и метод ПВР может применяться для типирования других MiNA. Это важно, поскольку по скорости анализа и простоте он практически не уступает ПЦР-РВ и при этом более экономически выгодный.

Заключение

Основное внимание при выборе оптимального метода следует уделить таким параметрам, как затрачиваемое на анализ время, стоимость анализа и возможность масштабирования для большого числа пациентов и изучаемых полиморфизмов. Экономически самые выгодные – АС-ПЦР и ПДРФ. Однако, если перед исследователем стоит задача массового и регулярного генотипирования больших объемов образцов, более перспективными представляются методы, не требующие дополнительных манипуляций после проведения ПЦР. Метод ПВР показал свою эффективность для 3 из 4 изучаемых полиморфизмов. Неприменимость ПВР для типирования HA-1 обусловлена особенностями строения участка ДНК, а именно наличием близлежащего сцепленного полиморфизма. Метод ПЦР-РВ сочетает в себе универсальность и быстроту получения результатов, ограничением для его применения является лишь его относительно высокая стоимость.

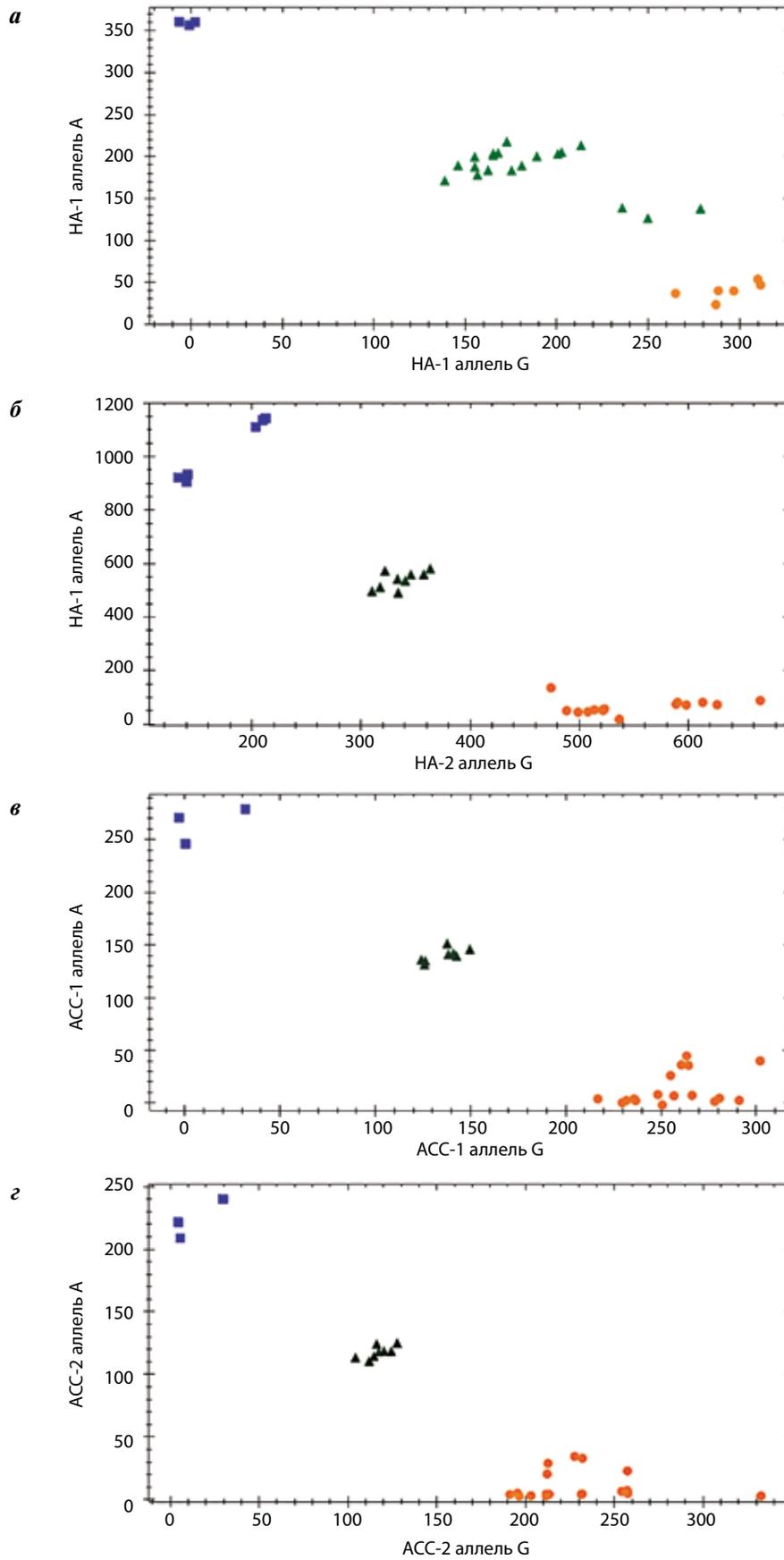


Рис. 3. Аллельная дискриминация образцов ДНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием зондов TaqMan: HA-1 (а), HA-2 (б), ACC-1 (в), ACC-2 (г). По осям X и Y отложена флуоресценция в каналах FAM и HEX. Различными значками обозначены кластеризующиеся по уровню флуоресценции образцы

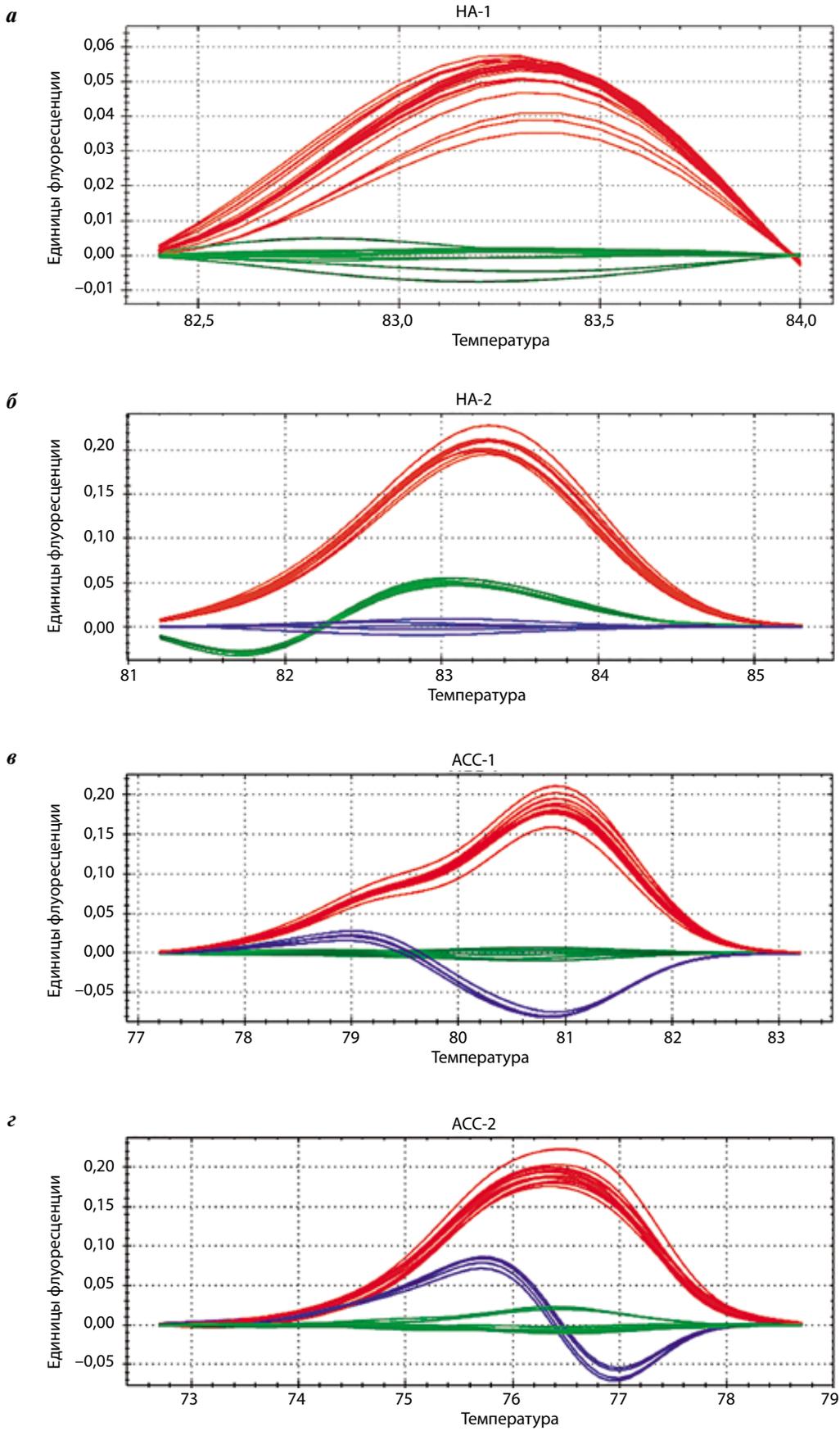


Рис. 4. Типирование образцов ДНК при помощи метода плавления в высоком разрешении: HA-1 (а), HA-2 (б), ACC-1 (в), ACC-2 (г). Приведены графики скорости изменения интенсивности флуоресценции от температуры. Различными цветами обозначены кластеризующиеся образцы

Таблица 5. Сводная таблица результатов типирования

| Донор | MiHA | Метод типирования | | | | |
|-------|-------|-------------------|------|--------------------|--------|---------------------------|
| | | АС-ПЦР | ПДРФ | ПВР | TaqMan | Секвенирование по Сэнгеру |
| 1 | HA-1 | G/G | G/G | G/G или A/A | G/G | G/G |
| | HA-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| 2 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-1 | A/A | A/A | A/A | A/A | A/A |
| | ACC-2 | A/A | A/A | A/A | A/A | A/A |
| 3 | HA-1 | G/G | G/G | G/G или A/A | G/G | G/G |
| | HA-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| 4 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| 5 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| 6 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| 7 | HA-1 | A/A | A/A | G/G или A/A | A/A | A/A |
| | HA-2 | A/A | A/A | A/A | A/A | A/A |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| 8 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | ACC-2 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| 9 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | A/A | A/A | A/A | A/A | A/A |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| 10 | HA-1 | G/A | G/A | G/A | G/A | G/A |
| | HA-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-1 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |
| | ACC-2 | G/G | G/G | G/G | G/G | G/G |

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Talmadge J.E. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2003;3(8):1121–43. DOI: 10.1016/S1567–5769(03)00014–6; PMID: 12860168.
2. Marsh S.G. and WHO Nomenclature Committee for Factors of HLA System. System, nomenclature for factors of the HLA system, update December 2015. *HLA*, 2016;87(2):126–30 DOI: 10.1111/tan. 12745; PMID: 26889910.
3. Felix N.J., Allen P.M. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(12):942–53. DOI: 10.1038/nri2200; PMID: 18007679.
4. Goulmy E., Termijtelen A., Bradley B.A., van Rood J.J. Alloimmunity to human H-Y. *Lancet* 1976;2(7996):1206. PMID: 63036.
5. den Haan J.M., Sherman N.E., Blokland E. et al. Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. *Science* 1995;268(5216):1476–80. PMID: 7539551.
6. Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А. и др. Иммунобиология острой реакции «трансплантат против хозяина. Медицинская иммунология 2015;17(6):499–516. [Efimov G.A., Vdovin A.S., Grigoryev A.A. et al. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical immunology* 2015;17(6):499–516 (In Russ.)]. DOI:10.15789/1563-0625-2015-6-499-516.
7. Murata M., Warren E.H., Riddell S.R. A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med.* 2003;197(10):1279–89. DOI: 10.1084/jem. 20030044; PMID: 12743171.
8. Griffioen M., van Bergen C.A., Falkenburg J.H. Autosomal minor histocompatibility antigens: how genetic variants create diversity in immune targets. *Front Immunol.* 2016;7:100. DOI: 10.3389/fimmu. 2016.00100; PMID: 27014279.
9. Быкова Н.А., Малько Д.Б., Вдовин А.С., Ефимов Г.А. In silico анализ иммуногенного потенциала однонуклеотидных полиморфизмов при полностью HLA-совместимой трансплантации. *Российский иммунологический журнал* 2016; 10(19)(1):39–49. [Bykova N.A., Malko D.B., Vdovin A.S., Efimov G.A. In silico analysis of single nucleotide polymorphism immunogenic potential in fully HLA-matched transplantation. *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal = Russian Immunology Journal* 2016; 10(19)(1): 39–49 (In Russ.)].
10. Granados D.P., Sriranganadane D., Daouda T. et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat Commun.* 2014;5:3600. DOI: 10.1038/ncomms4600; PMID: 24714562.
11. Li J.M., Giver C.R., Lu Y. et al. Separating graft-versus-leukemia from graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Immunotherapy* 2009;1(4): 599–621. DOI: 10.2217/imt. 09.32; PMID: 20191089.
12. Wilke M., Poo J., den Haan J.M., Goulmy E. Genomic identification of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus by allele-specific PCR. *Tissue Antigens* 1998;52(4):312–7. PMID: 9820596.
13. Wilke M., Pool J., Goulmy E. Allele specific PCR for the minor Histocompatibility antigen HA-2. *Tissue Antigens* 2002;59(4):304–7. PMID: 12135429.
14. Spierings E., Brickner A.G., Caldwell J.A. et al. The minor histocompatibility antigen HA-3 arises from differential proteasome-mediated cleavage of the lymphoid blast crisis(Lbc) oncoprotein. *Blood* 2003;102(2):621–9. DOI: 10.1182/blood-2003-01-0260; PMID: 12663445.
15. Simsek M., Adnan H. Effect of single mismatches at 3'-end of primers on polymerase chain reaction. *J Sci Res Med Sci* 2000;2(1):11–4. PMID: 24019700.
16. Spierings E., Drabbels J., Hendriks M. et al. A uniform genomic minor histocompatibility antigen typing methodology and database designed to facilitate clinical applications. *PLoS One* 2006;1: e42. DOI: 10.1371/journal. pone. 0000042; PMID: 17183671.
17. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230(4732):1350–4. PMID: 2999980.
18. Krypuy M., Newnham G.M., Thomas D.M. et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2006;6:295. DOI: 10.1186/1471-2407-6-295; PMID: 17184525.
19. Gundry C.N., Vandersteen J.G., Reed G.H. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem.* 2003;49(3):396–406. PMID: 12600951.
20. Turpeinen H., Volin L., Partanen J. Domestic and foreign donor candidates result in differential probability of matching minor histocompatibility antigens—relevance of selection for hematopoietic stem cell transplantation. *Tissue Antigens* 2009;73(3):236–41. DOI: 10.1111/j. 1399–0039.2008.01210. x; PMID: 19254253.
21. Di Terlizzi S., Zino E., Mazzi B. et al. Therapeutic and diagnostic applications of minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 disparities in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey of different populations. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1):95–101. DOI: 10.1016/j. bbmt. 2005.09.017; PMID: 16399573.
22. Ryazantsev D.Y., Rogozhin E.A., Dimitrieva T.V. et al. A novel hairpin-like antimicrobial peptide from barnyard grass (*Echinochloa crusgalli* L.) seeds: structure-functional and molecular-genetics characterization. *Biochimie* 2014;99:63–70. DOI: 10.1016/j. biochi. 2013.11.005; PMID: 24275143.
23. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T. et al. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012;40(15): e115. DOI: 10.1093/nar/gks596; PMID: 22730293.

ОТ РЕДАКЦИИ



Клинические исследования – что это такое и каково их значение в развитии медицинской науки

Очевидно, что главная цель клинических исследований (КИ) новых препаратов (и целых лечебных протоколов) состоит в том, чтобы определить их безопасность и эффективность, выявить вероятные побочные действия для пациентов и возможности их избежать. Только когда на эти вопросы будут получены убедительные и всесторонне доказанные ответы, лекарство разрешат к применению и официально зарегистрируют.

Клиническая оценка любых средств лечения с участием людей – это завершающий этап долгого пути препарата из теории в практику. Сам факт необходимости организации КИ вызывает противоречивое отношение широкой медицинской общественности, в частности потому, что понимание необходимости их непростой и дорогой организации, высокие требования к выполнению вызывают скептицизм и желание избежать участия в этой форме работы. Помимо прочего, КИ уделяется очевидно мало внимания со стороны организаторов здравоохранения, хотя создаются различные приказы, но к КИ не привлекают студентов, участие в них не входит в подготовку ординаторов, даже среди давно утвердившихся в профессии специалистов культура проведения КИ завоевывает свои позиции в широкой практике очень медленно. Возможно, это результат неумения усвоить новые принципы взаимоотношений в научно-практической медицине, принять обязательные постулаты, свойственные этой дисциплине – строго соблюдать правила выполнения, уметь правильно сформулировать происходящие с пациентом события, соблюдать временные параметры лечебных мероприятий. Исследования у детей вызывают особенно много вопросов, и даже многим врачам, не говоря уже о родителях больного ребенка, бывает трудно согласиться на участие в исследовании, посвященном оценке свойств неапробированного препарата.

Учитывая исключительную важность этой проблемы, журнал планирует публикацию материалов о КИ с надеждой, что эта информация постепенно достигнет того уровня понимания, которое поможет быстрее добиться появления новых качественных препаратов в арсенале современной медицины.

Теория и практика клинических исследований в онкологии и гематологии

Н.В. Жуков^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Николай Владимирович Жуков Icancerdoctor1@gmail.com

В эпоху доказательной медицины основным поводом для адаптации новых методов лечения являются результаты клинических исследований. Однако проведение клинических исследований давно превратилось в отдельную область знаний, зачастую малоизвестную клиницистам, что не позволяет им адекватно интерпретировать результаты исследований. В статье изложены основные принципы проведения и интерпретации клинических исследований в гематологии и онкологии.

Ключевые слова: клинические исследования, онкология, гематология, фазы клинических исследований, статистическая значимость, статистическая сила

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-52-59

Theory and practice of clinical trials in oncology and hematology

N. V. Zhukov^{1,2}

¹ Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev; 1 Samory Mashela str., Moscow, 117997, Russia;

² Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov str., Moscow, 117997, Russia

In the era of evidence-based medicine the main reason for the implementation of new treatment methods are the results of clinical trials. However, clinical trials is a separate area of knowledge, which is often little known to clinicians, that does not allow them to adequately interpret the results of studies. The article describes the basic principles for the conduct and interpretation of clinical trials in hematology and oncology.

Key words: clinical studies, oncology, hematology, clinical trial phase, statistical significance, statistical power.

Уже давно в своей практической деятельности врачи опираются не столько на субъективный личный опыт, сколько на результаты клинических исследований. Однако, что и как «извлекает» врач из результатов исследования, зависит от того, насколько точно он представляет механизм их получения. В связи с этим освещение базовых понятий, касающихся проведения и интерпретации результатов клинических исследований, представляется крайне актуальным.

Проспективные и ретроспективные исследования

В «иерархии» системы доказательств ретроспективные исследования занимают невысокое место, что обусловлено рядом факторов, повышающих риск получения в них ошибочных заключений. Безусловно, при наличии данных ретроспективного и проспективного исследования, посвященных одному и тому же вопросу, предпочтение почти всегда будет отдано последнему. Однако место для ретроспективных исследований имеется и по сей день. Более того, подобные исследования могут принести большую пользу – во-

прос лишь в правильной организации и интерпретации их данных. «В защиту» возможности проведения адекватных ретроспективных исследований хотелось бы отметить, что согласно современным рекомендациям наибольшим уровнем доказательности обладают метаанализы, предусматривающие суммацию данных нескольких проспективных рандомизированных исследований. Однако по сути сами метаанализы являются исследованиями ретроспективными, так как анализируют уже полученные ранее результаты.

Для России, где из-за скудности финансовой базы и постоянно меняющихся условий финансирования здравоохранения клинические исследования в области онкологии и гематологии до сих пор в основном ретроспективные, это имеет принципиальное значение. Для большинства молодых (и не очень) специалистов добывание архивных данных является единственной возможностью написания диссертации или статьи. В ряде случаев ретроспективный формат оказывается практически неизбежным (по крайней мере на начальных этапах изучения проблемы), например при редких

заболеваниях или редких клинических ситуациях (рецидивы опухолей с высокой частотой инициального излечения — лимфома Ходжкина, острый лимфобластный лейкоз, саркомы костей; высоко «гетерогенные» или редкие нозологии — мягкотканые саркомы, опухоли раннего детского возраста и др.).

В связи с этим, если все же выбран формат ретроспективного исследования, основная задача состоит в том, чтобы сделать его именно исследованием, экспериментом с заранее обговоренными правилами, для того, чтобы максимально снизить влияние субъективных факторов на результаты.

Как в проспективных, так и в адекватно организованных ретроспективных исследованиях «правила игры» должны оговариваться заранее, а не после подсчета собранных данных. За какой срок анализируется материал, по каким принципам он отбирается, какие данные извлекаются для анализа, какими методами они анализируются и т. д. — все это определяется перед началом исследования и вольным изменениям не подлежит. Соблюдение этих правил позволяет значительно уменьшить шанс получения неправильных результатов, при несоблюдении — и проспективное исследование вряд ли будет источником адекватной информации. Однако ретроспективный формат исследования все же сопряжен с гораздо большим риском «добросовестного заблуждения». Основным отличием ретроспективных исследований является то, что на момент начала оцениваемого в них событие уже свершилось: ремиссии уже достигнуты (или не достигнуты), прогрессирование случилось (или не случилось), побочные эффекты зафиксированы и т. д. В этом кроется основной недостаток ретроспективных исследований: назначение лечения, стадирование, наблюдение за пациентом не подконтрольны исследователю и возможность оценки этих данных ограничена (даже по хорошо организованным регистрам). Исследователь может повлиять лишь на адекватность переноса информации из первичной документации в свою базу данных, на метод статистического анализа, но на адекватность отражения проведенного лечения в первичной документации, на выбор тактики лечения или объем обследования влиять не может. В рутинной практике (являющейся основой для анализа в ретроспективных исследованиях) выбор лечения обычно осуществляется на основании субъективной оценки прогноза пациента конкретным врачом, а спектр диагностических мероприятий для оценки эффективности лечения или токсичности может значительно варьировать от пациента к пациенту. В этом и кроются причины «добросовестных ошибок». Так, например, если в результате ретроспективного анализа было выявлено, что больные, получавшие терапию с четким соблюдением «тайминга» (больные, которым удалось своевременно провести трансплантацию, выполнить весь запланированный объем лечения и т. д.), имели лучшую выживаемость, чем те, у кого это не удалось, не торопитесь делать выводы. Сначала

задумайтесь, почему при формально одинаковом диагнозе и стадии у одних больных выдержана интенсивность терапии, а у других — нет. Вполне возможно, что агрессивную терапию выдерживали пациенты с меньшей распространенностью и агрессивностью болезни (в рамках формально одинаковой стадии и общего состояния). И именно этим, а не соблюдением «тайминга» или проведением трансплантации обусловлены лучшие результаты лечения. Возможно и обратное — соблюдение «тайминга» действительно оказало положительное влияние на результаты лечения. К сожалению, эти вопросы не могут быть сняты в рамках даже самого хорошо организованного ретроспективного исследования. Тем не менее это исследование может (и должно) быть использовано в качестве отправной точки для проведения исследования проспективного (генерация идеи). И, если задуматься, так происходит очень часто: идеи по организации проспективных исследований в новых, ранее не исследованных областях не берутся из воздуха, а основаны на анализе ранее полученных данных.

Однако в дальнейшем мы все же сосредоточимся на проспективных исследованиях, так как именно с ними чаще приходится встречаться в зарубежной литературе и рекомендациях, на которые мы ориентируемся. И именно благодаря проспективным клиническим исследованиям в нашей практике появляются новые эффективные препараты и методики.

Фазы исследований

Фазы исследования — это то, что очень часто указывают в заголовках статей, но редко понимают врачи-клиницисты. В большей степени это интересно организаторам клинических исследований, регулирующим организациям, однако и для практикующего врача «фаза» потенциально несет много интересной информации — прежде всего о том, насколько можно адаптировать полученные результаты в практической деятельности.

Исследования I фазы

Исследования данного типа являются наиболее ответственными и «ресурсоемкими», так как представляют собой первый опыт использования препарата или методики на людях. Исследование предполагает сверхтщательное наблюдение (для выявления любых побочных эффектов) и готовность бороться с неожиданными (непривычными) побочными эффектами лечения. Именно поэтому большинство исследований I фазы зарубежные фармкомпании предпочитают проводить в «своих» странах. В России проходят лишь единичные исследования I фазы зарубежных препаратов. Однако сейчас свои инновационные препараты начинают создавать и отечественные производители, поэтому у ряда клиник существует реальный шанс участвовать в подобных исследованиях. Особенно это касается клиник педиатрических, так как современ-

ные правила предусматривают «повторную» регистрацию препарата у несовершеннолетних с прохождением ранних фаз исследований.

Задачей I фазы является определение переносимости, а также отработка дозы и режима введения нового препарата для использования в дальнейших исследованиях. В большинстве областей медицины I фазу исследований проводят на здоровых добровольцах, однако по понятным причинам в онкологии это невозможно, и в «онкологической» I фазе принимают участие только пациенты.

Эффективность лечения никогда не является первичной целью исследования I фазы. Безусловно, достижение противоопухолевого эффекта — желанный результат, однако дизайн исследования разрабатывается для оценки переносимости, фармакокинетики, фармакодинамики препарата, а не эффективности. В связи с этим исследования I фазы обычно не предусматривают включения больных с каким-либо определенным видом опухоли (подразумевается, что больные с любым видом опухоли переносят лечение одинаково и «подходят» для основных задач исследования).

Отбор в исследование ведется с учетом того, что эффективность и токсичность нового препарата лишь предположительные (на основании исследований на животных). С этической точки зрения в исследования I фазы включают только больных, не имеющих шансов на достижение клинически значимого противоопухолевого эффекта при использовании стандартной терапии, доступной в настоящее время. Альтернативой для них служит проведение симптоматического лечения и/или эмпирической терапии с использованием доступных препаратов, не входящих в стандарты лечения. С учетом этих особенностей контингента больных, включаемых в исследования I фазы, шанс на достижение у них противоопухолевого эффекта невелик, однако такая возможность все же существует. Это этически оправдывает проведение подобных исследований. Более того, ряд препаратов действительно изменили судьбу пациентов, принявших участие в исследованиях I фазы, — многие больные с герминогенными опухолями, впервые получившие цисплатин, больные ХМЛ, впервые получившие иматиниб, и больные меланомой, получившие ипилимумаб, были излечены. А все пациенты, находившиеся в это время в схожей клинической ситуации, но не попавшие в исследования, погибли, так как эти заболевания были абсолютно фатальны на тот момент.

Существует и второе условие, без соблюдения которого проведение исследований I фазы стало бы бессмысленным. Несмотря на отсутствие терапевтических перспектив, у больных должна быть сохранены функции основных органов и систем, что необходимо для адекватной переносимости лечения. В случае включения больных, имеющих серьезные нарушения функции органов, выбранная для последующих исследований доза, скорее всего, будет неадекватно низкой,

что может послужить поводом для признания неэффективным препарата, который при применении в адекватных дозах мог бы оказаться клинически успешным.

«Классические» исследования I фазы в онкологии предусматривают начало с очень малой дозы препарата, от которой по опыту предклинических испытаний не ожидается развития серьезной токсичности ни у одного пациента. По ходу исследования доза увеличивается от одной когорты пациентов к другой по заранее запланированной ступенчатой методике. Эскалация до следующего дозового уровня происходит, если во всей исследуемой когорте не отмечено дозолимитирующей токсичности (ДЛТ). Последний уровень, при котором не было отмечено ДЛТ, рекомендуется для использования в дальнейших испытаниях.

В связи с развитием целевой (таргетной) терапии стали проводиться и так называемые исследования IV фазы. Кроме стандартных задач классического исследования I фазы, они при этом дополнительно изучают взаимосвязь между дозой препарата и развитием основного биологического эффекта, например эффективность блокады рецепторов или связи антител с антигеном-мишенью. Необходимость подобных исследований обусловлена тем, что эффективность и токсичность многих таргетных препаратов в меньшей степени связана с дозой, чем это характерно для цитостатиков. Дополнительная информация, получаемая в исследованиях этого типа, позволяет частично решить эту проблему. Например, если при достижении ДЛТ удастся добиться лишь минимального желательного биологического эффекта (блокада 5 % целевых рецепторов и т. д.), то ожидать клинического эффекта в последующих исследованиях, скорее всего, бесперспективно. Или, наоборот, длительная блокада 100 % целевых рецепторов может свидетельствовать об отсутствии необходимости эскалации дозы, несмотря на то, что ДЛТ не достигнута.

Исследования II фазы

В отличие от исследований I фазы, основная цель которых — отработка дозы и режима, исследования II фазы направлены уже на определение эффективности терапии при конкретных типах злокачественных новообразований. В связи с этим в исследования II фазы больные включаются «по диагнозу», т. е. исследование проводится на больных с определенным типом опухоли, при котором планируется оценить эффективность нового лечения.

Очевидно, что основная задача любого противоопухолевого лечения — это излечение, продление жизни больного и/или сохранение/улучшение ее качества. Однако показатели, оценивающие достижение этих целей (общая выживаемость, качество жизни) сложны в оценке, требуют длительного времени наблюдения и зачастую очень большого числа больных. Перед тем, как проводить столь ресурсоемкие «окончательные»

исследования, необходим определенный промежуточный этап, который и представлен исследованиями II фазы. В них чаще всего оценивают «суррогатные» показатели (выживаемость без прогрессирования, частота достижения ремиссий), которые потенциально связаны с основными (общая выживаемость, качество жизни), но более просты в оценке. Предполагается, что терапия с высокой частотой достижения ремиссий и/или длительным периодом выживаемости без прогрессирования будет чаще приводить к излечению/продлению жизни. Достаточно часто исследования II фазы не имеют проспективной контрольной группы и их задача лишь показать, что эффективность новой терапии выше определенного уровня (уровень интереса).

Далеко не всегда препараты, показавшие эффективность в отношении «суррогатных» целей, в дальнейшем подтверждают ее при оценке в больших исследованиях III фазы. Существует много примеров, когда увеличение частоты ремиссий или медианы выживаемости без прогрессирования не транслировалось в увеличение общей выживаемости. Однако, исследования II фазы важны как инструмент «негативной селекции». В фарминдустрии они получили негласное название «убийцы препаратов», так как при разработке новых препаратов их основной задачей является ответ на вопрос, имеет ли смысл проводить в дальнейшем большое и дорогостоящее исследование III фазы. «Академические» (вне рамок регистрации новых препаратов и не спонсируемые напрямую фарминдустрией) исследования II фазы часто проводятся с целью оценки эффективности терапии в ситуациях, когда проведение больших исследований III фазы маловероятно в силу редкости заболевания или невозможности найти достаточное финансирование. При этом «академические» исследования II фазы часто бывают «окончательными» — после их проведения терапия адаптируется для широкого клинического применения. Так, например, большинство режимов, используемых в качестве терапии 2-й линии при неходжкинских лимфомах и лимфоме Ходжкина, герминогенных опухолях, практически всех опухолях у детей, никогда не исследовались в рамках больших исследований III фазы. Очень многие препараты, входящие в режимы «терапии спасения», не зарегистрированы для использования с этой целью (подобное показание отсутствует в инструкции). С одной стороны, подобная практика позволила расширить арсенал доступных онкологам и гематологам препаратов и режимов, с другой — реальное их влияние на выживаемость больных в большинстве случаев остается до конца недоказанным. Однозначные заключения об эффективности препарата по результатам II фазы можно сделать лишь в ситуации, если произошло кардинальное изменение судьбы больных — достигнута длительная ремиссия или излечение при ранее абсолютно фатальном заболевании, быстро приводившем к смерти всех пациентов.

Так, например, впервые были одобрены для клинического применения иматиниб при гастроинтестинальных стромальных опухолях, кризотиниб при немелкоклеточном раке легкого с транслокацией ALK, брентуксимаб ведотин при резистентной к высокодозной химиотерапии с трансплантацией аутологичных клеток-предшественников гемопоэза лимфоме Ходжкина.

В соответствии со своими задачами исследование II фазы должно включить достаточное число пациентов для того, чтобы «отсечь» неэффективные препараты, но при этом «не пропустить» новый перспективный метод лечения, что достигается за счет использования различных методов планирования размеров выборки и формирования групп. При исследовании препарата в качестве монотерапии часто достаточно показать, что он в переносимых дозах позволяет добиться эффективности, превышающей определенный уровень интереса (чаще всего уровень эффективности ранее использовавшейся терапии). В то же время сейчас остается все меньше ситуаций, в которых новый препарат может быть исследован в качестве монотерапии — практически для каждой опухоли существует несколько линий лечения, к окончанию которых состояние и степень предлежности больных не позволяют адекватно оценить эффективность и переносимость нового препарата. В связи с этим все чаще приходится исследовать новые препараты, добавляя их к ранее рекомендованному лечению. Подобные исследования уже на этапе II фазы практически всегда требуют наличия группы сравнения, так как «вычлнить» эффект нового препарата без нее не представляется возможным.

Исследования III фазы

Чаще всего при оценке результатов клинических исследований III фазы мы обращаем внимание лишь на уровень статистической значимости p (зачастую не понимая значения этого показателя) и величину абсолютного различия в анализируемых показателях. Однако информация, которую можно (и нужно) получить из анализа клинических исследований III фазы гораздо более обширна. И, к сожалению, далеко не всегда $p < 0,05$ говорит об однозначном преимуществе нового лечения, а $p > 0,05$ об отсутствии такового.

К сожалению, наиболее важные клинические исследования, дающие окончательный ответ об эффективности или неэффективности новой терапии, наиболее трудны для организации, и неправильное планирование даже большого проспективного рандомизированного исследования может послужить причиной получения нетрактуемых результатов.

Если учитывать, что результаты исследований III фазы являются «последним этапом оценки» препарата или методики перед внедрением в широкую клиническую практику, их конечной целью должно быть доказательство преимущества в отношении показателей, напрямую определяющих выигрыш пациента

от проводимого лечения. Чаще всего таким показателем служит общая выживаемость, позволяющая оценить насколько благодаря новому лечению изменяется продолжительность жизни больных (доля пациентов, проживших определенный срок). Использование в качестве первичной цели других показателей (выживаемость без прогрессирования, бессобытийная выживаемость, частота объективного ответа и т. д.) также возможно, однако в этом случае нужно понимать, что исследование не дает однозначного подтверждения продления жизни больных в результате используемой терапии, а «улучшение» суррогатного показателя на самом деле может быть безразлично для пациента. Так, например, большая длительность ремиссии, полученная за счет дополнительной токсичности, может быть не важна, если не приводит к улучшению качества жизни или к увеличению ее продолжительности.

Важным фактором, позволяющим оценить, на какую популяцию можно экстраполировать результаты исследования, являются критерии отбора, т. е. какие признаки должны присутствовать у больных для включения в исследование (критерии включения), а какие отсутствовать (критерии исключения). Критерии отбора присутствуют в исследованиях всех фаз, однако наиболее важную для клинициста информацию они несут именно в III фазе. В процессе проведения исследования критерии отбора позволяют сформировать более однородные группы для снижения шанса на неравномерное распределение прогностических факторов. Чем строже и уже критерии отбора, тем больше шанс выявить различия между группами там, где оно действительно есть. Однако при практическом применении результатов исследования узкие критерии отбора оставляют неуверенность при использовании препарата или методики в популяциях больных, отличающихся от включавшихся в исследование.

Большинство исследований III фазы подразумевает наличие рандомизации (распределение больных случайным методом), что в определенной мере позволяет избежать влияния других (кроме исследуемой терапии) факторов на результаты. Однако создание одинаковых по прогнозу групп не является целью рандомизации, она лишь делает распределение больных с неизвестными и известными влияющими факторами случайным, что позволяет применять для анализа адекватные статистические тесты.

Число больных, включаемых в исследования III фазы, не является произвольным и определяется статистиками, исходя из ожидаемого различия между сравниваемыми группами — чем меньшее различие планируется выявить, тем больше требуется больных. Ошибка в определении необходимого числа пациентов может полностью перечеркнуть результаты исследования: если в исследование включено недостаточно больных, может быть упущено истинное, но небольшое по магнитуде различие. Слишком же большое по объему включаемых пациентов исследование ри-

скует не закончиться в обозримом будущем, когда появятся уже новые варианты терапии и его результаты будут представлять лишь исторический интерес.

Вероятность получить статистически значимый результат в случае, если исследуемые методы лечения действительно отличаются по эффективности, называется статистической силой исследования. Статистическая сила исследования возрастает при увеличении размера выборки и удлинении интервала наблюдения за больными (увеличения числа неблагоприятных событий, оцениваемых в исследовании). С другой стороны, чем больше размер выборки, тем более длительным и ресурсоемким будет исследование. Определение оптимального размера выборки — сложная задача, требующая привлечения профессиональных статистиков.

Многие публикуемые «негативные» исследования, не получившие заветного $p < 0,05$ (часто это касается редких нозологий и препаратов/режимов, не представляющих интереса для фармацевтических компаний и оцениваемых в рамках «академических» исследований), на самом деле являются нетрактуемыми в связи со слишком малым размером выборки. Так, в исследовании с небольшой статистической силой, статистически незначимой может оказаться и абсолютная разница в 10–15 % выживаемости, в то время как при включении в исследование нескольких тысяч больных удастся доказать статистически значимое различие выживаемости в 1–2 % или увеличение медианы выживаемости на несколько недель и даже дней (при этом не обязательно, что оно будет медицински значимым, т. е. оправдывать использование подобной методики). Особенно важна статистическая сила в исследованиях, предусматривающих «деэскалацию терапии» — уменьшение доз, использование органосохраняющих операций и т. д. Недостаточная статистическая сила может привести к тому, что более щадящее, но на самом деле менее эффективное лечение будет признано новым стандартом, так как недостаточное число больных в исследовании не позволит доказать наличие значимой разницы в эффективности с ранее существовавшим стандартом. Исследования на терапевтическую эквивалентность (т. е. доказательство того, что одно вмешательство не отличается от другого) гораздо сложнее, чем исследования, направленные на доказательство преимущества одного метода над другим. В рамках существующих методов статистики продемонстрировать эквивалентность различных вариантов лечения невозможно, можно лишь доказать, что вероятность различий определенного уровня крайне низка. Однако какой уровень возможных различий является приемлемым, если речь идет об излечении? Менее 5 %, менее 10 %, менее 20 %? Чем меньше магнитуда различий, отсутствие которой предстоит доказать, тем больше должна быть выборка. В связи с этим настоящие исследования на терапевтическую эквивалентность и исследования с дизайном non-inferiority предусматривают включение гораздо

большого числа больных, чем исследования, направленные на доказательство превосходства одного метода лечения над другим (дизайн superiority).

С особой осторожностью нужно относиться к исследованиям с факториальным дизайном, при которых предусматривается двойная рандомизация (дизайн 2×2). Такой дизайн достаточно часто используется при недостаточном для проведения двух независимых исследований числе больных, например, в педиатрии. При подобном дизайне реально имеется 4 лечебные группы, однако часто проводится анализ с объединением по одному из факторов. Первый фактор, например, представляет 2 альтернативных вмешательства — ампутиацию или резекцию пораженной опухоли конечности. Второй — 2 альтернативных последующих вмешательства, например проведение или не проведение адьювантной химиотерапии. В случае, если влияние факторов связано между собой (например, адьювантная терапия эффективна только после резекции, но не улучшает результаты после ампутиации) при оценке эффективности метода локального контроля можно сделать ложный вывод об их эквивалентности. На самом же деле без проведения адьювантной терапии резекция оказалась бы менее эффективной. Подобный дизайн возможен лишь в случае, если взаимодействие между анализируемыми факторами исключено.

К наиболее важным принципам оценки адекватности исследований III фазы относят так называемый принцип анализа по включению или намерению лечить (intention-to-treat principle). Этот принцип требует, чтобы все рандомизированные пациенты, получившие хотя бы одно введение препарата и/или одну специфичную для исследования манипуляцию, были включены в первичный анализ. Исключение из анализа пациентов в связи с отклонениями от плана лечения, ранней смертью или с отказом больного от лечения может значительно исказить результаты. Часто именно исключаемые пациенты имеют наихудший прогноз по сравнению с больными, оставшимися в исследовании. Исключение таких больных из анализа исследователи обычно обосновывают тем, что плохие результаты лечения данного больного обусловлены отклонениями (несоответствием или нежеланием пациента) в лечении, однако все может быть совсем наоборот. Например, в одном из кардиологических исследований 5-летняя смертность пациентов, «не выдерживавших» план лечения в группе плацебо, составила 28,3 %, что было статистически значимо больше, чем в группе, которая могла получить лечение плацебо в жестких рамках протокола исследования, — 15,1 %. Даже в рандомизированных исследованиях есть вероятность того, что соответствие плану исследования может быть хуже в одной из групп или поводы плохого соответствия могут различаться между группами. Например, в одной из групп основной причиной «выбытия» является прогрессирование, в другой — токсичность. Исключение таких пациентов или их сепаратный анализ,

что эквивалентно исключению, в связи с любыми причинами (кроме несоответствия критериям отбора) обычно признается неприемлемым. Если выводы исследования основываются на анализе после исключения «неудобных» пациентов, эти выводы обычно находятся под сомнением. Во многом это обусловлено и тем, что в исследованиях оценивается весь план лечения в целом (соответственно, на указанной популяции больных), а практически любое лечение не может быть проведено в полном объеме и без отклонений всем пациентам. В связи с тем, что задача исследований III фазы — выявление метода, рекомендованного для переноса в широкую клиническую практику, а не на группу отобранных пациентов с благоприятным прогнозом, все больные, отвечающие критериям включения, должны анализироваться в исследованиях III фазы.

Крайне важно для оценки адекватности результатов, когда (и по каким критериям) выбирается время анализа данных. В адекватно организованных исследованиях заранее оговаривается количество проведенных анализов данных (т. е. сколько раз могут быть проанализированы данные в отношении достижения/недостижения уровня статистической значимости) и повод для проведения анализа (чаще всего после определенного количества неблагоприятных событий для первичной цели исследования). Однако иногда, при отсутствии жесткого соблюдения протокола, анализы проводят произвольно — к дате конференции, апробации, защите или просто от нетерпения. К сожалению, это значимо увеличивает шанс на неправильные выводы (обнаружение различий там, где их на самом деле нет). Например, при сравнении двух абсолютно одинаковых методов лечения существует 26 % вероятность выявить между ними различия (разумеется, не существующие на самом деле), если в исследовании, длящемся 3 года, тесты на статистическую значимость будут проводиться каждые 3 мес. Если провести даже поверхностный анализ онкологической периодики, можно обнаружить, что во многих публикациях нет указаний целевого объема выборки, необходимого для достаточной статистической силы исследования, а также нет информации о том, чем же является данный анализ — запланированным промежуточным анализом, финальным анализом исследования, или это просто реализация желания посчитать результаты к дате конференции. Промежуточные анализы могут часто вводить в заблуждение, а уровень статистической значимости таких анализов не может рассматриваться как истинное значение. При этом данные, полученные при незапланированном анализе, могут полностью «разрушить» исследование, так как выявление ложного различия не позволит продолжить включать больных в «худшую» группу. По этим причинам промежуточные анализы проводит комитет по мониторингу данных, а не участвующие исследователи, и это стандарт рандомизированных многоцентровых исследований. Такой подход помогает предотвратить

пациентов от результатов поверхностно проведенного анализа, исследование «от разрушения», но при этом позволяет вовремя отреагировать на действительно значимые изменения. Промежуточные результаты доступны только комитету по мониторингу данных, главные исследователи в данный комитет не входят, так как получение результатов заинтересованными лицами может привести к конфликту интересов при продолжении исследования. Только комитет принимает решение о том, являются ли данные достаточно зрелыми для опубликования и дальнейшего применения.

Формирование медицинского мнения об эффективности или неэффективности новой методики достаточно сложно, и клиницисты часто неверно интерпретируют тест на статистическую значимость (значение p), видя в нем четкую грань между этими понятиями. Уровень статистической значимости при сравнении результатов отражает вероятность увидеть различие столь же большое, какое наблюдается при анализе данных, в случае если виды лечения на самом деле равны, а различие обусловлено просто случайностью. В медицине наиболее часто в качестве «водораздела» используется $p < 0,05$, что обозначает 5 % вероятность принять ошибочное заключение об эффективности методики, на самом деле не отличающейся от терапии в контрольной группе. Величина p ни в коей мере не является эквивалентом шанса на равенство между группами (т. е. $p = 0,05$ не обозначает 5 % шанс, а $p = 0,9-90$ % шанс на равенство между группами).

Статистическая значимость может стать помощью при интерпретации результатов исследования, однако величина p не должна оцениваться отдельно, в отрыве от смысловой части исследования. Далеко не всегда $p = 0,0000001$ более «достоверное», чем $p = 0,045$, а $p = 0,09$ подтверждает неэффективность новой терапии. Уровень статистической значимости, находящийся под влиянием размера выборки, не служит эквивалентом отсутствия различий в эффективности лечения. Не существует простого индекса доверия при интерпретации результатов. При ориентировке на уровень статистической значимости исследователь должен проводить тщательный самостоятельный анализ данных, скептически их оценивать и проявлять осторожность при анализе.

Публикация результатов клинических исследований

Публикация результатов — неотъемлемая часть хорошо организованного исследования, по сути его конечная цель.

К сожалению, даже в развитых странах в большинстве обзоров отмечается плохое качество публикации результатов. Многие публикации являются результатом попыток преувеличить различие в эффективности лечения. Если формулировать кратко, желающие опубликовать данные исследования должны соблюдать несколько простых принципов, а желающие адапти-

ровать результаты исследования — оценить, насколько эти принципы соблюдены авторами публикации.

1. Авторы должны коротко описать методы контроля качества полученных результатов, использованные с целью быть уверенными в том, что данные (включая оценку ремиссии) являются полными и аккуратными.
2. Должны быть указаны все пациенты, зарегистрированные в исследовании.
3. Доля «неоцениваемых» пациентов не должна превышать 15 % для главной цели исследования.
4. В рандомизированных исследованиях отчет должен включать сравнение выживаемости и других основных конечных целей с использованием данных всех рандомизированных пациентов (кроме тех, которые не отвечают критериям отбора).
5. Размер выборки должен быть достаточным для обоснования осмысленного заключения по поводу наличия клинически значимого эффекта (тенденции), для «негативного» заключения при сравнении терапевтических подходов, адекватность размеров выборки должна быть подтверждена представлением конфиденциального интервала для истинного различия в эффективности лечения.
6. В отчете должен быть представлен начальный планируемый объем выборки, также должно быть указано какое количество промежуточных анализов было проведено и каким образом было принято решение по поводу остановки исследования и генерации отчета.
7. Заявление о терапевтической эффективности не должно основываться на результатах нерандомизированных исследований II фазы, за исключением случаев, когда заболевание очень редкое или прогноз заболевания настолько плох, что проведение контролируемого рандомизированного исследования невозможно. В таком случае результаты нерандомизированного исследования должны сравниваться с историческим контролем. Сравнение выживаемости между ответившими и не ответившими на лечение пациентами не может служить доказательством терапевтической эффективности.
8. Пациенты, включенные в исследование, должны быть детально описаны. Возможность переноса заключений исследования на общую популяцию больных должно быть адекватно отражено в дискуссии. Заявление о различии в эффективности лечения по подгруппам должно быть тщательно документировано и подтверждено статистическими тестами (приведение только нескольких сравнений с использованием тестов на статистическую значимость недостаточно).
9. Методы статистического анализа должны быть описаны в объеме достаточном для того, чтобы обладающий знаниями читатель мог воспроизвести результаты исследования при наличии данных.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Friedman L.M., Furberg C.D., DeMets D.L. Fundamentals of Clinical Trials, 4th ed. 2010. New York, NY: Springer Science + Business Media, LLC.
2. Streiner D.L., Norman G.R. Drug Trial Phases. Community Oncology. 2009;6(1): 36–40.
3. Наглядная медицинская статистика: учеб. пособие. А. Петри, К. Сэбин; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 216 с.
4. Including Clinical Trials in Your Practice – National Cancer Institute, <http://www.cancer.gov/resources-for/hp/education/including-clinical-trials-course.pdf>
5. Schilsky Richard L. Oncology Clinical Trials: Successful Design, Conduct and Analysis. Ed. Susan Halabi. Demos Medical Publishing, 2009.
6. Guideline on Evaluation of Anticancer Medicinal Products in Man (рекомендации Европейского медицинского агентства, ЕМА), http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/01/WC500137128.pdf.

ПРЕСС - РЕЛИЗ

Москва, 14 апреля 2016 г.

III Конгресс гематологов России

14 апреля 2016 г. в рамках III Конгресса гематологов России ведущие специалисты собрались в Москве, чтобы обсудить инновационные методы борьбы с лимфопролиферативными заболеваниями. Эксперты представили последние мировые достижения в лечении онкогематологических заболеваний, ставшие доступными для российских пациентов. Важнейшей темой конференции стала регистрация в России нового показания препарата обинутузумаб (Газива®) — для иммунотерапии фолликулярной лимфомы. Применение препарата Газива® позволяет снизить риск прогрессирования заболевания почти в 2 раза и перевести его в фазу «глубокого сна» — в продолжительную ремиссию. Это впечатляющие результаты, поскольку речь идет о пациентах с трудно поддающейся лечению формой фолликулярной лимфомы, для которых возможности терапии сильно ограничены. У таких больных с каждым новым рецидивом заболевание становится более резистентным к лечению.

Организаторами Конгресса выступили Министерство здравоохранения Российской Федерации, федеральные научные и медицинские центры, профессиональные сообщества онкологов и гематологов. В рамках научного конгресса прошел ряд пленарных заседаний и сателлитных симпозиумов, на которых специалисты рассмотрели актуальные вопросы терапии онкогематологических заболеваний, внедрения современных технологий лечения и инновационных препаратов. Одним из ключевых событий стал симпозиум «**Новые перспективы лечения фолликулярных лимфом и хронического лейкоза**», в рамках которого состоялся лонч нового показания препарата Газива® — для лечения фолликулярной лимфомы. Этот иммунотерапевтический таргетный препарат ведущие специалисты всего мира называют прорывом в терапии лимфопролиферативных заболеваний, с прошлого года он уже успешно применяется в России для лечения хронических лимфоцитарных лейкозов.

Фолликулярная лимфома — наиболее частая форма индолентных (вялотекущих) лимфом. Каждый год в мире регистрируют более 75 тыс. человек, страдающих от этого злокачественного заболевания. В России фолликулярной лимфомой ежегодно заболевают 3500 пациентов.

Точные причины злокачественного перерождения клеток в лимфатической системе неизвестны; ученые предполагают, что оно происходит вследствие цепочки случайных генетических событий. Исследования показывают, что развитию заболевания могут способствовать некоторые хромосомные нарушения, постоянные контакты с канцерогенными веществами и пестицидами, длительное лечение иммунодепрессантами (например, после трансплантации органов), проживание в экологически неблагоприятной зоне, наследственные и приобретенные поражения иммунной системы, аутоиммунные заболевания.

Опухоль состоит из зрелых В-лимфоцитов, которые в результате бесконтрольного размножения накапливаются в фолликулах лимфатической системы (локальных скоплениях лимфоидной ткани, где происходит рост и развитие клеток иммунной защиты человека). Поскольку такие центры содержатся не только в лимфатических узлах, но и в селезенке, миндалинах гортани, слизистых оболочках пищеварительной системы, первоначальный очаг может возникнуть в любой части организма.

Фолликулярная лимфома характеризуется чередующимися периодами ремиссий и рецидивов. На сегодняшний день полное излечение невозможно, однако при своевременной и правильной терапии большинство пациентов могут прожить долгие годы, сохранив хорошее качество жизни. Одна из основных задач, стоящих перед учеными и врачами, — разработать эффективные схемы лечения для достижения стойкой и максимально продолжительной ремиссии.

«Золотым стандартом» лечения считают сочетание химиотерапии с таргетной терапией препаратом ритуксимаб (Мабтера) и дальнейшую поддержку этим препаратом для увеличения периода ремиссии. Однако около 20–25 % пациентов с фолликулярной лимфомой не отвечают на стандартную терапию или имеют рецидивы после нее. С появлением обинутузумаба — иммунотерапевтического препарата нового поколения — у этих больных появились реальные (подкрепленные многочисленными исследованиями) шансы на благоприятный исход.

Обинутузумаб (Газива®) — это первое гликоинженерное моноклональное антитело II типа, воздействующее на белок CD20, находящийся на поверхности В-лимфоцитов. Препарат разрушает опухолевые клетки-мишени и одновременно делает их уязвимыми для собственной иммунной системы организма.

«Пациенты с фолликулярной лимфомой, у которых, несмотря на лечение, возникает рецидив или прогрессирование заболевания, нуждаются в дополнительных способах терапии, поскольку с каждым новым рецидивом недуг все труднее поддается лечению. Каждая последующая ремиссия короче предыдущей, а лимит эффективных терапевтических опций драматически снижается, в конечном итоге не оставляя пациенту шанса на получение эффективного лечения, — объясняет **Ирина Поддубная, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, ведущий российский онкогематолог, зав. кафедрой онкологии Российской медицинской академии последипломного образования.** — Теперь этот шанс появляется благодаря обинтузумабу — принципиально новому средству, которое открывает дополнительные возможности лечения: и подавляет опухоль, и активирует собственную иммунную систему организма».

Согласно исследованиям, применение препарата Газива® в комбинации с бендамустином снижает риск прогрессирования заболевания или смерти у пациентов с фолликулярной лимфомой на 52 %, а также позволяет на длительное время отсрочить проведение повторного лечения. Стойкая ремиссия и сохранение качества жизни больных связаны в том числе с низкой токсичностью данной схемы лечения.

«Использование моноклональных антител — это первый шаг к уходу от классической химиотерапии, сопровождаемой инфекциями, выпадением волос, тошнотой, которой так боятся наши пациенты. Мы должны увеличивать эффективность лечения, но при этом уменьшать его токсичность, повышая переносимость. Появление препарата обинтузумаб в России

позволяет успешно это делать», — отмечает **Вадим Птушкин, д.м.н., проф., главный внештатный гематолог-трансфузиолог Департамента здравоохранения г. Москвы.**

К сожалению, Газива® пока не входит в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Это значит, что лечебные учреждения смогут приобретать и применять его только за счет региональных льгот и только по «старому» показанию — хронический лимфоцитарный лейкоз. Не секрет, что финансовые возможности регионов очень разнятся, но врачи уверены, что жизнь человека не должна зависеть от того, в какой точке на карте страны стоит его дом. «Болезни одинаково поражают жителей столицы и регионов. И любой гражданин России, заболевший лимфомой, вправе рассчитывать на самую эффективную помощь. Надеюсь, что в ближайшее время мы сможем лечить всех, кто нуждается в помощи, за счет государственных средств», — говорит **Ирина Поддубная.**

Нельзя не отметить, что у врачей есть веское основание для подобного оптимизма. Благодаря сотрудничеству производителя препарата компании «Рош» с отечественным фармацевтическим гигантом «Фармстандарт» некоторые стадии производства препарата Газива® были успешно локализованы в России, что позволит сделать его более доступным для наших пациентов.

В настоящее время препарат одобрен более чем в 60 странах мира для лечения хронического лимфолейкоза. Эксперты уверены, что регистрация в России нового показания — для терапии фолликулярной лимфомы — откроет новые горизонты для спасения пациентов.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Онкогематология», следует руководствоваться следующими правилами:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме).

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

Статья должна быть подписана всеми авторами. В конце статьи должны быть обязательно указаны **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, факс, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; описание отдельных наблюдений, заметки из практики – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 20 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском языке, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т. д.)**. Объем резюме – не более 2000 знаков с пробелами. Количество **ключевых слов** должно составлять от 3 до 10.

4. Иллюстративный материал.

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.
- Фотографии представляются в оригинале или в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).
- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0. При невозможности представления файлов в данном формате необходимо связаться с редакцией.
- Все рисунки должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. На рисунке указываются «верх» и «низ»; фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи.
- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.
- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы при-

водятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках, а их расположение указывается автором в виде квадрата на полях статьи слева.

5. Единицы измерений даются в СИ.

Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование необщепринятых сокращений не допускается.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом.

• Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

• Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

• При ссылке на **статьи из журналов** указывают также название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы.

• При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания.

• При ссылке на **авторефераты диссертаций** указывают также полное название работы, докторская или кандидатская, год и место издания.

• При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

• Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

• Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательное **не более 20–25** источников, в обзорах литературы – **не более 60**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати бесплатно.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

Авторы могут присылать свои материалы по адресу: **115478, Москва, Каширское шоссе, 24, стр. 15**, либо по электронной почте на адрес ответственного секретаря: **j.roumiantseva@mail.ru** с обязательным указанием названия журнала.



ХІІІ РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЛИМФОМЫ

ХІІІ РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЛИМФОМЫ

27–28 октября 2016 г.

Гостиница Холидей Инн Сокольники
Москва, Русаковская улица, д. 24

Глубокоуважаемые коллеги!

От имени Российского общества онкогематологов, Европейской гематологической ассоциации и лично проф. И.В. Поддубной мы рады пригласить Вас принять участие в **ХІІІ Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы»**, которая состоится **27–28 октября 2016 г. в Москве**.

В рамках конференции планируются выступления крупнейших отечественных и зарубежных специалистов в области диагностики и лечения злокачественных лимфопролиферативных заболеваний, посвященные наиболее актуальным вопросам этого раздела онкогематологии, а также самым значимым событиям в области лечения лимфом, хронического лимфолейкоза и множественной миеломы, произошедшим в 2015–2016 гг.

Тезисы для постеров вы можете присылать до 1 сентября 2016 г. Тезисы должны быть представлены в виде текстовой аннотации длиной до 2500 знаков с пробелами.

Постеры будут оцениваться экспертной комиссией, авторам лучших постеров будет предоставлена возможность выступить с сообщением в рамках соответствующей сессии конференции.

Обязательная бесплатная регистрация на конференцию и подача аннотаций постеров доступны на сайте www.conferenceml.com с 1 апреля по 1 сентября 2016 г.

Организация конференции возложена на компанию TS Oncology. С любыми вопросами, связанными с конференцией, вы можете обращаться по адресу lymphoma@tsoncology.com.

До встречи на конференции!



CONTROVERSIES in THROMBOSIS and HEMOSTASIS

НАЦИОНАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ ПО ТРОМБОЗУ
И ГЕМОСТАЗУ



Впервые в России совместно

20 - 22 ОКТЯБРЯ, 2016

Москва, Россия

8 я

**Всероссийская
Конференция
ПО КЛИНИЧЕСКОЙ
ГЕМОСТАЗИОЛОГИИ
И ГЕМОРЕОЛОГИИ**

**CONGRESS ON
CONTROVERSIES IN
THROMBOSIS &
HEMOSTASIS (CITH)**

3rd



Под эгидой Европейской
и Средиземноморской Лиги
против тромбоземболических
расстройств (EMLTD)



www.cith2016.ru