

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOGEMATOLOGY

**Первичная диффузная В-крупноклеточная
лимфома центральной нервной системы**

**Адоптивная иммунотерапия
генетически модифицированными
Т-лимфоцитами**

**Физиология и патология внеклеточных
везикул**



1

ТОМ 12
2017

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

<http://oncohematology.abvpress.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Самочатова Елена Владимировна, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, главный научный сотрудник отдела депрессий кроветворения, миелоидных лейкозов, редких и наследственных болезней ФГБУ «Национальный научно-практический 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 ФГБОУ ВО «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 «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «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 «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России (Москва, Россия)

ПОМОЩНИК ОТВЕТСТВЕННОГО СЕКРЕТАРЯ

Петрова Галина Дмитриевна, к.м.н., 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 Л.К. Мусатова
Корректоры: В.Е. Ефремова,
В.В. Калинина
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка Е.А. Прокофьева

Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru
Руководитель проекта
А.Г. Прилесская, +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. 2017. Том 12.
№ 1. 1–88
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 3000 экз.

<http://oncohematology.abvpress.ru>

1
ТОМ 12
'17

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алейникова Ольга Витальевна, профессор, член-корреспондент Национальной академии наук Республики Беларусь, директор ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава 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 Детского исследовательского госпиталя Св. Иуды (Мемфис, США)

Карачунский Александр Исаакович, д.м.н., профессор, заместитель генерального директора — директор института онкологии, радиологии и ядерной медицины ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «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 ФГБОУ ВО «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)

Минков М.Л., д.м.н., доцент, заведующий Клиникой педиатрии и подростковой медицины с отделением неонатологии больницы Rudolfstiftung (Вена, Австрия)

Мякова Наталья Валерьевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением онкогематологии ФГБУ «Национальный научно-практический 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)

Пономарев Владимир Борисович, д.м.н., отдел радиологии Мемориального онкологического центра Слоана-Кеттеринга (Нью-Йорк, США)

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

Усс Анатолий Леонидович, д.м.н., профессор, главный гематолог Минздрава Республики Беларусь, член Комитета по трансплантологии 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 ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», руководитель Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Крыжановский Олег Игоревич, к.м.н., руководитель программы лечения злокачественных гематологических заболеваний медицинского 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 ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России на базе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Россиес Виктор Анатольевич, к.м.н., врач высшей категории, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. М.И. Калинина» (Самара, Россия)

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

Румянцев Сергей Александрович, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, проректор по стратегическому развитию, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, заведующий кафедрой трансляционной и регенеративной медицины ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Минобрнауки России (Москва, Россия)

Талалаев Александр Гаврилович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Российский национальный 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.

ONCO HEMATOLOGY

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

<http://oncohematology.abvpress.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Samochatova Elena V., MD, PhD, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Chief Researcher of Hematopoiesis depressions, myeloid leukemia, rare and hereditary diseases department in National Scientific and Practical 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 Hematology, 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 Healthcare Department; Head of Department of Cooperated Research in Adolescents/Adults Hematology/Oncology National Scientific and Practical 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 National Scientific and Practical 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 OF EXECUTIVE SECRETARY

Petrova Galina D., MD, PhD, 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

1 Vol. 12
'17

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 **L.K. Musatova**

Proofreaders: **V.E. Efremova, V.V. Kalinina**

Designer **E.V. Stepanova**

Maker-up **E.A. Prokofieva**

Subscription & Distribution Service

I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,

base@abvpress.ru

Project Manager

A.G. Prilepskaya, +7 (965) 319-10-53,

alla@abvpress.ru

The journal was registered at the Federal Service for Surveillance of Communications, Information Technologies, and Mass Media (ПН 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.

ISSN 2413-4023 (Online)
ISSN 1818-8346 (Print)
Onkogematologiya. 2017.
Volume 12. No 1. 1–88
© PH "ABV-Press", 2017
Pressa Rossii catalogue index: 42167

Printed at the Mediacolor LLC

3,000 copies

<http://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)

Doubrovina 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 National Scientific and Practical 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)

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)

Minkov M.L., MD, PhD, Vienna Hospital Association Rudolfstiftung Hospital, Clinic of Pediatrics and Adolescent Medicine with Department for Neonatology (Vienna, Austria)

Myakova Natalya V., MD, PhD, Professor, Head of Oncohematology Department of National Scientific and Practical 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 Healthcare 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 of 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 of Ministry of Defense of Russia, 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 No. 1, Head of Center of Children's Oncology and Hematology (Yekaterinburg, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

Krijanovski Oleg I., MD, PhD, Director of Malignant Hematology Program "Alta Bates" Summit Medical Center (Berkeley, California, 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 Sciences, Professor, Head of Oncology Department of Russian Medical Academy of Continuing Professional Education 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 National Scientific and Practical 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, Corresponding Member of RAS, Vice-Rector for Strategic Development, Head of the Oncology, Hematology and Radiotherapy Department, Faculty of Pediatrics in N.I. 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 N.I. 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)

ГЕМОБЛАСТОЗЫ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ

- К.А. Комратова, Ю.Г. Абугова, С.С. Озеров, Д.С. Абрамов, Г.В. Терещенко, Н.В. Мякова*
Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома центральной нервной системы (клинический случай и обзор литературы). 10
- А.А. Павлова, М.А. Масчан, В.Б. Пономарев*
Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы 17
- Е.А. Никитин, В.И. Воробьев, М.А. Пантелеев, Г.Е. Гендлин, В.В. Птушкин*
Как применять ибрутиниб. 33
- Б.Т. Джумабаева, Л.С. Бирюкова, В.А. Варшавский, С.А. Марьина, Л.С. Рощина, У.Л. Джулакян, Е.С. Столяревич*
Клинико-лабораторные и морфологические особенности поражения почек при лимфопролиферативных заболеваниях. 44

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

- И.А. Дёмина, Т.Ю. Вержбицкая, С.А. Кашипор, С.А. Плясунова, М.Э. Дубровина, Л.Г. Фечина, Н.В. Мякова, Е.В. Самочатова, А.А. Масчан, А.М. Попов*
Иммунофенотипическая характеристика опухолевых клеток в костном мозге при лимфоме/лейкозе Беркитта: возможности дифференциальной диагностики с острым лимфобластным лейкозом 55
- М.А. Пантелеев, А.А. Абаева, Д.Ю. Нечипуренко, С.И. Обыденный, А.Н. Свешникова, А.М. Шибeko*
Физиология и патология внеклеточных везикул 62
- А.Н. Хвастунова, Л.С. Аль-Ради, О.С. Федянина, У.Л. Джулакян, Н.М. Капранов, А.О. Закирова, С.А. Луговская, Е.В. Наумова, Ф.И. Атауллаханов, С.А. Кузнецова*
Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (исследование с помощью клеточного биочипа) 71

РЕДКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ

- А.Л. Меликян, Е.И. Пустовая, Е.К. Егорова, М.В. Калинина, Т.И. Колошейнова, И.Н. Суборцева, Е.А. Гилязитдинова, В.Н. Двирнык*
Дифференциальная диагностика тромбоцитопений 78

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

- K.A. Komratova, Yu.G. Abugova, S.S. Ozerov, D.S. Abramov, G.V. Tereshchenko, N.V. Myakova*
Primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system
 (case report and literature review). 10
- A.A. Pavlova, M.A. Maschan, V.B. Ponomarev*
Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express
chimeric antigen receptors 17
- E.A. Nikitin, V.I. Vorobiev, M.A. Panteleev, G.E. Gendlin, V.V. Ptushkin*
How to use ibrutinib 33
- B.T. Dzhumabaeva, L.S. Biryukova, V.A. Varshavsky, S.A. Mar'ina,*
L.S. Roshchina, U.L. Julhakyan, E.S. Stolyarevich
Clinical, laboratory, and morphological characteristics of kidney damage
in lymphoproliferative disorders 44

CURRENT BASIC RESEARCH IN PRACTICAL MEDICINE

- I.A. Demina, T.Yu. Verzhbitskaya, S.A. Kashpor, S.A. Plyasunova, M.E. Dubrovina,*
L.G. Fechina, N.V. Myakova, E.V. Samochatova, A.A. Maschan, A.M. Popov
Immunophenotypic features of bone marrow tumor cell in Burkitt lymphoma/leukemia:
B-lineage acute lymphoblastic leukemia diagnostics opportunities 55
- M.A. Panteleev, A.A. Abaeva, D.Yu. Nechipurenko, S.I. Obyedennyi, A.N. Sveshnikova, A.M. Shibeko*
Physiology and pathology of extracellular vesicles. 62
- A.N. Khvastunova, L.S. Al-Radi, O.S. Fedyanina, U.L. Julhakyan, N.M. Kapranov,*
A.O. Zakirova, S.A. Lugovskaya, E.V. Naumova, F.I. Ataulakhanov, S.A. Kuznetsova
Determination of morphology and immunophenotype of circulating lymphoma cells
in patients with splenic marginal zone lymphoma using an anti-CD antibody microarray. 71

RARE DISORDERS: DIFFERENTIAL DIAGNOSIS AND THERAPY APPROACHES

- A.L. Melikyan, E.I. Pustovaya, E.K. Egorova, M.V. Kalinina, T.I. Kolosheynova,*
I.N. Subortseva, E.A. Gilyazitdinova, V.N. Dvirnyk
Differential diagnosis of thrombocytopenes. 78

Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома центральной нервной системы (клинический случай и обзор литературы)

К.А. Комратова, Ю.Г. Абугова, С.С. Озеров, Д.С. Абрамов, Г.В. Терещенко, Н.В. Мякова

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

Контакты: Юлия Георгиевна Абугова Yuliya.Abugova@fccho-moscow.ru

Поражение центральной нервной системы (ЦНС) при распространенных неходжкинских лимфомах (особенно в случаях опухолей из зрелых В-клеток у детей) встречается нередко в отличие от первичной лимфомы ЦНС (ПЛЦНС), которая является редкой экстранодальной формой неходжкинских лимфом, возникающей только в пределах ЦНС (в головном, спинном мозге, в оболочках мозга, в глазах). Частота ее встречаемости составляет у взрослых 1–2 % от числа лимфом и 5 % от всех опухолевых поражений ЦНС. Данные о распространенности в детском возрасте отсутствуют и ограничены описанием отдельных случаев. В данной статье представлен обзор литературы, посвященный диагностике и терапии ПЛЦНС, и продемонстрирован клинический случай такой лимфомы с интраспинальным поражением у ребенка 11 лет.

Ключевые слова: первичная лимфома центральной нервной системы, неходжкинские лимфомы, ритуксимаб, дети

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-10-16

Primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system (case report and literature review)

K.A. Komratova, Yu.G. Abugova, S.S. Ozerov, D.S. Abramov, G.V. Tereshchenko, N.V. Myakova

National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev,
Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia

The central nervous system (CNS) involvement in patients with non-Hodgkin's lymphomas is not uncommon, especially in children with mature B-cells lymphomas, unlike the primary CNS lymphoma (PCNSL). PCNSL is a rare extranodal form of NHL that occurs only in the CNS – in the brain, spinal cord, meninges, in the eyes, and not extending beyond CNS. Its frequency in adults is 1–2 % of lymphomas and 5 % of all CNS tumors. Data on prevalence in childhood are not available, limited to some case reports. This article presents a literature review about PCNSL diagnosis and treatment and case report of such lymphoma with intraspinal lesion in 11 years old child.

Key words: primary central nervous system large B-cell lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, rituximab, children

Введение

Первичные лимфомы центральной нервной системы (ПЛЦНС) среди экстранодальных локализаций у взрослых занимают 2-е место после лимфом желудка. Частота их встречаемости составляет у взрослых 1–2 % от числа лимфом и 5 % от всех опухолевых поражений центральной нервной системы (ЦНС) [1]. Исследование этой опухоли идет уже на протяжении 80 лет. ПЛЦНС была впервые описана в 1929 г. Р. Bailey как периваскулярная саркома [2]. В последующие классификации она входила как саркома из ретикулярных клеток и микроглиома. Множество онкологических и гематологических центров по всему миру изучают проблему ПЛЦНС, однако из-за редкости этих лимфом в популяции до сих пор нет ни одного рандомизированного исследования по лечению данной патологии.

Пропорционально увеличению лечебно-диагностических возможностей современной медицины

растет научно-практический врачебный интерес к экстранодальным лимфомам. С введением специфической полихимиотерапии (ритуксимаб) появилась возможность получать длительные полные ремиссии более чем у 50 % больных [2].

ПЛЦНС вызывает особенный интерес по нескольким причинам. Во-первых, за последние десятилетия увеличилось число заболевших данной формой лимфомы, во-вторых, в отличие от многих других первичных опухолей головного мозга, ПЛЦНС чувствительна к проводимому химиотерапевтическому лечению.

По данным программы SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) американского Национального института рака, за период с 1973–1975 по 1982–1984 гг. база данных по случаям возникновения ПЛЦНС в США увеличилась втрое [3]. Соотношение заболеваемости у мужчин и женщин составляет 2 : 1. Первичная лимфома может возникнуть у пациентов с синдромом приобретенного иммунодефицита

и другими заболеваниями иммунной системы. Среди инфицированных вирусом иммунодефицита 95 % составляют мужчины (7,38 : 1 соответственно) [4].

Численность заболевших лимфомой глаза с 70-х по 90-е гг. также увеличилась в 1,5 раза. Наблюдается рост числа всех видов экстраокулярных лимфом, но особенно высок рост числа лимфом головного мозга и глаз. Такое повышение частоты ПЛЦНС нельзя объяснить только достижениями нейровизуализации и опухолевой диагностики. Одним из объяснений поражения ПЛЦНС людей старшего возраста может быть общее старение населения, однако данные указывают на увеличение числа заболевших во всех возрастных группах.

Исторически при ПЛЦНС применялась радиотерапия, однако она не была способна индуцировать длительную ремиссию у большинства пациентов. Комбинированное лечение (химиотерапия и облучение) имело целью повысить эффективность радиотерапии. Результаты исследований позволили разработать основу современных лечебных подходов — комбинацию высокодозного метотрексата (MTX) и цитарабина с интратекальной терапией и лучевой консолидацией ремиссии.

Презентация опухоли может наблюдаться в разных отделах ЦНС в виде одиночного или множественного очагового поражения ткани мозга, лимфомы глаза, лептоменингеального поражения или поражения спинного мозга. Солитарное поражение головного мозга наблюдается у иммунокомпетентных пациентов в 70 % случаев, а у пациентов с иммунодепрессией — в 50 %. Анатомически поражение располагается в 85 % случаев супратенториально, в 15 % — инфратенториально. В паравентрикулярной зоне (таламус, базальные ганглии, мозолистое тело) локализуются 60 % случаев поражений. Лобные доли вовлечены в 20 %, височные — в 18 %, теменные — в 15 % и затылочные — в 4 % случаев [5]. Первичное поражение твердой мозговой оболочки при неходжкинских лимфомах (НХЛ) встречается крайне редко. Большинство публикаций представляют собой описания единичных клинических случаев. Такой вариант НХЛ чаще встречается у женщин среднего возраста в отличие от первичных ее вариантов с поражением вещества головного мозга, которые по частоте встречаемости преобладают у мужчин. Наиболее распространенным морфоиммунологическим вариантом НХЛ с поражением твердой мозговой оболочки является лимфома маргинальной зоны, которая характеризуется благоприятным прогнозом.

Размер опухоли при первичном выявлении варьирует, однако это преимущественно хорошо видимые опухоли более 2 см в диаметре. Без контрастирования такое образование может быть гипо-, изо-, гиперинтенсивным по отношению к окружающим тканям, а на компьютерной томограмме выглядит как плотное гомогенное образование. Перитуморозный отек,

локальный масс-эффект (смещение срединных структур) наблюдаются реже, чем при внутричерепных поражениях другой этиологии. Кальцификаты, кровоизлияния и кольцевидные образования редки. Первичные симптомы возникают при накоплении локального объема опухолевой ткани за счет повышения внутричерепного давления, поражения глаза, сдавления окружающей ткани головного мозга или проводниковых путей.

Морфология первичных лимфом центральной нервной системы

Более 90 % случаев ПЛЦНС представлены В-клеточными лимфомами. В классификации опухолей гемопоэтической и лимфатической систем (ВОЗ, 2008) выделена отдельная нозологическая форма — первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) ЦНС, которая является субтипом, но не имеет системного распространения и локализуется интраокулярно, в головном и спинном мозге. Кроме того, из этой группы исключены лимфомы у пациентов с иммунодефицитом и вторичные лимфопролиферативные заболевания.

Морфологически данный подтип ДВККЛ имеет диффузный тип роста, в составе опухоли хорошо различима периваскулярная инфильтрация. Клеточный состав представлен преимущественно элементами, напоминающими центробласты, имеется примесь из мелких лимфоцитов, макрофагов и реактивных астроцитарных клеток. Часто опухоль сопровождается некробиозом, встречаются поля некрозов с обилием пенистых макрофагов. Некроз может быть выражен в различной степени — вплоть до полного отсутствия витальной опухоли, так называемая исчезающая опухоль. Данное биологическое поведение затрудняет диагностический процесс [5].

Как и в любом другом случае диагностики лимфопролиферативных заболеваний, необходимым методом является иммуногистохимическое исследование. Клетки опухоли представлены CD20-позитивными В-лимфоцитами с частой коэкспрессией других пан-В-клеточных маркеров (CD19, CD22 или CD79a). Экспрессия CD10 выявлена в 10–20 %, BCL6 — в 60–80 % и яркая экспрессия IRF4/MUM1 — в 90 % случаев. Экспрессия BCL2 встречается часто и не связана с t(14;18).

К редким (не более 10 %) типам ПЛЦНС принадлежат Т-клеточная, анапластическая, индолентная лимфомы, а также лимфома глаза и лимфома Беркитта.

Доля Т-клеточных лимфом, по данным литературы, в западных странах составляет около 2 % всех случаев ПЛЦНС. Исследование наибольшего числа пациентов с Т-клеточными ПЛЦНС (45 больных из 7 стран) проведено Международной группой по исследованию ПЛЦНС (The international primary CNS lymphoma collaborative group). В этом исследовании

представлены в основном супратенториальные поражения, морфологически наиболее часто (28 %) встречались ангиоцентрические опухоли. В половине случаев клетки описаны как мелкие или средние, а в остальных случаях — как плеоморфные или крупные [6].

В литературе сообщено всего о 20 случаях анапластической крупноклеточной лимфомы, и все они не связаны с иммунодефицитом. Большинство из них встречается у пациентов младше 22 лет. Морфологически опухоль представлена крупными клетками с плеоморфными ядрами и множественными ядрышками. Большая часть этих лимфом имеет положительные Т-клеточные маркеры. Экспрессия CD45, CD30 и эпителиального мембранного антигена различна [6].

Индолентные лимфомы — чрезвычайно редкие заболевания (всего 3 % ПЛЦНС). Супратенториальные локализации наиболее часты. Международной группой по исследованию ПЛЦНС были опубликованы результаты исследования 40 пациентов, у которых 32 (80 %) ПЛЦНС были В-клеточными и 8 (20 %) Т-клеточными [7].

Первичная лимфома глаза поражает сетчатку, стекловидное тело и зрительный нерв. Большинство случаев представлены билатеральным поражением, и в дальнейшем, при прогрессировании заболевания, отмечают распространение с поражением головного мозга [8].

Первичная лептоменингеальная лимфома обычно проявляется повышением внутричерепного давления, множественным поражением черепных нервов или вовлечением спинномозговых корешков на различном уровне.

Клинические особенности первичной лимфомы центральной нервной системы

Обычно ПЛЦНС характерна для пациентов старшей возрастной группы и редко встречается в детском возрасте. В большинстве случаев симптомы появляются только за несколько недель до начала медицинского поиска. У 73 % пациентов доминируют фокальные симптомы. Когнитивные и личностные изменения (43 %) — самые частые начальные симптомы ПЛЦНС — связаны с излюбленной локализацией опухоли с поражением лобных долей, мозолистого тела и глубоко расположенных перивентрикулярных структур. Симптомы, обусловленные сдавлением окружающих тканей (головная боль, тошнота, рвота), проявляются в 33 % случаев ПЛЦНС, судорожный синдром — в 10–14 %, нарушения зрения — в 4 %.

Около 15 % больных ПЛЦНС имеют поражение глаз, тогда как от 50 до 80 % пациентов с изолированной лимфомой глаза в дальнейшем заболевают лимфомой головного мозга. Симптомы поражения органа зрения выражаются в нечеткости изображения, снижении остроты зрения, более чем у половины больных симптомов нарушения зрения нет. Часто установление

правильного диагноза откладывается у больных с изолированной лимфомой глаза из-за ошибочной диагностики витреита или увеита.

Дифференциальный диагноз

Рентгенологически ПЛЦНС не имеет особенностей, позволяющих четко отличать ее от других поражений ЦНС. Дифференциальный диагноз необходимо проводить с глиобластомой и вторичным поражением ЦНС метастазами других опухолей. Также необходимо отличить ПЛЦНС от проявлений демиелинизирующих заболеваний, а также от последствий инфекционного и паразитарного заражения (абсцесс, церебральный токсоплазмоз). Для исключения этих болезней необходимы биопсия и гистологическое и иммуногистохимическое исследование материала опухоли [9].

Лечение первичных лимфом центральной нервной системы

В настоящее время не заявлено ни одного крупномасштабного клинического исследования по лечению ПЛЦНС. Большинство представляют собой исследования II фазы, включающие не более 200 пациентов. Не разработано достоверно обоснованной тактики ведения таких пациентов. До сегодняшнего дня остро дискутируется вопрос возможности и необходимости проведения лучевой терапии (ЛТ) в качестве 1-й линии лечения пациентов с ПЛЦНС [9]. Терапия иногда требует назначения дополнительных препаратов для коррекции неврологических нарушений. Однако здесь нужно быть весьма осторожными. Например, следует избегать профилактического использования антиэпилептических препаратов в связи с их способностью усиливать токсические эффекты химиотерапии.

Принципиальная схема определения тактики лечения для взрослых пациентов выглядит следующим образом: при исходно низком статусе по шкале Карновского (менее 40 баллов) и клиренсе креатинина менее 50 мл/мин больным показана краниальная ЛТ. При выявлении клеток лимфомы в спинномозговой жидкости проводится интратекальное введение МТХ. При выявлении по данным магнитно-резонансной томографии (МРТ) патологических очагов в спинном мозге рассматривается вопрос о возможности локального спинального облучения.

Детям проводится лечение по стандартным протоколам для IV стадии заболевания, включающим терапию высокодозным метотрексатом и (или) цитозаром, таргетную терапию ритуксимабом, интратекальное лечение с установкой, при необходимости, резервуара Оммайя. Вопросы лучевой терапии решаются индивидуально.

Хирургическое лечение. Хирургические методы при ПЛЦНС применимы в целях гистологической диагностики. Радикальная резекция не увеличивает продолжительность жизни, но может быть причиной

развития неврологических нарушений. Используется стереотаксическая биопсия [9]. Иногда более предпочтительна биопсия открытая, чем стереотаксическая, особенно при локализации опухоли в труднодоступных местах (ствол головного мозга). Хирургическое лечение также используется для декомпрессии, когда тяжесть состояния пациента обусловлена симптомами сдавления головного и (или) спинного мозга [10].

Кортикостероиды. При ПЛЦНС кортикостероиды оказывают противоопухолевое и противоотечное действие, вызывая, по результатам радиографических исследований, разрушение опухолевых клеток и уменьшение размера опухоли у 40 % больных. Кортикостероиды начинают оказывать эффект в кратчайшие сроки, приводя к заметной регрессии симптомов заболевания и уменьшению размеров опухоли в течение 24–48 ч.

Лучевая терапия. Некоторые виды ПЛЦНС радиочувствительны, и краниальное облучение являлось стандартом лечения многие годы. Однако мнения о необходимости ЛТ весьма разноречивы — от полного ее отрицания до рекомендаций проведения исключительно ЛТ [11].

Тотальное облучение головы может быть необходимо при диффузно-инфильтративном росте опухоли. Медиана выживаемости после такого лечения колеблется от 10 до 18 мес. Краниоспинальное облучение не увеличивает выживаемости, зато ассоциируется со значительной смертностью больных, ограничивая возможности применения впоследствии химиотерапии. При локальном облучении опухоли (например, с использованием линейного ускорителя) необходимо распространять его и на окружающие опухоль ткани в пределах 2 см. Вопрос об оптимальной дозе тотального облучения головы остается спорным, но, по данным некоторых исследований, ее границы лежат между 40–50 Гр.

Химиотерапия. Применение химиотерапии значительно улучшило результаты лечения ПЛЦНС. Выбор лекарственных препаратов для лечения ПЛЦНС обусловлен их способностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Это прежде всего МТХ, цитарабин, прокарбазин, винкристин, кармустин, ломустин, тиотеп, топотекан, циклофосфамид и кортикостероиды [12].

МТХ в высоких дозах является одним из наиболее часто используемых препаратов для лечения ПЛЦНС. На основании полученных данных самыми эффективными режимами лечения у взрослых признаны монотерапия высокими дозами МТХ (от 1 до 8 г/м²), а также комбинация его с другими химиотерапевтическими агентами с последующим тотальным облучением головы. Применение этого комбинированного метода приводит к 100 % ответу на лечение и увеличению выживаемости до 30–60 мес. В протоколах лечения детей стандартная доза МТХ равна 5–8 г/м² за 24 ч в комбинации с другими химиопрепаратами [13].

Лимфома глаза исключительно чувствительна к кортикостероидам и локальному облучению. К сожалению, у большинства больных возникают повторные случаи заболевания с локализацией лимфомы или в глазном яблоке, или в головном мозге. Витрэктомия улучшает зрение путем элиминации скопления опухолевых клеток в полости стекловидного тела, создающих препятствия для формирования изображения. Ввиду очень частого двустороннего поражения глаз рекомендовано проводить ЛТ на оба глаза.

В последние годы для лечения первичной лимфомы глаза все чаще рекомендуют химиотерапию. При рецидивных и рефрактерных первичных лимфомах глаза рекомендована дополнительная интратекальная или системная химиотерапия с дополнительным введением МТХ в полость глазного яблока. Однако даже при таких подходах 5-летняя общая выживаемость составляет менее 25 %.

Рецидивы первичных лимфом центральной нервной системы

Риск возникновения рецидива для пациентов, получающих комбинированную терапию, составляет примерно 50 %. Большинство рецидивов возникает в течение первых 2 лет с момента окончания первоначальной терапии, но возможны и более поздние рецидивы — в течение 5 лет после завершения лечения. Пациенты с лимфомой глаза и лептоменингитом имеют большую вероятность возникновения рецидива. Рецидивы опухоли в головном мозге возникают на месте первичного очага или в другом участке мозга. Более чем в 10 % случаев наблюдаются рецидивы лептоменингеальной, системной лимфомы и лимфомы глаза [14].

Прогноз при рецидивах опухоли у большинства больных плохой. У некоторых пациентов сохраняется чувствительность к терапии несмотря на многочисленные рецидивы. Сообщалось об эффективном применении высокодозного МТХ, цитарабина, комбинации PCV (прокарбазин, ломустин и винкристин) и терапии высокими дозами циклофосфамида [7]. ЛТ особенно эффективна при рецидивах лимфомы глаза. Однако у пациентов с предшествующим тотальным облучением головы существует высокий риск возникновения токсического поражения нервной системы.

При том, что случаи ПЛЦНС описаны с одинаковой частотой у взрослых и у детей, единых педиатрических протоколов диагностики и лечения этого варианта НХЛ не существует. В литературе представлена информация о почти 100 случаях первичной НХЛ ЦНС у детей, что позволяет с высокой долей вероятности диагностировать эту опухоль и предлагать максимально эффективную ее терапию [11]. Медиана возраста составляет 7–14 лет. Мы приводим описание особенно редкого случая такой лимфомы с интраспинальным поражением у ребенка 11 лет.

Клинический случай

Пациентка А., 11 лет. Анамнез жизни: сведений о раннем развитии больной нет. Мать лишена родительских прав (на тот момент ребенку был 1 год 1 мес). Из перенесенных заболеваний: ОРВИ, ветряная оспа. Развивалась до удочерения с психомоторной задержкой. Анамнез заболевания: с февраля 2016 г. у ребенка появились слабость, снижение мышечной силы, быстрая утомляемость. В марте во время игры резко повернула голову, после чего появились боли в области шеи, вынужденное положение головы — шея несколько наклонена вперед. Травма колена 4.04.16 г., после чего на фоне болей в ноге и шее стала прогрессировать мышечная слабость. С конца апреля ребенок не мог самостоятельно ходить, «подкашивалась» левая нога.

Осмотрена неврологом 26.04.16 г., заподозрено дегенеративное заболевание нервной системы, рекомендована срочная госпитализация в стационар по месту жительства. 27.04.16 г. девочка была госпитализирована в детскую клиническую больницу по месту жительства, где были констатированы нарушения двигательных функций и проведена люмбальная пункция. В ликворе цитоз — 940/мм³, лимфоцитарный. По данным МРТ ЦНС (29.04.16 г.) — очаговое поражение оболочек спинного мозга на уровне С6 в пояснично-крестцовом отделе, поражение височной доли вещества головного мозга слева.

На электронейромиографии (29.04.16 г.) обнаружены признаки умеренно выраженной аксонально-демиелинизирующей невропатии. Заключение по диагнозу не было. По тяжести состояния была проведена терапия высокодозным иммуноглобулином, пульс-терапия метипредом, после чего отмечалась положительная динамика в виде восстановления двигательных функций (ребенок стал садиться, ходить). При попытке отмены терапии отмечена отрицательная динамика в виде возобновления неврологических симптомов и резкая потеря массы тела (около 7 кг за 2–3 нед), в связи с чем терапия кортикостероидами была продолжена в течение месяца. С 20.06.16 г. в состоянии ребенка отмечена отрицательная динамика в виде появления очаговой симптоматики — провисание угла рта, развитие тетрапареза. В ликворе от 21.06.16 г. цитоз — 1398/мм³, бластные клетки составляли 49 %, морфологически, возможно, с чертами моноцитарной природы. Для дальнейшей диагностики переведена в гематологическое отделение областной больницы с тяжелой неврологической симптоматикой, явлениями тетрапареза, выраженным снижением массы тела.

В гемограмме от 24.06.16 г.: лейкоциты 7,2 тыс/мкл (палочко-ядерные 13 %, сегментоядерные 48 %, моноциты 7 %, лимфоциты 31 %), гемоглобин 105 г/л, тромбоциты 216 тыс/мкл. В миелограмме бласты менее 5 %, клеток с атипичной морфологией не выявлено. Были выполнены 3 люмбальные пункции (21.06.16, 24.06.16 и 29.06.16 г.) с введением метотрексата 12 мг, цитозара 30 мг, дексаметазона 2 мг. Цитоз в ликворе снизился, бласты не определялись.

В связи с отсутствием диагноза и невозможностью определить тактику терапии ребенок был переведен в ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (июль 2016 г.).

При поступлении тяжесть состояния была обусловлена основным заболеванием, тяжелой нутритивной недостаточностью (дефицит массы тела более 25 %) и выраженным неврологическим дефицитом (тетрапарез смешанного типа с доминированием периферического, мозаичная гипотрофия мышц правой кисти, суставной синдром с ограничением объема движений).

На МРТ головного и спинного мозга от 12.07.16 г. обнаружен участок патологического накопления парамагнетика в области внутреннего уха справа, не определявшийся в предыдущих исследованиях (май 2016 г.); нивелирование участка по медиобазальной поверхности левой височной доли; отрицательная динамика изменений в спинном мозге на уровне шейного отдела с увеличением зоны поражения, вовлечением спинного мозга с его утолщением и отеком (рис. 1).

В ликворограмме от 11.07.16 г. цитоз — 20/мм³, в цитопрепарате — 99 % лимфоцитов, остальные показатели без особенностей. В миелограмме из 4 точек от 11.07.16 г. опухолевых клеток не найдено.

Компьютерная томография средостения и брюшной полости от 25.07.16 г. без патологии.

Для получения субстрата 19.07.16 г. проведена открытая биопсия спинного мозга на уровне С5–С6 с частичным удалением опухоли.

Описание и гистологическое заключение: морфологические признаки агрессивной В-клеточной лимфомы, в большей степени соответствуют диффузной В-клеточной лимфоме.

При цитогенетическом исследовании методом FISH транслокации t(8;14) перестроек генов C-MYC и IgH не обнаружено.

Таким образом, клиническая симптоматика с нарастающими симптомами неврологической патологии, дефицитом массы тела, данные диагностических исследований (изменения в анализах ликвора, наличие очаговых поражений оболочек и вещества спинного мозга по данным МРТ), результаты исследования удаленной опухоли спинного мозга с проведением гистологического, иммунофенотипического и цитогенетического исследований, отсутствие патологических изменений в костномозговом пунктате, органах грудной и брюшной полости и малого таза дают основание для постановки диагноза ПЛЦНС. Была начата терапия по протоколу В-NHL-2010M [15].

С учетом поражения ЦНС для полноценного локального воздействия ребенку был поставлен резервуар Ом-майя для интравентрикулярных введений цитостатиков. Было проведено 6 курсов иммунохимиотерапии с ритуксимабом, высокодозным цитозаром и высокодозным МТХ. Контрольное обследование после 2 блоков, включая МРТ ЦНС с контрастным усилением

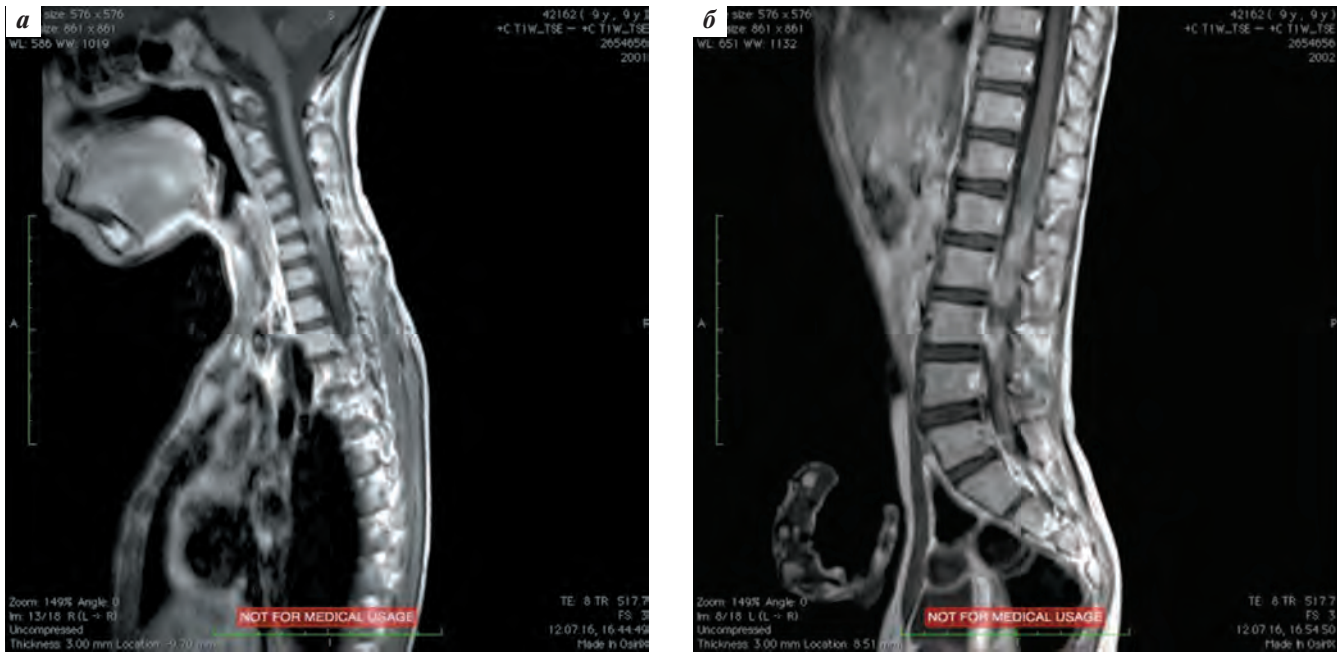


Рис. 1. Пациентка А., 11 лет, магнитно-резонансная томография головного (а) и спинного (б) мозга: участки патологического накопления парамагнетика с вовлечением спинного мозга с его утолщением и отеком

Fig. 1. Female patient A., 11 years, magnetic resonance imaging of the brain (a) and spinal cord (b): areas of pathological paramagnetic accumulation with spinal cord involvement accompanied by thickening and edema of the spinal cord

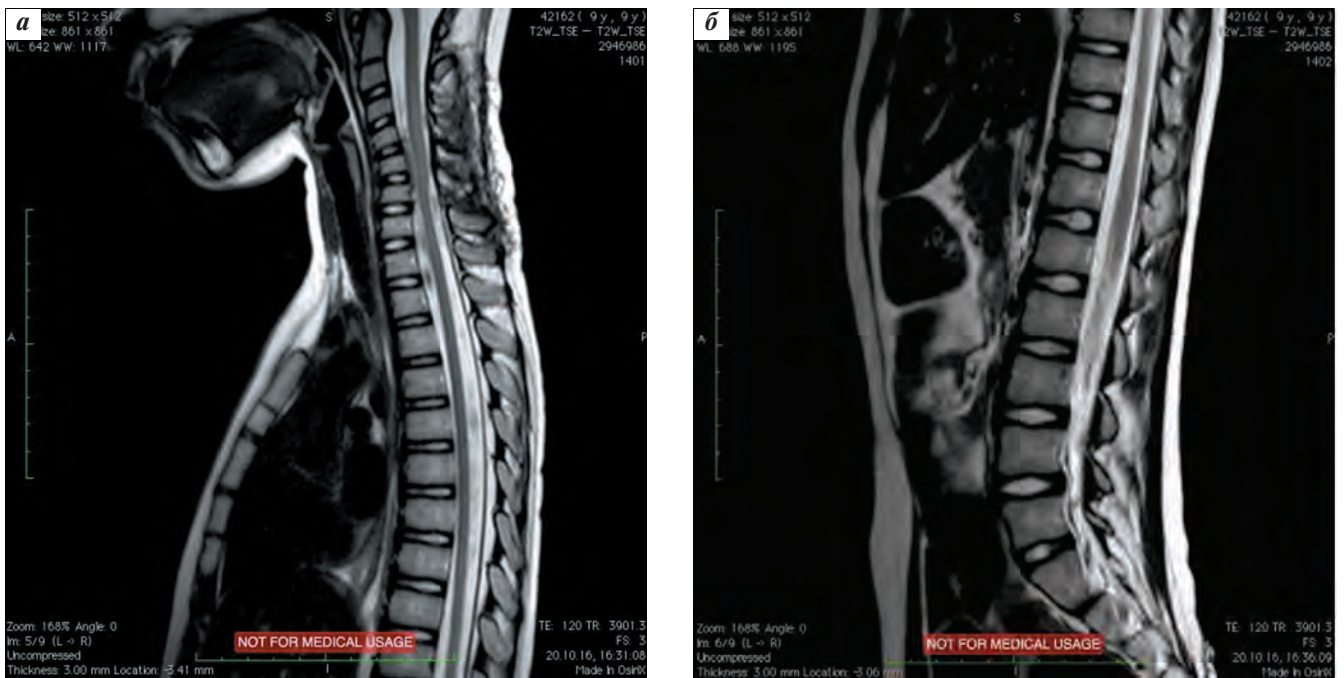


Рис. 2. Та же пациентка, магнитно-резонансная томография головного (а) и спинного (б) мозга: в позвоночном канале (экстрамедулярно) на шейном уровне и на уровне корешков конского хвоста — значительное уменьшение объема патологической ткани

Fig. 2. Same patient, magnetic resonance imaging of the brain (a) and spinal cord (b): significant reduction of pathological tissue volume in the spinal canal (extramedullary) at the neck level and the level of cauda equina spinal roots

(от 2.09.16 г.), выявило положительную динамику, значительное сокращение объема контраст-позитивной патологической ткани в позвоночном канале (экстрамедулярно) на шейном уровне и на уровне корешков конского хвоста (рис. 2). После окончания всех курсов терапии признаков опухолевого поражения в позвоночном

канале не обнаруживалось. В настоящее время ребенок находится в ремиссии, терапия закончена в январе 2017 г.

Неврологический статус ребенка значительно улучшился, девочка может самостоятельно сидеть, двигаться, ее речь не нарушена; сохраняются парез левой руки

и ног, ограничение при разгибании в суставах. Нутритивный статус ребенка удовлетворительный, питается через рот, назогастральный зонд был удален после 2-го блока.

Данный случай демонстрирует крайне редкую интраспинальную локализацию опухоли. Особенностью диагностики в таких ситуациях является необходимость экстренного вмешательства и как можно более раннее начало терапии. Биопсия новообразования должна была быть проведена уже после первой люмбальной пункции, при которой точный диагноз не удалось установить. С учетом быстрого нарастания неврологической симптоматики агрессивная хирургическая диагностическая тактика являлась единственно возможной и необходимой.

Заключение

Поскольку ПЛЦНС является относительно редкой формой экстракраниальных НХЛ, ее крайне малая встречаемость у детей затрудняет диагностику, при том что только ее своевременность позволяет получить хорошие результаты при проведении направленной терапии. Диагностика опухолей ЦНС заслуживает особого внимания и требует настороженности врачей разных специальностей. Отсутствие стандартов лечения и различная чувствительность ПЛЦНС к терапии требуют дальнейшего исследования особенностей этого заболевания и разработки новых подходов к лечению.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Batchelor T., Loeffler J.S. Primer CNS Lymphoma. J Clin Oncol 2006;24(8):1281–8. DOI: 10.1200/JCO.2005.04.8819.
2. Bailey P. Intracranial sarcomatous tumors of leptomeningeal origin. Arch Surg 1929;18:1359–402.
3. Abrey L.E., DeAngelis L.M., Yahalom J. Long-term survival in primary CNS lymphoma. J Clin Oncol 1998;16:859–63. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.3.859.
4. Kadan-Lottick N.S., Skluzarek M.C., Gurney J.G. Decreasing incidence rates of primary central nervous system lymphoma. Cancer 2002;95:193–202. DOI: 10.1002/cncr.10643.
5. Baumann M.A., Ritch P.S., Hande K.R. et al. Treatment of intraocular lymphoma with high-dose Ara-C. Cancer 1986;57:1273–5. PMID: 2418934.
6. Schwechheimer K., Schwarzkopf G., Braus D. et al. Primary cerebral malignant non-Hodgkin's lymphomas. Histological and immunopathological findings on stereotactic brain biopsies. Clin Neuropathol 1989;8:250–1.
7. Reni M., Ferreri A.J., Landoni C., Villa E. Salvage therapy with temozolomide in an immunocompetent patient with primary brain lymphoma. J Natl Cancer Inst 2000;92(7):575–6. PMID: 10749917.
8. DeAngelis L.M., Seiferheld W., Schold S.C. et al. Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93–10. J Clin Oncol 2002;20:4643–8. DOI: 10.1200/JCO.2002.11.013.
9. Grimm S.A., McCannel C.A., Omuro A.M. et al. Primary CNS lymphoma with intraocular involvement: International PCNSL Collaborative Group Report. Neurology 2008;71(17):1355–60. DOI: 10.1212/01.wnl.0000327672.04729.8c.
10. Bednar M.M., Salerni A., Flanagan M.E., Pendlebury W.W. Primary central nervous system T-cell lymphoma. J Neurosurg 1991;74:668–72. DOI: 10.3171/jns.1991.74.4.0668.
11. Abrey L.E., Yahalom J., DeAngelis L.M. Treatment for primary central nervous system lymphoma (PCNSL): the next step. J Clin Oncol 2000;18:3144–50. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.17.3144.
12. McGuirt W.F., Feehs R.S., Strickland J.L., McKinney W.M. Irradiation induced atherosclerosis: a factor in therapeutic planning. Ann Otol Rhinol Laryngol 1992;101:222–8. DOI: 10.1177/000348949210100305.
13. Kawamura T., Ishiguchi T., Shibamoto Y. et al. Results of Primary Central Nervous System Lymphoma Treated by Radiation and Chemotherapy: Retrospective Analysis of Twelve Institutions in the Tokai District of Japan, 1995–1999. Radiat Med 2006;1(24):9–16. PMID: 16715656.
14. Ferreri A.J., Blay J.Y., Reni M.F. et al. Relevance of intraocular involvement in the management of primary central nervous system lymphomas. Ann Oncol 2002;13:531–8. PMID: 12056702.
15. Смирнова Н.В., Мякова Н.В., Белогорова М.Б. и др. Лечение зрелоклеточных В-клеточных неходжкинских лимфом с использованием комбинированной иммунохимиотерапии: возможности оптимизации терапевтической стратегии. Онкогематология 2015;10(4):15–25. [Smirnova N.V., Myakova N.V., Belogorova M.B. et al. Treatment of B-NHL with combined immunochemotherapy: ability to treatment optimization. Onkogematologiya = Oncohematology 2015;10(4):15–25. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-15-24.

Адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами, экспрессирующими химерные антигенные рецепторы

А.А. Павлова^{1,2}, М.А. Масчан³, В.Б. Пономарев²

¹Сколковский институт науки и технологий, инновационный центр «Сколково»; Россия, 143026 Москва, ул. Нобеля, 3;

²Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; США, 10065 Нью-Йорк, Йорк-авеню 1275;

³Лаборатория клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Владимир Борисович Пономарев ponomarev@mskcc.org

Значительная смертность от онкологических заболеваний в целом и онкогематологических в частности побуждает научно-медицинское сообщество к разработке новых методов лечения. Одним из новейших методов является адоптивная клеточная терапия с использованием генетически-модифицированных Т-лимфоцитов больного, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR) к специфическим опухолевым антигенам. Несмотря на высокую стоимость и наличие осложнений в применении, многообещающие клинические испытания у больных даже на поздних стадиях онкозаболеваний позволяют рассчитывать на успешное внедрение этого метода в практику.

В статье представлен обзор основных принципов данной технологии, опубликованных результатов клинических испытаний CAR Т-клеток с акцентом на таргетирование антигена CD19, осложнений данной терапии, механизмов резистентности опухолей к действию CAR Т-клеток и потенциальных путей ее преодоления.

Ключевые слова: онкогематологические заболевания, адоптивная терапия, модифицированные Т-клетки, химерный антигенный рецептор

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-17-32

Adoptive immunotherapy with genetically engineered T lymphocytes modified to express chimeric antigen receptors

A.A. Pavlova^{1,2}, M.A. Maschan³, V.B. Ponomarev²

¹Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center; 3 Nobel St., Moscow 143026, Russia;

²Memorial Sloan Kettering Cancer Center; 1275 York Avenue, New York, NY 10065, USA;

³National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela Str., Moscow 117997, Russia

Significant mortality due to oncological diseases as a whole, and oncohematological diseases in particular, motivates scientific and medical community to develop new treatment methods. One of the newest methods is adoptive cell therapy using patient's own T-cells modified to express chimeric antigen receptors (CAR) to tumor-specific antigens. Despite high cost and side effects of treatment, promising clinical trials even in patients with advanced disease allow to anticipate successful use of this method in clinical practice.

The article includes a review of the main principles of this technique, published results of clinical studies of CAR T-cells with a focus on CD19 gene targeting, complications of this therapy, mechanisms of tumor resistance to CAR T-cells, and potential ways to overcome it.

Key words: oncohematological diseases, adoptive therapy, modified T-cells, chimeric antigen receptor

Вступление

Несмотря на успехи в диагностике и терапии, онкологические заболевания занимают 2-е место в структуре смертности (15,5 %) после болезней системы кровообращения [1]. При диссеминированных опухолях эффективность стандартных программ лечения, включая хирургию, лучевую терапию и химиотерапию, остается минимальной.

Одним из наиболее перспективных направлений в современной онкологии является иммунотерапия, которая на данный момент включает такие подходы, как ингибиторы контрольных путей (checkpoint inhibitors), нативные и конъюгированные с химиопрепаратами

или радиоактивными частицами антитела, противоопухолевые вакцины и адоптивную клеточную терапию. Адоптивная терапия генно-модифицированными Т-лимфоцитами стала, безусловно, прорывным направлением в лечении ряда гематологических опухолей. В ее основе лежит создание пула опухоль-специфичных цитотоксических лимфоцитов путем внесения *ex vivo* трансгена, кодирующего химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR). Такие клетки получили в англоязычной литературе название CAR Т-клетки.

После длительного периода разработок и тестирования *in vitro* и на лабораторных животных данная технология была разрешена к клиническим испыта-

ниям в ряде стран Европы, Азии и Северной Америки. Наиболее впечатляющие результаты были получены при применении CAR T-клеток у больных с В-клеточными лимфомами, хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и особенно у больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ).

Из экспериментальной технологии лечение онкологических заболеваний CAR T-клетками превращается в быстро развивающийся подход к терапии с более чем 100 зарегистрированными клиническими исследованиями при гематологических новообразованиях и солидных опухолях.

В этой обзорной статье мы обсудим основные принципы данной технологии и опубликованные результаты клинических испытаний CAR T-клеток, с акцентом на таргетирование антигена CD19. Мы также кратко остановимся на осложнениях данной терапии, механизмах резистентности опухолей к действию CAR T-клеток и потенциальных путях ее преодоления.

История

В первых работах, посвященных CAR [2–4], Т-клеточные тельца (T-bodies) — как их изначально назвали — создавались для фундаментальных исследований механизмов активации Т-лимфоцитов. Эта модель была использована для разьяснения физико-химических параметров, обуславливающих сигнал от Т-клеточного рецептора (ТКР), и изучения роли

молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) и дополнительных (костимуляторных) рецепторов.

Известно, что обычные Т-лимфоциты распознают белковые антигены в виде коротких пептидов, представленных в комплексе с молекулой ГКГ на поверхности клеток. Благодаря сложному механизму процессинга и презентации антигена Т-лимфоциты способны распознавать внутриклеточные антигены. В отличие от ТКР, антитела распознают антигенные эпитопы нативных молекул белка на поверхности раковых клеток. Взаимодействие антиген — антитело не требует процессинга и презентации антигена, не зависит от ГКГ, однако в физиологических условиях взаимодействие антител с клеточными антигенами ограничено молекулами, экспрессированными на наружной мембране клеток. ТКР и иммуноглобулины относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и демонстрируют существенную гомологию молекулярной структуры. Альфа-субъединица ТКР гомологична легкой, а бета-субъединица — тяжелой вариabельным цепям иммуноглобулинов, за исключением отсутствующего в ТКР Fc фрагмента (от англ. fragment crystallizable — кристаллизующийся фрагмент). Более того, гены α -цепи ТКР проходят тот же тип рекомбинации (VJ), что и гены легких цепей иммуноглобулинов, гены β -цепи проходят VDJ-рекомбинацию, так же как и гены тяжелых цепей иммуноглобулинов [4] (рис. 1).

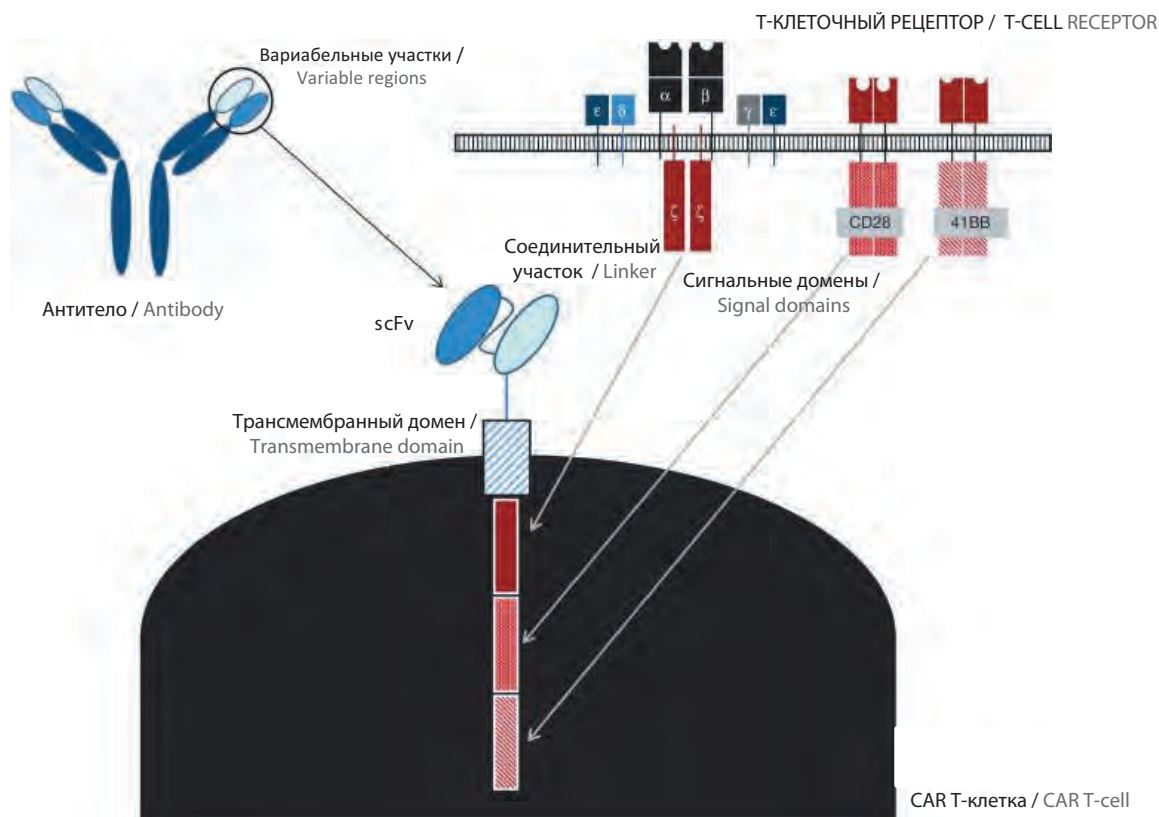


Рис. 1. Основные компоненты химерных антигенных рецепторов различных поколений (адаптировано из [5])

Fig. 1. Main components of chimeric antigen receptors of different generations (adapted from [5])

Внутриклеточный участок ТКР короткий и не несет сигнальных последовательностей, необходимых для передачи внутриклеточного сигнала. Активирующий сигнал от ТКР передается через комплекс молекул CD3, в частности через сигнальные последовательности ζ -цепи CD3. Взаимодействие ТКР с антигенным пептидом в комплексе с ГКГ запускает передачу сигнала, функциональные последствия которого определяются физиологическим или экспериментальным контекстом. В частности, в условиях классической антиген-презентации при развитии иммунного ответа во время инфекции активирующий сигнал запускает пролиферацию, дифференцировку и созревание эффекторных функций Т-лимфоцитов [4].

Сходство в строении ТКР и иммуноглобулина и организации соответствующих геномных регионов стало основой для попытки совместить антиген-связывающую вариабельную часть антител с константной частью ТКР в одном полипептиде. Целью такой «молекулярной хирургии» является придание ТКР способности распознавать антигены независимо от ГКГ и сохранять внутриклеточные сигнальные пути и функционал Т-лимфоцитов. Успех такой манипуляции позволяет объединить гигантский репертуар специфичностей и возможностей инжиниринга моноклональных антител с эффекторным разнообразием Т-лимфоцитов. Химерные рецепторы 1-го поколения представляют собой молекулы, в которых внеклеточная антиген-распознающая часть получена из моноклонального антитела с известной специфичностью, а внутриклеточная часть представлена нативным ТКР или химерной молекулой, включающей фрагмент ζ -цепи CD3 (см. рис. 1).

Цитотоксическая активность первых CAR изучалась с использованием гибридных конструкций [6]. С этой целью были созданы Т-клетки, экспрессирующие рецепторы, специфичные к простат-специфическому мембранному антигену (prostate-specific membrane antigen, PSMA). Коинкубация клеточной линии рака простаты (LnCAP), экспрессирующей на своей поверхности PSMA со специфичными к нему CAR Т-клеток, показала, что активированные лимфоциты проходили 2–3 деления, после чего подвергались апоптозу [7].

Эти результаты подтвердились позже при первых клинических испытаниях CAR Т-клеток в группе пациентов с метастатическим раком яичников, метастатическим раком почки, лимфомой, нейробластомой, где были использованы химерные рецепторы 1-го поколения и отмечены низкая эффективность терапии, отсутствие значимой пролиферации и быстрая гибель терапевтических клеток [8, 9].

К середине 1990-х годов был расшифрован механизм активации Т-лимфоцитов в процессе физиологического иммунного ответа. Было установлено, что для полноценной активации, дифференцировки и пролиферации Т-клетками необходимы наличие

специфического взаимодействия комплекса антиген/молекула ГКГ с ТКР (сигнал 1) и взаимодействие костимулирующих рецепторов (CD28, 4-1BB, OX-40) на поверхности Т-клеток с соответствующими лигандами (CD80/86, 4-1BBL, OX-40L) на антигенпрезентирующих клетках (сигнал 2).

Взаимодействие CD28 с лигандом CD80/CD86 на поверхности антиген-презентирующих клеток предотвращает индуцированную активацией гибель Т-лимфоцитов и обеспечивает клональную экспансию и функциональное созревание активированных Т-лимфоцитов [10, 11]. Стало очевидным, что отсутствие лигандов костимуляторных рецепторов на поверхности опухолевых клеток предотвращает полноценную активацию CAR Т-клеток, несмотря на специфичное распознавание антигена на поверхности клетки-мишени.

Именно использование CAR, дополненных костимулирующим доменом — рецепторов 2-го поколения — стало настоящим прорывом в adoptивной клеточной терапии и выявило гигантский потенциал этой терапии [12].

Химерный антигенный рецептор

Сегодня CAR — это рекомбинантный рецептор, обеспечивающий как специфичность взаимодействия, так и активацию Т-лимфоцитов. CAR распознает мишень с помощью внеклеточного домена — одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (single-chain variable fragment, scFv), отвечающего за специфичность узнавания антигена. Активацию Т-клеток, пролиферацию и созревание эффекторных функций обеспечивает внутриклеточный сигнальный домен, состоящий из ζ -цепи CD3 и дополнительных сигнальных доменов, заимствованных у костимуляторных рецепторов, — как правило, CD28 или 4-1BB (CD137) (рис. 2).

Химерные рецепторы, содержащие один костимуляторный домен, принято считать конструкциями 2-го поколения, именно такие модификации рецепторов

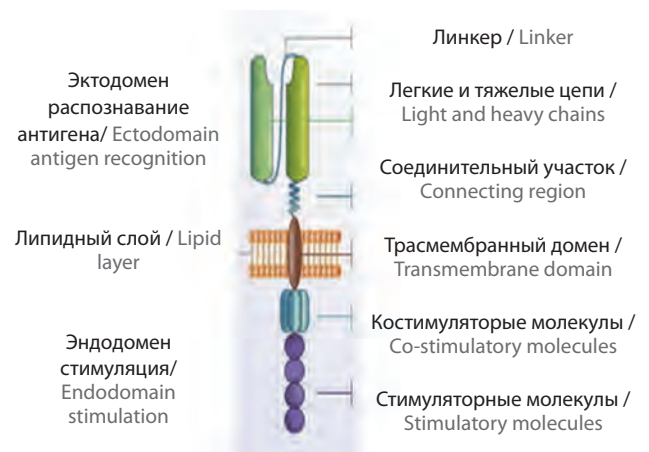


Рис. 2. Строение химерного антигенного рецептора (адаптировано из [13])

Fig. 2. Chimeric antigen receptor anatomy (adapted from [13])

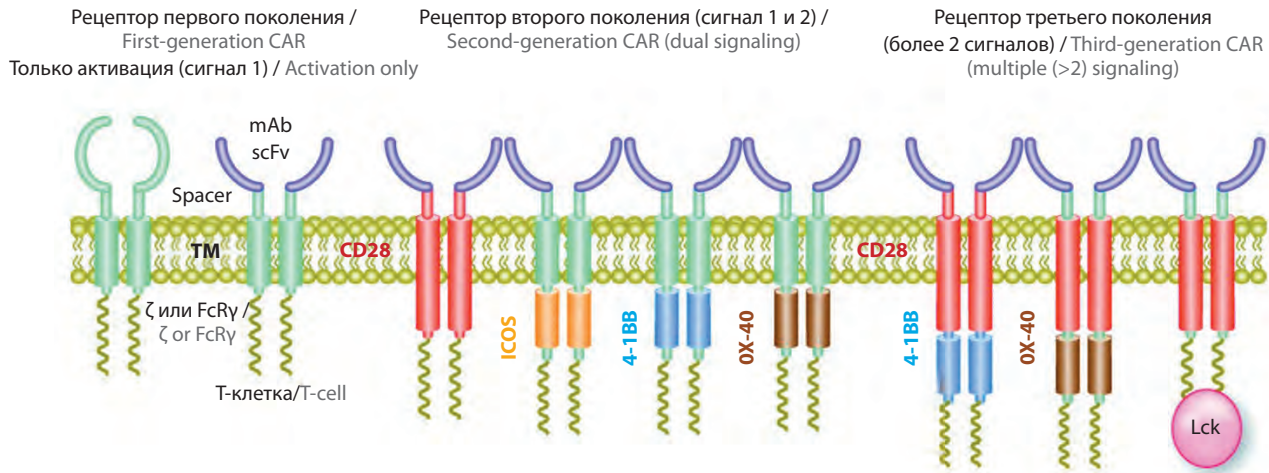


Рис. 3. Поколения химерных антигенных рецепторов (адаптировано из [18])
Fig. 3. Generations of chimeric antigen receptors (adapted from [18])

находятся в настоящее время на этапе клинических испытаний 2–3 фазы. В конструкциях 3-го поколения была предпринята попытка улучшить функциональные свойства молекул с помощью включения 2-го костимуляторного домена, однако убедительных данных о преимуществе таких вариантов не получено [14–17] (рис. 3).

Требования к Т-клеткам и выбор мишени для CAR

После демонстрации принципиальной возможности управления специфичностью Т-лимфоцитов с помощью антиген-распознающих фрагментов моноклональных антител и обеспечения их высокой функциональной активности за счет синтетических внутриклеточных сигнальных доменов ключевым вопросом на пути разработки медицинского применения CAR Т-клеток стал выбор антигена. Основным механистическим требованием к мишеням для CAR Т-клеток, в сравнении с физиологическими Т-лимфоцитами, является экспрессия белка или иного антигена на поверхности опухолевой клетки. Теоретически потенциальные опухолевые антигены можно разделить на несколько групп:

- 1) антигены, содержащие новую белковую последовательность, которая появилась в результате соматической мутации и экспрессирована только опухолевыми клетками, так называемые неоантигены;
- 2) антигены, специфичные для определенной ткани/линии клеточной дифференцировки;
- 3) раково-эмбриональные антигены и антигены иммунопривилегированных тканей;
- 4) антигены, экспрессия которых на опухолевых клетках выше, чем на нормальных тканях.

Идеальная мишень — новая белковая последовательность, характерная исключительно для опухолевой линии. Одним из примеров являются мутированные варианты эпидермального фактора роста (EGFvIII) и MUC-1 [17, 19, 20]. Эмбриональные антигены и антигены иммунопривилегированных

тканей, такие как члены семейства MAGE или NY-ESO-1, активно исследуются в качестве мишеней для искусственных ТКР, однако большинство этих антигенов находится в цитоплазме и недоступно для взаимодействия с CAR [21–23]. Гиперэкспрессированные антигены в качестве мишени также широко используются для разработки новых химерных рецепторов, однако высокая эффективность Т-лимфоцитов оказывает повреждающий эффект и на здоровые ткани (так называемый on-target/off-tumor эффект), что может вести к тяжелым проявлениям токсичности, вплоть до летальных исходов. Возможность использования таких мишеней в будущем будет определяться разработкой механизмов дополнительного контроля за «включением» либо «выключением» активности CAR Т-клеток [24].

Наиболее исследованным антигеном-мишенью на сегодняшний день является CD19, представляющий собой линейно-специфичный тканевой антиген, экспрессированный практически на всех этапах дифференцировки В-лимфоцитов, за исключением плазматических клеток. CD19 экспрессируется на поверхности опухолевых клеток почти всех В-линейных опухолей (ОЛЛ, ХЛЛ, В-клеточные неходжкинские лимфомы) [25, 26]. Именно с использованием CD19-CAR Т-клеток были получены первые успешные результаты терапии, что позволило перевести технологию в клинические исследования II–III фаз.

Благодаря работе нескольких ведущих академических медицинских центров в течение нескольких лет были выработаны основные протоколы производства и клинического применения генно-модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR к CD19, определено оптимальное количество клеток и оптимальный дизайн CAR для НХЛ и ХЛЛ [11, 12, 14, 27, 28]. Наиболее успешными на сегодняшний день являются результаты терапии ОЛЛ. В опубликованных работах вероятность достижения полной ремиссии для этого заболевания достигает 67–90 % [15–17, 19, 20],

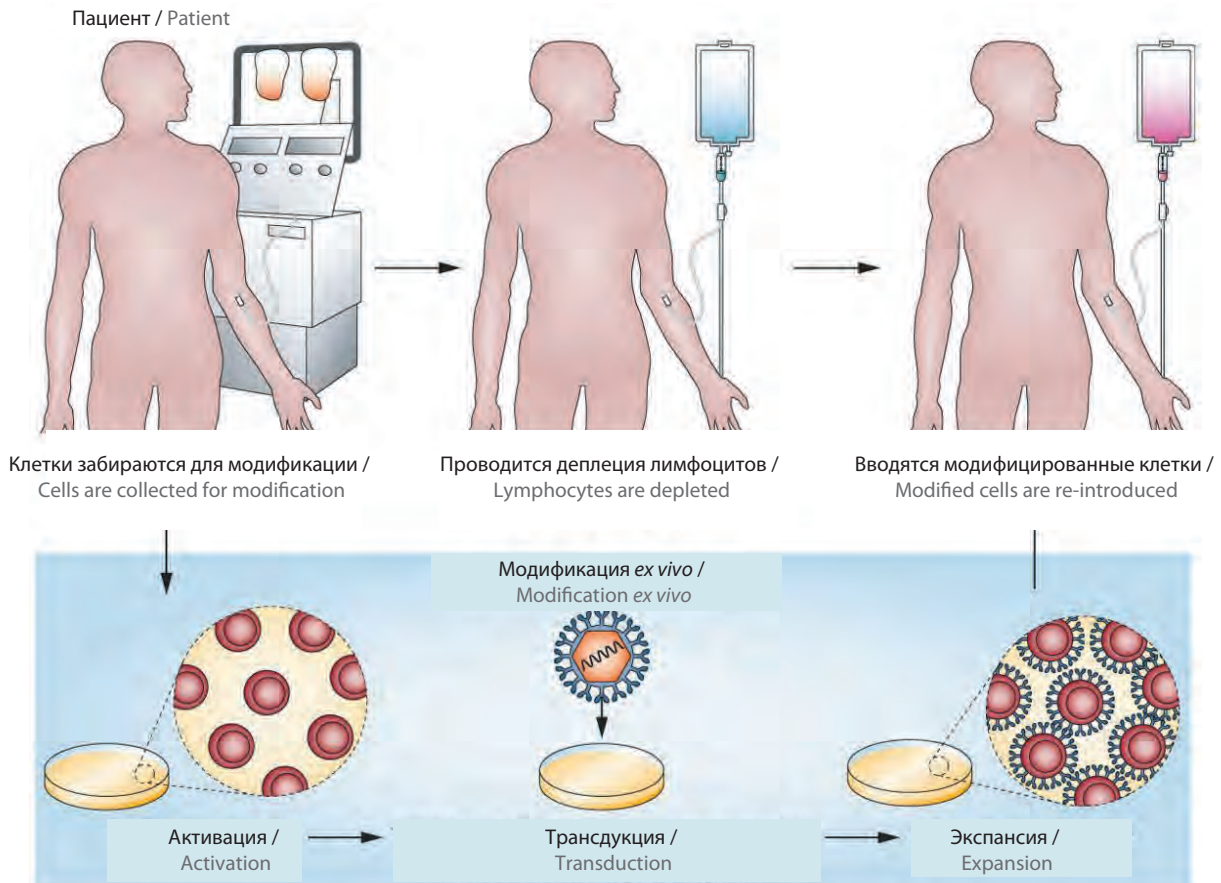


Рис. 4. Технология производства модифицированных Т-клеток (адаптировано из [30])
 Fig. 4. Technology of producing modified T-cells (adapted from [30])

что существенно превышает опубликованные результаты терапии биспецифическими моноклональными антителами [29].

Технология производства

Производство CAR Т-клеток для клинического применения состоит из нескольких этапов:

- 1) афереза лейкоцитов пациента;
- 2) активации Т-лимфоцитов с помощью синтетического поликлонального активатора, связывающегося с рецепторами CD3 и CD28;
- 3) доставки трансгена;
- 4) экспансии в среде, обогащенной цитокинами;
- 5) контроля качества клеточного препарата;
- 6) криоконсервации и/или подготовки к введению [13] (рис. 4).

Первым этапом, как и для большинства видов клеточной терапии, является аферез лейкоцитов периферической крови пациента. Ключевым параметром, необходимым для производства терапевтического клеточного продукта, служит сбор достаточного количества Т-лимфоцитов, ориентировочно около 100×10^6 клеток. В связи с этим, с точки зрения практического применения, аферез целесообразно выполнить до проведения курсов химиотерапии

с включением нуклеозидных аналогов и иных лимфодеплезирующих препаратов. В ряде протоколов перед этапом стимуляции выполняют выделение отдельных субпопуляций лимфоцитов методом иммуномангнитной селекции и/или деплецию моноцитов путем адгезии или элютиации. Продукт афереза может быть подвержен криозаморозке или незамедлительно использован для создания Т-клеток, экспрессирующих CAR. Заморозка продукта дает большую мобильность для планирования терапии, однако сопровождается снижением количества клеток в результате процедуры [31].

Вторым этапом производства является активация Т-лимфоцитов. Активация необходима для последующей экспансии клеток и эффективной трансдукции ретро- и лентивирусными векторами. Наиболее часто используется активация с использованием специального реагента — анти-CD3/CD28-антител, иммобилизованных на магнитном носителе разного размера в присутствии интерлейкина 2 или других цитокинов [32, 33]. Однако существуют и другие варианты, такие как активация с использованием антиген-презентирующих клеток пациента [34] или искусственных антиген-презентирующих клеток [35], недавно разработанная технология Expamer [36].

Третьим этапом производства является собственно генетическая модификация Т-лимфоцитов. На сегодняшний день наиболее широко применяются гамма-ретровирусные и лентивирусные векторы, а также система транспозон/транспозаза. Альтернативой стабильной генетической модификации является методика электропорации для доставки мРНК, в результате которой достигается временная, до 1 нед, экспрессия химерной молекулы.

Гамма-ретровирусные векторы первыми использовали для создания CD19 CAR Т-клеток. На сегодняшний день их применяют в 50 % клинических испытаний. Привлекательны как высокая эффективность, так и большой спектр доступных клеточных линий — продюсеров вирусных частиц. Длительный срок наблюдения за пациентами, получившими терапию Т-лимфоцитами, модифицированными гамма-ретровирусами, продемонстрировал безопасность метода [37, 38]. В отличие от ретровирусной трансдукции гемопоэтических стволовых клеток, при трансдукции Т-лимфоцитов не было зарегистрировано ни одного случая злокачественной трансформации. Более того, было показано, что благодаря возможности создания стабильных клеточных линий — продюсеров [39] использование ретровирусных векторов может обеспечивать большие объемы производства CAR Т-клеток в условиях III фазы клинических испытаний [31].

Лентивирусные векторные системы широко используются для трансдукции неделящихся клеток и теоретически более безопасны с точки зрения риска инсерционного мутагенеза и злокачественной трансформации, что важно, по крайней мере в случае модификации стволовых клеток [40]. Так же как и ретровирусные системы, лентивирусная трансдукция дает высокую эффективность и постоянную стабильную экспрессию химерного рецептора. К минусам лентивирусных векторов относятся отсутствие стабильных линий продюсеров и высокие затраты на производство вектора [41].

Еще один подход, активно тестирующийся в настоящее время, — использование систем транспозон/транспозаза, таких как Sleeping beauty и Piggybag. Преимуществом по отношению к вирусным векторам являются большая биобезопасность и снижение затрат на производство, однако результаты клинического применения данной системы в настоящее время ограничены единичными сообщениями [42].

К временной (в течение 1–2 нед) экспрессии трансгена в цитоплазме приводит мРНК-электропорация, что снимает вопросы о генотоксичности (потенциальном онкогенезе) [43, 44]. Транзиторная экспрессия химерного рецептора является одновременно недостатком и преимуществом системы. Так, эффективность CD19 CAR Т-клеток в значительной степени связана с их экспансией и персистенцией *in vivo*, что при мРНК-электропорации достижимо только с помощью многократных повторных инфузий

терапевтических клеток. С другой стороны, транзиторная экспрессия теоретически делает продукт менее токсичным, и эта система может найти применение при создании химерных рецепторов с перекрестной реактивностью к здоровым тканям.

Четвертым этапом является экспансия модифицированных Т-клеток. Экспансия происходит в биореакторах различных модификаций, с использованием цитокинов, поддерживающих пролиферацию Т-лимфоцитов, — ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15. Наиболее широко применяются биореакторы GE WAVE. Они автоматически поддерживают оптимальный состав среды, температуру, газовый состав воздуха, перемешивают клетки и позволяют быстро нарастить количество клеток до 10^7 в 1 мл [45, 46]. Биореактор Prodigy (Miltenyi Biotec) позволяет в полуавтоматическом режиме выполнять последовательность производственных этапов, включая селекцию отдельных популяций, трансдукцию и экспансию Т-лимфоцитов, в закрытой системе [47].

Другой подход — стимуляция пролиферации с помощью искусственных антиген-презентирующих клеток. Так, клеточная линия K-562, экспрессирующая CD32, CD64, CD86, CD137 и мембранную форму ИЛ-15, используется для клинических испытаний CD19-специфичных CAR Т-клеток [42].

Последним этапом перед введением клеток пациенту является контроль качества клеточного продукта — тестирование на микробиологическую безопасность, эффективность трансдукции и функциональную активность Т-лимфоцитов [48].

Клинические результаты терапии при В-клеточных лимфомах и хроническом лимфолейкозе

С 2008 по 2012 г. было проведено несколько клинических исследований CAR Т-клеток для терапии В-клеточных лимфом. Суммарно были представлены результаты терапии 38 пациентов, страдающих В-НХЛ и получивших терапию CD19 и CD20 CAR Т-клетками 1-го и 2-го поколений [12, 49–55]. Эффективность терапии варьировала, но эти клинические исследования оказали значительное влияние на последующие испытания и развитие технологии в целом.

Введение CD19 CAR Т-клеток 1-го поколения в дозировке от 2×10^7 до 3×10^9 клеток/м² не сопровождалось значимым ответом со стороны опухоли [49, 52], тогда как у пациентов, получивших CAR Т-клетки 2-го поколения, были выявлены увеличенная пролиферативная активность и длительная персистенция эффекторных клеток [51]. Это стало клиническим подтверждением исследований *in vitro*, показавших эффективность CD19 Т-клеток, дополненных CD28 костимулирующим доменом [56].

Группа из MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center — Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг, США) показала повышение эффективности терапии CAR Т-клетками в комбинации

с предшествующей лимфодеплетирующей химиотерапией [53]. Благодаря этим данным стало ясно, что одним из условий успешного применения CAR T-клеток является предварительное введение химиотерапевтических препаратов для снижения опухолевой массы и создания «пространства» для пролиферации Т-лимфоцитов.

В дальнейшем в клинических испытаниях использовали различные дозы CAR T-клеток (от $1,5 \times 10^5$ до 4×10^8) и комбинации химиопрепаратов, такие как циклофосфамид (ЦФ) + флударабин (ФЛУ) или ЦФ + бендамустин [12, 54]. Все исследовательские группы использовали рецепторы 2-го поколения, однако конструкции различались костимулирующим доменом (4-1BB, CD28) [54, 57, 58] и моноклоном, из которого был заимствован одноцепочечный вариабельный фрагмент. Также появились первые отчеты о токсичности — введение терапевтических клеток сопровождалось повышением концентрации ряда цитокинов и лихорадкой.

Несмотря на то что в первых исследованиях доля пациентов с частичным ответом составила лишь 12 и 21 % [54, 55], в течение следующих 2 лет удалось получить более успешные результаты благодаря оптимизации химиотерапии.

Четырнадцать пациентов с резистентным/рецидивирующим течением ХЛЛ получили терапию CD19 CAR T-клетками с 4-1BBz костимулирующим доменом в дозе от $0,14 \times 10^8$ до 11×10^8 CTL019 клеток. Предшествующее кондиционирование включало ЦФ + ФЛУ или пентостатин + ЦФ или бендамустин. Полный ответ был получен в 29 % случаев, частота суммарного объективного ответа (objective response rate, ORR) составила 57 % [59]. В этой когорте пациентов была обнаружена длительная персистенция терапевтических клеток (до 4 лет). На момент публикации отчета у всех пациентов, достигших полной ремиссии (ПР), ремиссия сохранялась.

В другом исследовании I фазы 15 пациентов (диффузная В-крупноклеточная лимфома — 9, ХЛЛ — 4, индолентные лимфомы — 2) получили кондиционирование ЦФ + ФЛУ и CD19 CAR T-клетки с CD28z костимулирующим доменом в дозе от 1×10^6 до 5×10^6 клеток/кг. ПР — 53 % (8/15), частичная ремиссия (ЧР) — 27 % (4/15) [32]. В группе пациентов, получавших предшествующее кондиционирование низкими дозами химиопрепаратов, частота полных ответов составила 23 % [60].

В другое исследование было включено 34 пациента с рецидивом/резистентным течением. Основным результатом исследования стало существенное преимущество в частоте полного ответа на терапию (42 против 8 %) в случае использования ЦФ и ФЛУ по сравнению с пациентами, получившими монотерапию ЦФ [61].

В исследовании Пенсильванского университета (UPENN — University of Pennsylvania), США, в когорте 38 пациентов с различными вариантами рецидивов/рефрактерных В-клеточных лимфом общая частота

ответа составила 68 %, а выживаемость без прогрессирования — 62 % при медиане наблюдения 11 мес [62].

Сравнительно недавно было продемонстрировано, что пациенты с ХЛЛ, получавшие терапию ибрутинибом до сбора Т-клеток, показали значительно более высокую скорость экспансии CAR Т-лимфоцитов [63].

Таким образом, CD19 CAR Т-лимфоциты обладают существенной активностью при В-клеточных лимфомах (табл. 1, 2). В ближайшем будущем ожидаются публикации данных многоцентровых исследований, на основании которых будет определено потенциальное место данного вида терапии в программном лечении пациентов с различными В-клеточными опухолями.

В-линейный острый лимфобластный лейкоз

В то время как терапия В-НХЛ CD19 CAR Т-клетками показала работоспособность этой технологии как таковой, наиболее очевидный успех в ее использовании был достигнут в терапии ОЛЛ.

В течение 2 лет ученые нескольких ведущих институтов опубликовали результаты клинических исследований терапии ОЛЛ у взрослых и детей с использованием CD19 CAR Т-клеток [64–68]. Суммарно 67 пациентов (21 взрослый, 45 детей) были включены в клинические испытания.

В исследовании, проведенном в MSKCC, вводились 3×10^6 19–28z CAR Т-клеток/кг. Для лимфодеплеции использовали ЦФ в дозе 900 мг/м². В исследование была включена группа из 16 взрослых пациентов с рецидивом или резистентным течением ОЛЛ. Частота ПР составила 88 %, из них 75 % — ремиссии с негативной минимальной остаточной болезнью [45, 46, 49]. ПР сохранялась в среднем 24,5 дня у 70 % пациентов, после чего они получили аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. В исследовании отмечена быстрая экспансия терапевтических клеток *in vivo* и относительно быстрый, через 1–3 мес, их клиренс. Авторы предполагают, что при таком быстром достижении молекулярной ремиссии ОЛЛ длительная персистенция CAR Т-клеток не является необходимым условием их эффективного применения.

Схожие результаты были получены Национальным институтом рака (National Cancer Institute, NCI), США. В исследовании I фазы в группе пациентов ($n = 21$) с рецидивом/рефрактерным течением В-ОЛЛ до 30 лет использовались 19–28z CAR Т-клетки. Клинико-гематологическая ремиссия была достигнута у 70 % пациентов, молекулярная ремиссия — у 60 % [68]. Персистенция терапевтических клеток составила не более 2 мес. Большинство пациентов, достигших ремиссии, были трансплантированы [68].

В Пенсильванском университете были проведены исследования в группе из 25 детей и 5 взрослых [66, 67]. Большинство пациентов получило кондиционирование ФЛУ и ЦФ за неделю до введения 19-BBz

CAR T-клеток. Введенная доза клеток составила от $0,8 \times 10^6$ до $17,4 \times 10^6$ клеток/кг. Частота достижения клинико-гематологической и молекулярной ремиссии равнялась 90 и 73 % соответственно [65]. Ответ

на терапию коррелировал с персистенцией T-клеток: 3 пациента, не ответившие на терапию, имели самые низкие уровни циркулирующих терапевтических клеток. У 68 % педиатрических больных персистенция

Таблица 1. Результаты опубликованных клинических испытаний терапии T-клетками, модифицированными анти-CD19-химерным антигенным рецептором. Ответ на терапию в зависимости от режима кондиционирования (адаптировано из [28])

Table 1. Results of the published clinical studies of therapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells. Response to therapy depending on conditioning regimen (adapted from [28])

Группа Group	Диагноз (n) Diagnosis (n)	Режим кондиционирования Conditioning regimen	Доза/кг Dose/kg	Ответ на терапию, % Response to therapy, %	
				ПР CR	ЧР PR
MSKCC Brentjens et al. [53]	ХЛЛ (3) CLL (3)	Не проводилось None	$1,2 - 3,0 \times 10^7$	0	0
MSKCC Brentjens et al. [53]	ХЛЛ (4) CLL (4)	ЦФ CP	$0,4 - 1,0 \times 10^7$	0	25
NCI Kochenderfer et al. [12, 55]	ХЛЛ (7) CLL (7)	ФЛУ/ЦФ FLU/CP	$0,3 - 4,0 \times 10^6$	43	43
UPENN Kalos et al. [50] Porter et al. [54]	ХЛЛ (14) CLL (14)	ФЛУ/ЦФ, П/ЦФ, Р/СР бендамустин bendamustine	$0,14 - 11,0 \times 10^8$ (всего) (total)	29	28
NCI Kochenderfer et al. [12, 55]	Другие НХЛ (14) Other NHL (14)	ФЛУ/ЦФ FLU/CP	$0,3 - 5,0 \times 10^6$	36	36

Сокращения: НХЛ – неходжкинская лимфома; П/ЦФ – пентостатин/циклофосфамид; ПР – полная ремиссия, ФЛУ/ЦФ – флударабин/циклофосфамид; ХЛЛ – хронический лимфобластный лейкоз; ЦФ – циклофосфамид; ЧР – частичная ремиссия; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; NCI – National Cancer Institute, Национальный институт рака; UPENN – University of Pennsylvania, Университет Пенсильвании
Abbreviations: CLL – chronic lymphocytic leukemia, CP – cyclophosphamide, FLU/CP – fludarabine/cyclophosphamide, CR – complete remission, MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NCI – National Cancer Institute, NHL – non-Hodgkin's lymphoma, P/CP – pentostatin/cyclophosphamide; PR – partial remission, UPENN – University of Pennsylvania,

Таблица 2. Результаты опубликованных клинических испытаний терапии T-клетками, модифицированными антиCD19 – химерным антигенным рецептором (адаптировано из [28])

Table 2. Results of the published clinical studies of therapy using anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cells (adapted from [28])

Исследование Study	n / медиана возраста, лет n / median age	Предшествующая алло-ТКМ, % Previous allo-BMT, %	Доза/кг Dose/kg	Ответ на терапию Response to therapy		СЦШ / костимулирующий домен CRS / costimulatory domain
				ПР FR	МР MR	
MSKCC Davila et al. [64], Brentjens et al. [65]	16 / 50	25	$3,0 \times 10^6$	88	75	7 19–28z
UPENN Maude et al. [66], Grupp et al. [67]	25 / 11 5 / 47	60	от $8,0 \times 10^6$ до $21,0 \times 10^6$	90	73	22 19BBz
NCI Lee et al. [68]	21	38	от $1,0 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$	67	57	16 19–28z

Сокращения: алло-ТКМ – аллогенная трансплантация костного мозга; МР – полная молекулярная ремиссия; ПР – полная ремиссия, СЦШ – синдром цитокинового шторма; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Мемориальный онкологический центр Слоун Кеттеринг; UPENN – University of Pennsylvania, Университет Пенсильвании; NCI – National Cancer Institute, Национальный институт рака

Abbreviations: allo-BMT – allogeneic bone marrow transplantation, FR – full remission, MR – full molecular remission, CRS – cytokine release syndrome; MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center, UPENN – University of Pennsylvania, NCI – National Cancer Institute.

Т-клеток сохранялась в течение 6 мес. У некоторых из них персистенция обнаруживается в течение более 2 лет [65]. Таким образом, в случае использования конструкции с 4-1BB костимуляторным доменом клинический ответ коррелировал с длительным персистированием Т-клеток. Дополнительно было показано, что у 6 пациентов CAR Т-клетки исчезли перед развитием рецидива заболевания, а у 3 из этих 6 было отмечено восстановление нормальных В-клеток, что можно считать суррогатным маркером потери функции CAR Т-клеток.

Одним из важных наблюдений стала потеря экспрессии CD19 опухолевыми клетками при развитии рецидива ОЛЛ после терапии. Согласно данным всех исследовательских групп, этот механизм является ведущим в развитии рецидива ОЛЛ при терапии как CAR Т-клетками, так и биспецифическими препаратами, направленными на CD19. В этой связи одним из возможных решений является одновременное таргетирование нескольких антигенов на поверхности опухоли, что теоретически должно снизить риск «ускользания» опухоли от эффекторных механизмов иммунной системы.

Множественная миелома

Несмотря на обилие новых фармакологических препаратов для лечения множественной миеломы (ММ), вопрос о куративной терапии остается открытым. В Пенсильванском университете CD19 CAR Т-клетки были использованы для лечения группы пациентов, страдающих ММ. У 4 пациентов из 10 была показана эффективность терапии (ПР — 1, очень хорошая ЧР — 1, ЧР — 2), у оставшихся 6 пациентов — стабилизация (без прогрессии) [69].

В качестве альтернативной мишени для CAR Т-терапии ММ был предложен поверхностный антиген SLAMF7, экспрессирующийся на естественных киллерах (НК-клетках) и плазмочитах. В настоящее время используется препарат моноклональных антител к этому рецептору (элотузумаб), демонстрирующий эффективность при рефрактерном/рецидивирующем течении ММ [70, 71].

Кроме того, исследователи из NCI доложили об 11 пациентах с рецидивирующим/резистентным течением ММ, включенных в I фазу клинических исследований с применением CAR Т-клеток к антигену созревания В-клеток (В cell maturation antigen, BCMA). Медиана числа предшествующих линий терапии для пациентов, включенных в протокол, была равна 7. Кондиционирование проводилось ЦФ с ФЛУ с последующим введением CAR Т-клеток в дозе от $0,3 \times 10^6$ до 9×10^6 . Один из 3 пациентов из группы со средней дозой достиг статуса очень хорошего частичного ответа, оба пациента из группы с наибольшей дозой CAR Т-клеток продемонстрировали хороший ответ, в том числе ПР — у 1 из 2 пациентов [72]. Поскольку

экспрессия BCMA в основном ограничена плазматическими клетками, этот антиген служит хорошей мишенью как для CAR Т-клеток, так и для моноклональных антител и может быть использован в качестве индивидуальной мишени или для создания биспецифических (SLAMF7/BCMA) препаратов [73, 74].

Солідные опухоли

Успех терапии CAR Т-клетками при В-ОЛЛ и В-НХЛ стал доказательством терапевтического потенциала генетически модифицированных Т-лимфоцитов и проложил путь для клинических испытаний при других заболеваниях.

Необходимо отметить, что в адоптивной иммунотерапии солидных опухолей существует несколько принципиальных проблем:

- 1) ограниченное количество идентифицированных антигенов, пригодных для таргетирования химерными рецепторами;
- 2) наличие в опухоли иммуносупрессивного микроокружения;
- 3) ограниченная эффективность миграции терапевтических клеток в ткань опухоли.

Несмотря на это многие группы активно работают над созданием CAR Т-клеток к солидным опухолям. В качестве мишеней используются раково-эмбриональный антиген (carcinoembryonic antigen, CEA), диганглиозид GD2, мезотелин (NCT02414269, NCT02465983) [75], α -цепь рецептора интерлейкина 13 (IL-13R α), рецептор эпидермального фактора роста (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) [76], белок активации фибробластов (fibroblast activation protein, FAP), молекула клеточной адгезии L1 (L1CAM) и другие [24, 77]. Наиболее успешными являются клинические испытания GD2 CAR Т-клеток для терапии нейробластомы (3 из 11 пациентов достигли ПР) и HER2-CAR для терапии саркомы (у 4 из 17 пациентов достигнута стабилизация) [11, 76] (табл. 3).

Осложнения терапии CAR Т-клетками

В клинических исследованиях CAR Т-клеток был выявлен ряд побочных эффектов, как предсказанных на основании доклинических данных, так и впервые выявленных при использовании у человека (рис. 5). К наиболее распространенным побочным эффектам относятся В-лимфопения, синдром цитокинового шторма (СЦШ) и нейротоксичность [64–68].

Основным предсказанным побочным эффектом является В-лимфопения, обусловленная закономерной деплецией пула нормальных В-лимфоцитов. В-клеточная аплазия сохраняется в течение всего срока персистенции CD19 CAR Т-клеток и сопровождается гипогаммаглобулинемией, требующей заместительной терапии внутривенным иммуноглобулином. Как указано выше, В-клеточная аплазия

Таблица 3. Примеры мишеней, используемых в клинических испытаниях Т-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (адаптировано из [78])

Table 3. Examples of chimeric antigen receptor targets in clinical trails (adapted from [78])

Мишень Target	Заболевание Disease	Клинические испытания Clinical trials
CD19/CD20		
CD19 или CD20 CD 19 or CD20	Лейкозы Leukemias	NCT01860937, NCT02146924, NCT02228096, NCT02435849, NCT02028455, NCT02614066, NCT02625480, NCT01747486, NCT02030847, NCT02535364, NCT01683279
	Лейкозы/Лимфома Leukemia/Lymphoma	NCT02443831, NCT02529813, NCT02546739, NCT01430390, NCT01853631, NCT02050347, NCT02456350, NCT02081937, NCT02132624, NCT02349698, NCT01475058, NCT02537977
	Лимфома Lymphoma	NCT02650999, NCT02431988, NCT02631044, NCT02445248, NCT02277522, NCT02624258, NCT01493453, NCT01840566, NCT02134262, NCT02247609, NCT02348216, NCT02030834
	Множественная миелома Multiple myeloma	
Дополнительные мишени для гематологических заболеваний Additional targets for hematological diseases		
CD22	В-клеточные заболевания B-cell disorders	NCT02588456, NCT02315612
Легкая цепь Igκ Igκ light chain	В-клеточные заболевания B-cell disorders	
CD30	Лимфома Lymphoma	NCT02259556, NCT02274584
CD138	Множественная миелома Multiple myeloma	
BCMA	Множественная миелома Multiple myeloma	
CD33	Миелоидные заболевания Myeloid disorders	NCT02546167, NCT02215967
CD123	Миелоидные заболевания Myeloid disorders	
Лиганды NKG2D NKG2D ligands	Различные гематологические заболевания Various hematological disorders	NCT02623582, NCT02159495
ROR1	Лейкоз Leukemia	NCT02203825
Мишени для солидных опухолей Targets for solid tumors		
EGFR	EGFR+ солидные опухоли EGFR+ solid tumors	NCT02331693
EGFRvIII	Глиобластома Glioblastoma	NCT02209376
GD2	Нейробластома, саркома Юинга, остеосаркома и меланома Neuroblastoma, Ewing's sarcoma, and melanoma	NCT01822652, NCT02107963
IL-13Rα2	Глиома Glioma	NCT02208362

Окончание табл. 3

End tab. 3

Мишень Target	Заболевание Disease	Клинические испытания Clinical trials
HER2	HER2+ солидные опухоли HER2+ solid tumors	
Мезотелин Mesothelin	Мезотелиома, рак поджелудочной железы и рак яичников Mesothelioma, pancreatic cancer, and ovarian cancer	NCT02159716, NCT02414269, NCT01897415, NCT02580747, NCT02465983
PSMA	Рак предстательной железы Prostate cancer	NCT01140373
FAP	Злокачественная мезотелиома плевры Malignant pleural mesothelioma	NCT01722149
GPC3	Гепатокарцинома Hepatocellular carcinoma	NCT02395250
MET	Рак груди Breast cancer	NCT01837602
MUC16	Рак яичников Ovarian cancer	NCT02498912
CEA	Различные солидные опухоли Various solid tumors	NCT02349724, NCT01723306
Lewis-Y	Солидные опухоли и миелоидные заболевания Solid tumors and myeloid disorders	NCT01716364
MUC1	Гепатокарцинома, карцинома поджелудочной железы и трижды негативный рак молочной железы Hepatocellular carcinoma, pancreatic cancer, and triple negative breast cancer	NCT02617134, NCT02587689

Сокращения: ВСМА — антиген созревания В-клеток (B cell maturation antigen), EGFR — рецептор эпидермального фактора роста, HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа, PSMA — простат-специфический мембранный антиген, FAP — белок активации фибробластов, MUC16 — муцин-16, CEA — раково-эмбриональный антиген, MUC1 — муцин-1. Abbreviations: BCMA — B cell maturation antigen, EGFR — epidermal growth factor receptor, HER2 — human epidermal growth factor receptor-2, PSMA — prostate-specific membrane antigen, FAP — fibroblast activation protein, MUC16 — mucin 16, CEA — carcinoembryonic antigen, MUC1 — mucin 1.

является классическим примером on target/off tumor эффекта специфической иммунотерапии, обусловленной экспрессией таргетируемого антигена на поверхности здоровых тканей. В случае CD19 CAR T-клеток данный эффект не угрожает жизни пациентов, может быть скорректирован отработанными клиническими инструментами и не рассматривается как противопоказание к применению метода, по крайней мере в контексте терапии пациентов с рецидивами и рефрактерными формами В-клеточных опухолей.

СЦШ — наиболее тяжелый побочный эффект терапии CAR T-клетками, описанный всеми крупными исследовательскими группами.

СЦШ является потенциально жизнеугрожающим состоянием, сопровождающим терапевтическое введение как моноклональных антител [80, 81], биспецифических антител [82], так и Т-клеток, экспрессирующих CAR [64, 83, 84].

СЦШ — состояние, близкое к таким заболеваниям, как гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз и синдром активации моноцитов/макрофагов. В основе лежит системный воспалительный ответ, обусловленный гиперпродукцией провоспалительных цитокинов. Источником цитокинов являются как собственно CAR T-клетки, так и вторичные эффекторы. Тяжесть течения СЦШ варьирует и может достигать полиорганной недостаточности и летального исхода.

Клиника СЦШ включает лихорадку, нарушение дыхательной функции, тахикардию, гипотензию, генерализованные отеки, нарушение сознания, диффузную лимфаденопатию, гепатоспленомегалию и часто эритематозную или зудящую сыпь. Эта симптоматика появляется вскоре после введения модифицированных Т-клеток и нарастает в течение последующих дней. Было показано, что СЦШ ассоциирован с повышенными уровнями цитокинов, в том числе интерлейкина 6 (ИЛ-6)

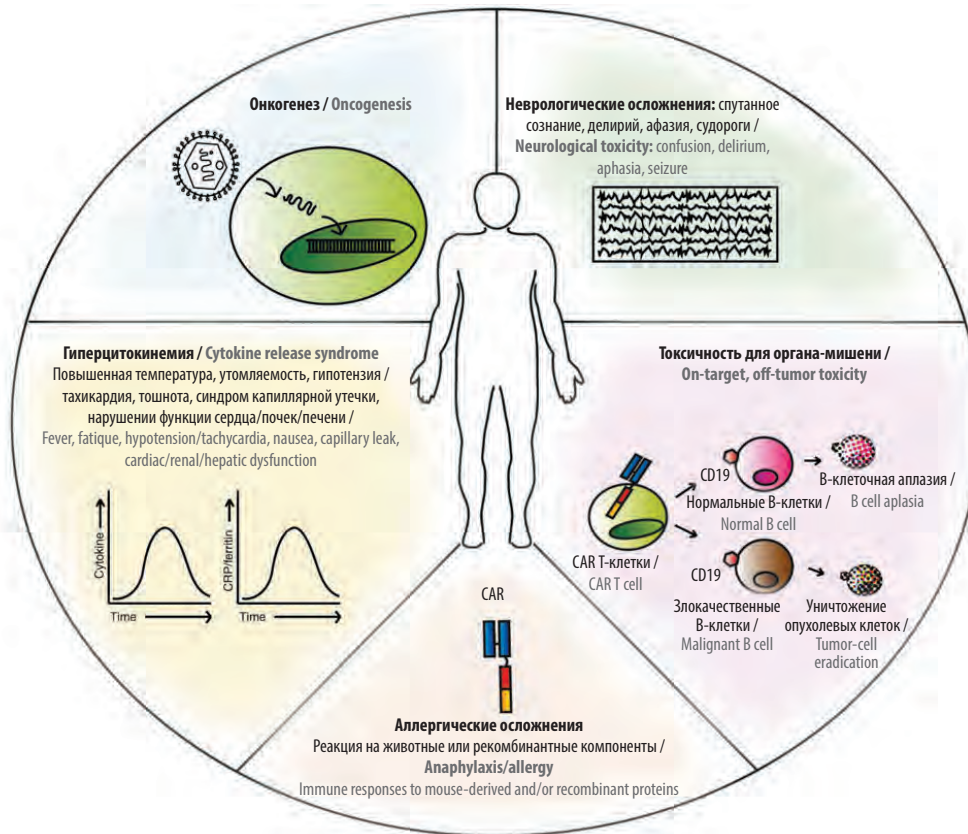


Рис. 5. Осложнения терапии Т-клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (адаптировано из [79])
Fig. 5. Complications of therapy using T-cells expressing chimeric antigen receptors (adapted from [79])

и интерферона γ , и тяжесть проявлений синдрома зависит от изначальной опухолевой массы [81, 85]. Терапия СЦШ включает применение кортикостероидов и антагониста рецептора ИЛ-6 — препарата тоцилизумаб. Таргетная иммуносупрессия тоцилизумабом позволяет в ряде случаев избежать необходимости назначения кортикостероидов, оказывающих негативное влияние на функциональность CAR T-клеток [64, 86]. В настоящее время ведется разработка стандартов градации и протоколов лечения СЦШ [85].

Третьим серьезным побочным эффектом CD19 CAR T-клеток является нейротоксичность, проявляющаяся спутанностью сознания, делирием, афазией, миоклонусом, судорогами, галлюцинациями. У части пациентов нейротоксичность совпадает по времени с развитием СЦШ, однако может наблюдаться изолированно. Механизм развития и прогностические факторы нейротоксичности не установлены, что в значительной степени обусловлено отсутствием адекватной животной модели. Не ясно также, является ли нейротоксичность специфическим побочным эффектом, связанным с таргетированием CD19, или универсальным побочным эффектом CAR T-клеток.

Проблемы и перспективы развития

Очевидно, что адоптивная иммунотерапия генетически модифицированными Т-лимфоцитами как кли-

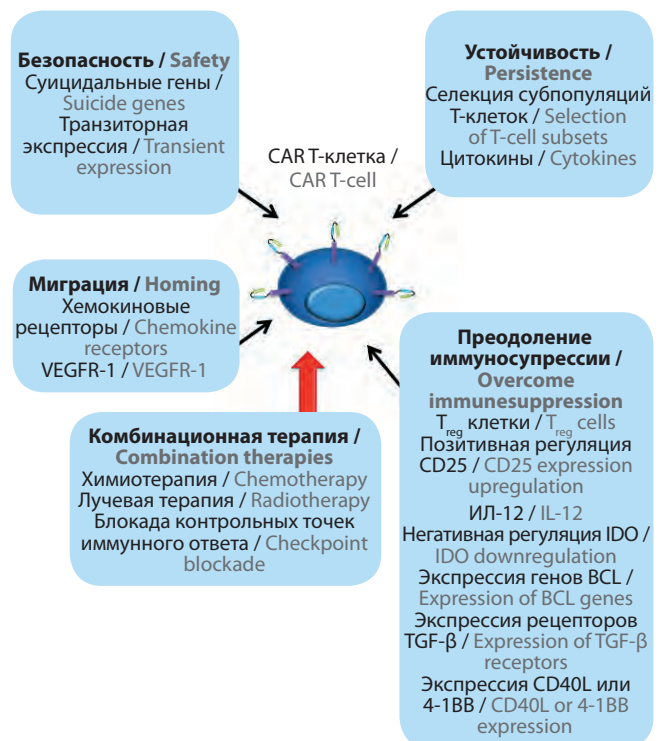


Рис. 6. Основные параметры и методы повышения эффективности модифицированных Т-клеток (адаптировано из [87])
Fig. 6. Main parameters and methods of increasing effectiveness of modified T-cells (adapted from [87])

ническая технология находится в фазе экспоненциального роста. Существующие платформы, безусловно, нуждаются в совершенствовании с точки зрения как безопасности, так и эффективности терапии (рис. 6).

В области безопасности наиболее ожидаемым новшеством является интеграция в CAR Т-лимфоциты молекулярных механизмов, позволяющих «выключать» терапевтические клетки в случае развития нежелательных побочных эффектов. Одним из способов такого «выключения» служит трансдукция Т-лимфоцитов так называемыми суицидальными генами (suicidal genes), продукты которых под действием специфических малых молекул запускают апоптоз Т-лимфоцитов. На сегодняшний день в клинических испытаниях CAR эффективно используются 2 суицидальных гена: индуцируемая система Caspase-9 и тимидинкиназа герпес-вируса человека (HSV1-TK) [88–91]. Последний может также быть использован в качестве репортерного гена для позитронно-эмиссионной визуализации локализации CAR-Т клеток с использованием HSV1-TK-авидных радиофармпрепаратов [92].

Эффективность CAR Т-лимфоцитов ограничена рядом факторов, значимость которых варьирует в зависимости от таргетируемой опухоли. Так, основным механизмом, обуславливающим резистентность В-ОЛЛ к CD19 CAR Т-клеткам, является потеря экспрессии CD19 на поверхности опухолевых клеток. При солидных опухолях, помимо потери таргетируемого антигена, резистентность может быть обусловлена ограничением трафика Т-лимфоцитов в опухоль и иммуносупрессивным воздействием на CAR Т-клетки со стороны опухолевых клеток и/или клеток микроокружения.

Возможным решением проблемы потери экспрессии антигена опухолевыми клетками является создание биспецифичных CAR Т-клеток [93], так, для контроля В-клеточных новообразований предполагается комбинированное таргетирование CD19, CD22, CD20 и других линейно-специфичных молекул.

С целью преодоления ингибирующих сигналов разрабатывается целый спектр решений, потенциально способных увеличить эффективность терапии в неблагоприятных условиях иммуносупрессивного микро-

окружения. Параллельно многочисленным клиническим испытаниям CAR 2-го поколения ведется доклиническая работа по усовершенствованию и оптимизации существующих конструкций — создание «бронированных» CAR, защищенных от иммуносупрессивного воздействия стромы. Проводятся активные исследования, направленные на более глубокое понимание строения микроокружения опухоли, секрецию цитокинов и молекул, ингибирующих иммунный ответ [88].

Одной из стратегий преодоления иммуносупрессивного воздействия является комбинированная терапия CAR Т-клетками с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, например PD-1, для предотвращения «истощения» Т-клеток [88, 94, 95].

Другая возможная стратегия — использование CAR Т-клеток, экспрессирующих как сам антигенный рецептор, так и хемокиновые рецепторы CXCR2 (CXCL1 receptor)/CCR4 (CCL17 receptor)/Gro-a/CCL17/CCL2, улучшающие миграцию терапевтических клеток и таким образом увеличивающие эффективность терапии [96, 97].

Активно развивающаяся технология — Т-клетки, экспрессирующие CAR и секретирующие цитокины, такие как ИЛ-12 [98, 99].

Заключение

Технология использования Т-клеток с CAR — это метод, показавший беспрецедентную эффективность в терапии В-линейного ОЛЛ и обнадеживающие результаты при других В-клеточных опухолях.

Ближайшие годы покажут, сможет ли эта технология заменить аллогенную трансплантацию костного мозга в терапии ОЛЛ, удастся ли упростить и удешевить процедуру создания терапевтических клеток благодаря разработке новых методик доставки генетического материала, а также станет ли она широко используемой терапией онкологических заболеваний в целом (в том числе солидных опухолей) или останется нишевой терапией «спасения» для В-клеточных заболеваний.

Основной проблемой на пути CAR Т-клеточной терапии в онкологии является трудность идентификации опухоль- или ткань-специфичных антигенов, обеспечивающих необходимую селективность терапевтического воздействия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Доступно по: http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors. [Malignancies in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Available at: http://www.oncology.ru/service/statistics/malignant_tumors. (In Russ.)].
2. Irving B.A., Weiss A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor — associated signal transduction pathways. *Cell* 1991;64:891–901. PMID: 1705867.
3. Romeo C., Amiot M., Seed B. Sequence requirements for induction of cytotoxicity by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 1992;68:889–97. PMID: 1547489.
4. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:720–4. PMID: PMC45737.
5. Newick K., Moon E., Albelda S.M. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16006. DOI: 10.1038/mt.2016.6.

6. Eshhar Z., Bach N., Fitzer-Attas C.J. et al. The T-body approach: potential for cancer immunotherapy. Springer Semin Immunopathol 1996;18(2):199–209. PMID: 8908700.
7. Gong M.C., Latouche J.B., Krause A. et al. Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. Neoplasia 1999;1:123–7. PMID: 10933046.
8. Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L. et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. Clin Cancer Res 2006;12(20 pt 1):6106–15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
9. Lamers C.H., Sleijfer S., Vulto A.G. et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. J Clin Oncol 2006;1;24(13):e20–2. DOI: 10.1200/JCO.2006.05.9964.
10. Haynes N.M., Trapani J.A., Teng M.W. et al. Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. Blood 2002;100:3155–63. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1041.
11. Hombach A., Heuser C., Marquardt T. et al. CD4+ T cells engrafted with a recombinant immunoreceptor efficiently lyse target cells in a MHC antigen- and Fas-independent fashion. J Immunol 2001;167:1090–6. PMID: 11441120.
12. Kochenderfer J.N., Wilson W.H., Janik J.E. et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood 2010;116(20): 4099–102. DOI: 10.1182/blood-2010-04-281931.
13. Gill S., Maus M.V., Porter D.L. Chimeric antigen receptor T cell therapy: 25 years in the making. Blood Rev 2016;30(3):157–67. DOI: 10.1016/j.blre.2015.10.003.
14. Wilkie S., Picco G., Foster J. et al. Retargeting of human T cells to tumor-associated MUC1: the evolution of a chimeric antigen receptor. J Immunol 2008;180:4901–9. PMID: 18354214.
15. Pule M.A., Straathof K.C., Dotti G. et al. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. Mol Ther 2005;12:933–41. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.04.016.
16. Wang J., Jensen M., Lin Y. et al. Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. Hum Gene Ther 2007;18:712–25. DOI: 10.1089/hum.2007.028.
17. Maher J., Wilkie S. CAR mechanics: driving T cells into the MUC of cancer. Cancer Res 2009;69(11):4559–62. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0564.
18. Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. The basic principles of chimeric antigen receptor design. Cancer Discov 2013;3(4):388–98. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0548.
19. Gan H.K., Burgess A.W., Clayton A.H., Scott A.M. Targeting of a conformationally exposed, tumor-specific epitope of EGFR as a strategy for cancer therapy. Cancer Res 2012;72(12):2924–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3898.
20. Sampson J.H., Heimberger A.B., Archer G.E. et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Oncol 2010;28(31):4722–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.6963.
21. Krogsgaard M., Davis M.M. How T cells 'see' antigen. Nat Immunol 2005;6:239–45. DOI: 10.1038/ni1173.
22. Rapoport A.P., Stadtmauer E.A., Binder-Scholl G.K. et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. Nat Med 2015;21(8):914–21. DOI: 10.1038/nm.3910.
23. Morgan R.A., Chinnsamy N., Abate-Daga D. et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. J Immunother 2013;36(2):133–51. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3182829903.
24. Kakarla S., Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? Cancer J 2014;20(2):151–5. DOI: 10.1097/PPO.000000000000032.
25. Li Y.S., Wasserman R., Hayakawa K., Hardy R.R. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. Immunity 1996;5:527–35. PMID: 8986713.
26. Li Y.S., Hayakawa K., Hardy R.R. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. J Exp Med 1993;178:951–60. PMID: PMC2191150.
27. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G. et al. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta/CD28 receptor. Nat Biotechnol 2002;20:70–5. DOI: 10.1038/nbt0102-70.
28. Davila M.L., Sadelain M. Biology and clinical application of CAR T cells for B cell malignancies. Int J Hematol 2016;104:6–17. DOI: 10.1007/s12185-016-2039-6.
29. Topp M.S., Gökbuğut N., Stein A.S. et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol 2015 Jan;16(1):57–66. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71170-2.
30. Kochenderfer J.N., Rosenberg S.A. Treating B-cell cancer with T cells expressing anti-CD19 chimeric antigen receptors. Nat Rev Clin Oncol 2013 May;10(5):267–76. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.46.
31. Wang X., Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. Mol Ther Oncolytics 2016;3:16015. DOI: 10.1038/mto.2016.15.
32. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H. et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Clin Oncol 2015;33:540–9. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
33. Wang X., Stefanski J., Borquez-Ojeda O. et al. Comparison of CTS Dynabeads CD3/CD28, Miltenyi TransAct CD3/28 and ExpAct beads for large-scale CAR T cell manufacturing. European Society of Gene and Cell Therapy Collaborative Congress 2015, Helsinki, Finland. A31.
34. Vacchelli E., Vitale I., Eggermont A. et al. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. Oncoimmunology 2013;2:e25771. DOI: 10.4161/onci.25771.
35. Kim J.V., Latouche J.B., Riviere I., Sadelain M. The ABCs of artificial antigen presentation. Nat Biotechnol 2004;22:403–10. DOI: 10.1038/nbt955.
36. Bashour K.T., Graef P., Stemmer C. et al. Functional characterization of a T cell stimulation reagent for the production of therapeutic chimeric antigen receptor T cells. ASH 57th Annual Meeting & Exposition, 2015, Orlando, FL.
37. Sadelain M., Papapetrou E.P., Bushman F.D. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nat Rev Cancer 2011;12(1):51–8. DOI: 10.1038/nrc3179.
38. Suerth J.D., Schambach A., Baum C. Genetic modification of lymphocytes by retrovirus-based vectors. Curr Opin Immunol 2012;24(5):598–608. DOI: 10.1016/j.coi.2012.08.007.
39. Ghani K., Wang X., de Campos-Lima P.O. et al. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. Hum Gene Ther 2009;20:966–74. DOI: 10.1089/hum.2009.001.
40. Vannucci L., Lai M., Chiuppesi F. et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. New Microbiol 2013;36:1–22. PMID: 23435812.
41. Throm R.E., Ouma A.A., Zhou S. et al. Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection. Blood 2009;113:5104–10. DOI: 10.1182/blood-2008-11-191049.
42. Singh H., Huls H., Kebriaei P., Cooper L.J. A new approach to gene therapy using Sleeping Beauty to genetically modify clini-

- cal-grade T cells to target CD19. *Immunol Rev* 2014;257:181–90.
DOI: 10.1111/immr.12137.
43. Zhao Y., Zheng Z., Cohen C.J. et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther* 2006;13(1):151–9.
DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.07.688.
 44. Birkholz K., Hombach A., Krug C. et al. Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther* 2009;16(5):596–604.
DOI: 10.1038/gt.2008.189.
 45. Hollyman D., Stefanski J., Przybylowski M. et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother* 2009;32:169–80.
DOI: 10.1097/CJI.0b013e318194a6e8.
 46. Levine B.L. Performance-enhancing drugs: design and production of redirected chimeric antigen receptor (CAR) T cells. *Cancer Gene Ther* 2015;22:79–84.
DOI: 10.1038/cgt.2015.5.
 47. Kumaresan P., Figliola M., Moyes J.S. et al. Automated cell enrichment of cytomegalovirus-specific T cells for clinical applications using the cytokine-capture system. *J Vis Exp* 2015;(104). DOI: 10.3791/52808.
 48. Wang X., Riviere I. Manufacture of tumor- and virus-specific T lymphocytes for adoptive cell therapies. *Cancer Gene Ther* 2015;22:85–94. DOI: 10.1038/cgt.2014.81.
 49. Jensen M.C., Popplewell L., Cooper L.J. et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(9):1245–56.
DOI: 10.1016/j.bbmt.2010.03.014.
 50. Kalos M., Levine B.L., Porter D.L. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra73.
DOI: 10.1126/scitranslmed.3002842.
 51. Savoldo B., Ramos C.A., Liu E. et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 2011;121(5):1822–6.
DOI: 10.1172/JCI46110.
 52. Till B.G., Jensen M.C., Wang J. et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 2008;112(6):2261–71.
DOI: 10.1182/blood-2007-12-128843.
 53. Brentjens R.J., Riviere I., Park J.H. et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 2011;118(18):4817–28.
DOI: 10.1182/blood-2011-04-348540.
 54. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365(8):725–33.
DOI: 10.1056/NEJMoa1103849.
 55. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A. et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* 2012;119(12):2709–20.
DOI: 10.1182/blood-2011-10-384388.
 56. Brentjens R.J., Latouche J.B., Santos E. et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 2003;9(3):279–86.
DOI: 10.1038/nm827.
 57. Imai C., Mihara K., Andreansky M. et al. Chimeric receptors with 4-1BB signaling capacity provoke potent cytotoxicity against acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(4):676–84.
DOI: 10.1038/sj.leu.2403302.
 58. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest* 2015;125(9):3392–400.
DOI: 10.1172/JCI80010.
 59. Porter D.L., Hwang W.T., Frey N.V. et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med* 2015;7(303):303ra139.
DOI: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
 60. Kochenderfer J.N., Somerville R., Lu L. et al. Anti-CD19 CAR T cells administered after low-dose chemotherapy can induce remissions of chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2014;124(21):550.
 61. Turtle C.J., Berger C., Sommermeyer D. et al. Anti-CD19 chimeric antigen receptor-modified T cell therapy for B cell non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: fludarabine and cyclophosphamide lymphodepletion improves in vivo expansion and persistence of CAR-T cells and clinical outcomes. *Blood* 2015;126(23):184.
 62. Schuster S.J., Svoboda J., Dwyer Nasta S. et al. Sustained remissions following chimeric antigen receptor modified T cells directed against CD19 (CTL019) in patients with relapsed or refractory CD19+ lymphomas. *Blood* 2015;126(23):183.
 63. Fraietta J.A., Beckwith K.A., Patel P.R. et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood* 2016;127(9):1117–27.
DOI: 10.1182/blood-2015-11-679134.
 64. Davila M.L., Riviere I., Wang X. et al. Efficacy and toxicity management of 19–28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2014;6(224):224ra25.
DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
 65. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013;5(177):177ra38.
DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930.
 66. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A. et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(16):1507–17.
DOI: 10.1056/NEJMoa1407222.
 67. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D. et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2013;368(16):1509–18.
DOI: 10.1056/NEJMoa1215134.
 68. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M. et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 2015;385(9967):517–28.
DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
 69. Garfall A.L., Maus M.V., Hwang W.T. et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(6):1040–7.
DOI: 10.1056/NEJMoa1504542.
 70. Danhof S., Gogishvili T., Koch S. et al. CAR-Engineered T Cells Specific for the Elotuzumab Target SLAMF7 Eliminate Primary Myeloma Cells and Confer Selective Fratricide of SLAMF7+ Normal Lymphocyte Subsets. *Blood* 2015;126:115.
 71. Lonial S., Dimopoulos M., Palumbo A. et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(7):621–31.
DOI: 10.1056/NEJMoa1505654.
 72. Ali S.A., Shi V., Wang M.L. et al. Remissions of Multiple Myeloma during a First-in-Humans Clinical Trial of T Cells Expressing an Anti-B-Cell Maturation Antigen Chimeric Antigen Receptor; ASH Annual Meeting, 2015: Late-Breaking Abstracts, p. LBA-1.
 73. Ryan M.C., Hering M., Peckham D. et al. Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:3009–18.
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0464.
 74. Ramadoss N.S., Schulman A.D., Choi S.H. et al. An anti-B cell maturation antigen bispecific antibody for multiple myeloma. *J Am Chem Soc* 2015;137:5288–91.
DOI: 10.1021/jacs.5b01876.
 75. Geyer M.B., Brentjens R.J. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 2016;18(11):1393–409.
DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.07.003.
 76. Ahmed N., Brawley V.S., Hegde M. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 2015;33:1688–96.
DOI: 10.1200/JCO.2014.58.0225.

77. Newick K., O'Brien S., Moon E., Albelda S.M. CAR T-cell therapy for solid tumors. *Annu Rev Med* 2017;68:139–52. DOI: 10.1146/annurev-med-062315-120245.
78. Fesnak A.D., June C.H., Levine B.L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16(9):566–81. DOI: 10.1038/nrc.2016.97.
79. Bonifant C.L., Jackson H.J., Brentjens R.J., Curran K.J. Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16011. DOI: 10.1038/mt.2016.11.
80. Wing M.G., Moreau T., Greenwood J. et al. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 1996;98(12):2819–26. DOI: 10.1172/JCI119110.
81. Suntharalingam G., Perry M.R., Ward S. et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355(10):1018–28. DOI: 10.1056/NEJMoa063842.
82. Teachey D.T., Rheingold S.R., Maude S.L. et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood* 2013;121(26):5154–7. DOI: 10.1182/blood-2013-02-485623.
83. Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M. et al. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther* 2010;18(4):843–51. DOI: 10.1038/mt.2010.24.
84. Brentjens R., Yeh R., Bernal Y. et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with genetically targeted autologous T cells: case report of an unforeseen adverse event in a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2010;18(4):666–8. DOI: 10.1038/mt.2010.31.
85. Lee D.W., Gardner R., Porter D.L. et al. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 2014;124:188–95. DOI: 10.1182/blood-2014-05-552729.
86. Grupp S.A., Porter D.L., Teachey D. et al. CD19-Redirected Chimeric Antigen Receptor T (CART19) Cells Induce a Cytokine Release Syndrome (CRS) and Induction of Treatable Macrophage Activation Syndrome (MAS) That Can Be Managed by the IL-6 Antagonist Tocilizumab (toc). 54th ASH Annual Meeting and Exposition; Atlanta, GA. 2012. Abstract 2604.
87. Dai H., Wang Y., Lu X., Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016 Jan 27;108(7):djv439. DOI: 10.1093/jnci/djv439.
88. Zhang H., Ye Z. L., Yuan Z.G. et al. New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells. *Int J Biol Sci* 2016;12(6):718–29. DOI: 10.7150/ijbs.14405.
89. Jones B.S., Lamb L.S., Goldman F., Di Stasi A. Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 2014;5:254. DOI: 10.3389/fphar.2014.00254.
90. Gargett T., Brown M.P. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol* 2014;5:235. DOI: 10.3389/fphar.2014.00235.
91. Ciceri F., Bonini C., Stanghellini M.T. et al. Infusion of suicide-gene-engineered donor lymphocytes after family haploidentical haemopoietic stem-cell transplantation for leukaemia (the TK007 trial): a non-randomised phase I-II study. *Lancet Oncol* 2009;10:489–500. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70074-9.
92. Keu K.V., Witney T.H., Yaghoubi S. et al. Reporter gene imaging of targeted T cell immunotherapy in recurrent glioma. *Sci Transl Med* 2017;9(373). pii: eaag2196. DOI: 10.1126/scitranslmed.aag2196.
93. Zah E., Lin M.Y., Silva-Benedict A. et al. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res* 2016;4(6):498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231.
94. Hillerdal V., Essand M. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for the Treatment of Metastatic Prostate Cancer. *Bio-Drugs* 2015;29:75–89. DOI: 10.1007/s40259-015-0122-9.
95. Hamid O., Robert C., Daud A. et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013;369:134–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1305133.
96. Craddock J.A., Lu A., Bear A. et al. Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b. *J Immunother* 2010;33:780. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ee6675.
97. Di Stasi A., De Angelis B., Rooney C.M. et al. T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* 2009;113:6392–402. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209650.
98. Chmielewski M., Hombach A.A., Abken H. Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunological reviews*. 2014;257:83–90. DOI: 10.1111/imr.12125.
99. Zhang L., Kerkar S.P., Yu Z. et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther* 2011;19:751–9. DOI: 10.1038/mt.2010.313.

Как применять ибрутиниб

Е.А. Никитин¹, В.И. Воробьев¹, М.А. Пантелеев², Г.Е. Гендлин³, В.В. Птушкин¹

¹ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

²Лаборатория клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

³Кафедра госпитальной терапии № 2 ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Евгений Александрович Никитин eugene_nikitin@mail.ru

Появление таргетных препаратов открывает новую страницу в лечении больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Это означает не только расширение терапевтического выбора, но и, возможно, изменение всей тактики ведения ХЛЛ в ближайшем будущем. В клинических исследованиях ибрутиниба впервые показано увеличение продолжительности жизни у больных с рефрактерным ХЛЛ по сравнению с данными исторического контроля, а затем и в рандомизированном сравнении с офатумумабом.

Таргетным препаратам не свойственны типичные осложнения химиотерапии, такие как миелосупрессия. Тем не менее таргетные препараты имеют свои осложнения. Неумелое использование может привести к преждевременному прекращению приема или редукции доз, что скажется на успехе лечения.

Данный обзор посвящен практике применения ибрутиниба — первого в своем классе ингибитора сигнального пути В-клеточного рецептора.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, таргетные препараты, ибрутиниб

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-33-43

How to use ibrutinib

E.A. Nikitin¹, V.I. Vorobiev¹, M.A. Panteleev², G.E. Gendlin³, V.V. Ptushkin¹

¹S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; 5 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

The emergence of new targeted drugs, affecting B-cell receptor signaling pathway opens a new page in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL). It is not simply expanding choice, it will likely to change total strategy of CLL management. Clinical trials have shown improvement of overall survival in CLL patients in both first line and relapsed disease settings. Targeted drugs lack typical complications of chemotherapy, such as myelosuppression. However, they have their specific side effects that require particular attention to avoid unjustified dose reduction and treatment cessation. The present review focuses on practical use of ibrutinib, the first inhibitor of Bruton's tyrosinkinase.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, targeted drugs, ibrutinib

Введение

Появление таргетных препаратов (ибрутиниб, иделалисиб, венетоклакс и целый ряд других) открывает новую страницу в лечении больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Это означает не только расширение терапевтического выбора, но и, возможно, изменение всей тактики ведения ХЛЛ в ближайшем будущем. В клинических исследованиях ибрутиниба впервые показано увеличение продолжительности жизни у больных с рефрактерным ХЛЛ по сравнению с историческим контролем, а затем и в рандомизированном сравнении с офатумумабом [1–3]. Использование ибрутиниба в 1-й линии у пожилых пациентов также привело к увеличению общей выживаемости [4].

Таргетным препаратам не свойственны типичные осложнения химиотерапии. В частности, миелотоксичность и инфекции не являются ключевой проблемой. Так, если режим FCR (fludarabine, cyclophosphamide, rituximab) у молодых пациентов вызывает нейтропению в 34 % случаев, а инфекции в 25 % случаев, то во время лечения ибрутинибом в монорежиме в 1-й линии у пожилых пациентов эти осложнения возникают в 3 % и 13 % случаев соответственно [4, 5]. Отсутствие миелотоксичности, в том числе кумулятивной, позволяет применять эти препараты длительно, использовать в разном контексте, комбинировать с другими лекарствами.

Тем не менее при применении таргетных препаратов возможны осложнения. Неумелое использование

может привести к преждевременному прекращению приема или редукции доз, что скажется на успехе лечения. Данный обзор посвящен практике применения ибрутиниба — первого в своем классе ингибитора сигнального пути В-клеточного рецептора (B-cell receptor, BCR).

Механизм действия ибрутиниба

Мишенью действия ибрутиниба является тирозинкиназа Брутона (Bruton's tyrosin kinase, BTK), нерецепторная тирозинкиназа, играющая принципиальную роль в созревании и функции В-лимфоцитов [6–9]. Ибрутиниб ковалентно связывается с цистеином в 481-м положении аминокислотной последовательности BTK и подавляет ее активность [10]. С практической точки зрения важно то, что ибрутиниб связывается с BTK в неизменной форме. Метаболит ибрутиниба PCI-45227 также ингибирует BTK, но в 15 раз слабее.

BTK кодируется геном *XLA*, расположенным в локусе Xq22. Мутации BTK приводят к развитию X-сцепленной врожденной агаммаглобулинемии [7]. Прием ибрутиниба может вызывать некоторые лабораторные и, возможно, клинические проявления, сходные с X-сцепленной врожденной агаммаглобулинемией. Однако полный фенотип не реализуется никогда. Это связано с тем, что BTK имеет ключевое значение в эмбриогенезе.

В нормальных В-лимфоцитах BTK участвует в передаче сигнала, поступающего с нескольких рецепторов, включая BCR [11, 12], Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptor, TLR) [13, 14], фактор активации В-клеток (B-cell activation factor, BAFF) [15] и хемокиновые рецепторы CXCR4/5 [16]. Роль BAFF и TLR на разных стадиях созревания В-лимфоцитов и в контексте ответа на разные антигены окончательно не ясна. Соответственно, не ясно, в какой степени блокада передачи сигнала от этих рецепторов содействует противоопухолевому эффекту ибрутиниба. Действие ибрутиниба сегодня связывается преимущественно с воздействием на сигнальный путь BCR [7, 8, 10] и хемокинов CXCR4/5, определяющих миграцию клеток ХЛЛ [10, 17].

В нормальных В-лимфоцитах связывание антигена с BCR активирует сигнальный каскад, который может приводить либо к пролиферации, либо к апоптозу, либо к анархии, в зависимости от стадии созревания В-лимфоцита и типа антигена [18]. В клетках ХЛЛ передача сигнала через BCR организована так, что связывание лиганда или аутоstimуляция оказывает антиапоптозное действие или приводит к пролиферации клеток [19, 20]. Вот почему блокада внутриклеточного сигнального пути BCR ведет к гибели клеток ХЛЛ, а центральная роль BTK в сигнальном пути BCR позволяет использовать ее как терапевтическую мишень.

Специфичность действия ибрутиниба

Таргетные препараты действуют на сигнальные пути, которые обычно активны в клетках многих

линий (например, кроветворения, эпителия кишечника, кардиомиоцитов и т.д.). В этом смысле ингибиторы внутриклеточных сигнальных путей менее селективны, нежели моноклональные антитела. BTK экспрессируется в В-лимфоцитах на всех стадиях созревания, кроме терминально дифференцированных плазматических клеток [21]. По этой причине воздействие на BTK специфично в отношении В-лимфоцитов. В существенно меньшей степени BTK экспрессируется в клетках миелоидного ряда [21]. BTK участвует в сигнальных путях от рецепторов ростовых факторов, рецепторов врожденной иммунной системы, рецепторов коллагена и фактора Виллебранда в тромбоцитах. Хорошо охарактеризованное к настоящему времени клиническое значение имеет только воздействие ибрутиниба на внутриклеточные сигнальные пути в тромбоцитах, что проявляется минимальной кровоточивостью у половины больных и повышает риск развития тяжелых кровотечений/кровозлияний (см. далее). Имеет ли какое-либо клиническое значение блокада BTK в других миелоидных клетках — не ясно.

Может ли ибрутиниб связываться с другими киназами, кроме BTK? Только 9 других киназ в геноме человека имеют сходно расположенный цистеиновый остаток [22]. Это определяет высокий уровень специфичности ибрутиниба. Тем не менее наличие нежелательных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), нервно-мышечной системы, сердечно-сосудистой системы убеждает в том, что нецелевые эффекты возможны. BTK является членом семейства TEC-киназ (tyrosine kinase expressed in hepatocellular carcinoma). TEC-киназы регулируют множество внутриклеточных сигнальных путей. Незначительное связывание ибрутиниба с этими молекулами теоретически может приводить к клиническим последствиям в виде нежелательных явлений.

Показания к назначению ибрутиниба

В России ибрутиниб зарегистрирован по 3 показаниям к лечению взрослых пациентов:

- 1) с ХЛЛ (независимо от линии терапии);
- 2) с рецидивами и рефрактерными формами лимфомы из клеток мантийной зоны;
- 3) с рецидивами макроглобулинемии Вальденстрема, а также пациентов, у которых проведение химиотерапии затруднено.

С учетом относительно ограниченной доступности препарата, ибрутиниб показан в терапии рецидивов ХЛЛ и прежде всего у больных с рефрактерным ХЛЛ. Пациентам с делецией 17p/мутациями *TP53* ибрутиниб необходимо назначать в 1-й линии [23]. Ибрутиниб может назначаться пожилым пациентам в качестве 1-й линии [4]. Результаты исследования RESONATE-2 позволяют считать, что максимальную выгоду от ибрутиниба получают пациенты с del11q, del17p, с уровнем бета-2-микроглобулина более 3,5 мг/л, без мутаций

ВН-генов, а также пациенты с массивной лимфаденопатией. Иными словами, ибрутиниб эффективен в прогностически наименее благоприятной группе больных [4]. Необходимость в назначении антикоагулянтов и антитромбоцитарных препаратов является относительным противопоказанием к назначению ибрутиниба.

Ибрутиниб и трансплантация аллогенных стволовых кроветворных клеток

У молодых пациентов с делецией 17p/мутациями *TP53* ибрутиниб может рассматриваться как способ достижения максимального ответа перед трансплантацией аллогенных кроветворных стволовых клеток. В особенности это касается больных с комплексным кариотипом. В ретроспективном анализе, проведенном в MD Anderson Cancer Center, наличие комплексного кариотипа (не менее 3 хромосомных нарушений) независимо ассоциировалось с худшей бессобытийной и общей выживаемостью [24].

Срок проведения трансплантации не определен. По-видимому, ее необходимо рассматривать не ранее чем через 12 мес от начала приема ибрутиниба. Важным условием является достижение максимального эффекта, когда при оценке эффекта в интервале 3 мес никаких изменений нет. Можно назвать две причины, почему такая тактика оправданна. Во-первых, у больных с ранним прогрессированием на фоне терапии ибрутинибом прогноз неблагоприятен и выживаемость после отмены препарата составляет 3,1 мес [25]. Трансплантация в такой ситуации не имеет перспектив — так, для развития реакции «трансплантат против лейкоза» требуется не менее 6 мес. Во-вторых, судя по динамике инфекций, терапия ибрутинибом приводит к устранению иммунодефицита, обусловленного ХЛЛ [26]. Можно предполагать, что на более поздних сроках проведения трансплантации инфекционных осложнений будет меньше. После трансплантации пациенты должны продолжать терапию ибрутинибом. Имеются данные о высокой эффективности ибрутиниба в лечении реакции «трансплантат против хозяина» [27].

Клиническая фармакология ибрутиниба

Ибрутиниб быстро всасывается в ЖКТ (инструкция к препарату). Пик плазменной концентрации (C_{max}) достигается через 1–2 ч после приема препарата, всасывание полностью завершается через 2,5 ч. Средний период полувыведения составляет 4–6 ч. Фармакокинетика ибрутиниба существенно меняется под влиянием еды, в особенности жирной. В исследовании J. de Jong и соавт. показано, что жирная пища повышает пиковую концентрацию ибрутиниба в 2–4 раза, а площадь под кривой примерно в 2 раза [28]. Время достижения пиковой концентрации также возрастает до 4 ч. Взаимодействие происходит, если прием пищи осуществляется за 30 мин до приема ибрутиниба или в течение 2 ч после приема. Иными

словами, натошак всасывается на 40 % меньше препарата. Полагают, что эти изменения обусловлены усилением кровоснабжения кишечника во время и после приема еды. Авторы сделали вывод, что ограничения по приему ибрутиниба с едой не нужны [28].

S. Bernard и соавт. исследовали фармакокинетику ибрутиниба у 2 больных с мантийноклеточной лимфомой и поражением центральной нервной системы и нашли, что препарат проникает через гематоэнцефалический барьер. В спинномозговой жидкости обнаруживалось небольшое количество препарата — от 1 до 7 % от плазменной концентрации, однако это значительно превышает концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) ибрутиниба [29]. Во всех описываемых авторами случаях достигнут клинический эффект. По данным C. Grommes и соавт., ибрутиниб высокоэффективен в лечении лимфом центральной нервной системы [30].

Как отмечалось ранее, средний период полувыведения ибрутиниба составляет 4–6 ч. Главным способом элиминации является разрушение препарата ферментом CYP3A4. В меньшей степени этому содействует CYP2D6. Ибрутиниб выводится в виде метаболитов (неизмененное вещество составляет только 0,77 %). Более 80 % введенной дозы ибрутиниба выводится с калом и только 7 % почками. Почечная недостаточность не является противопоказанием к назначению препарата. У пациентов с умеренным снижением функции печени концентрация ибрутиниба была выше в 6 раз. Ибрутиниб можно назначать пациентам с циррозом печени класса А по Чайлду–Пью в дозе 140 мг/сут. Пациентам с субкомпенсированным и декомпенсированным циррозом (классы В и С по Чайлду–Пью) препарат противопоказан. Возраст и пол не влияют на фармакокинетику ибрутиниба.

Сильные ингибиторы CYP3A4 повышают площадь под кривой плазменной концентрации препарата более чем в 10 раз, что может усиливать токсичность ибрутиниба. Сильные индукторы CYP3A4, напротив, снижают площадь под кривой, сводя действие препарата к минимуму. При необходимости назначения пациенту сильных ингибиторов или индукторов CYP3A4 ибрутиниб можно временно отменить. При этом известно, что перерыв в приеме более 8 последовательных дней существенно влияет на результаты лечения [31]. Совместный прием ибрутиниба и сильных индукторов CYP3A4 бессмысленен. Совместный прием ибрутиниба и сильного или умеренного ингибитора CYP3A4 возможен, но в этом случае дозу ибрутиниба необходимо снизить до 140 мг в сутки (инструкция к препарату). Препараты, влияющие на фармакокинетику ибрутиниба, указаны в табл. 1.

Как ибрутиниб, так и его метаболит PCI-45227 являются слабыми индукторами изоферментов CYP450. В применяемых дозах они не влияют на фармакокинетику других препаратов. Ибрутиниб и его метаболит PCI-45227 ингибируют транспортеры

Таблица 1. Препараты, влияющие на фармакокинетику ибрутиниба

Table 1. Drugs affecting ibrutinib's pharmacokinetics

Препараты, способные повышать концентрацию ибрутиниба в плазме Drugs capable to increase ibrutinib serum concentration		Препараты, понижающие концентрацию ибрутиниба Drugs decreasing ibrutinib concentration
Сильные ингибиторы CYP3A4 Strong CYP3A4 inhibitors	Умеренные ингибиторы CYP3A4 Moderate CYP3A4 inhibitors	Сильные индукторы CYP3A4 Strong CYP3A4 inducers
Итраконазол Itraconazole Кетоконазол Ketoconazole Позаконазол Posaconazole Кларитромицин Clarithromycin Телитромицин Telithromycin Нелфинавир Nelfinavir Индинавир Indinavir Нефазодон Nefazodone Ритонавир Ritonavir Саквинавир Sakvinavir Хлорамфеникол Chloramphenicol	Эритромицин Erythromycin Ципрофлоксацин Ciprofloxacin Флуконазол Flukonazole Верапамил Verapamil Вориконазол Voriconazole Амиодарон Amiodarone Дилтиазем Diltiazem Иматиниб Imatinib Кризотиниб Crizotinib Фосампренавир Fosamprenavir Ампренавир Amprenavir Апрепитант Aprepitant Атазанавир Atazanavir	Карбамазепин Carbamazepine Оскарбазепин Oxcarbapazine Рифампицин Rifampicin Рифабутин Rifabutin Фенитоин Phenytoin Фенобарбитал Phenobarbital Препараты, содержащие экстракт зверобоя продырявленного (<i>Hypericum perforatum</i>) Drugs containing St. John's wort (<i>Hypericum perforatum</i>) extract
Уменьшить дозу ибрутиниба до 140 мг или временно приостановить лечение (на срок не более 7 дней) Decrease ibrutinib dose to 140 mg or temporarily stop the treatment (for no longer than 7 days)	Уменьшить дозу ибрутиниба до 140 мг на время совместного применения с ингибитором CYP3A4 Decrease ibrutinib dose to 140 mg during concomitant administration with CYP3A4 inhibitor	Совместное применение с ибрутинибом противопоказано Concomitant administration with ibrutinib is contraindicated

Р-гликопротеин (P-gp) и BCRP (breast cancer resistance protein — белок сопротивления раку молочной железы). В тех концентрациях, которые достигаются в организме после всасывания ибрутиниба, это ингибирование ничтожно и не имеет клинического значения. Клинически значимо только подавление P-gp и BCRP в кишечнике, где создаются высокие локальные концентрации препарата. Совместный прием ибрутиниба с субстратами P-gp и BCRP повышает их концентрацию в крови. Этот эффект касается препаратов с «узким терапевтическим окном», например дигоксина, метотрексата, в какой-то степени дабигатрана. Поэтому прием этих препаратов и ибрутиниба необходимо развести во времени.

Ибрутиниб связывается с ВТК необратимо. Эту особенность можно использовать при совместном назначении препаратов, фармакокинетически взаимодействующих с ним: достаточно развести прием этих лекарств во времени. Через 4–6 ч после приема концентрация ибрутиниба падает, но это уже неважно,

поскольку основная масса препарата связывается с мишенью в первые часы приема, во время наивысшей концентрации препарата в крови.

В поисках оптимальной дозы R. H. Advani и соавт. исследовали эффективность и безопасность ибрутиниба в разных дозах, а также измеряли насыщаемость сайтов ВТК в лимфоцитах с помощью высокоспецифичного флуоресцентно меченного деривата ибрутиниба методом вестерн-блоттинга [32]. Использовались два различных способа применения ибрутиниба. При первом, прерывистом способе ибрутиниб назначался в течение 28 дней с 7-дневным перерывом. Доза препарата повышалась от 1,25 до 12,5 мг/кг в день. При втором, постоянном способе ибрутиниб назначался ежедневно в фиксированной дозе — 8,3 мг/кг или 560 мг до прогрессирования непереносимой токсичности, решения пациента или врача отменить ибрутиниб. Полная насыщаемость сайтов связывания ВТК была получена при назначении препарата в дозе 2,5 мг/кг в день. Максимально переносимая доза

не была достигнута даже в группе пациентов, получавших ибрутиниб 12,5 мг/кг в день.

Дозы препаратов подобраны с учетом этих особенностей. В дозе не менее 2,5 мг/кг/день сайты связывания ВТК заблокированы более чем на 90 % в течение 24 ч [32]. Активность СУР3А4 может существенно отличаться от пациента к пациенту. Эти различия также учтены в итоговой рекомендации. При ХЛЛ препарат назначается в дозе 420 мг независимо от массы тела. При лимфоме из клеток мантийной зоны подобранная доза ибрутиниба составляет 560 мг в день. По данным R. H. Advani и соавт., назначение препарата пациентам с лимфомой мантийной зоны в этой дозе позволило добиться максимального эффекта и сопровождалось полным насыщением сайтов ВТК [32].

Данных о том, что препарат накапливается при длительном приеме, нет.

Лимфоцитоз, вызванный ибрутинибом

Особенность механизма действия ибрутиниба в том, что он вызывает перераспределительный лимфоцитоз. Как правило, во время приема ибрутиниба происходит быстрое сокращение размеров лимфатических узлов (ЛУ) и повышение абсолютного уровня лимфоцитов периферической крови, обусловленное перераспределением клеток ХЛЛ из ткани ЛУ и селезенки в кровь [33]. Этот эффект наблюдается при использовании других ингибиторов сигнального пути BCR (иделалисиба, фостаматиниба и других препаратов) и, таким образом, является маркером воздействия на путь BCR при ХЛЛ. В случае с ибрутинибом перераспределительный лимфоцитоз обусловлен несколькими эффектами: подавлением пролиферации и жизнеспособности клеток ХЛЛ, подавлением миграции клеток в ткани по градиенту хемокинов CXCL12, CXCL13 и подавлением адгезии клеток ХЛЛ, опосредуемой интегринами [33, 34]. D. Wodarz и соавт. исследовали соответствие между сокращением ЛУ/органов и перераспределительным лимфоцитозом, используя точную количественную компьютерную томографию. Авторы нашли, что сокращение ЛУ происходит не столько за счет перераспределения клеток ХЛЛ в кровь, сколько за счет их гибели в ткани ЛУ. Фракция клеток ХЛЛ, которая перераспределяется в кровь из тканей, составляла 23 ± 17 % [35].

Лимфоцитоз, вызванный ибрутинибом, достигает своего пика к 4-й неделе и у большинства больных разрешается в течение 8–12 мес. В этой связи уже в первых клинических исследованиях ибрутиниба возникла сложность с оценкой эффекта. С одной стороны, у пациента происходит полная редукция значительно увеличенных ЛУ. С другой стороны, абсолютное число лимфоцитов оказывается выше, чем до начала, или снижается менее чем на 50 %. В соответствии с критериями оценки эффекта IWCLL 2008 такой результат можно рассматривать как прогрессирование или стабилизацию. В действительности же к 3–6-му месяцу терапии у многих паци-

ентов можно констатировать полную клиническую ремиссию (нормализация уровня гемоглобина, тромбоцитов, сокращение ЛУ и селезенки), если бы не лимфоцитоз. В связи с этой особенностью для оценки эффекта стало применяться новое понятие «частичная ремиссия с лимфоцитозом». Она констатируется у пациентов, достигших частичной ремиссии со стороны ЛУ, селезенки, уровня гемоглобина, тромбоцитов, у которых уровень лимфоцитов снизился менее чем на 50 % по сравнению с исходным уровнем или даже увеличился. Таким образом, повышение количества лимфоцитов само по себе не может рассматриваться как рефрактерность к терапии или прогрессирование и не может быть основанием для прекращения терапии. Прогрессирование констатируется только при отрицательной динамике со стороны других проявлений болезни, документированной объективными методами, или при устойчивом росте лимфоцитоза после его снижения.

У пациентов с гиперлейкоцитозом возникает опасение, что дополнительное повышение лейкоцитов ухудшит состояние больного. ХЛЛ, в отличие от большинства других лейкозов, не вызывает лейкостазов. В литературе можно встретить описания лейкостазов на фоне ХЛЛ, однако в последние годы таких описаний нет и можно думать, что в прежних публикациях речь шла о других лимфатических опухолях [36]. У больных с ХЛЛ и лимфомой из малых лимфоцитов не было описано ни одного случая лейкостаза на фоне применения ибрутиниба. Если есть опасение, что ибрутиниб может вызвать серьезные осложнения, перед его назначением можно провести курс циторедуктивной терапии. Именно такая тактика используется в исследовании CLL2-XXX немецкой группы, предполагающем 3 этапа лечения: циторедукцию, индукцию ремиссии, поддерживающую терапию до эрадикации минимальной остаточной болезни. Циторедукция в протоколе обеспечивается 1 или 2 циклами монотерапии бендамустином. Далее назначается ибрутиниб в сочетании с обинутузумабом.

Следует отметить, что у больных с рефрактерным ХЛЛ циторедуктивная терапия малоэффективна. Лейкаферезы во избежание развития лейкостазов, по опыту авторов, не улучшают состояние больного. Теоретически, последствием гиперлейкоцитоза может быть усугубление кровоточивости у больных с тромбоцитопенией, и в этом смысле быстрое снижение лейкоцитов оправданно. Данных о преимуществе комбинации ритуксимаба и ибрутиниба над монотерапией ибрутинибом пока не опубликовано.

Имеет ли прогностическое значение персистенция лимфоцитоза после длительного приема препарата? Максимальный срок приема ибрутиниба пациентами с ХЛЛ составляет к настоящему времени около 6 лет. Данных о неблагоприятном значении персистирующего лимфоцитоза не получено. Более того, по данным исследования PCYC-1102, персистирующий лимфоцитоз наблюдался у больных с благоприятными прогностически-

ми маркерами, такими как вариант с мутациями VH-генов и делеция 13q [36]. J.A. Woyach и соавт. провели исследование фосфорилирования нескольких молекул пути BCR [37]. Понятие «персистирующий лимфоцитоз» было определено ими как снижение количества лимфоцитов менее чем на 50 % к 12-му месяцу приема. Авторы нашли, что у больных с персистирующим лимфоцитозом активность ВТК и следующей за ней молекулы сигнального каскада фосфолипазы С-гамма остается заблокированной (фосфорилирование обеих молекул снижено). При этом сам по себе путь BCR активен, поскольку фосфорилирование молекул, передающих сигнал непосредственно в ядро (ERK и АКТ), было сохранено и даже усилено. Авторы не нашли никаких мутаций в генах пути BCR и сделали вывод о том, что персистирующие клетки ХЛЛ не представляют собой субклоны ХЛЛ и не означают прогрессирования. Эти клетки не полностью зависят от проксимальной передачи сигнала через BCR, в них активны обходные пути внутриклеточного сигнального каскада и поэтому они устойчивы к апоптозу, вызываемому ибрутинином [37]. Выживаемость больных с персистирующим лимфоцитозом не отличалась от остальной группы пациентов.

Персистирующий лимфоцитоз может изменить концепцию ведения ХЛЛ. Ибрутиниб не позволяет добиться полной ремиссии, но пациент не страдает от лейкоза. Можно ли считать, что достижение ремиссии перестает быть целью лечения ХЛЛ? На этот вопрос ответа пока нет. Нашей целью должно быть уничтожение опухоли. Поэтому в настоящее время проводится много исследований, в которых ибрутиниб комбинируется

с другими препаратами и терапевтический план подразумевает прекращение терапии на каком-то этапе.

Риск кровоточивости и ибрутиниб

Кровоточивость развивается у 40–50 % больных, получавших ибрутиниб. В большинстве случаев речь идет об умеренной и легкой кровоточивости I–II степени тяжести (петехии, экхимозы, носовая и десневая кровоточивость, гематомы небольшого размера). Осложнения III–IV степени наблюдались менее чем у 5 % больных [1, 2, 4, 23, 38] (табл. 2).

Ибрутиниб селективно подавляет передачу внутриклеточного сигнала в тромбоцитах и воздействует на молекулы, получающие сигнал от коллагенового рецептора GPVI. В настоящее время нет согласия по вопросу, подавляется ли им только ВТК или же и другие, похожие киназы в сети реакций тирозинкиназной сигнализации, связывающей GPVI с функциональными ответами тромбоцитов [39]. Однако многочисленные исследования уверенно показывают, что вне зависимости от внутриклеточной мишени ибрутиниб избирательно подавляет агрегацию тромбоцитов в ответ на коллаген [40]. Есть также данные по его влиянию на outside-in сигнализацию интегринов в тромбоцитах [41].

Вторым важным механизмом влияния ибрутиниба на гемостаз является, по-видимому, сам по себе лимфоцитоз, описанный выше [42]. Фермент эндонуклеотидаза CD39, экспрессирующийся на поверхности тромбоцитов, разрушает аденозиндифосфат (АДФ) — один из главных активаторов тромбоцитов — и при ХЛЛ ведет к ослаблению тромбоцитарного гемостаза

Таблица 2. Тяжелые геморрагические осложнения ибрутиниба по данным разных исследований

Table 2. Severe hemorrhagic complications of ibrutinib according to various studies

Исследование Study	Пациенты Patients	Группа Group	n	Осложнения III–IV степени, n (%) Severity grade III–IV complications, n (%)
PCYC-1102	Первичные >65 лет Primary >65 years	Ибрутиниб Ibrutinib	31	
PCYC-1103 [1]	Рецидивы Relapses	Ибрутиниб Ibrutinib	101	11 (8)
RESONATE-17 [23]	Рецидивы, del17p Relapses, del17p	Ибрутиниб Ibrutinib	144	7 (5)
RESONATE-1 [2]	Рецидивы Relapses	Ибрутиниб Ibrutinib	195	2 (1)
		Офатумумаб Ofatumumab	191	3 (2)
HELIOS [38]	Рецидивы Relapses	Ибрутиниб, бендамустин, ритуксимаб Ibrutinib, bendamustine, rituximab	287	8 (2,8)
		Бендамустин, ритуксимаб Bendamustine, rituximab	287	5 (1,7)
RESONATE-2 [4]	Первичные >65 лет Primary >65 years	Ибрутиниб Ibrutinib	136	5 (4)
		Хлорамбуцил Chlorambucil	133	2 (2)

сам по себе [43]. Дополнительный лимфоцитоз, вызываемый ибрутинибом, подавляет его еще сильнее и, в комбинации с его ингибированием сигнализации от коллагена, может вести к кровотечениям. Тот факт, что после первых месяцев терапии кровотечения ослабевают (параллельно с уменьшением лимфоцитоза), хорошо согласуется с этой гипотезой.

Пациенты с ХЛЛ часто имеют сопутствующие заболевания, по поводу которых получают антикоагулянтную и антитромбоцитарную терапию. J. Jones и соавт. провели анализ 2 исследований ибрутиниба в монорежиме, в которые включено 327 пациентов с ХЛЛ. Из 327 пациентов 65 (20 %) одновременно получали антикоагулянтные препараты (антагонисты витамина К, гепарины, ингибиторы II и X факторов). Аспирин одновременно с ибрутинибом принимали 70 (21 %) пациентов, клопидогрел — 7 (2 %), нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) — 91 (28 %) [44]. У 8 пациентов развились тяжелые геморрагические осложнения. Пять из них одновременно получали антикоагулянты или антитромбоцитарные препараты (низкомолекулярные гепарины (НМГ) — 1 пациент, аспирин — 1, НПВП — 1, аспирин и варфарин — 1, НМГ и НПВП — 1). Геморрагическое осложнение послужило причиной перманентной отмены препарата у 4 больных. Таким образом, одновременное назначение антикоагулянтов и антиагрегантов повышает риск развития тяжелых кровотечений/кровозлияний. При этом распространенность приема препаратов, воздействующих на гемостаз, очень высока. Суммарно 205 (63 %) из 327 больных получали антитромбоцитарные и антикоагулянтные препараты. Каким образом сочетать эти препараты с ибрутинибом? Риски и выгоды в каждом случае оцениваются индивидуально. С учетом фармакодинамики ибрутиниба, наиболее опасна его комбинация с клопидогрелом и другими препаратами, подавляющими связывание АДФ с P2Y12-рецепторами тромбоцитов [41]. Назначение комбинации антикоагулянтного, антиагрегантного препаратов и ибрутиниба также небезопасно.

Если альтернатива возможна, целесообразно воздержаться от назначения ибрутиниба. При необходимости назначить одновременно антикоагулянтный препарат и ибрутиниб теоретически более предпочтителен дабигатран, поскольку он не взаимодействует с ибрутинибом через CYP3A4. Прием ибрутиниба и дабигатрана должен быть разведен во времени. Апиксабан является слабым ингибитором CYP3A4, поэтому сочетание апиксабана и ибрутиниба возможно. В этом случае также необходимо развести их прием во времени.

При развитии кровотечений/кровозлияний III–IV степени или тяжелого распространенного геморрагического синдрома показано переливание тромбоцитов. Ибрутиниб связывается с ВТК ковалентно. Таким образом, после приема препарата функция всех тромбоцитов угнетена необратимо до замены их новыми. Как отмечалось в разделе «фармакокинетика», концентрация ибрутиниба радикально снижается уже через 4 ч после его приема, поэтому на тромбоциты, перелитые через 6 ч, он не оказывает влияния. По этой же причине при проведении оперативных вмешательств ибрутиниб отменяют за 3 дня до операции и не возобновляют еще 3 дня. За 3 дня примерно половина тромбоцитов заменяется новыми. При низком количестве тромбоцитов срок может быть увеличен.

Кардиальные осложнения на фоне ибрутиниба: фибрилляция предсердий

Частое возникновение наджелудочковых тахикардий на фоне терапии ибрутинибом было зафиксировано уже в первых клинических исследованиях. Однако связь с препаратом была сомнительна, поскольку фибрилляция предсердий (ФП) наблюдается часто и в общей популяции: у 2 % лиц моложе 65 лет и у 9 % старше 65 лет [45]. Более надежные данные получены в рандомизированных исследованиях. Риск ФП на фоне ибрутиниба оказался выше, чем в контрольных группах [2, 4, 38]. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3. Частота мерцательной аритмии по данным рандомизированных исследований

Table 3. Rate of atrial fibrillation according to randomized studies

Исследование Study	Пациенты Patients	Группа Group	n	Фибрилляция предсердий, n (%) Atrial fibrillation, n (%)
RESONATE-1 [2]	Рецидивы Relapses	Ибрутиниб Ibrutinib	195	10 (5)
		Офатумумаб Ofatumumab	191	1 (0,5)
HELIOS [38]	Рецидивы Relapses	Ибрутиниб, бендамустин, ритуксимаб Ibrutinib, bendamustine, rituximab	287	22 (7,7)
		Бендамустин, ритуксимаб Bendamustine, rituximab	287	8 (2,4)
RESONATE-2 [4]	Первичные >65 лет Primary >65 years	Ибрутиниб Ibrutinib	136	8 (6)
		Хлорамбуцил Chlorambucil	133	1 (1)

Наибольший, 10-кратный риск возникновения ФП получен в исследовании RESONATE-1 [2]. В нем пациенты получали ибрутиниб значительно дольше, чем офатумумаб, поскольку при прогрессировании на фоне офатумумаба происходило снятие с протокола. В течение 12 мес из-за прогрессирования были сняты с протокола 80 % больных. Ибрутиниб к этому сроку продолжали получать более 80 % пациентов. Таким образом, срок наблюдения за больными на ибрутинибе был выше и вероятность развития ФП больше. Но в других исследованиях, где сроки приема сопоставимы, риск ФП был в 3–5 раз выше.

Каким образом ибрутиниб содействует развитию ФП — не ясно. По данным J.R. McMullen и соавт., ибрутиниб подавляет ВТК и родственные киназы, такие как ТЕС-киназы, транскрипты которых обнаруживаются в большом количестве в ткани предсердий при мерцательной аритмии [46].

Развитие ФП на фоне ибрутиниба создает несколько проблем. Эта аритмия ассоциирована с тромбоэмболическим инсультом, поэтому ее ведение предполагает назначение антикоагулянтов, что повышает риск развития геморрагических осложнений. Рекомендаций по сочетанию ибрутиниба с антикоагулянтами / антитромбоцитарными препаратами нет. Ибрутиниб фармакокинетически взаимодействует как с антиаритмическими препаратами (дилтиазем, верапамил, амиодарон через CYP3A4, дигоксин через P-gp), так и с антикоагулянтами (апиксабан и ривароксабан через CYP3A4, дабигатран через P-gp).

P.A. Thompson и соавт. обобщили 56 случаев наджелудочковых тахикардий, развившихся на фоне терапии ибрутинибом [47]. Двадцать девять пациентов получали ибрутиниб в рамках программы раннего доступа во Франции и Бельгии, 21 пациент в США (MD Anderson Cancer Center) и 6 пациентов в Австралии (Peter MacCallum Cancer Centre). Кумулятивная частота ФП составила 8,7 %. Все пациенты получали ибрутиниб в дозе 420 мг/день; 51 в режиме монотерапии, 5 в комбинации с ритуксимабом. Суммированы данные по пациентам, получавшим ибрутиниб с 2010 по 2015 г. Медиана возраста 70 лет (разброс 49–86 лет); выборка включала 46 мужчин и 10 женщин. Анамнез ФП имелся у 27 % больных, и все больные имели синусовый ритм к началу приема ибрутиниба.

Медиана времени начала ФП составила 3,8 мес (разброс 6–1410 дней). В 76 % случаев ФП случилась в течение 1-го года терапии. У 64 % больных нарушения ритма носили пароксизмальный характер (эпизоды менее 7 дней). В соответствии с общими терминологическими критериями по побочным реакциям ФП I–II степени наблюдалась у 58 % больных, III–IV степени (необходимость в urgentном вмешательстве) — у 42 %.

Противоаритмическая терапия потребовалась 51 (91 %) пациенту из 56. Амиодарон был назначен 19 (34 %) пациентам, флекаинид 4 (7 %), бета-блокато-

ры 38 (68 %), блокаторы кальциевых каналов — 4 (7 %). Семи пациентам проведена кардиоверсия. Устойчивая конверсия ритма произошла только у 2 пациентов из 7. В 17 (30 %) случаях тахикардия не была устранена, несмотря на терапевтическое вмешательство. Реверсия ритма была достигнута у 35 (62 %) пациентов, однако у 10 (28 %) пациентов произошли рецидивы.

В момент эпизода ФП ибрутиниб был отменен у 22 больных, у 17 снижена доза, 17 продолжили прием в прежней дозе. В ходе дальнейшего наблюдения за больными установлено, что у 25 больных препарат отменен навсегда и только 17 продолжили прием в прежней дозе.

Антикоагулянтная и антиагрегантная терапия представлена в табл. 4. У 8 (14 %) пациентов развились геморрагические осложнения: 2 желудочно-кишечных кровотечения, 2 гемоперикарда с тампонадой сердца, 1 легочное кровотечение, 1 внутримышечная гематома, 1 нетравматическая и 1 травматическая субдуральная гематома. Частота этих осложнений выше, чем в общей популяции. Медиана уровня тромбоцитов на момент развития геморрагических осложнений была $110 \times 10^9/\text{л}$ (69–173). Трое больных не получали антикоагулянты и/или антиагреганты препараты. Один пациент получал аспирин, 1 — комбинацию аспирина и клопидогрела, 3 — варфарин.

Авторам не удалось выявить факторы, предсказывающие риск ФП на фоне ибрутиниба (см. табл. 4).

Практических рекомендаций по ведению пациентов с ФП, развившейся на фоне терапии ибрутинибом, пока не опубликовано. Рекомендации авторов данной статьи представлены ниже.

1. До начала терапии ибрутинибом желательно устранить факторы, предрасполагающие к ФП: артериальную гипертензию, гипертиреоз, курение, алкоголь, тяжелые физические нагрузки.

2. Во время терапии ибрутинибом необходимы быстрое ведение инфекций, быстрая коррекция электролитных нарушений, госпитализация в стационар при развитии осложнений.

3. При выраженных клинических проявлениях ФП (III–IV балла по шкале EHRA (European Heart Rhythm Association)) терапию ибрутинибом желательно приостановить до разрешения экстренной ситуации. Решение о продолжении терапии и о дозе ибрутиниба — в зависимости от клинической ситуации.

4. Где возможно, терапию ибрутинибом предпочтительно оставить, снизив дозу. Прием препарата в сниженных дозах оказывает меньшее влияние на эффективность терапии ХЛЛ, чем полная отмена.

5. Оптимальное ведение пациентов с ФП достигается при тесном взаимодействии гематологов и кардиологов.

Ибрутиниб и инфекционные осложнения

Воздействие ибрутиниба на ВТК теоретически должно приводить к высокой частоте инфекций.

Таблица 4. Частота факторов риска и лечение мерцательной аритмии, развившейся на фоне терапии ибрутинибом**Table 4.** Rate of risk factors and treatment of atrial fibrillation during ibrutinib therapy

Фактор риска Risk factor	n/N (%)
Гипертензия Hypertension	36/56 (64)
ФП в анамнезе History of AF	15/56 (27)
Патология клапанов Valve disorders	9/36 (25)
Манифестная ХСН Clinical CHF	7/56 (12)
Стенокардия Angina pectoris	7/56 (12)
Недавняя инфекция Recent infection	10/56 (18)
Противотромботические препараты Antithrombotic drugs	n (%)
Аспирин Aspirin	16 (29)
Аспирин + клопидогрел Aspirin + clopidogrel	2 (3)
Аспирин + клопидогрел + НМГ Aspirin + clopidogrel + LMWHs	1 (2)
Варфарин Warfarin	7 (12)
НМГ LMWHs	5 (9)
Новые антикоагулянты New anticoagulants	15 (27)
Ведение пациентов с ФП AF management	N (%)
Понадобилось лечение Required treatment	51 (91)
Амиодарон Amiodarone	19 (34)
Бета-блокаторы Beta blockers	38 (68)
Флекаинид Flecainide	7 (12)
Антагонисты кальция Calcium channel blockers	4 (7)
Кардиоверсия Cardioversion	4 (7)

Сокращения: ФП — фибрилляция предсердий; ХСН — хроническая сердечная недостаточность; НМГ — низкомолекулярные гепарины.

Abbreviations: AF — atrial fibrillation; CHF — chronic heart failure; LMWHs — low molecular weight heparins.

Агаммаглобулинемия Брутона характеризуется повышенной восприимчивостью к инкапсулированным пиогенным бактериям *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas* sp. Типичными проявлениями у детей являются отит, синусит, пневмония. У взрослых часты сепсис, менингит, энтеровирусные инфекции, бактериальная диарея, характерны кожные инфекции, вызванные стрептококками группы А, *Staphylococcus aureus* [48]. На фоне терапии

ибрутинибом чаще всего наблюдаются респираторные инфекции (65 %), затем инфекции ЖКТ и мочеполовых путей (16 %) и кожные инфекции (13 %) [26]. Флударабин, алемтузумаб и ритуксимаб по-разному влияют на иммунную систему, обуславливая специфический характер инфекционных осложнений. В отношении ибрутиниба этого сказать нельзя (табл. 5). Повышения частоты оппортунистических инфекций, инфекций, вызванных специфическими возбудителями, не происходит. Более того, частота инфекционных осложнений зависит от того, применяется ли ибрутиниб в 1-й линии или при рецидиве. Так, в исследовании RESONATE-2, проводившемся у первичных больных, частота тяжелых пневмоний составила 4 % в группе ибрутиниба и 2 % в группе хлорамбуцила [4]. В исследовании RESONATE-1, проводившемся у пациентов с рецидивами, тяжелые пневмонии развились у 7 % больных в группе ибрутиниба и у 5 % в группе офатумумаба [2]. В исследовании C. Sun и соавт. частота тяжелых инфекций в группе предлеченных пациентов была достоверно выше, чем в группе первичных больных (отношение рисков 2,23) [26].

Во многих исследованиях ибрутиниба отмечается, что частота инфекций убывает со временем. Так, по данным C. Sun и соавт. средняя частота инфекций в первые 6 мес приема составила 16,3 инфекции на 100 пациенто-мес, в то время как после 6-го месяца приема — 6,9 инфекции.

В совокупности все эти факты говорят нам о том, что устранение с помощью ибрутиниба иммунодефицита, обусловленного ХЛЛ, имеет значительно большее клиническое значение, чем иммунодефицит, вызываемый ибрутинибом.

Уже в первом исследовании ибрутиниба было обращено внимание на восстановление гуморального иммунитета на фоне лечения. Подробное исследование на эту тему было проведено C. Sun и соавт. Этой группой исследователей показано, что к 24 мес приема ибрутиниба происходит повышение уровня IgA, небольшое повышение уровня IgM и существенное снижение уровня IgG [26]. Авторы установили также качественные изменения репертуара антител: при 2-летнем сроке приема ибрутиниба возрастают титры полиреактивных антител, что напоминает доминирование полиреактивных В-лимфоцитов у лиц с агаммаглобулинемией Брутона. Эти изменения оправдывают профилактическое и лечебное назначение препаратов внутривенного иммуноглобулина у пациентов, получающих ибрутиниб, в особенности в качестве 3-й и более линии терапии. Препараты иммуноглобулина восполняют пул высокоаффинных высокоспецифичных антител.

Заключение

Ибрутиниб — новый таргетный препарат, демонстрирующий высокую эффективность в лечении

Таблица 5. Особенности спектра инфекций на фоне терапии препаратами, применяющимися в лечении хронического лимфолейкоза

Table 5. Characteristics of infections depending on drugs using for chronic lymphoid leukemia therapy

Препарат Drug	Особенности спектра инфекций Characteristics of specter of infections
Алкилирующие препараты Alkylating agents	Обычные бактериальные возбудители: стрептококки, стафилококки, грамотрицательные бактерии Common bacterial infections: streptococcus, staphylococcus, Gram-negative bacteria
Аналоги пуринов Purine analogues	Герпесвирусы, плесени, дрожжи, пневмоцисты Herpes viruses, fungi, yeasts, pneumocystis
Ритуксимаб Rituximab	Реактивация вируса гепатита В, реактивация JCV (John Cunningham virus) Hepatitis B virus reactivation, JCV (John Cunningham virus) reactivation
Алемтузумаб Alemtuzumab	Цитомегаловирус, дрожжи, плесени Cytomegalovirus, fungi, yeasts
Ибрутиниб Ibrutinib	Данных недостаточно. Менее иммуносупрессивен в сравнении с аналогами пуринов и алемтузумабом Not enough data available. Less immunosuppressive compared to purine analogues and alemtuzumab

ХЛЛ. Несмотря на недавний срок применения, ибрутиниб включен во все клинические рекомендации и может применяться как у больных с рецидивами, так и в 1-й линии. Для оптимального ведения больных необходимо принимать во внимание биологиче-

ские прогностические факторы, фармакокинетику и фармакодинамику препарата и имеющиеся у пациента сопутствующие заболевания. Также важно подробное информирование пациента и оперативное ведение осложнений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E. et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013;369(1):32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.
- Byrd J.C., Brown J.R., O'Brien S. et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2014;371(3):213–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1400376.
- Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E. et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood* 2015;125(16):2497–506. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606038.
- Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M. et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2015;373(25):2425–37. DOI: 10.1056/NEJMoa1509388.
- Hallek M., Fischer K., Fingerle-Rowson G. et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376(9747):1164–74. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61381-5.
- Bruton O.C., Apt L., Gitlin D., Janeway C.A. Absence of serum gamma globulins. *AMA J Dis Child* 1952;84(5):632–6. PMID: 12984834.
- Rawlings D.J., Saffran D.C., Tsukada S. et al. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science* 1993;261(5119):358–61. PMID: 8332901.
- Tsukada S., Saffran D.C., Rawlings D.J. et al. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. 1993. *J Immunol* 2012;188(7):2936–47. PMID: 22442491.
- Rickert R.C. New insights into pre-BCR and BCR signalling with relevance to B cell malignancies. *Nat Rev Immunol* 2013;13(8):578–91. DOI: 10.1038/nri3487.
- Singh J., Petter R.C., Kluge A.F. Targeted covalent drugs of the kinase family. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14(4):475–80. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.06.168.
- Buggy J.J., Elias L. Bruton tyrosine kinase (BTK) and its role in B-cell malignancy. *Int Rev Immunol* 2012;31(2):119–32. DOI: 10.3109/08830185.2012.664797.
- Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;120(24):4684–91. DOI: 10.1182/blood-2012-05-423194.
- Liu X., Zhan Z., Li D. et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nat Immunol* 2011;12(5):416–24. DOI: 10.1038/ni.2015.
- Treon S.P., Xu L., Yang G. et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367(9):826–33. DOI: 10.1056/NEJMoa1200710.
- Shinners N.P., Carlesso G., Castro I. et al. Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J Immunol* 2007;179(6):3872–80. PMID: 17785824.
- de Gorter D.J., Beuling E.A., Kersseboom R. et al. Bruton's tyrosine kinase and phospholipase Cgamma2 mediate chemokine-controlled B cell migration and homing. *Immunity* 2007;26(1):93–104. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.11.012.
- Packham G., Krysov S., Allen A. et al. The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica* 2014;99(7):1138–48. DOI: 10.3324/haematol.2013.098384.
- Dal Porto J.M., Gauld S.B., Merrell K.T. et al. B cell antigen receptor signaling 101.

- Mol Immunol 2004;41(6–7):599–613.
DOI: 10.1016/j.molimm.2004.04.008.
19. Deglesne P.A., Chevallier N, Letestu R. et al. Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res* 2006;66(14):7158–66.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0085.
 20. Bernal A., Pastore R.D., Asgary Z. et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001;98(10):3050–7.
PMID: 11698290.
 21. de Weers M., Verschuren M.C., Kraakman M.E. et al. The Bruton's tyrosine kinase gene is expressed throughout B cell differentiation, from early precursor B cell stages preceding immunoglobulin gene rearrangement up to mature B cell stages. *Eur J Immunol* 1993;23(12):3109–14.
DOI: 10.1002/eji.1830231210.
 22. Pan Z., Scheerens H., Li S.J. et al. Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *ChemMedChem* 2007;2(1):58–61.
DOI: 10.1002/cmdc.200600221.
 23. O'Brien S., Jones J.A., Coutre S.E. et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol* 2016;17(10):1409–18.
DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30212-1.
 24. Thompson P.A., O'Brien S.M., Wierda W.G. et al. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer* 2015;121(20):3612–21.
DOI: 10.1002/cncr.29566.
 25. Jain P., Keating M., Wierda W. et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood* 2015;125(13):2062–7.
DOI: 10.1182/blood-2014-09-603670.
 26. Sun C., Tian X., Lee Y.S. et al. Partial reconstitution of humoral immunity and fewer infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Blood* 2015;126(19):2213–9.
DOI: 10.1182/blood-2015-04-639203.
 27. Miklos D., Arora M., Waller E. et al. Multicenter Open-Label Phase 2 Study of Ibrutinib in Chronic Graft Versus Host Disease (cGVHD) after Failure of Corticosteroids. *Blood* 2016;128(22): abstr #LBA-3.
 28. de Jong J., Sukbuntherng J., Skee D. et al. The effect of food on the pharmacokinetics of oral ibrutinib in healthy participants and patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75(5):907–16.
DOI: 10.1007/s00280-015-2708-9.
 29. Bernard S., Goldwirt L., Amorim S. et al. Activity of ibrutinib in mantle cell lymphoma patients with central nervous system relapse. *Blood* 2015;126(14):1695–8.
DOI: 10.1182/blood-2015-05-647834.
 30. Grommes C., Pastore A., Gavrilovic I. et al. Single-Agent Ibrutinib in Recurrent/Refractory Central Nervous System Lymphoma. *Blood Abstracts: 58th Annual Meeting Abstracts* 2016;128(22).
 31. Barr P., Hillmen P., O'Brien S. et al. Dose adherence and baseline exposure analysis of the ibrutinib 420 mg dose administered to patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *J Clin Oncol* 2015;33 suppl:abstr 7012.
 32. Advani R.H., Buggy J.J., Sharman J.P. et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013;31(1):88–94.
DOI: 10.1200/JCO.2012.42.7906.
 33. Ponader S., Chen S.S., Buggy J.J. et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2012;119(5):1182–9.
DOI: 10.1182/blood-2011-10-386417.
 34. de Rooij M.F., Kuil A., Geest C.R. et al. The clinically active BTK inhibitor PCI-32765 targets B-cell receptor- and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119(11):2590–4.
DOI: 10.1182/blood-2011-11-390989.
 35. Wodarz D., Garg N., Komarova N.L. et al. Kinetics of CLL cells in tissues and blood during therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *Blood* 2014;123(26):4132–5.
DOI: 10.1182/blood-2014-02-554220.
 36. Herman S.E., Niemann C.U., Farooqui M. et al. Ibrutinib-induced lymphocytosis in patients with chronic lymphocytic leukemia: correlative analyses from a phase II study. *Leukemia* 2014;28(11):2188–96.
DOI: 10.1038/leu.2014.122.
 37. Woyach J.A., Smucker K., Smith L.L. et al. Prolonged lymphocytosis during ibrutinib therapy is associated with distinct molecular characteristics and does not indicate a suboptimal response to therapy. *Blood* 2014;123(12):1810–7.
DOI: 10.1182/blood-2013-09-527853.
 38. Hallek M., Kay N.E., Osterborg A. et al. The HELIOS trial protocol: a phase III study of ibrutinib in combination with bendamustine and rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol* 2015;11(1):51–9.
DOI: 10.2217/fon.14.119.
 39. Levade M., Severin S., Gratacap M.P. et al. Targeting Kinases in Cancer Therapies: Adverse Effects on Blood Platelets. *Curr Pharm Des* 2016;22(16):2315–22. PMID: 26916020.
 40. Kamel S., Horton L., Ysebaert L. et al. Ibrutinib inhibits collagen-mediated but not ADP-mediated platelet aggregation. *Leukemia* 2015;29(4):783–7.
DOI: 10.1038/leu.2014.247.
 41. Bye A.P., Unsworth A.J., Vaipuri S. et al. Ibrutinib Inhibits Platelet Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Outside-In Signaling and Thrombus Stability But Not Adhesion to Collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(11):2326–35.
DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306130.
 42. Lipsky A.H., Lozier J.N., Wiestner A. Response to Comment on Incidence and Risk Factors of Bleeding-Related Adverse Events in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Treated with Ibrutinib. *Haematologica* 2016;101(3):e124–5.
DOI: 10.3324/haematol.2015.140558.
 43. Pulte D., Olson K.E., Broekman M.J. et al. CD39 activity correlates with stage and inhibits platelet reactivity in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med* 2007;5:23.
DOI: 10.1186/1479-5876-5-23.
 44. Jones J.A., Hillmen P., Coutre S. et al. Pattern of Use of Anticoagulation and/or Antiplatelet Agents in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Treated with Single-Agent Ibrutinib Therapy. *Blood* 2014;124(21):1990.
 45. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S. et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131(4):e29–322.
DOI: 10.1161/CIR.0000000000000152.
 46. McMullen J.R., Boey E.J., Ooi J.Y. et al. Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood* 2014;124(25):3829–30.
DOI: 10.1182/blood-2014-10-604272.
 47. Thompson P.A., Lévy V., Tam C.S. et al. Atrial fibrillation in CLL patients treated with ibrutinib. An international retrospective study. *Br J Haematol* 2016;175(3):462–6.
DOI: 10.1111/bjh.14324.
 48. Chun J.K., Lee T.J., Song J.W. et al. Analysis of clinical presentations of Bruton disease: a review of 20 years of accumulated data from pediatric patients at Severance Hospital. *Yonsei Med J* 2008;49(1):28–36.
DOI: 10.3349/yjmj.2008.49.1.28.

Клинико-лабораторные и морфологические особенности поражения почек при лимфопролиферативных заболеваниях

Б.Т. Джумабаева¹, Л.С. Бирюкова¹, В.А. Варшавский², С.А. Марьина¹,
Л.С. Рощина¹, У.Л. Джулакян¹, Е.С. Столяревич³

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

²кафедра патологической анатомии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8;

³факультет дополнительного профессионального образования, кафедра нефрологии ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 123182 Москва, ул. Пехотная, 3/1

Контакты: Болдукиз Толгонбаевна Джумабаева bola.blood@yandex.ru

Поражение почек в дебюте лимфопролиферативных заболеваний (ЛПЗ) выявляется редко, наблюдается преимущественно при прогрессии или рецидиве опухоли.

Цель исследования. Определение клинико-лабораторных и морфологических особенностей поражения почек при инициальной манифестации ЛПЗ.

Материалы и методы. В исследование включено 19 пациентов с ЛПЗ, сопровождавшимися поражением почек. Диагноз неходжкинских лимфом устанавливали согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (2008). Проводились гистологическое и иммуногистохимическое, иммунофлуоресцентное и электронно-микроскопическое исследования нефробиоптата.

Результаты. Возраст пациентов составлял 46–83 года (медиана – 63 года), из них 13 мужчин, 6 женщины. Среди включенных в исследование были 12 пациентов с хроническим лимфолейкозом / мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомой, 4 – с лимфомой маргинальной зоны, 1 – с фолликулярной лимфомой, 1 – с макроглобулинемией Вальденстрема, 1 – с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ). Протеинурия наблюдалась у 18 пациентов, микрогематурия – у 6, артериальная гипертензия – у 8, нефротический синдром – у 3, почечная недостаточность – у 18. Средний уровень креатинина составлял $330,9 \pm 152,3$ мкмоль/л, средняя скорость клубочковой фильтрации – $25,7 \pm 12,9$ мл/мин. Моноклональная секреция иммуноглобулинов (IgMκ) выявлена у 6 пациентов, белок Бенс-Джонса каппа – у 9, повышение уровня свободных легких цепей – у 4, криоглобулина – у 5, из них криоглобулина II типа – у 3, криоглобулина I типа – у 1 больного.

При морфологическом исследовании нефробиоптата обнаружена опухолевая лимфоидная инфильтрация в интерстиции почки в 10 (52,6 %) случаях. Массивная диффузная мелкоклеточная лимфоидная пролиферация определялась у 1 пациента, очаговая инфильтрация – у 9, из них в сочетании с гломерулонефритом у 3 и с карциномой почки у 4. Очаговая крупноклеточная лимфоидная пролиферация выявлена у 1 пациента с ДВККЛ, AL-амилоидоз – у 2 больных, тромботическая микроангиопатия – также у 2. Гломерулопатия обнаружена у 10 (52,6 %) пациентов, из них гломерулонефрит мезангиопролиферативный – у 4, мезангиокапиллярный – у 3, фибриллярный – у 1, иммунотактоидный – у 1, с минимальными изменениями – у 1.

Заключение. При манифестации лимфатической опухоли поражение почек клинически не всегда проявляется протеинурией, гематурией, нефротическим синдромом и почечной недостаточностью. В большинстве случаев имеется секреция белка Бенс-Джонса, свободных легких цепей, моноклонального иммуноглобулина и криоглобулина; морфологические изменения гетерогенны, включая лимфоидную пролиферацию, различные виды гломерулопатий, AL-амилоидоз, тромботическую микроангиопатию.

Ключевые слова: мезангиопролиферативный, мезангиокапиллярный, иммунотактоидный, фибриллярный гломерулонефрит; гломерулопатия с минимальными изменениями, лимфома, белок Бенс-Джонса, свободные легкие цепи, электронно-микроскопическое исследование биоптата почки

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-44-54

Clinical, laboratory, and morphological characteristics of kidney damage in lymphoproliferative disorders

B.T. Dzhumabaeva¹, L.S. Biryukova¹, V.A. Varshavsky², S.A. Mar'ina¹, L.S. Roshchina¹, U.L. Julhakyan, E.S. Stolyarevich³

¹Hematological Research Center, Ministry of Health of Russia; 4a Noviy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

²Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

³Faculty of Additional Professional Education, Department of Nephrology, A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Ministry of Health of Russia; 2/1 Pekhotnaya St., Moscow 123182, Russia

Kidney involvement in the onset of lymphoproliferative diseases (LPD) detected rarely, observed mainly at tumor progression or relapse.

Objective: to determine the clinical and morphological features of kidney damage in the initial manifestation of LPD.

Materials and methods: 19 patients with LPD and kidney damage were included in the study. The diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas was established according to 2008 WHO classification. Histological and immunohistochemical, immunofluorescent and electron microscopic studies of nephrobiopsy have been performed.

Results. Patients were aged 46–83 years (median 63 years), of which 13 were men and 6 women. Chronic lymphocytic leukemia / small cell lymphocytic lymphoma was established in 12 patients, marginal zone lymphoma — in 4 pts, follicular lymphoma — in 1 patient, Waldenström's macroglobulinemia — in 1 patient and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) in 1 patient. Proteinuria was observed in 18 patients, microhematuria — in 6 pts, arterial hypertension — in 8 pts, nephrotic syndrome — in 3 pts and renal failure in 18 patients. The mean creatinine level was $330.9 \pm 52.3 \mu\text{mol/L}$, the average glomerular filtration rate was $25.7 \pm 12.9 \text{ ml/min}$. Monoclonal IgM κ secretion was detected in 6 patients, B κ protein — in 9 pts, increased free light chain level — in 4 pts, cryoglobulin — in 4 pts (type II cryoglobulin in 3 of them, type I — in 1 patient).

Morphological study of nephrobiopsy revealed tumor lymphoid infiltration of kidney interstitium in 10 (52.6 %) cases. Diffuse small cell lymphoid proliferation was detected in 1 patient, local infiltration — in 9 pts, in 3 of them in combination with glomerulonephritis, and in 4 cases with kidney carcinoma. Local large cell lymphoid proliferation was found in 1 patient with DLBCL. Amyloidosis was detected in 2 pts and thrombotic microangiopathy — in 2 patients. Glomerulopathy was revealed in 10 patients (52.6 %): mesangioproliferative glomerulonephritis (MPGN) — in 4, mesangiocapillary glomerulonephritis — in 3, fibrillar glomerulonephritis (FGN) — in 1, immunotactoid glomerulonephritis — in 1, and glomerulonephritis with minimal changes — in 1 patient.

Conclusion. Kidney damage in the onset of lymphatic tumor does not always manifest with proteinuria, hematuria, nephrotic syndrome and renal failure. In most cases, secretion of B κ protein, free light chains, monoclonal immunoglobulin and cryoglobulin are detected. Morphological changes are heterogeneous, including lymphoid proliferation, various types of glomerulopathies, amyloidosis and thrombotic microangiopathy.

Key words: mesangioproliferative, mesangiocapillary, immunotactoid, fibrillar glomerulonephritis, glomerulopathy with minimal changes, lymphoma, Bence-Jones protein, free light chains, electron microscopic examination of kidney biopsy

Введение

Последние десятилетия особое внимание уделяется поражению почек при гемобластах. Известно, что протеинурия как первый симптом поражения почек наблюдается у 70–90 % пациентов с миеломной болезнью и из них более чем в 50 % случаев развивается почечная недостаточность, обусловленная в основном развитием миеломной или каст-нефропатии [1]. При острых лейкозах повреждение почек вызвано совокупностью факторов, связанных с расстройством микроциркуляции вследствие массивной лейкоцитарной инфильтрации паренхимы почек, а также токсическим действием лизоцима и цитокинов, продуцируемых или активируемых бластными клетками. Лейкемическая инфильтрация паренхимы почек выявляется преимущественно в продвинутых стадиях лейкоза, приблизительно в 42 % случаев, а в период манифестации значительно реже — в 3–5 % [2, 3]. При неходжкинских лимфомах (НХЛ) поражение почек обнаруживается в основном при прогрессировании или рецидиве заболевания [4]. Наиболее часто вовлечение почек определяется при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) / мелкоклеточной лимфоцитарной лимфоме (МЛЛ) (40 %), несколько реже — при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВККЛ) и НК/Т-клеточной лимфоме (20 %) [5]. По данным J. Sun и соавт. [6], поражения почек чаще наблюдаются при ДВККЛ (36,2 %), реже при НК/Т-клеточных лимфомах (11,0 %) и ХЛЛ/МЛЛ (3,7 %). Такую разноречивость можно объяснить прежде всего анализом небольших групп больных и ретроспективностью данных. Частота поражения почек при манифестации лимфоидных опухолей неизвестна, в основном публикуют описания единичных случаев. При этом выявление вовлечения почек в опухолевый процесс при дебюте лимфопролиферативных заболе-

ваний (ЛПЗ) имеет большое значение, так как определяет выбор химиотерапевтической программы, от проведения которой зависит не только достижение ремиссии ЛПЗ, но и восстановление и сохранение функции почек у излеченных пациентов [7].

Целью настоящего исследования явилось определение клиничко-лабораторных и патоморфологических особенностей поражения почек при манифестации ЛПЗ.

Материалы и методы

В исследование включено 19 пациентов с ЛПЗ, которые сопровождалось поражением почек. Обследование и лечение больных проводились в ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России с 2005 по 2014 г. Диагноз НХЛ соответствует классификации Всемирной организации здравоохранения (2008) [8]. На основе клинических, лабораторных, функциональных методов обследования (компьютерной томографии, ультразвукового исследования), гистологического и иммуногистохимического исследования костного мозга и пораженного лимфатического узла, а также на основе иммунофенотипирования клеток периферической крови методом проточной флуориметрии устанавливали диагноз ЛПЗ — ХЛЛ/МЛЛ, фолликулярной лимфомы (ФЛ), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ) и ДВККЛ.

Пункционную биопсию почки выполнили 17 пациентам. Гистологическое и иммуногистохимическое исследования нефробиоптата проведено в ФГБУ ГНЦ Минздрава России, иммунофлуоресцентное и электронно-микроскопическое исследования (ЭМИ) выполнялись в лаборатории кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, Массону,

конго красным, PAS, PASM. Иммунофлуоресценция проводилась с применением моноклональных антител IgG, IgM, IgA, C3, C1q, легких κ - и λ -цепей фибриногена (Dako Corporation). Препараты нефробиоптата состояли из 5–40 клубочков. Электронная микроскопия ультратонких срезов толщиной 20–25 нм выполнена на микроскопе «Теспау-12» фирмы Philips. Материалы фотографировались и описывались. В среднем выполняли 8 срезов и 15 фотографий. Гистологические препараты нефробиоптата всех пациентов морфологически оценивали 3 патологоанатома.

Результаты исследований

Поражение почек было выявлено у 19 больных в дебюте ЛПЗ (табл. 1), из них было 13 мужчин и 6 женщин. Средний возраст составил $63,3 \pm 8,8$ года. Из 19 пациентов у 12 (63,1 %) установлен диагноз ХЛЛ/МЛЛ, у 4 (21 %) – ЛМЗ, у 1 (5,3 %) – ДВККЛ, у 1 (5,3 %) – ФЛ и у 1 (5,3 %) – МВ. Первыми симптомами поражения почек были: протеинурия, которая наблюдалась у 18 пациентов, микрогематурия – у 6, артериальная гипертензия – у 8, нефротический синдром – у 3, почечная недостаточность – у 18. Увеличение размеров почек по данным компьютерной томографии и ультразвукового исследования выявлено у 5 пациентов, причем у 4 из них ХЛЛ сочетался с карциномой почки. У 1 пациента с ДВККЛ обнаружена лимфоидная пролиферация на фоне ангиолипомуы почки. Средний уровень креатинина составил $330,9 \pm 152,3$ мкмоль/л, средняя скорость клубочковой фильтрации (СКФ) – $25,7 \pm 12,9$ мл/мин.

При иммунохимическом исследовании выявлена секреция патологического белка в 15 (78,9 %) случаях (табл. 2). Моноклональная секреция IgMк выявлена у 6 пациентов, белок Бенс-Джонса (BJ) – у 9, повышение уровня свободных легких цепей (СЛЦ) – у 4, криоглобулин – у 5, при этом у 4 из них – криоглобулин II типа, у 1 – криоглобулин I типа. Секреция белка BJ и СЛЦ определялась в 13 (68,4 %) случаях, из них в 4 – вместе с моноклональным IgMк.

При гистологическом исследовании опухолевая лимфоидная инфильтрация в почке была обнаружена у 10 (52,6 %) больных (табл. 2). Массивная диффузная мелкоклеточная лимфоидная пролиферация была определена у 1 пациента, очаговая – у 9, включая 4 случая сочетания очаговой мелкоклеточной пролиферации с картиной карциномы (рис. 1) [9]. Мелкоклеточная лимфоидная пролиферация в почке выявлена при ХЛЛ/МЛЛ и индолентных неходжкинских лимфомах, крупноклеточная лимфоидная инфильтрация паренхимы почки – у пациента с ДВККЛ.

Поражение клубочков составило 10 случаев (табл. 3). При светооптической микроскопии найденные изменения укладывались в следующие морфологические формы: мезангиопролиферативный гломерулонефрит (4 случая), мезангиокапиллярный гломерулонефрит (2), болезнь депозитов легких цепей (БДЛЦ) (2); из-за

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, сопровождавшимися поражением почек, N = 19

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of patients with lymphoproliferative disorders accompanied by kidney damage, N = 19

Данные Data	Число больных, n (%) Number of patients, n (%)
ХЛЛ/МЛЛ CLL/SLL	12 (63,1)
ЛМЗ MZL	4 (21)
ФЛ FL	1 (5,3)
МВ WM	1 (5,3)
ДВККЛ DLBCL	1 (5,3)
Медиана возраста, лет Median age, years	63
Мужчины, n Men, n	13
Женщины, n Women, n	6
Клинико-лабораторные признаки поражения почек, n Clinical and laboratory symptoms of kidney damage, n	
Почечная недостаточность Renal failure	18
Нефротический синдром Nephrotic syndrome	3
Артериальная гипертензия Arterial hypertension	8
Периферические отеки Peripheral edema	7
Протеинурия (от 2 до 10 г/сут) Proteinuria (from 2 to 10 g/day)	18
Микрогематурия Microhematuria	6
Без клинических симптомов No clinical symptoms	1
Увеличение размеров почек: Kidney enlargement:	5
с карциномой with carcinoma	4
с ангиолипомуой with angiolipomyoma	1

Сокращения: ХЛЛ – хронический лимфолейкоз, МЛЛ – мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, ЛМЗ – лимфома маргинальной зоны, ФЛ – фолликулярная лимфома, МВ – макроглобулинемия Вальденстрема, ДВККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома.

Abbreviations: CLL – chronic lymphocytic leukemia, SLL – small lymphocytic lymphoma, MZL – marginal zone lymphoma, FL – follicular lymphoma, WB – Waldenström's macroglobulinemia, DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma.

выраженных изменений в почечной ткани в 2 случаях трудно было интерпретировать поражение гломерул.

В 1 случае не представлялось возможным определить характер поражения почки.

Иммунокомплексный характер повреждения почек подтвержден иммунофлуоресцентным исследованием (см. табл. 3). Фиксация IgG и легких цепей иммуноглобулинов (κ и λ) на базальной мембране капилляров (БМК) гломерул обнаружена в 8 случаях, в мезангии — в 2 случаях преимущественно очагово-гранулярного характера. Фиксация IgA также на БМК определена в 4 случаях, IgM — в 6, C3 — в 7, C1q — в 1, фибриногена — в 5.

При ЭМИ и сопоставлении с результатами морфологического и иммунофлуоресцентного исследований в ряде случаев установлены другие формы гломерулопатий (см. табл. 3): гломерулонефрит мезангиопролиферативный (4 случая), мезангиокапиллярный (3),

фибрилярный (1), иммунотактоидный (1), с минимальными изменениями (1). В 3 случаях нефробиоптат был неинформативным.

Приводим примеры результатов комплексных исследований.

Пример 1. Больная Д., 64 года, диагноз: «Мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома. Хроническая болезнь почек, III стадия». При гистологическом исследовании биоптата почки обнаружена очаговая лимфоидная инфильтрация, представленная мелкими лимфоидными клетками, экспрессирующими CD20 и CD23, единичные клетки были позитивны по CD3 (рис. 2). В 3 клубочках определялись фиброэпителиальные полулуния, в остальных — очаговое диффузное расширение мезангия, диффузное утолщение БМК, очаговая пролиферация мезангиоцитов (4–5 клеток), эпителий извитых канальцев

Таблица 2. Результаты иммунохимического и гистологического исследований пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, сопровождавшимися поражением почек, n = 19

Table 2. Results of immunochemical and histological examinations of patients with lymphoproliferative disorders accompanied by kidney damage, n = 19

Диагноз Diagnosis	Гистологическое исследование биоптата почки Histological examination of kidney biopsy sample	Лимфоидная инфильтрация почки Lymphomatous kidney infiltration	ΠIg PIg	ВЖ, г/с BJ, g/s	СЛЦ FLC	Криоглобулинемия Cryoglobulinemia
ЛМЗ MZL	МПГН, ТМА MPGN, TMA	0	0	0	k	0
ХЛЛ CLL	БДЛЦ, ТМА, нефросклероз LCDD, TMA, nephrosclerosis	0	Mk	k	0	0
МЛЛ SLL	ГН, нефросклероз GN, nephrosclerosis	++	0	k	0	0
	БДЛЦ LCDD	0	0	—	k	+
ЛМЗ MZL	МПГН MPGN	0	Mk	0	0	++++
ХЛЛ CLL	МПГН MPGN	0	0	0	k	0
ЛМЗ MZL	МКГН MCGN	0	Mk	k	0	++
ХЛЛ CLL	МГН MGN	0	0	0	0	0
	Карцинома почки Renal carcinoma	+++	0	k	0	0
	Карцинома почки, AL-амилоидоз Renal carcinoma, AL-amyloidosis	+++	0	k	0	0
	Карциномы почки Renal carcinomas	+++	Mk	0	0	0
	Карциномы почки Renal carcinomas	+++	0	0	0	0
	Тубулоинтерстициальные изменения Tubulointerstitial changes	+++	0	k	0	0
	НП NP	НП* NP*	0	λ	0	0

Диагноз Diagnosis	Гистологическое исследование биоптата почки Histological examination of kidney biopsy sample	Лимфоидная инфильтра- ция почки Lymphomatous kidney infiltration	Плг PIg	ВЈ, г/с BJ, g/s	СЛЦ FLC	Криоглобу- линемия Cryoglobu- linemia
МЛЛ SLL	МКГН MCGN	++	0	0	0	+
ЛМЗ MZL	НП NP	НП* NP*	Mk	k	0	0
МВ WM	АЛ амилоидоз AL-amyloidosis	++	Mk	k	0	0
ФЛ FL	МПГН, нефросклероз MPGN, nephrosclerosis	++	0	0	0	0
ДВККЛ DLBCL	Картина неясна Not clear	++	0	0	k	+
Всего пациентов Total number of patients		10	6	9	4	5

*Биопсия почки не проводилась.

*Kidney biopsy wasn't performed.

Примечание. Лимфоидная инфильтрация в почках: 0 — отсутствует, + — незначительная, ++ — умеренная, +++ — значи-
тельная, ++++ — выраженная криоглобулинемия.

Note: Lymphomatous kidney infiltration: 0 — absent, + — insignificant, ++ — moderate, +++ — significant, ++++ — pronounced cryoglobulinemia.

Сокращения: БДЛЦ — болезнь депозитов легких цепей, ВЈ — белок Бенс-Джонса, Плг — патологический иммуноглобулин, ГН — гло-
мерулонефрит, ДВККЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома, ЛМЗ — лимфома маргинальной зоны, МВ — макроглобулинемия
Вальденстрема, МГН — мембранозный гломерулонефрит, МКГН — мезангиокапиллярный гломерулонефрит, МЛЛ — мелкокле-
точная лимфоцитарная лимфома, МПГН — мезангиопролиферативный гломерулонефрит, НП — не проводилась, СЛЦ — свободные
легкие цепи, ТМА — тромботическая микроангиопатия, ФЛ — фолликулярная лимфома, ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

Abbreviations: LCDD — light chain deposition disease, BJ — Bence-Jones protein, PIg — pathological immunoglobulin, GN — glomerulonephritis, DLBCL —
diffuse large B-cell lymphoma, MZL — marginal zone lymphoma, WB — Waldenström's macroglobulinemia, MGN — membranous glomerulonephritis,
MCGN — mesangiocapillary glomerulonephritis, SLL — small lymphocytic lymphoma, MPGN — mesangioproliferative glomerulonephritis, NP — not
performed, FLC — free light chains, TMA — thrombotic microangiopathy, FL — follicular lymphoma, CLL — chronic lymphocytic leukemia.

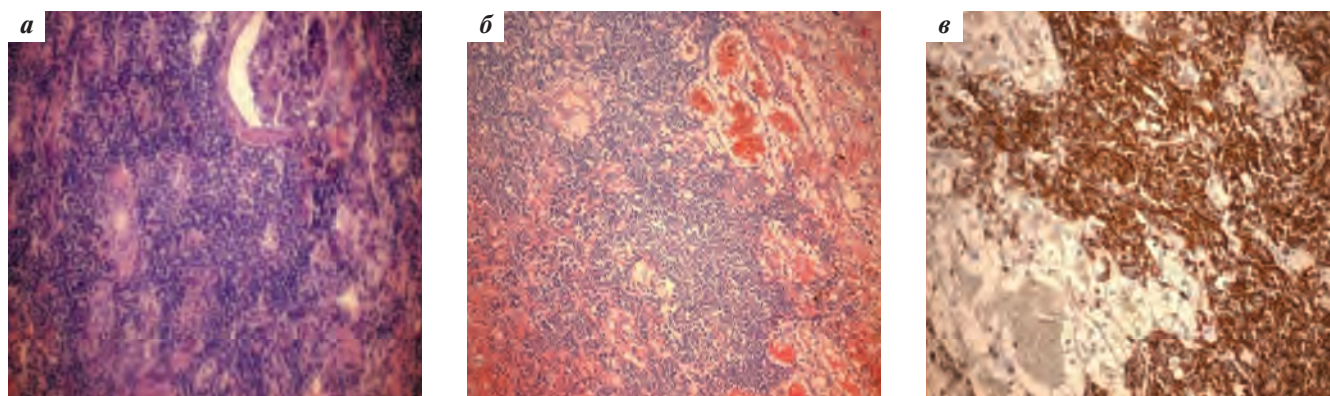


Рис. 1. Гистологическое исследование биоптата почки, окраска гематоксилином и эозином, ×200: а — диффузная, массивная лимфоидная проли-
ферация, представленная мелкими лимфоидными клетками больной В.; б, в — очаговая лимфоидная пролиферация, представленная мелкими
клетками, экспрессирующими CD23 в сочетании с картиной светлоклеточного рака почки больной Ф.

Fig. 1. Histological examination of a kidney biopsy sample, hematoxylin and eosin stain, ×200: а — diffuse massive lymphoid infiltration presented by small
lymphoid cells (male patient V.); а, б — focal lymphoid proliferation presented by small cells expressing CD23 in combination with clear cell renal cell carcinoma
(male patient F.)

в состоянии белковой дистрофии и диффузной атрофии.
В просвете расширенных канальцев белковые цилиндры.
Диффузный склероз стромы почки. При иммунофлуорес-
центной микроскопии определена фиксация IgG, М, А и СЗ
на БМК, очагово-гранулярного характера. Указанные
данные и результаты ЭМИ позволили установить диаг-
ноз мезангиокапиллярного гломерулонефрита (рис 2б, в).

Пример 2. Больная М., 49 лет, диагноз: «Хрониче-
ский лимфолейкоз, стадия В (по J. Vinet)». В 2001 г.
обратилась с клиникой нефротического синдрома.
При гистологическом исследовании нефробиоптата
обнаружено одноконтурное утолщение стенки капилля-
ров, пролиферация мезангиоцитов (рис. 3а); при иммуно-
флуоресценции с антителами к IgG — линейное и сливное

Таблица 3. Результаты гистологического, иммунофлуоресцентного и электронно-микроскопического исследований биоптата почки у больных с лимфопролиферативными заболеваниями, сопровождавшимися гломерулонефритом

Table 3. Results of histological, immunofluorescence, and electron microscopy examination of kidney biopsy samples of patients with lymphoproliferative disorders accompanied by glomerulonephritis

Пациент Patients	Диагноз Diagnosis	Иммунофлуоресцентное исследование Immunofluorescence examination							Гистологическое исследование Histological examination	ЭМИ EME
		IgG	IgA	IgM	C3	C1q	k	λ		
Ф. F.	ЛМЗ MZL	+	+	+	+	+	+	+	МППГН, ТМА MPGN, TMA	НИ NI
Ш. Sh.	ХЛЛ CLL	+	+	+	+	–	+	+	БДЛЦ, нефросклероз, ТМА LCDD, nephrosclerosis, TMA	МППГН MPGN
Д. D.	МЛЛ SLL	+	–	–	+	–	–	–	ГН?, нефросклероз, ЛП GN?, nephrosclerosis, LP	МКГН MCGN
А. A.	МЛЛ SLL	+	+	+	+	–	+	+	БДЛЦ LCDD	ГПМИ MCD
Х. Kh.	ЛМЗ MZL	+	+	+	–	–	+	+	МППГН MPGN	ФГН FGN
С. S.	ХЛЛ CLL	+	–	–	+	–	+	+	МППГН MPGN	МППГН MPGN
Д. D.	ЛМЗ MZL		+	+	+	–	–	–	МКГН MCGN	НИ NI
М. M.	ХЛЛ CLL	+/-	–	–	–	–	+/-	–	МГН? MGN?	ИТГН ITGN
К. K.	ХЛЛ CLL	+	–	–	–	–	+	–	МКГН MCGN	НИ NI
Л. L.	ФЛ FL	–	–	+	+	–	–	–	МППГН, нефросклероз MCGN, nephrosclerosis	МППГН MPGN
З. Z.	ДВККЛ DLBCL	–	–	–	–	–	–	–	Картина неясна? Not clear?	Ангиолипомиома Angiolipomyoma

Сокращения: БДЛЦ – болезнь депозитов легких цепей, ГН – гломерулонефрит, ГПМИ – гломерулопатия с минимальными изменениями, ДВККЛ – диффузная В-крупноклеточная лимфома, ИТГН – иммунотактоидный гломерулонефрит, ЛМЗ – лимфома маргинальной зоны, ЛП – лимфоидная пролиферация, МГН – мембранозный гломерулонефрит, МКГН – мезангиокапиллярный гломерулонефрит, МЛЛ – мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, МППГН – мезангиопролиферативный гломерулонефрит, НИ – неинформативный, ТМА – тромботическая микроангиопатия, ФГН – фибриллярный гломерулонефрит, ФЛ – фолликулярная лимфома, ХЛЛ – хронический лимфолейкоз, ЭМИ – электронно-микроскопическое исследование.

Abbreviations: LCDD – light chain deposition disease, GN – glomerulonephritis, MCD – minimal-change disease, DLBCL – diffuse large B-cell lymphoma, ITGN – immunotactoid glomerulonephritis, LP – lymphoid proliferation, MZL – marginal zone lymphoma, MGN – membranous glomerulonephritis, MCGN – mesangiocapillary glomerulonephritis, MPGN – mesangioproliferative glomerulonephritis, NI – non-informative, TMA – thrombotic microangiopathy, FGN – fibrillary glomerulonephritis, FL – follicular lymphoma, CLL – chronic lymphocytic leukemia, EME – electron microscopy examination.

гранулярное свечение в мезангии и на периферии капиллярных петель. Изменения, определенные при гистологическом и иммунофлуоресцентном исследованиях нефробиоптата, было трудно трактовать. При ЭМИ субэпителиально выявлены электроноплотные депозиты, которые располагались отдельно или были сгруппированы. Определялись отдельные субэндотелиальные депозиты в виде микротрубочек, отделенных друг от друга веществом базальной мембраны (рис. 3б). Базальная мембрана имела обычную толщину и структуру.

Диффузное сглаживание малых ножек подоцитов. Изменения, выявленные при ЭМИ, позволили поставить диагноз иммунотактоидного гломерулонефрита.

Пример 3. Больная Х., 39 лет, диагноз: «Лимфома из клеток маргинальной зоны с поражением селезенки, печени, костного мозга, висцеральных лимфатических узлов и моноклональной секрецией IgMκ; хронический гепатит С с минимальной активностью; криоглобулинемия II типа». 26.06.12 г. выполнена спленэктомия. Клинически симптомов поражения почек не наблюда-

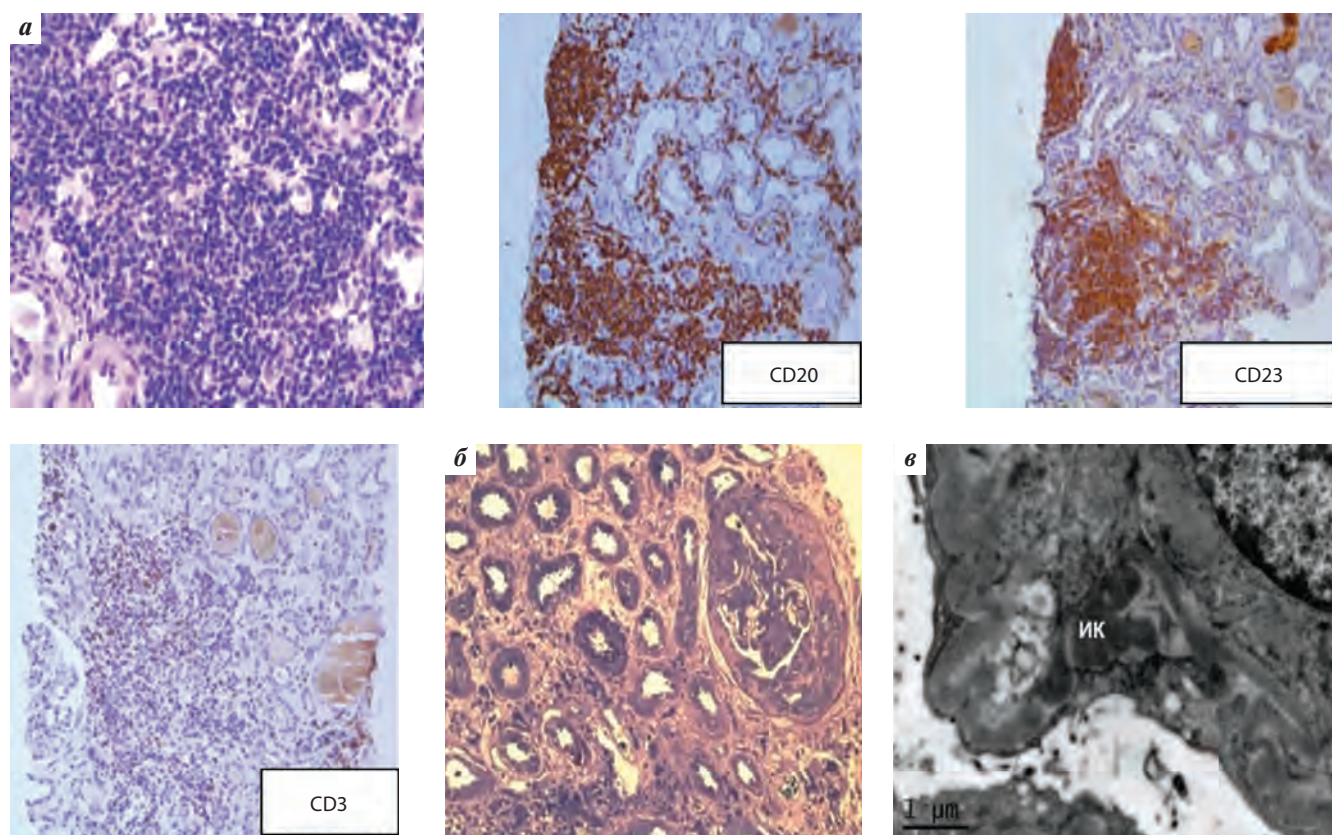


Рис. 2. Гистологическое (окраска гематоксилином и эозином), иммуногистохимическое и электронно-микроскопическое исследование ($\times 20\,000$) биоптата почки больной Д.: очаговая лимфоидная пролиферация, представленная клетками мелких размеров (а, $\times 400$), экспрессирующими CD20, CD23, единичные клетки — CD3 ($\times 200$); диффузное утолщение базальной мембраны капилляров, расширение мезангия, очаговая пролиферация мезангиоцитов; диффузный склероз стромы почки (б); иммунные комплексы (ИК) базальной мембраны (в)

Fig. 2. Histological (hematoxylin and eosin stain), immunohistochemical, and electron microscopy ($\times 20\,000$) examinations of a kidney biopsy sample of female patient D.: focal lymphoid proliferation presented by small cells (a, $\times 400$), expressing CD20, CD23 and some cells — CD3 ($\times 200$); diffuse thickening of the capillary basement membrane, mesangial widening, focal mesangiocyte proliferation; diffuse sclerosis of the renal stroma (b); immune complexes (ИК) of the basement membrane (v)

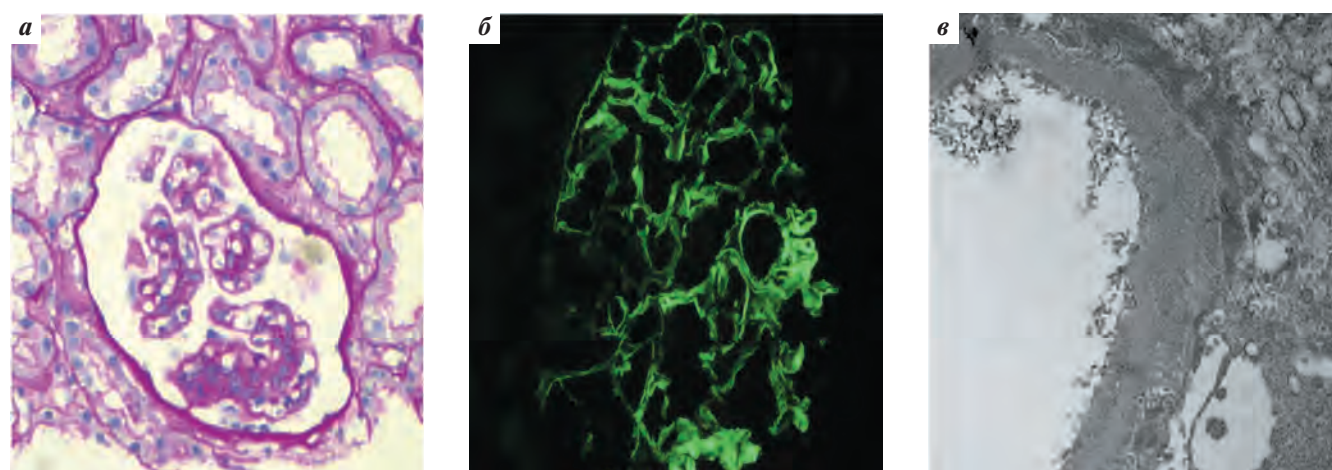


Рис. 3. Гистологическое (а; окраска — реакция Шифф-йодной кислотой, $\times 200$), иммунофлуоресцентное (б) и электронно-микроскопическое (в, $\times 30\,000$) исследования биоптата почки больной М.: утолщение стенок капилляров, пролиферация мезангиоцитов до 10 и более клеток на зону мезангия (а); линейное и сливное гранулярное свечение в мезангии и на периферии капиллярных петель (б, с антителами к IgG); субэндотелиальные депозиты в виде микротрубочек (в)

Fig. 3. Histological (a; periodic acid-Schiff stain, $\times 200$), immunofluorescence (b), and electron microscopy (v, $\times 30\,000$) examinations of a kidney biopsy sample of female patient M.: thickening of capillary walls, mesangiocyte proliferation to 10 and more cells per a mesangium zone (a); linear and confluent granular fluorescence in the mesangium and in the periphery of capillary loops (b, with IgG antibodies); subendothelial deposits in the form of microtubules (v)

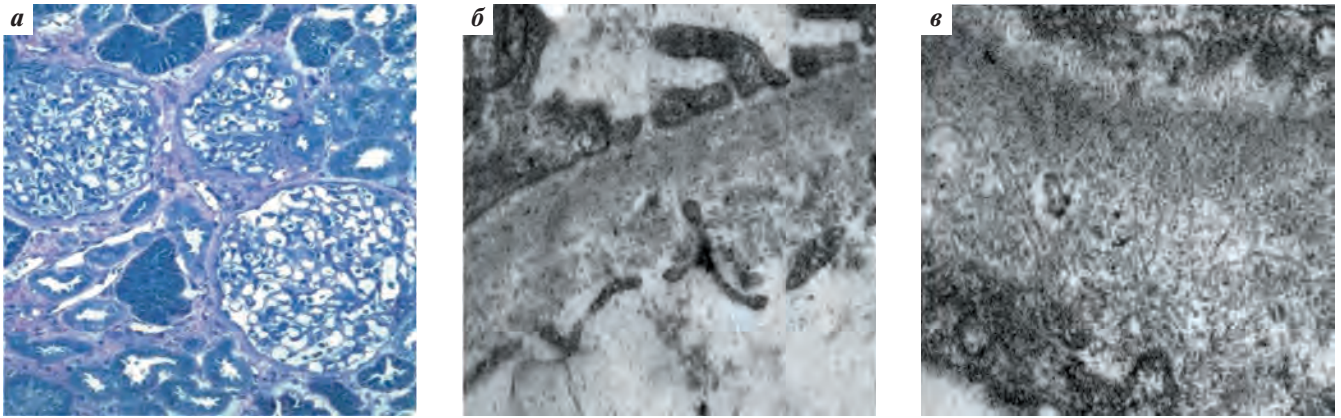


Рис. 4. Гистологическое (а, окраска метиленовым синим, $\times 200$) и электронно-микроскопическое ($\times 60\,000$) исследования биоптата почки больной Х.: очаговое утолщение базальной мембраны в клубочках, очаговое расширение мезангия, очаговая пролиферация мезангиоцитов (а); субэндотелиально мелкие рыхлые разрывающиеся иммунные комплексы; в мезангии скопления хаотически расположенных тубулярных структур диаметром около 12 нм (б, в)

Fig. 4. Histological (a, methylene blue stain, $\times 200$) and electron microscopy ($\times 60\,000$) examinations of a kidney biopsy sample of female patient Kh.: focal thickening of the glomerular basement membrane, focal mesangial widening, focal mesangiocyte proliferation (a); subendothelial small non-cohesive immune complexes; agglomerations of chaotically localized tubular structures with diameter of about 12 nm in the mesangium (б, в)

лось, отмечалось снижение уровня креатинина — 70 мкмоль/л. При светоптической микроскопии биоптата почки, выполненного во время спленэктомии, в клубочках выявлено очаговое утолщение БМК, очаговое расширение мезангия, очаговая пролиферация мезангиоцитов (рис. 4). Отдельные канальцы с расширенным просветом были заполнены белковыми цилиндрами. Очаговый склероз стромы. При иммунофлуоресцентной микроскопии на БМК обнаружена фиксация IgG, IgM, IgA очагового крупно- и мелкогранулярного характера; в отдельных клубочках — фиксация легких цепей κ и λ также очагового гранулярного характера. Полученные данные указывали на мезангиопролиферативный гломерулонефрит. Но при электронно-микроскопическом исследовании обнаружена картина развивающегося фибриллярного гломерулонефрита с депозитами 3 типов: иммунных комплексов обычной структуры, депозитов, состоящих из хаотически расположенных тубулярных структур, и смешанных депозитов (см. рис. 4) [10].

Пример 4. Больная А., 64 года, диагноз: «Хронический лимфолейкоз, стадия С (по Vinet). Нефротический синдром. Острая почечная недостаточность». При светоптической микроскопии биоптата почки выявлены минимальные изменения (рис. 5а): очаговое утолщение БМК, очаговое расширение мезангия, очаговая пролиферация мезангиоцитов (3–4 клетки). В просвете отдельных канальцев обнаружены цилиндры. При иммунофлуоресцентном исследовании определен очаговый склероз стромы (30 %). Амилоидоза нет. При иммунофлуоресценции выявлена фиксация IgG, IgA, IgM, C3 на базальной мембране клубочка, легких цепей иммуноглобулинов (κ и λ) на БМК отдельных клубочков очагового гранулярного характера. Выявленные изменения указывали на формирование болезни легких цепей. При ЭМИ обнаружены субэндотелиально расположенные иммунные комплексы и тотальное редуцирование отростков подоцитов, что позволяло поставить диагноз гломерулонефрита с минимальными изменениями (рис 5б, в) [11].

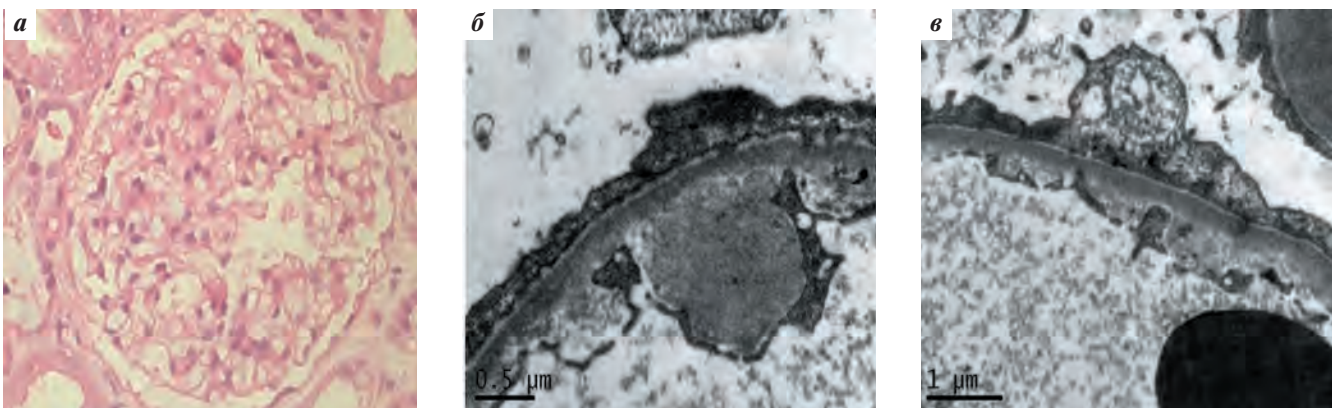


Рис. 5. Гистологическое (окраска гематоксилином и эозином (а, $\times 200$) и электронно-микроскопическое исследования биоптата почки больной А.: крупные плотные (б, $\times 40\,000$) и мелкие рыхлые (в, $\times 25\,000$) субэндотелиально расположенные иммунные комплексы; тотально редуцированные малые отростки подоцитов

Fig. 5. Histological (hematoxylin and eosin stain (а, $\times 200$)) and electron microscopy examinations of a kidney biopsy sample of female patient A.: large dense (б, $\times 40\,000$) and small non-cohesive (в, $\times 25\,000$) subendothelial immune complexes; totally reduced small processes of podocytes

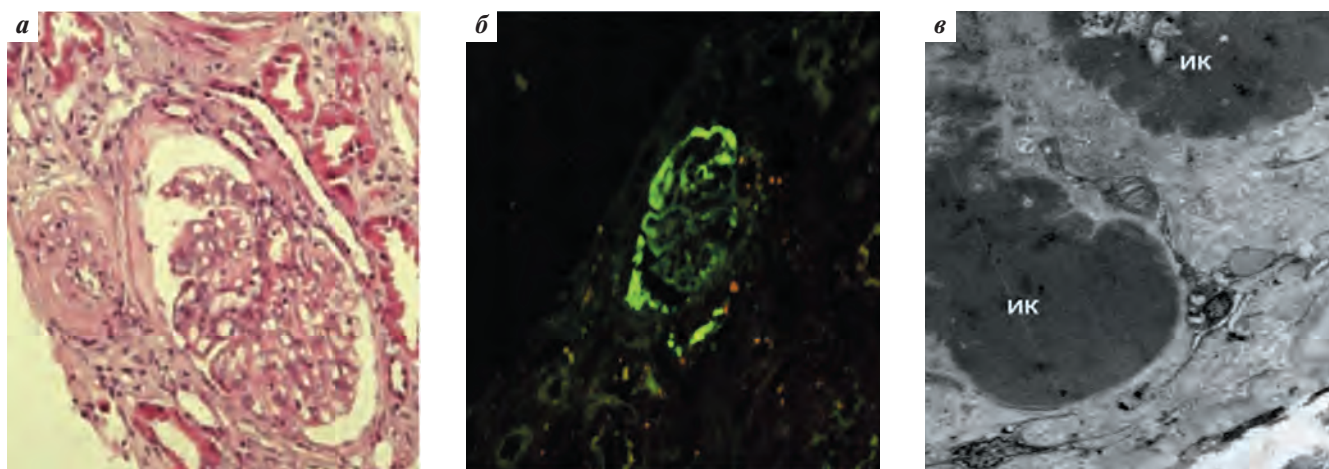


Рис. 6. Гистологическое (а, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$), иммунофлуоресцентное (б), электронно-микроскопическое (в, $\times 2550$) исследования биоптата почки больного С.: фиксация СЗ на базальной мембране; крупные иммунные комплексы (ИК) (в), окруженные плотно прилегающей базальной мембраной капилляров

Fig. 6. Histological (a, hematoxylin and eosin stain ($\times 200$)), immunofluorescence (б), and electron microscopy (в, $\times 2550$) examinations of kidney biopsy sample of male patient S.: fixation of СЗ on the basement membrane; large immune complexes (ИК) (в) surrounded by closely fitting capillary basement membrane

Пример 5. Больной С., 62 года, диагноз: «Хронический лимфолейкоз, стадия С (по Binet); хроническая болезнь почек, III стадия; артериальная гипертензия». При светооптической микроскопии в отдельных клубочках выявлялась очаговая пролиферация мезангиоцитов, расширение мезангия, утолщение БМК, склероз сосудистых петель. Эпителий извитых канальцев в состоянии белковой дистрофии и очаговой атрофии. При иммунофлуоресцентном исследовании обнаружены фиксация IgG, СЗ на базальной мембране и фиксация легких цепей (κ, λ) в отдельных клубочках очагового гранулярного характера. При ЭМИ обнаруживаются спавшиеся капилляры с резко утолщенной, часто складчатой БМК. В мезангии замурованы единичные иммунные комплексы. Некоторые клубочки имеют дольчатую структуру. Дольки представляют собой очень крупные иммунные комплексы, окруженные плотно прилегающей БМК (рис. 6). Капилляры, сохраняющие просвет, отсутствуют. Мочевое пространство заполнено грубым коллагеном. Клубочки уменьшены в размерах. Таким образом, по данным ЭМИ, выявлены признаки иммунокомплексного поражения почек. Учитывая данные светооптической микроскопии и иммунофлуоресценции, установлен диагноз очагового мезангиопролиферативного гломерулонефрита.

Пример 6. Больной З., 58 лет, диагноз: «Экстранодальная диффузная В-крупноклеточная лимфома не-GCB-типа, BCL-2 позитивная с высоким уровнем митотической и пролиферативной активности, поражением почек, печени, кожи, мягких тканей, периферических и висцеральных лимфатических узлов; хроническая почечная недостаточность, терминальная стадия; программный гемодиализ». Биоптат почки при светооптическом исследовании был представлен грубоволокнистой фиброзной тканью, при ЭМИ обнаружена картина ангиолипомы.

В результате комплексных исследований у 2 пациентов выявлен AL-амилоидоз.

Пример 7. Первый больной М., 70 лет, диагноз: «ХЛЛ, стадия С по Binet, с секрецией белка BJk. Хроническая болезнь почек, III стадия». При гистологическом исследовании: картина светлоклеточного рака в сочетании с очаговой мелкоклеточной лимфоидной пролиферацией. Клубочки склерозированы и гиалинизированы, канальцы дистрофически изменены. При иммуногистохимическом исследовании мелкие лимфоидные клетки экспрессировали CD23, CD45RA, BCL2 и не экспрессировали CD20, CD10, CD5. Единичные клетки были позитивны к Ki67. Окраска на амилоидоз была положительной.

Пример 8. Второй больной М., 61 год, диагноз: Лимфома плазматомы с моноклональной секрецией IgMκ, BJk. Системный амилоидоз типа AL с поражением периферических и висцеральных лимфатических узлов, миокарда, легких, печени, селезенки, почек, костного мозга, желудочно-кишечного тракта, языка, щитовидной железы, нервной системы с формированием синдрома карпального канала, нарушением конечного этапа коагуляционного гемостаза — полимеризации фибрин-мономера. Синдром мальабсорбции. Кахексия. Дыхательная недостаточность, III стадия. Сердечная недостаточность, IIБ стадия. Хроническая болезнь почек, IV стадия. Учитывая продвинутую стадию заболевания и высокий риск кровотечения, биопсия почки не проводилась.

Тромботическая микроангиопатия установлена в 2 случаях: в 1 случае — выявлена ЛМЗ, во 2-м ХЛЛ, сопровождавшиеся мезангиопролиферативным гломерулонефритом и ТМА.

Таким образом, по данным светооптического и иммунофлуоресцентного микроскопирования не всегда возможно определить характер поражения клубочков. Как показано на примерах, на основании только данных ЭМИ были выявлены фибриллярный, иммунотактоидный гломерулонефриты, гломерулопатия с минимальными изменениями, а также идентифицирован характер

поражения почки при наличии выраженного нефросклероза и трудностей интерпретации повреждений почки при светоптической микроскопии.

Обсуждение

Поражение почек при манифестации В-клеточного ХЛЛ и индолентных лимфомах выявляется преимущественно у мужчин. Клинически проявляется артериальной гипертензией, нефротическим синдромом и почечной недостаточностью. Лабораторно определяется протеинурия, микрогематурия. Может не наблюдаться увеличение размеров почек, кроме случаев сочетанного поражения лимфатической опухоли и карциномы почки.

Морфология повреждения почек гетерогенна, выявляются как лимфоидная инфильтрация паренхимы почек, так и гломерулопатии, AL-амилоидоз, ТМА. Генез возникновения лимфоидной пролиферации в почечной ткани недостаточно ясен. Возможно, играют роль индуцируемые при НХЛ провоспалительные молекулы, способствующие проникновению лимфоидных клеток в воспалительный инфильтрат [12]. Диффузная лимфоидная инфильтрация интерстиция почек разрушает нормальную почечную архитектуру, вызывает интратенальную обструкцию микроциркуляции и канальцев, способствуя развитию склероза клубочков, атрофии канальцев, и тем самым приводит к дисфункции почек. В большинстве случаев лимфоидная инфильтрация почек при НХЛ обнаруживается в продвинутой стадии — диссеминации опухолевого процесса или в период рецидива заболевания [5]. При манифестации лимфатической опухоли, по данным литературы, выявляется редко. В нашем исследовании лимфоидная инфильтрация почек установлена в 10 (52,6 %) случаях из 19 и преимущественно очагового характера.

Поражение клубочков при ЛПЗ имеет также гетерогенный характер. В литературе имеются сообщения отдельных случаев или небольших групп наблюдений при лейкозах и лимфомах [13, 14]. В наших исследованиях поражение клубочков выявлено у 10 (52,6 %) пациентов с ХЛЛ и индолентными лимфомами: мезангиопролиферативный, мезангиокапиллярный, фибриллярный, иммунотактоидный гломерулонефриты и гломерулопатия с минимальными изменениями. Определить характер поражения и выделить особенности изменения гломерул возможно только при исследованиях (комплексном гистологическом, иммунофлуоресцентном и ЭМИ) нефробиоптата. В генезе развития гломерулопатий при ЛПЗ не исключается роль секретируемых при этом заболевании моноклональных иммуноглобулинов и криоглобулина [15–18].

Известна роль свободных легких цепей в формировании амилоидоза, однако их значение в генезе гломерулопатий остается не совсем ясным. По данным наших исследований в 13 случаях отмечалась секреция СЛЦ: в 9 случаях — белка ВJκ и в 4 — повышение уровня только СЛЦ.

Необходимо обратить внимание, что морфологические изменения в почках не всегда коррелируют с клиническими и лабораторными признаками поражения почек. Как показано в клиническом наблюдении, у пациентки (пример 3) без каких-либо симптомов поражения почек, но с моноклональной секрецией IgMκ и криоглобулинемией при ЭМИ материала почки установлена одна из агрессивных форм гломерулонефрита — фибриллярный гломерулонефрит. На другом примере показано, что у пациентки с клинически выраженным нефротическим синдромом и почечной недостаточностью установлен гломерулонефрит с минимальными изменениями.

При ДВКЛЛ наблюдается в основном билатеральное увеличение размеров почек и морфологически определяется крупноклеточная инфильтрация паренхимы почек CD20 позитивными лимфоидными клетками, что указывало на опухолевую природу [19]. Возможна также интраваскулярная (описано около 20 случаев) и очень редко интрагломерулярная В-крупноклеточная инфильтрация, клинически проявляющаяся симптомами, схожими с гломерулонефритом [20, 21]. В этих случаях только иммуногистохимическое исследование биоптата почки позволяет установить правильный диагноз.

Заключение

Поражение почек при манифестации ЛПЗ выявляется редко, что обусловлено скудностью клинических, лабораторных симптомов вовлечения почек в опухолевый процесс и редкостью выполнения диагностической биопсии почек. Клиническая симптоматика не всегда коррелирует с морфологическими изменениями в почках. При минимальной клинической симптоматике возможны довольно выраженные патоморфологические изменения почек. Поэтому особое значение имеет комплексное исследование (гистологическое, иммуногистохимическое, иммунофлуоресцентное исследования и ЭМИ) нефробиоптата. Определен морфологически гетерогенный характер поражения почек, представленный опухолевой лимфоидной пролиферацией, гломерулонефритом в сочетании с тромботической микроангиопатией и AL-амилоидозом. Патогенетическое значение моноклонального парапротеина и СЛЦ в генезе поражения почек при ЛПЗ требует дальнейшего исследования.

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

1. Bridoux F, Delbes S., Sirac C. et al. Renal disorders associated with monoclonal gammopathies: diagnostic and therapeutic progress. *Presse Med* 2012;41(3 Pt 1):276–89. DOI: 10.1016/j.lpm.2011.11.008.
2. Ali S.H., Yacoub F.M., Al-Matar E. Acute lymphoblastic leukemia presenting as bilateral renal enlargement in a child. *Med Princ Pract* 2008;17(6):504–6. DOI: 10.1159/000151576.
3. Mantan M., Singhal K.K., Sethi G.R. Acute lymphoblastic leukemia: an unusual cause of nephromegaly in infancy. *Indian J Pediatr* 2010 May;77(5):583. DOI: 10.1007/s12098-010-0028-y.
4. Da'as N., Polliack A., Cohen Y. et al. Kidney involvement and renal manifestations in non-Hodgkin's lymphoma and lymphocytic leukemia: a retrospective study in 700 patients. *Eur J Haematol* 2001;67(3):158–64. DOI: 10.1034/j.1600-0609.2001.5790493.x.
5. Kowalewska J., Nicosia R.F., Smith K.D. et al. Patterns of glomerular injury in kidneys infiltrated by lymphoplasmacytic neoplasms. *Hum Pathol* 2011;42(6):896–903. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.09.009.
6. Sun J., Yang Q., Lu Z. et al. Distribution of lymphoid neoplasms in China: analysis of 4,638 cases according to the World Health Organization classification. *Am J Clin Pathol* 2012;138(3):429–34. DOI: 10.1309/AJCP7YLTQPUSDQ5C.
7. Джумабаева Б.Т., Бирюкова Л.С., Гемдзян Э.Г. и др. Опыт терапии хронического лимфолейкоза, сопровождающегося почечной недостаточностью. *Терапевтический архив* 2014;86(12):37–41. [Dzhumabaeva B.T., Biryukova L.S., Gemdzian E.G. et al. Chronic lymphocytic leukemia accompanied by renal failure. *Terapevticheskiy Arkhiv* = *Therapeutic Archive* 2014;86(12):37–41 (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh2014861237-41.
8. Campo E., Swerdlow S.H., Harris N.L. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011;117(19):5019–32. DOI: 10.1182/blood-2011-01-293050.
9. Джумабаева Б.Т., Никитин Е.А., Капланская И.Б. и др. Хронический лимфолейкоз и рак почки: обзор литературы и собственные клинические наблюдения. *Клиническая онкогематология* 2013;(1):68–73. [Dzhumabaeva B.T., Nikitin E.A., Kaplanskaya I.B. et al. Chronic lymphocytic leukemia and kidney cancer: review of the literature and own experiences. *Klinicheskaya onkologematologiya* = *Clinical oncohematology* 2013;(1):68–73 (In Russ.)].
10. Джумабаева Б.Т., Бирюкова Л.С., Голицына Е.П. и др. Гломерулонефрит, ассоциированный с В-клеточной лимфомой маргинальной зоны: клиническая, патоморфологическая характеристика поражения почек и лечение (клинические случаи). *Онкогематология* 2015;10(4):7–35. [Dzhumabaeva B.T., Biryukova L.S., Golitsyna E.P. et al. Glomerulonephritis associated with marginal zone B-cell lymphoma: clinical, pathological characteristics of renal injury and treatment (clinical cases). *Onkogematologiya* = *Oncohematology* 2015;10(4):27–35. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-25-33.
11. Джумабаева Б.Т., Бирюкова Л.С., Голицына Е.П., Варшавский В.А. Гломерулонефрит с минимальными изменениями при хроническом лимфолейкозе. *Терапевтический архив* 2015; 87(12):85–8. [Dzhumabaeva B.T., Biryukova L.S., Golitsyna E.P., Varshavskiy V.A. Minimal-change glomerulonephritis in chronic lymphocytic leukemia: A clinical case. *Terapevticheskiy Arkhiv* = *Therapeutic Archive* 2015; 87(12):85–8. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh2015871285-88.
12. Li S.J., Chen H.P., Chen Y.H. et al. Renal Involvement in Non-Hodgkin Lymphoma: Proven by Renal Biopsy. *PLoS One* 2014;9(4):e95190. DOI: 10.1371/journal.pone.0095190.
13. Shi S.F., Zhou F.D., Zou W.Z., Wang H.Y. Acute kidney injury and bilateral symmetrical enlargement of the kidneys as first presentation of B-cell lymphoblastic lymphoma. *Am J Kidney* 2012;60(6):1044–8. DOI: 10.1053/j.ajkd.2012.05.023.
14. Yeo S.C., Chuah K.L., Lee H.Y., Liew A. An unusual case of glomerulonephritis in a patient with non-Hodgkin mucosal associated lymphoid tissue (MALT) B-cell lymphoma. *BMC Nephrol* 2013;22(140):158. DOI: 10.1186/1471-2369-14-158.
15. Джумабаева Б.Т., Бирюкова Л.С. Новые аспекты в понимании патофизиологии и патоморфологии поражения почек при опухолевых заболеваниях. *Клиническая онкогематология* 2015;8(4):390–6. [Dzhumabaeva B.T., Biryukova L.S. New Aspects of Pathophysiology and Pathomorphology of Renal Lesions in Malignant Tumors. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical oncohematology* 2015;8(4):390–6. (In Russ.)].
16. Poitou-Verkinder A.L., Francois A., Drieux F. et al. The spectrum of kidney pathology in B-cell chronic lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma: a 25-year multicenter experience. *PLoS One* 2015;10(3):e0119156. DOI: 10.1371/journal.pone.0119156.
17. Lien Y.H.H., Lai L.W. Pathogenesis diagnosis and management of paraneoplastic glomerulonephritis. *Nat Rev Nephrol* 2011;7(2): 85–95. DOI: 10.1038/nrneph.2010.171.
18. Bridoux F, Delbes S., Sirac C. et al. Renal disorders associated with monoclonal gammopathies: diagnostic and therapeutic progress. *Presse Med* 2012; 41(3 Pt 1):276–89. DOI: 10.1016/j.lpm.2011.11.008.
19. Villa D., Connors J.M., Sehn L.H. et al. Diffuse large B-cell lymphoma with involvement of the kidney: outcome and risk of central nervous system relapse. *Haematologica* 2011 Jul;96(7):1002–7. DOI: 10.3324/haematol.2011.041277.
20. Bai X., Li X., Wan L. et al. Intravascular large B-cell lymphoma of the kidney: a case report. *Diagn Pathol* 201;23(6):86. DOI: 10.1186/1746-1596-6-86.
21. Kameoka Y., Takahashi N., Komatsuda A. Kidney-limited intravascular large B cell lymphoma: a distinct variant of IVLBCL? *Int J Hematol* 2009;89(4):533–7. DOI: 10.1007/s12185-009-0294-5.

Иммунофенотипическая характеристика опухолевых клеток в костном мозге при лимфоме/лейкозе Беркитта: возможности дифференциальной диагностики с острым лимфобластным лейкозом

И.А. Дёмина¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, С.А. Кашпор¹, С.А. Плясунова¹, М.Э. Дубровина¹,
Л.Г. Фечина^{2,3}, Н.В. Мякова¹, Е.В. Самочатова¹, А.А. Масчан¹, А.М. Попов¹

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

²ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1»; Россия, 620149 Екатеринбург, ул. Серафимы Дерябиной, 32;

³ГАОУ Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22, корп. А

Контакты: Александр Михайлович Попов uralcytometry@gmail.com

Иммунофенотипирование бластов в костном мозге (КМ) является одним из основных методов дифференциальной диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта (ЛБ) и острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ). Однако определение поверхностной экспрессии тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов может быть затруднено. Поэтому целью исследования стало формирование дополнительных иммунофенотипических критериев дифференциальной диагностики ЛБ и ВП-ОЛЛ. Проведено ретроспективное сравнение данных иммунофенотипирования клеток КМ пациентов с верифицированными диагнозами ЛБ и ВП-ОЛЛ. Исследуемую группу составил 21 пациент с ЛБ с наличием бластов в КМ, а группу сравнения — 84 ребенка с ВП-ОЛЛ. Был определен ряд особенностей иммунофенотипа ЛБ, который может помочь при оценке результатов проточной цитометрии КМ при дифференциальной диагностике В-клеточных лейкозов. Было показано, что по экспрессии различных поверхностных маркеров ЛБ существенно отличается от ВП-ОЛЛ, поэтому даже при неоднозначном или негативном результате определения экспрессии поверхностного иммуноглобулина М дифференциальная диагностика этих двух нозологий возможна при комплексной оценке иммунофенотипа. В частности, при ЛБ для опухолевых клеток характерно отсутствие экспрессии миелоидных маркеров и CD34. При обнаружении бластных клеток с таким фенотипом необходимо обратить пристальное внимание на долю CD20-позитивных клеток, которая достоверно выше при ЛБ, чем при ВП-ОЛЛ. Полученный алгоритм анализа данных при использовании порогового уровня в 87 % CD20-позитивных бластов позволил в исследованной нами выборке абсолютно точно отделить все случаи ЛБ от ВП-ОЛЛ.

Ключевые слова: лимфома/лейкоз Беркитта, острый лимфобластный лейкоз, проточная цитометрия

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-55-61

Immunophenotypic features of bone marrow tumor cell in Burkitt lymphoma/leukemia: B-lineage acute lymphoblastic leukemia diagnostics opportunities

I.A. Demina¹, T.Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, S.A. Kashpor¹, S.A. Plyasunova¹, M.E. Dubrovina¹,
L.G. Fechina^{2,3}, N.V. Myakova¹, E.V. Samochatova¹, A.A. Maschan¹, A.M. Popov¹

¹National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Sverdlovsk Regional Clinical Children's Hospital No 1; 32 Serafimy Deryabinoy St., Ekaterinburg 620149, Russia;

³Institute of Medical Cell Technologies; 22A Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia

Bone marrow tumor blasts immunophenotyping is an essential part of Burkitt lymphoma/leukemia (BL) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) differential diagnostics. Nevertheless immunoglobulin heavy and light chains detection on the cell surface could meet several biological and methodological pitfalls. Thus the aim of the present study was development of additional BL immunophenotypic criteria. Leukemic blasts antigen profile in 21 BL cases and 84 children with BCP-ALL was compared in a retrospective way. Antigen expression patterns in BL and BCP-ALL were significantly different. It was shown that even in cases with weak immunoglobulin M expression these two tumor types could be distinguished well by complex immunophenotype analysis. In present study all cases of CD34-negative B-lineage ALL without myeloid coexpression and with high CD20-positive cells proportion belonged to BL.

Key words: Burkitt lymphoma/leukemia, acute lymphoblastic leukemia, flow cytometry

Введение

Лимфома/лейкоз Беркитта (ЛБ) — злокачественная, агрессивно протекающая лимфома из зрелых В-клеток, которая выявляется примерно в 2,5 % случаев всех неходжкинских лимфом (НХЛ) [1]. У детей ЛБ составляет около 30–50 % всех лимфом [2]. Чаще всего опухоль, не ограничиваясь локализацией в лимфатических узлах, поражает костный мозг (КМ), надпочечники, челюсть, яичники, почки, поджелудочную железу, кишечник, желудок. Специфическое поражение КМ наблюдается в 25–35 % случаев. Менее чем в 5 % случаев единственной локализацией ЛБ является КМ [3]. Ключевым молекулярным механизмом ЛБ выступает гиперэкспрессия протоонкогена *c-Myc*. Наиболее часто к этому приводит транслокация $t(8;14)(q24;q32)$ с участием в качестве партнера гена *IgH*, которая встречается приблизительно в 80 % случаев [4]. Описаны и другие транслокации: $t(2;8)(p12;q24)$ и $t(8;22)(q24;q11)$, а также случаи активации *c-Myc* в результате соматической мутации [5–7].

В настоящее время диагностика ЛБ основана на комплексе данных молекулярно-генетических, патоморфологических, цитологических, иммуноцитохимических и иммунофенотипических исследований, которые должны проводиться в как можно более сжатые сроки с момента госпитализации пациента. При вовлечении в процесс КМ критически важно разграничить ЛБ не только с другими типами НХЛ, но и провести дифференциальную диагностику с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ). Относительно быстрая верификация ЛБ чрезвычайно важна не только из-за очень высокой скорости прогрессирования заболевания, но и из-за риска стремительного возникновения жизнеугрожающих осложнений при вовлечении центральной нервной системы [8]. Однако весь комплекс указанных методов доступен далеко не во всех клинических лабораториях. Кроме того, они относительно дороги, качество их выполнения зависит от квалификации специалистов и они могут иметь ряд технических ограничений. Использование же только части необходимых методик может быть причиной постановки неправильного диагноза и выбора ошибочной тактики лечения, что, учитывая агрессивность заболевания, часто приводит к гибели пациента.

Цитологическое исследование мазков КМ и иммунофенотипирование опухолевых клеток методом проточной цитометрии позволяют получить результат существенно быстрее, чем молекулярно-генетическое и патоморфологическое исследования, поэтому являются крайне важной частью диагностики ЛБ. При этом цитоморфологический вариант бластов L3, наиболее характерный для ЛБ, не является строго специфичным признаком [9]. Изолированное исследование иммунофенотипа клеток КМ при всей своей эффективности также не может гарантировать абсолютно точную постановку диагноза.

При типировании ОЛЛ согласно критериям классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL) [10] наиболее частым при ЛБ является ВIV-вариант, так называемый зрелый В-клеточный ОЛЛ, основным признаком которого — поверхностная экспрессия μ -цепи молекулы иммуноглобулина и (или) одной из легких цепей. Однако описаны случаи ЛБ, не экспрессирующих иммуноглобулин М (IgM) [11]. Кроме того, слабая экспрессия IgM иногда определяется на поверхности части бластных клеток при ВП-ОЛЛ. Наконец, цитометрическое выявление тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов может быть затруднено вследствие различных технических нюансов. При этом проточная цитометрия остается одним из самых быстрых, точных и доступных методов исследования. Таким образом, существует необходимость формирования дополнительных критериев оценки иммунофенотипа клеток КМ для более точной дифференциальной диагностики ЛБ и ВП-ОЛЛ.

Цель исследования — формирование дополнительных иммунофенотипических критериев дифференциальной диагностики ЛБ и ВП-ОЛЛ.

Материалы и методы

Проведено ретроспективное сравнение данных иммунофенотипирования клеток КМ пациентов с верифицированными диагнозами ЛБ и ВП-ОЛЛ. Всего в исследование было включено 105 пациентов (55 мальчиков и 50 девочек) в возрасте от 1 года до 16 лет из Центра детской онкологии и гематологии ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1» (Екатеринбург) и ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва).

Исследуемую группу составил 21 пациент с ЛБ с наличием бластов в КМ. Диагноз ЛБ был подтвержден патоморфологическим, цитогенетическим и молекулярно-генетическим исследованиями. В группу сравнения были включены 84 ребенка с ВП-ОЛЛ: согласно критериям группы по классификации EGIL [10] у 5 детей был диагностирован VI-вариант, у 78 — VII, а у 1 — VIII.

Имунофенотипирование опухолевых клеток в КМ производили методом 6–8-цветной проточной цитометрии на приборах FACS Canto II (Becton Dickinson & Co (BD), США). Настройка проточных цитометров проводилась с использованием калибровочной системы CompBeads (BD). Мониторинг стабильности работы приборов осуществлялся с помощью частиц Cytometer Setup and Tracking (BD). Использовались моноклональные антитела (МКАТ), меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), R-фикоэритрином (PE), перидининхлорофилл-протеином (PerCP), аллофикоцианином (APC), тандемными конъюгатами: PE с цианином 7 (Cy7), PerCP с цианином 5.5 (Cy5.5) и APC с Cy7, а также с красителями BV421 и BV510. Для иммунофенотипирования применяли МКАТ

к следующим антигенам: CD45, CD19, CD3, CD10, CD34, CD13, CD33, CD117, CD15, CD58, CD38, CD20, CD22, CD79a, CD7, CD5, NG2, IgM, κ , λ , TdT, MPO. Окрашивание первично-меченными МКАТ выполняли согласно инструкции производителя.

Результаты иммунофенотипирования оценивали с помощью программного обеспечения FACS Diva 6.1 (BD) и Kaluza 1.5a (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 10 тыс. ядросодержащих клеток. Опухолевые клетки выделяли на точечных графиках по экспрессии CD45, значениям параметра бокового светорассеяния и экспрессии линейно-ассоциированного маркера CD19. Популяция клеток считалась позитивной, если более 20 % клеток экспрессировали исследуемый антиген на мембране или более 10 % внутриклеточно [10]. В качестве негативного контроля использовали сохранившиеся в образце нормальные клетки.

Группы сравнивали качественно по количеству позитивных пациентов, а также количественно как по доле позитивных по каждому антигену клеток, так и по экспрессии антигенов, выраженной в виде средней интенсивности флуоресценции. Значения

параметра бокового светорассеяния также сравнивали по интенсивности свечения.

Для статистической обработки результатов применяли программы XLSTAT-2016 и Statistica 7.0. Для сравнения количественных показателей в 2 группах применялся критерий Манна–Уитни, для качественных показателей – критерий χ^2 . Для уточнения пороговых уровней относительного содержания позитивных по каждому антигену клеток, позволяющих наиболее четко дифференцировать ЛБ и ВП-ОЛЛ, применялся метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [12, 13]. Для каждого маркера в отдельности и для различных их комбинаций рассчитывали диагностическую чувствительность, специфичность, прогностическую ценность положительного и отрицательного результатов, а также общую диагностическую эффективность теста для диагностики ЛБ [14].

Результаты

В целом по профилю экспрессии антигенов пациенты с ЛБ существенно отличались от пациентов с ВП-ОЛЛ (табл. 1). Кроме очевидных различий в экспрес-

Таблица 1. Экспрессия антигенов опухолевыми клетками при лимфоме/лейкозе Беркитта (ЛБ) и остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ)

Table 1. Antigen expression in tumor cells in Burkitt's lymphoma/leukemia (BL) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL)

Антигены Antigens	ЛБ BL		ВП-ОЛЛ BCP-ALL		p
	Число позитивных пациентов / общее число обследованных пациентов Number of positive patients / Total number of tested patients				
	n/N, абс	n/N, %	n/N, абс	n/N, %	
CD10	21/21	100	80/84	95,2	0,579
CD19	21/21	100	84/84	100	0,999
CD20	21/21	100	32/84	38,1	0,006
CD22	16/17	94,1	65/66	98,4	0,873
CD34	0/21	0	62/84	73,8	<0,0001
CD45	21/21	100	66/84	78,6	0,033
CD58	0/7	0	76/81	93,8	<0,0001
CD38	16/16	100	40/42	95,2	0,934
IgM	21/21	100	0/84	0	<0,0001
κ	6 /18	33,3	0/84	0	<0,0001
λ	11/18	61,1	0/84	0	<0,0001
iCD79a	21/21	100	84/84	100	0,464
NG2	0/21	0	2/84	2,4	0,875
Myelo*	0/21	0	47/84	56	0,003

*Myelo – миелоидные маркеры (CD13/CD33/CD117/CD15).

*Myelo – myeloid markers (CD13/CD33/CD117/CD15).

Примечание. Внутриклеточная экспрессия антигенов отмечена буквой i.

Note: Subscript "i" denotes intracellular antigen expression.

сии поверхностных и цитоплазматических легких и тяжелых цепей IgM, число пациентов, позитивных по экспрессии CD20, CD45, CD34, CD58 и миелоидных антигенов, также было неодинаковым. У 47 (56 %) пациентов с ВП-ОЛЛ детектировали коэкспрессию хотя бы одного из миелоидных маркеров на бластных клетках, в то время как у всех пациентов с ЛБ миелоидные маркеры не были выявлены. У всех пациентов с ЛБ также отсутствовала экспрессия CD34 и CD58, при этом экспрессировались CD10, CD38, CD20 и CD45 и по экспрессии каждого из антигенов опухолевая популяция при ЛБ была гомогенна во всех случаях. Несмотря на отсутствие достоверных различий по количеству CD10-позитивных клеток между исследуемой группой и группой сравнения, интенсивность экспрессии данного антигена при ЛБ и ВП-ОЛЛ существенно различалась (рис. 1). Кроме того, опухолевые клетки отличались и по значению параметра бокового светорассеяния, косвенно отражающего степень развитости внутриклеточных структур (рис. 2). Типичные примеры расположения опухолевых клеток при ЛБ и ВП-ОЛЛ на точечных графиках представлены на рис. 3.

При оценке параметров диагностической эффективности для каждого отдельного маркера было

выявлено, что с наибольшей точностью случаи исследуемой группы и группы сравнения могли быть разделены по наличию на мембране CD58 (табл. 2). Однако относительно небольшое количество пациентов с ЛБ, обследованных на предмет экспрессии данного антигена ($n = 7$), не позволяет сделать однозначные выводы о ценности его как одиночного маркера различия ЛБ и ВП-ОЛЛ. Остальные антигены, хоть и имели высокую диагностическую чувствительность, тем не менее за счет низкой специфичности не обладали высокой диагностической эффективностью.

Для разработки алгоритма цитометрической диагностики ЛБ из общей группы (исследуемая группа плюс группа сравнения) пошагово исключали случаи с иммунофенотипическими признаками ВП-ОЛЛ. Так, на первом этапе было учтено отсутствие случаев ЛБ с коэкспрессией миелоидных антигенов. Среди оставшихся 37 пациентов с ВП-ОЛЛ 27 были CD34-позитивны, в то время как данный маркер ни в одном случае не был обнаружен при ЛБ. Поэтому в дальнейшем исследуемая группа сравнивалась с пациентами с ВП-ОЛЛ, не экспрессирующими миелоидные антигены и CD34. Наиболее точное разделение между этими случаями ВП-ОЛЛ

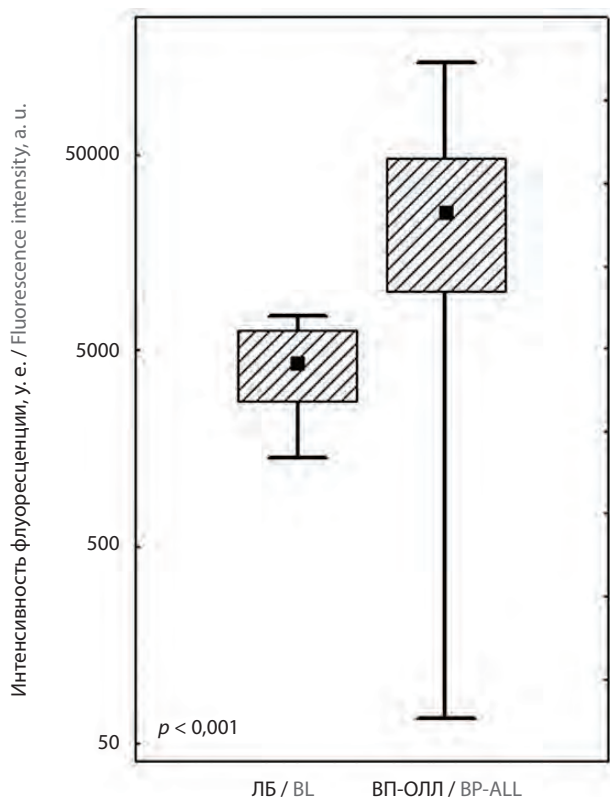


Рис. 1. Различия экспрессии CD10 (HI10a-PE) при лимфоме/лейкозе Беркитта (ЛБ; $n = 13$) и остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ; $n = 59$)

Fig. 1. Differences in CD10 expression (HI10a-PE) in Burkitt's lymphoma/leukemia (BL; $n = 13$) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL; $n = 59$)

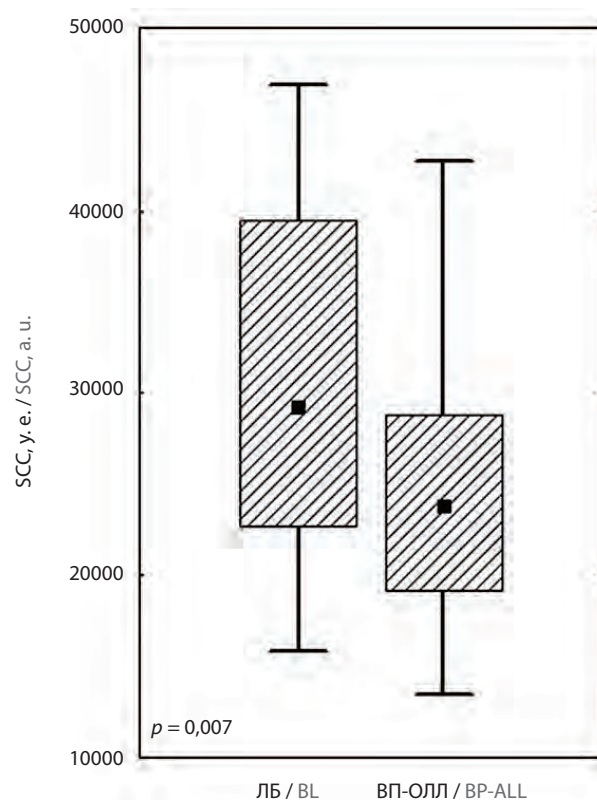


Рис. 2. Различия величины бокового светорассеяния (SSC) при лимфоме/лейкозе Беркитта (ЛБ; $n = 21$) и остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ; $n = 84$)

Fig. 2. Differences in side scatter (SSC) values in Burkitt's lymphoma/leukemia (LB; $n = 21$) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL; $n = 84$)

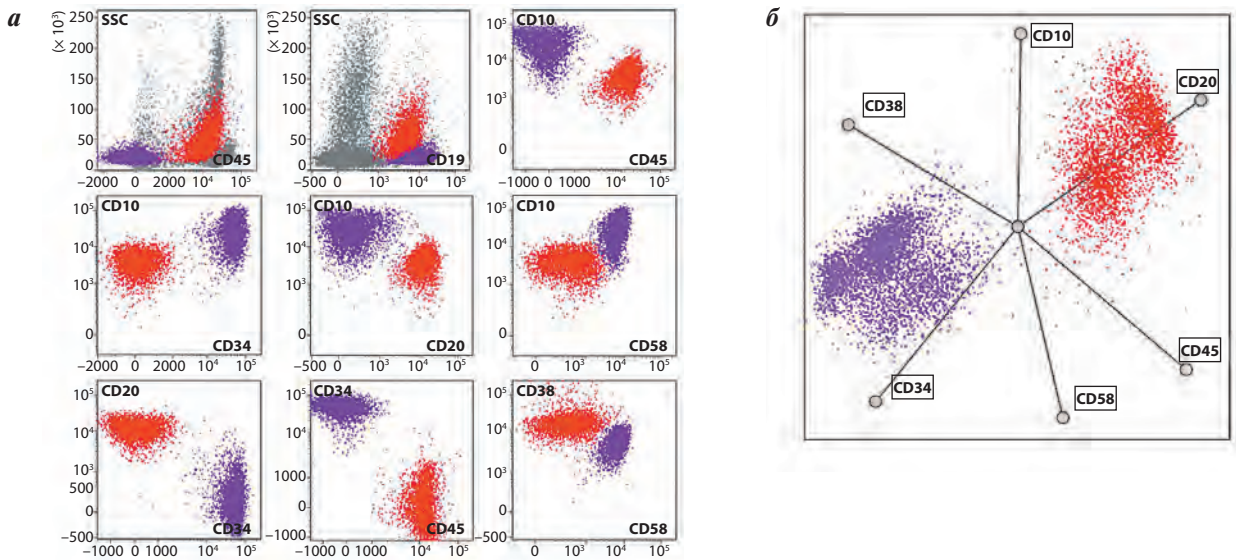


Рис. 3. Пример типичного расположения на точечных графиках опухолевых клеток при лимфоме/лейкозе Беркитта (показано красным) и остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (показано фиолетовым). Результаты иммунофенотипирования 2 пациентов объединены в один массив данных. Как при двухмерном (а), так и при многомерном (б) анализе видно существенное различие иммунофенотипов опухолевых бластов. Нормальные клетки костного мозга показаны серым

Fig. 3. An example of typical distribution of tumor cells on scatter point plots for Burkitt's lymphoma/leukemia (red) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (purple). Results of immunophenotyping of 2 patients were combined into a single data set. Both two-dimensional (a) and multidimensional (b) analyses show significant differences between immunophenotypes of tumor blasts. Normal bone marrow cells are shown in grey

Таблица 2. Параметры диагностической информативности определения экспрессии отдельных антигенов для дифференциальной диагностики лимфомы/лейкоза Беркитта и острого лимфобластного лейкоза

Table 2. Parameters of diagnostic information value for determination of antigen expression for Burkitt's lymphoma/leukemia and acute lymphoblastic leukemia differential diagnosis

Антигены Antigens	ДЧ DS	Сп Sp	ПЦПР PVPR	ПЦОР PVNR	ДЭТ DET
CD20	1,00	0,62	0,40	1,00	0,70
CD34	0,95	0,74	0,48	0,98	0,78
CD38	1,00	0,05	0,29	1,00	0,31
CD45	1,00	0,21	0,24	1,00	0,37
CD58	1,00	0,94	0,58	1,00	0,93
Myelo	1,00	0,56	0,36	1,00	0,65

Сокращения: myelo – миелоидные маркеры (CD13/CD33/CD117/CD15), ДЧ – диагностическая чувствительность, Сп – специфичность, ПЦПР и ПЦОР – прогностическая ценность положительного и отрицательного результатов соответственно, ДЭТ – диагностическая эффективность теста.

Abbreviations: myelo – myeloid markers (CD13/CD33/CD117/CD15), DS – diagnostic sensitivity, Sp – specificity, PVPR and PVNR – prognostic value of positive and negative result respectively, DET – diagnostic effectiveness of the test.

и пациентами с ЛБ было достигнуто при использовании порогового значения в 87 % CD20-положительных клеток, определенного с помощью ROC-анализа (рис. 4). Таким образом, в исследованной выборке случаев ВП-ОЛЛ и ЛБ все пациенты, не имевшие экспрессии миелоидных антигенов и CD34, а также имевшие высокую долю CD20-положительных бластов, принадлежали к исследуемой группе. Для этого алгоритма в данной группе значения всех параметров диагностической эффективности составили 100 %.

Обсуждение

В условиях относительно долгого получения результатов патоморфологического и молекулярно-генетического исследований своевременное и достоверное цитометрическое определение типа гемопоэтической опухоли может играть ключевую роль в выборе тактики лечения и успехе проводимой терапии. ЛБ иммунофенотипически характеризуется экспрессией пан-В-клеточных антигенов, CD10, а также экспрессией поверхностного IgM с рестрикцией по одной из легких

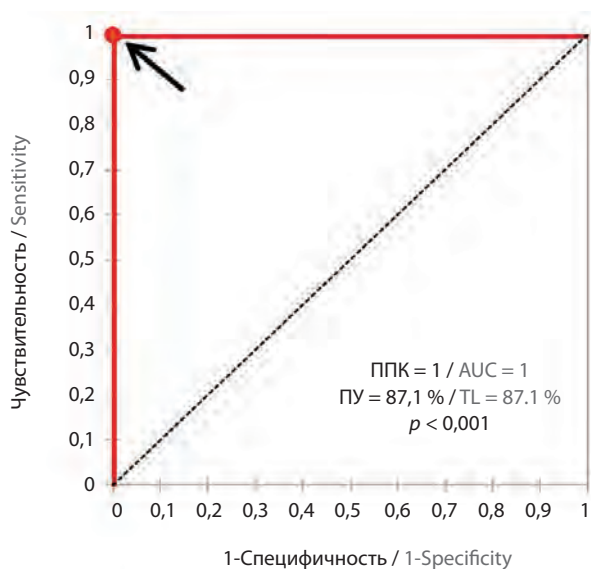


Рис. 4. ROC-кривая (красная линия) определения возможности разделения пациентов с лимфомой/лейкозом Беркитта ($n = 21$) и случаев острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников без экспрессии миелоидных антигенов и CD34 ($n = 10$) по доле CD20-позитивных клеток (пояснения даны в тексте).

Сокращения: ППК — площадь под кривой, ПУ — пороговый уровень, обладающий наилучшим разделением (указан стрелкой)

Fig. 4. ROC-curve (red line) for determination of possibility of distinguishing between patients with Burkitt's lymphoma/leukemia ($n = 21$) and B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia without myeloid antigens and CD34 expression ($n = 10$) using the fraction of CD20-positive cells (see explanation in the text).

Abbreviations: AUC — area under curve, TL — threshold level with best separation (arrow)

цепей. Однако определение экспрессии IgM зачастую вызывает затруднения из-за недостаточно качественных реагентов и отсутствия опыта персонала. Кроме того, в литературе описаны случаи aberrантной экспрессии или полного отсутствия этих маркеров [10], что существенно осложняет дифференциальную диагностику. При этом важное значение приобретает формирование дополнительных критериев оценки данных проточной цитометрии при иммунофенотипировании образцов КМ. При выявлении патогномичных для ЛБ особенностей иммунофенотипа blasts становится возможным более прицельное определение характерных для ЛБ молекулярно-генетических нарушений.

В результате проведенного нами ретроспективного исследования был определен ряд особенностей иммунофенотипа ЛБ, который может помочь при оценке результатов проточной цитометрии КМ при диффе-

ренциальной диагностике В-клеточных лейкозов. Было показано, что по экспрессии различных поверхностных маркеров ЛБ существенно отличается от ВП-ОЛЛ, поэтому даже при неоднозначном или негативном результате определения экспрессии поверхностного IgM дифференциальная диагностика этих двух нозологий возможна при комплексной оценке иммунофенотипа. В частности, при ЛБ для опухолевых клеток характерно отсутствие экспрессии миелоидных маркеров и CD34. При обнаружении бластных клеток с таким фенотипом необходимо обратить пристальное внимание на долю CD20-позитивных клеток, которая достоверно выше при ЛБ, чем при ВП-ОЛЛ. Приведенный алгоритм анализа данных при использовании порогового уровня в 87 % CD20-позитивных blasts позволил в исследованной нами выборке абсолютно точно отделить все случаи ЛБ от ВП-ОЛЛ. Отдельного внимания заслуживает маркер CD58, выявляющийся на различных клетках кроветворной и некроветворной природы. Многократно было показано, что данный антиген экспрессируется в большинстве случаев ВП-ОЛЛ. Однако данные по его экспрессии при ЛБ редки [15–17]. Как и в работе М. Veltroni и соавт. [15], нами было показано, что он отсутствовал во всех случаях ЛБ. При этом при ВП-ОЛЛ его экспрессия чаще всего была высока и отсутствовала только в 5 % случаев. Однако экспрессию CD58 определяли только у 7 пациентов с ЛБ, что недостаточно для проведения полноценного статистического анализа. Следует, однако, признать, что для окончательного формирования критериев диагностики поражения КМ при ЛБ по иммунофенотипу опухолевых клеток необходимо проведение более крупных исследований.

Заключение

Таким образом, нами был выявлен ряд особенностей иммунофенотипа опухолевых blasts при ЛБ. Анализируя данные проточной цитометрии комплексно, можно с высокой точностью дифференцировать данную опухоль от случаев В-линейного ОЛЛ. В свою очередь, это позволяет проводить более прицельные патоморфологические и генетические исследования для верификации диагноза ЛБ. В нашем исследовании все случаи В-линейного ОЛЛ при отсутствии экспрессии миелоидных маркеров и CD34, а также высокой (более 87 %) доле CD20-позитивных клеток относились к пациентам с ЛБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kelemen K., Brazier R.M., Gatter K. et al. Immunophenotypic variations of Burkitt lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2010; 134:127–38. DOI: 10.1309/AJCP93LJPTRQPKR.
2. Клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфомы Беркитта. II Конгресс гематологов России, 2014. [Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of Burkitt's lymphoma. II Hematology Congress in Russia, 2014. (In Russ.)].
3. Martinez A., Ponzone M., Agostinelli C. et al. International Extranodal Lymphoma Study Group. Primary bone marrow

- lymphoma: an uncommon extranodal presentation of aggressive non-Hodgkin lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2012;36(2):296–304.
DOI: 10.1097/PAS.0b013e31823ea106.
4. Dalla-Favera R., Bregni M., Erikson J. et al. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(24):7824–7.
PMID: 6961453.
5. Schmitz R., Young R.M., Ceribelli M. et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012;490(7418):116–20.
DOI: 10.1038/nature11378.
6. Love C., Sun Z., Jima D. et al. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma. *Nat Genet* 2012;44(12):1321–5.
DOI: 10.1038/ng.2468.
7. Richter J., Schlesner M., Hoffmann S. et al. Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 2012;44(12):1316–20.
DOI: 10.1038/ng.2469.
8. McGowan P., Nelles N., Wimmer J. et al. Chang Differentiating between Burkitt lymphoma and CD10+ diffuse large B-cell lymphoma: the role of commonly used flow cytometry cell markers and the application of a multiparameter scoring system. *Am J Clin Pathol* 2012;137(4):665–70.
DOI: 10.1309/AJCP3FEPX5BEEKGX.
9. Coche D., Bergues B., Harnivel V., Guillaume N. Biphenotypic acute leukaemia with Burkitt-like cytology. *Ann Biol Clin (Paris)* 2009;67:437–40.
DOI: 10.1684/abc.2009.0337.
10. Bene M., Castoldi G., Knapp W. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 1995;9(10):1783–6.
PMID: 7564526.
11. Kelemen K., Brazier R.M., Gatter K. et al. Immunophenotypic Variations of Burkitt Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2010;134:127–38.
DOI: 10.1309/AJCP93LJPTRQPDKR.
12. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;31:561–77.
PMID: 8472349.
13. Obuchowski N.A. ROC analysis. *Am J Roentgenol* 2005;184:364–72.
DOI: 10.2214/ajr.184.2.01840364.
14. Weinstein S., Obuchowski N.A., Lieber M.L. Clinical evaluation of diagnostic tests. *Am J Roentgenol* 2005;184:14–9.
DOI: 10.2214/ajr.184.1.01840014.
15. Veltroni M., De Zen L., Sanzari M.C. et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2003;88(11):1245–52.
PMID: 14607753.
16. Lee R.V., Braylan R.C., Rimsza L.M. A CD58 expression decrease as nonmalignant B cells mature in bone marrow and is frequently overexpressed in adult and pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2005;123(1):119–24.
PMID: 15762287.
17. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Аберрации иммунофенотипа, применимые для мониторинга минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии при CD10-позитивном остром лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников. *Иммунология* 2010;6:299–304. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Immunophenotype aberrations useful for minimal residual disease monitoring by flow cytometry in CD10-positive B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Immunologiya = Immunology* 2010;6:299–304. (In Russ.)].

Физиология и патология внеклеточных везикул

М.А. Пантелеев¹⁻⁴, А.А. Абаева², Д.Ю. Нечипуренко¹⁻³, С.И. Обыденный^{1,2}, А.Н. Свешникова¹⁻³, А.М. Шибeko²

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

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН»; Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 38А, корп. 1;

³физический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2;

⁴факультет биологической и медицинской физики ФГАУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)»; Россия, 141700 Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9

Контакты: Михаил Александрович Пантелеев mapanteleev@yandex.ru

Этот год юбилейный: 50 лет назад была опубликована первая работа, сообщающая об открытии микровезикул плазмы крови. Изначально считавшиеся просто обломками клеток, «тромбоцитарной пылью», внеклеточные везикулы в настоящее время привлекают внимание биохимиков, биофизиков, врачей, фармакологов всего мира. Они гетерогенны по устройству и клеточному происхождению, несут на себе и в себе разнообразные биомолекулы и обладают широким спектром биологических активностей (прокоагулянтную, регенеративную, иммуномодулирующую и др.), которые играют важную роль в патофизиологии широкого круга заболеваний и состояний — от инфаркта, травмы и беременности до реакции «трансплантат против хозяина». Сами везикулы в качестве лекарств и их носителей, равно как и влияющие на них препараты, представляют собой объект исследований и разработок, который быстро набирает популярность. Настоящий обзор посвящен современным представлениям о внеклеточных везикулах и их практическом применении.

Ключевые слова: внеклеточные микровезикулы, экзосомы, эктосомы, прокоагулянтная активность

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-62-70

Physiology and pathology of extracellular vesicles

M.A. Panteleev¹⁻⁴, A.A. Abaeva², D. Yu. Nechipurenko¹⁻³, S.I. Obydenniy^{1,2}, A.N. Sveshnikova¹⁻³, A.M. Shibeko²

¹National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, Russia, 117997;

²Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology RAS; 38A-1 Leninsky Avenue, Moscow 119991, Russia;

³Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University; 1-2 Leniskie Gory, Moscow 119991, Russia;

⁴Department of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology (State University); 9 Institutskiy Lane, Dolgoprudny, Moscow Region 141700, Russia

This year marks the 50th anniversary of the first publication about blood plasma microparticles. Initially considered as cell fragments or “platelet dust”, extracellular vesicles currently attracted the attention of biochemists, biophysicists, physicians, pharmacists around the world. They are heterogeneous in structure and derived from many cell types, express different antigen and contain variety of biomolecules that determines wide range of biological activity, including procoagulant, regenerative, immunomodulating, and others. They play an important role in the pathophysiology of different diseases and conditions — from infarction, injuries and pregnancies to the “graft versus host” disease. The vesicles as medicaments and their carriers, as well as the drugs that affect them, are a rapidly developing field of research.

Key words: extracellular microvesicles, exosomes, ectosomes, procoagulant activity

Введение

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой бислойные структуры из мембранных липидов, которые присутствуют во всех жидкостях нашего организма: интерстициальной, спинномозговой, амниотической и других, а также в слюне, сперме, плазме крови, лимфе. Везикулы крови были открыты самими первыми и остаются наиболее изученными до сих пор. Их размер варьирует в широких пределах — от десятков нанометров до микрона и более, форма чаще всего сферическая (особенно для небольших). ВВ образуют-

ся при разнообразных процессах активации, жизнедеятельности и смерти практически из любых клеток. В зависимости от происхождения и устройства, среди ВВ выделяют экзосомы, микровезикулы, апоптотические тела и другие подтипы (впрочем, эта классификация пока плохо проработана и не устоялась). В отличие от клеток, даже самых примитивных, ВВ «мертвы»: у них нет мембранной и ионной асимметрии, зависящих от аденозинтрифосфата (АТФ) процессов и прочих признаков даже самых примитивных клеток. Однако они несут на себе и внутри себя разнообразные

белки, липиды и нуклеиновые кислоты, способные существенно влиять на биологические процессы. За последние десятилетия ВВ поднялись в статусе от «клеточного мусора» и «обломков клеток» до активно изучаемых и важных объектов. Существуют профессиональное общество и специализированный журнал (www.journalofextracellularvesicles.net), посвященные исключительно ВВ.

Текущий год для ВВ юбилейный: существование липидного везикулярного материала в крови было обнаружено ровно полвека назад в работах английского физиолога Питера Вульфа [1], который пытался разобраться в природе прокоагулянтной активности плазмы крови. В каком-то смысле история открытия ВВ напоминает историю открытия нуклеиновых кислот Фридрихом Мишером: 1) они были обнаружены исследователем-одиночкой в результате долгих попыток разрешить некую сложную фундаментальную загадку; 2) несмотря на успешное решение этой конкретной загадки (подробно описанной чуть ниже), истинная значимость ВВ на протяжении десятилетий оставалась никем не оцененной.

Исследования Вульфа были направлены на поиск в плазме гипотетических объектов, способных взаимодействовать с белками свертывания и улучшать их работу. Из-за маленького размера, в целом лежащего ниже дифракционного предела, ВВ почти не видны в оптических микроскопах (если не использовать флуоресцентные метки), а из-за недостаточно развитого цитоскелета плохо переносят пробоподготовку для любого вида электронной или зондовой микроскопии. Поэтому Вульф выявил их благодаря способности ускорять реакции свертывания крови. Как известно, основные реакции свертывания крови протекают на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах [2]: ферменты, субстраты, кофакторы связываются с фосфатидилсерином через ионные

кальциевые «мостики», и из-за концентрирования белков скорости реакций возрастают на порядки [3]. Главным поставщиком мембранной поверхности для свертывания крови *in vivo* считаются активированные тромбоциты, при стимуляции которых появляется субпопуляция с фосфатидилсерином на поверхности [4–6]. Абсолютная необходимость мембранной поверхности для свертывания крови стала понятна достаточно рано (самый главный способ антикоагуляции при заготовке препаратов крови – добавление цитрата натрия – основан как раз на удалении из плазмы крови ионов кальция), равно как и способность тромбоцитов поддерживать мембранные реакции свертывания. Но загадка заключалась в том, что плазма крови способна свертываться даже без клеток [7]. Но чистые выделенные белки свертывания без мембраны не работают. Получается, в плазме должны были быть еще какие-то объекты, вероятно, мембранной природы? Концентрирование этих объектов при центрифугировании на высоких скоростях и наблюдение с помощью световой микроскопии (рис. 1) позволили их выявить. Объекты получили название «тромбоцитарной пыли».

Как стало понятно позже, даже ВВ плазмы имеют далеко не только тромбоцитарное происхождение (хотя тромбоцитарные считаются самыми многочисленными). Они способны не только ускорять свертывание крови, но также ингибировать его и индуцировать фибринолиз, стимулировать и подавлять иммунную систему, влиять на регенерацию и ангиогенез, экспрессию генов и дифференцировку разнообразных клеток (например, мезенхимальных стволовых [9, 10]).

В данном обзоре мы вкратце рассмотрим современные представления об устройстве, происхождении и свойствах ВВ, чтобы затем сосредоточиться на описании тех функций, которые они могут осуществлять

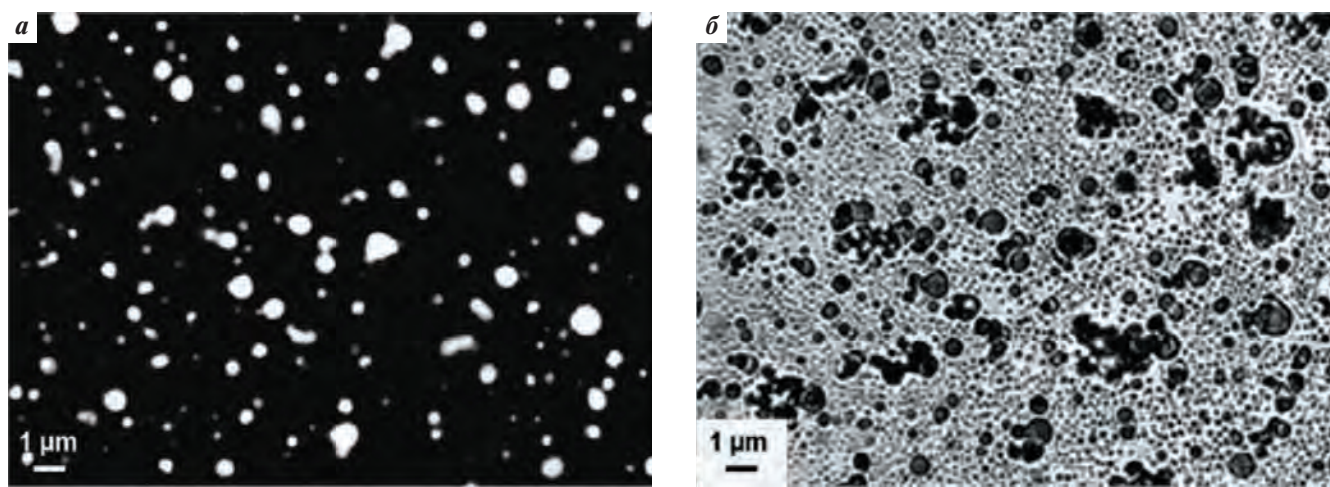


Рис. 1. Вид эритроцитарных микровезикул из плазмы крови пациента с бета-талассемией при наблюдении в световой микроскоп (воспроизведено из [8]): а – флуоресцентная конфокальная микроскопия, б – классическая световая микроскопия. Шкала масштаба – 1 µм
Fig. 1. Erythrocyte microvesicles from plasma of a patient with beta-thalassemia as seen in an optical microscope (reproduced from [8]): а – fluorescence confocal microscopy, б – traditional light microscopy. Scale – µm

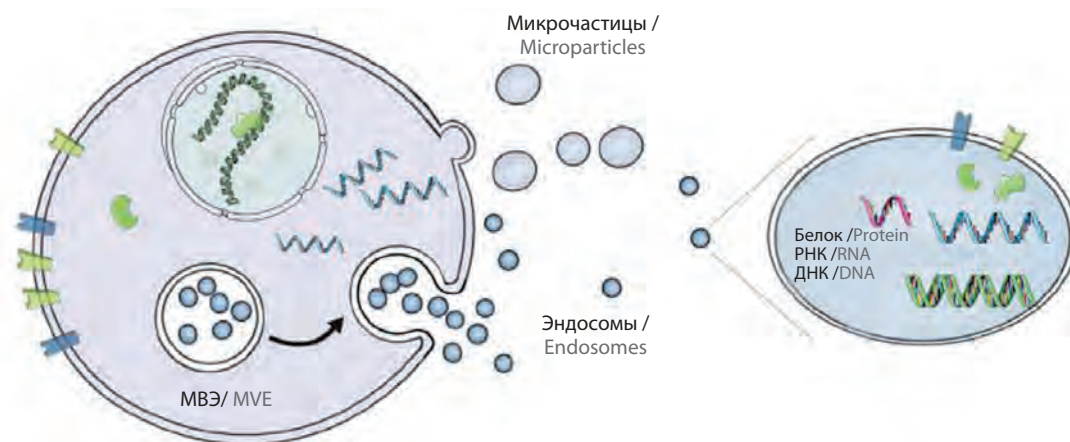


Рис. 2. Основные пути образования внеклеточных везикул в современной трактовке (воспроизведено из [11]): справа — отщепление от клеточной мембраны (в результате получаются микровезикулы); слева — формирование экзосом внутри мультивезикулярной эндосомы (МВЭ).

Сокращения: ДНК и РНК — дезокси- и рибонуклеиновые кислоты

Fig. 2. Main pathways of extracellular vesicles' formation according to current knowledge (reproduced from [11]): right — separation from the cell membrane (this results in formation of microvesicles); left — formation of exosomes inside multivesicular endosome (MVE).

Abbreviations: DNA and RNA — deoxy- and ribonucleic acids

в норме и патологии, а также на представлении их возможного применения на практике в целях диагностики и терапии.

Происхождение и устройство внеклеточных везикул

ВВ представляют собой бислойные липосомы, несущие разнообразные мембранные белки, матричные и микрорибонуклеиновые кислоты (мРНК и миРНК). Точный состав и структура зависят от типа клеток, на которых ВВ формируются в результате выпячивания и отрыва участков разных клеточных мембран (рис. 2). Два главных класса ВВ — это экзосомы и эктосомы, они же микровезикулы.

Микровезикулы, или эктосомы, отщепляются от плазматической (т.е. внешней) мембраны практически всех клеток (для которых совершались соответствующие исследования) при активации, смерти и просто в ходе их жизни и старения. Они имеют 100–1000 нм в диаметре и являются единственным видом ВВ, доступным для прямого наблюдения в оптическом диапазоне с помощью микроскопа или проточного цитометра. Их состав по липидам и мембран-

ным белкам качественно близок к составу плазматической мембраны порождающей клетки, но количественно может сильно различаться. В результате работ последних лет у них даже обнаружили цитоскелет (рис. 3). Как и плазматическая мембрана, микровезикулярная содержит фосфатидилсерин. Однако в отличие от клеток микровезикулы не имеют АТФ-зависимых механизмов для поддержания мембраны в асимметричном состоянии, поэтому фосфатидилсерин присутствует на внешнем слое мембраны микровезикулы постоянно [11]. Именно микровезикулы являются главным неклеточным источником прокоагулянтной поверхности в плазме крови, соперничая в этом даже с тромбоцитами [13, 14], и именно они, по-видимому, были обнаружены Вульфом в его работе.

Второй главный класс ВВ — экзосомы, отщепляемые от мембран внутриклеточных компартментов частицы 50–100 нм в диаметре [15]. Теоретически их можно детектировать по флуоресценции, но понять структуру при этом все равно нельзя из-за дифракционного ограничения разрешающей способности, если

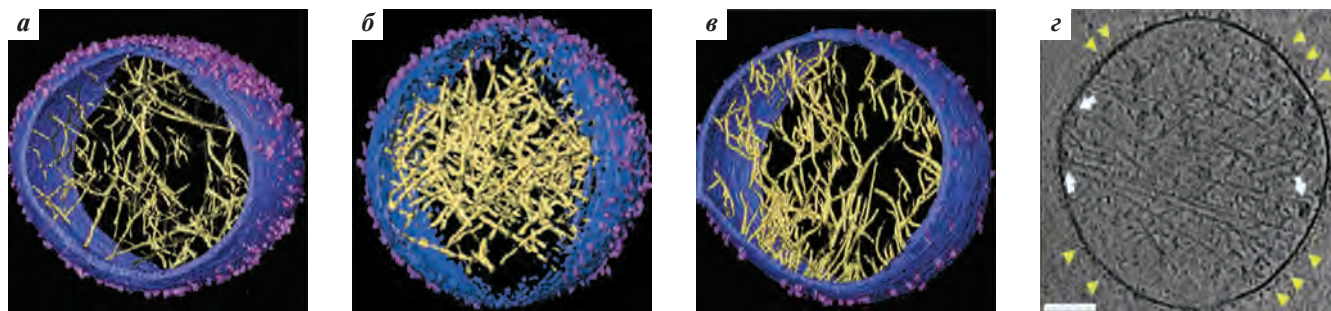


Рис. 3. Криоэлектронная томография и ультраструктура тромбоцитарных микровезикул. Показаны 3 разные микровезикулы (а–в) и 1 исходный срез (г). Видна мембрана, нити актина и мембранные гликопротеины. Шкала масштаба — 100 нм. Воспроизведено из [12]

Fig. 3. Cryo-electron tomography and ultrastructure of platelet microvesicles. Different microvesicles (a – в) and the initial section (г) are shown. Membrane, actin filaments, and membrane glycoproteins are apparent. Scale — 100 nm. Reproduced from [12]

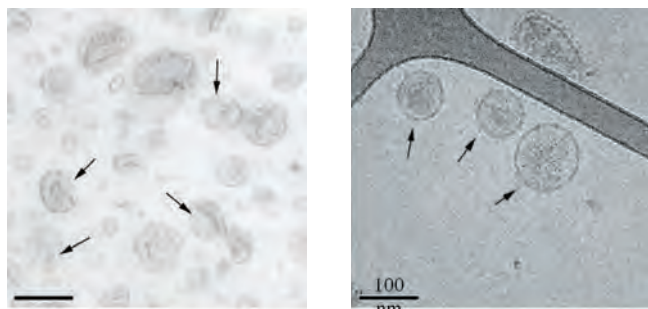


Рис. 4. Электронная микроскопия экзосом (воспроизведено из [16]): слева — стандартная, справа — криоэлектронная

Fig. 4. Electron microscopy of exosomes (reproduced from [16]): left — standard, right — cryo-electron

только не использовать новейшие технологии сверхвысокого разрешения STORM или PALM, поэтому главным источником информации о структуре экзосом является электронная микроскопия (рис. 4). При этом из-за нестабильности экзосом качественные изображения дает только криоэлектронная микроскопия, при которой сокращены процедуры подготовки образца. В отличие от микровезикул экзосомы предположительно не несут фосфатидилсерин и не имеют прокоагулянтной активности.

Разделение на экзосомы и эктосомы достаточно условно. Распределение этих образований по размерам не является дискретным, антигенный состав тоже в значительной степени может быть смешанным, и разделить их друг от друга сложно. Например, недавнее детальное исследование Бриссона и соавт. показало, что ВВ плазмы крови плохо укладываются в вышеописанные 2 класса [17]. В плазме крови оказалось 3 типа везикул, отличающихся по форме: сферические, трубчатые и фрагментарные. Сферические ВВ были равномерно распределены по диаметру от 30 до 1000 нм и составляли около 95 % всех ВВ, при этом никакой жесткой границы распределения не было. Окраска антителами с наночастицами золота показала, что сферические везикулы на 40 % тромбоцитарные, но только треть из них содержит фосфатидилсерин; 20 % были эритроцитарными, причем почти все без фосфатидилсерина (что озадачивает, так как у эритроцита нет внутренних мембран без фосфатидилсерина). Трубчатые ВВ были 1–5 мкм длиной и составляли около 5 % всех ВВ, мембранные фрагменты размером 1–8 мкм — около 0,5 % и не более. При этом трубки тромбоцитарного происхождения не несли фосфатидилсерина, и значительную долю составляли загадочные мультинегативные трубки неясного происхождения. Тут стоит отметить, что из-за того, что ВВ находятся на грани чувствительности современных методов, неопределенность их количественных показателей в разных жидкостях организма составляет порядки. Интересно отметить, что в исследовании Бриссона в плазме крови наблюдалось 30 тыс. ВВ в микролитре, а стандартная проточная цитометрия

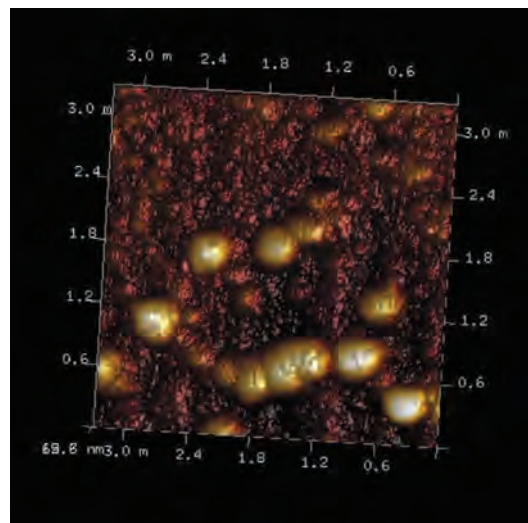


Рис. 5. Тромбоцитарные микровезикулы под атомно-силовым микроскопом (воспроизведено из [18])

Fig. 5. Platelet microvesicles in an atomic force microscope (reproduced from [18])

давала в микролитре 500 ВВ; т. е. с помощью цитометра можно определить только 1–2 % от общего количества ВВ.

Атомно-силовая микроскопия способна детектировать ВВ (рис. 5), но при этом сложно сохранить их структуру в процессе пробоподготовки и сложно использовать этот метод для количественных оценок.

Наконец, в последние годы выделяют 3-й тип везикул — апоптотические тела [19, 20]. Они похожи на микровезикулы по размеру и также несут фосфатидилсерин. Однако эти ВВ специально образуются в ходе запрограммированной клеточной смерти для «упаковки» содержимого клетки и часто включают элементы ядерного материала и органеллы [20]. По этим параметрам и ряду других они заметно отличаются от состава микровезикул, которые отделяются от плазматической мембраны при активации или механическом повреждении клетки.

Формирование ВВ, по-видимому, является универсальным феноменом, сопровождающим функционирование любых биологических мембран: они производятся любыми клетками и содержатся в любых жидкостях организма. В какой-то степени охарактеризованы ВВ синовиальной жидкости и слюны [21], мочи [22], межклеточной жидкости печени [23], мозга [20], плаценты [24], внеклеточного матрикса [25] и особенно органического матрикса скелетных тканей [26]. Разумеется, наиболее детально изученными являются ВВ плазмы крови.

Считается, что в норме кровь содержит только ВВ, произведенные клетками крови или сосудистого русла. Появление ВВ иного происхождения обычно характерно только для травм или онкологических заболеваний. Больше всего — тромбоцитарных микровезикул, возможно, часть из них производится мегакариоцитами. Эритроцитарные ВВ также достаточно многочис-

сленны, даже в норме [27], а при серповидноклеточной анемии, бета-талассемии и других нарушениях их число заметно выше. Лейкоцитарных везикул очень мало, но они могут иметь интересные виды биологической активности (в частности, в отличие от тромбоцитов и эритроцитов, они несут сигнальные нуклеиновые кислоты). Чаще всего предметом изучения являются моноцитарные ВВ [28]. Эндотелиальные везикулы немногочисленны, повышение их уровня обычно связано с системными заболеваниями [29]. Для каждой клетки существует свой набор стимуляторов выброса ВВ, обычно включающий свыше десятка активаторов.

Как предполагается, микрочастицы формируются прямым выпячиванием плазматической мембраны. Впрочем, в этом задействованы сложные молекулярные «машины», требуется регуляция актинового и микротрубочкового цитоскелетов, работа ассоциированных с ними миозиновых и кинезиновых моторов, специальные белки (такие как SNARE). Напротив, экзосомы формируются как интралюминальные везикулы больших вакуолей — многовезикулярных эндосом (МВЭ) — и выбрасываются наружу при их слиянии с мембраной. Из подробностей этого процесса известно, что МВЭ бывают двух морфологически идентичных типов [16]: а) богатые холестерином и несущие экзосомы для секреции и б) бедные холестерином и несущие органеллы и белки к лизосомам для уничтожения. Пока лучше всего изучен процесс формирования МВЭ второго типа: выявлена роль эндосомальных сортирующих комплексов (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) и в целом охарактеризована сортировка содержимого на мембране в процессе формирования. Не исключено, что ряд этих механизмов задействован и в секреции экзосом.

Взаимодействие ВВ с клетками и слияние с ними изучены недостаточно. По-видимому, клетки используют самые разнообразные механизмы в зависимости от своего типа и вида активации, включая клатрин-зависимый эндоцитоз, кавеолин-опосредованный вход, макропиноцитоз, фагоцитоз, интернализацию посредством липидных рафтов [30].

Основные свойства ВВ связаны с их ключевыми компонентами — липидами мембран, мембранными белками и нуклеиновыми кислотами внутри [30, 31]. В первую очередь это прокоагулянтная активность. Благодаря фосфатидилсерину ВВ связывают белки свертывания и ускоряют мембранные реакции. Далее, благодаря мембранным белкам, ВВ обладают адгезионной и сигнальной активностью: одни белки-рецепторы отвечают за физическое взаимодействие ВВ с клетками-мишенями, а другие — за индукцию определенных сигналов. Наконец, важнейшее свойство ВВ — это регуляция экспрессии генов в клетках-мишенях при слиянии с мембраной и выделении своего содержимого в цитоплазму. Наиболее важными нуклеиновыми кислотами ВВ являются миРНК — малые некодирующие РНК, способные к транс- и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем РНК-интерференции [32].

Физиологические и патологические роли внеклеточных везикул

ВВ несравненно лучше изучены относительно патологии, нежели физиологического потенциала. Их участие в многочисленных патологических процессах хорошо документировано, в то время как доказанных физиологических функций немного.

Исторически самая первая функция ВВ — это прокоагулянтная активность, и она лучше всего изучена

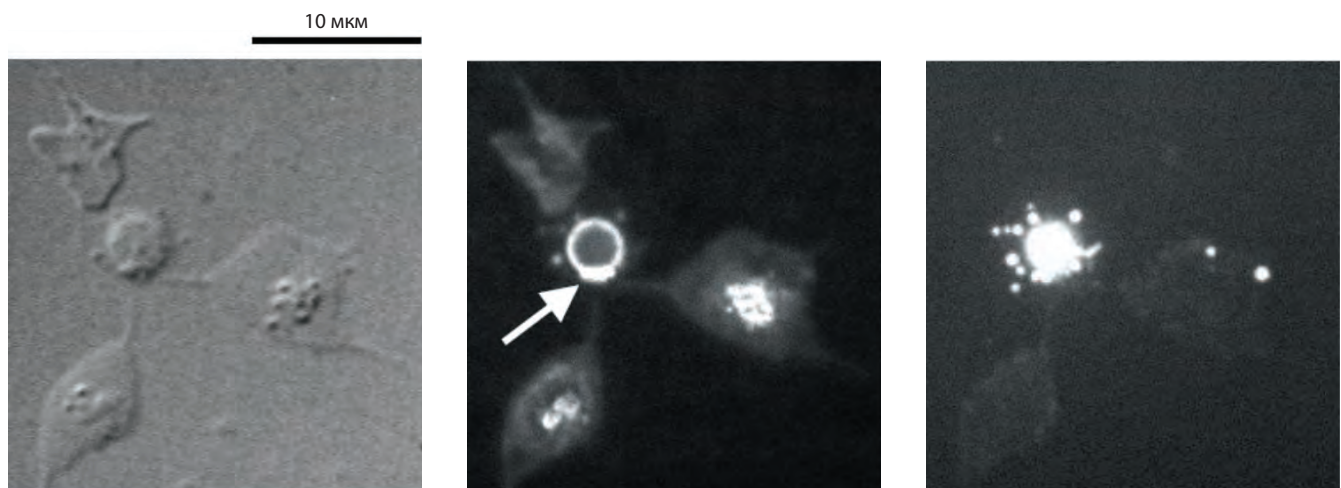


Рис. 6. Формирование микровезикул при активации тромбоцитов (воспроизведено из [40]). На микрофотографии показаны 4 тромбоцита после активации: слева — в дифференциальном интерференционном контрасте (ДИК), в центре — конфокальная микроскопия с окраской антителом против интегринов (общий маркер тромбоцитов), справа — с окраской аннексином V. Можно увидеть, что один тромбоцит стал прокоагулянтным и окружен россыпью микровезикул

Fig. 6. Formation of microvesicles during activation of platelets (reproduced from [40]). Microphotograph shows 4 platelets after activation: left — in differential interferential contrast, center — confocal microscopy with staining by antibodies against integrins (general platelet marker), right — with staining by annexin V. One of the platelets became procoagulating and is surrounded by a scattering of microvesicles

для микровезикул плазмы крови. Присутствующий в их мембранах фосфатидилсерин не просто ускоряет мембранные реакции свертывания по аналогии с клетками. В силу плохо понятных пока причин микровезикулы связывают белки свертывания в 50–100 раз лучше, чем наиболее сильно активированные тромбоциты [14]. В результате одна маленькая микровезикула по способности ускорять основные реакции свертывания крови сопоставима с полноценным тромбоцитом. При этом во время активации тромбоцитов сильными стимуляторами [33–36] или во время иных процессов [37, 38] (в частности, при хранении тромбоконцентратов [39]) идет интенсивная везикуляция: свыше десятка везикул образуется на один прокагулянтный тромбоцит (рис. 6) [40]. В результате легко может случиться, что вклад тромбоцитарных микровезикул в ускорение реакций свертывания будет выше вклада самих тромбоцитов.

Прокагулянтная активность ВВ плазмы крови не ограничивается пассивным ускорением реакций свертывания. Циркулирующие микровезикулы могут нести на себе активные долгоживущие факторы свертывания, такие как IXa, XIa или XIIa [11]. Тромбоцитарные и эритроцитарные микровезикулы напрямую активируют свертывание крови по контактному пути [41], в то время как моноцитарные микровезикулы несут тканевый фактор и активируют по пути внешнему [31].

Какую роль это все играет в норме и в патологии? Для здорового организма ответ пока неопределенный. Ускорение реакций свертывания циркулирующими микровезикулами здоровых доноров достаточно заметно, равно как и вклад микровезикул, генерируемых при активации тромбоцитов *in vitro*. Однако прямых доказательств их вклада *in vivo* пока нет. Еще меньше информации о возможном значении активации свертывания микровезикулами в норме.

У пациентов наблюдается повышение концентрации ВВ, в том числе несущих активные факторы и активирующих свертывание, при самых различных заболеваниях, состояниях и процедурах: инсульте, травмах, онкологических заболеваниях, химиотерапии, беременности [31]. Однако при этом нет ответа на принципиальный вопрос — тромботические осложнения вызывают эти ВВ, или они являются их следствием?

Два других варианта биологического действия ВВ (запуск путей сигнализации при контакте с клеточными рецепторами и регуляция экспрессии генов через мРНК) стоит рассматривать в связке, так как они часто соседствуют и с трудом отделимы друг от друга. Как и в случае со свертыванием, физиологические функции ВВ пока недостаточно понятны. Исторически первой является демонстрация способности простасом регулировать мобильность сперматозоидов [42]. В ряде недавних работ было обнаружено, что экзосомы могут нести на себе молекулы-морфогены,

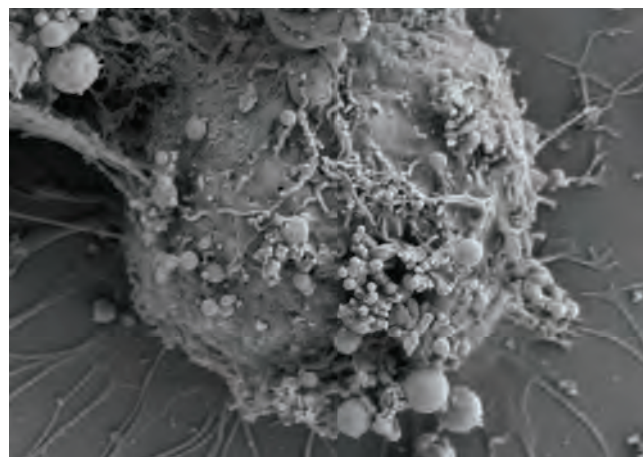


Рис. 7. Поверхность циркулирующей опухолевой клетки с большим количеством отщепляющихся микровезикул (воспроизведено из [46]). Сканирующая электронная микроскопия

Fig. 7. Surface of a circulating tumor cell with a large number of separating microvesicles (reproduced from [46]). Scanning electron microscopy

такие как секретируемые белки Wnt, управляющие дифференциацией клеток в процессе развития и формированием биологических структур [43]. Для клеток нервной системы показано значение ВВ в регуляции формирования миелиновой оболочки [44]. ВВ внеклеточного матрикса служат узловыми точками в процессах биоминерализации [45]. Обсуждается возможное участие ВВ в регуляции иммунитета путем обмена сигналами между клетками, вплоть до антиген-презентирования [30], так как не все сигнальные молекулы могут далеко двигаться в плазме крови и не все клетки легко мобильны.

Напротив, роль ВВ в патологических процессах проявляется ярко и считается надежно установленной. Это особенно касается нарушений иммунитета и онкологических заболеваний, при которых формирование ВВ происходит особо бурно (рис. 7).

ВВ способны переносить разнообразные рецепторы (например, тромбоцитарные интегрины) на поверхность раковых клеток путем слияния с ними, индуцировать активацию киназных каскадов (например, путей митоген-активируемой протеинкиназной сигнализации и протеинкиназы В), стимулировать экспрессию металлопротеиназ матрикса и сосудистого эндотелиального фактора роста, подавлять апоптоз, вызывать хемотаксис и способствовать появлению метастазов, а также развитию множественной лекарственной устойчивости (путем переноса одних мембранных молекул или индукции экспрессии других) [47]. Сейчас эта область исследований бурно развивается.

Применение внеклеточных везикул в фармакологии, диагностике и терапии

В настоящее время ВВ в медицине рассматриваются во всех возможных качествах — как биомаркеры, потенциальные лекарственные средства, носители лекарств, мишени терапии. Использование ВВ в каче-

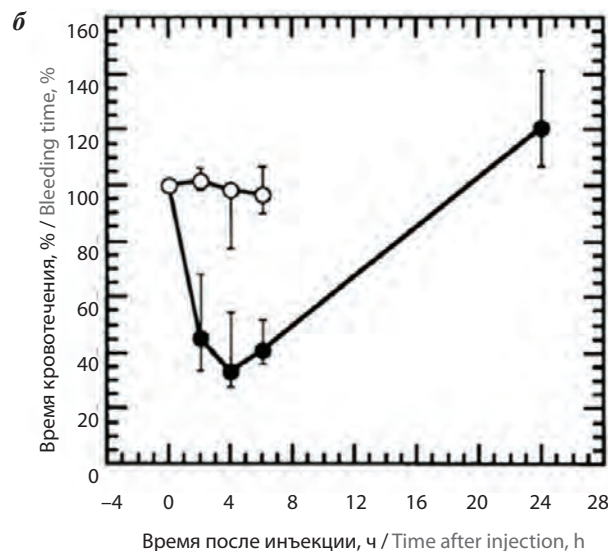
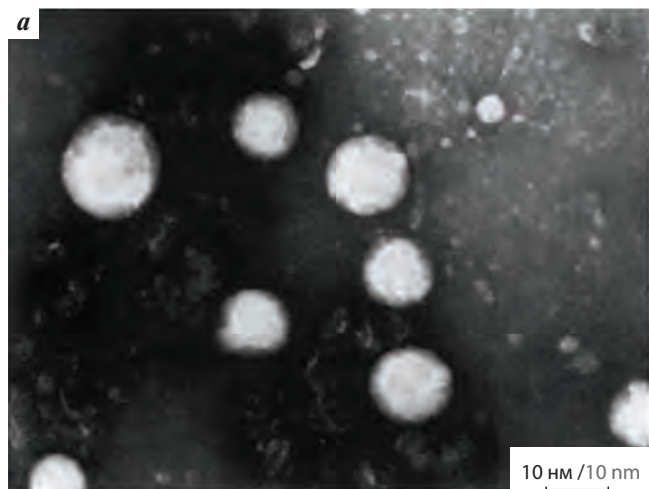


Рис. 8. «Искусственные тромбоциты» на основе микровезикул (воспроизведено из [50]): слева — негативно окрашенная трансмиссионная электронная микрофотография (масштаб 100 нм), справа — сокращение времени кровотечения при добавлении лиофилизированных восстановленных тромбоцитарных микровезикул (черный) по сравнению с контролем (белый)

Fig. 8. “Artificial platelets” based on microvesicles (reproduced from [50]): left — negative staining transmission electron microphotography (scale 100 nm), right — decrease in bleeding time after addition of lyophilized recovered platelet microvesicles (black) compared to control (white)

стве биомаркеров тромботических рисков, онкологических нарушений и иммунных реакций на данный момент является единственным из этих вариантов, который вышел из стадии разработки. Несмотря на все сложности, связанные с воспроизводимой детекцией ВВ, они успешно используются для прогнозирования тромбозов при широком круге нарушений [31]. ВВ определенных типов можно применять для избирательной детекции в конкретных случаях: так, эндотелиальные микровезикулы успешно показали себя как прогностический маркер развития острой реакции «трансплантат против хозяина» при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [48]. Другой пример — анализ профиля мРНК в циркулирующих ВВ пациентов с острым лимфобластным лейкозом, позволяющий различить подтипы заболевания [49]: предварительные исследования показали, что ВВ из клеток Т-клеточного и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза обладают принципиально разным профилем мРНК. Аналогичные исследования сейчас проводятся для широкого круга онкологических и онкогематологических заболеваний, так как микровезикулы плазмы или сыворотки представляют собой очень привлекательный вариант «жидкой биопсии». Так, в феврале 2017 г. появилась работа, посвященная исследованию мРНК-155 (не-кодирующего транскрипта гена кластера интеграции В-клеток) в ряде гематологических заболеваний: она резко повышена при хроническом лимфоцитарном лейкозе, ангиомиолипоме и макроглобулинемии Вальденстрема.

Сами по себе ВВ могут в ряде ситуаций быть потенциально полезны. Одна из интересных попыток их применения — создание на их основе «искусственных тромбоцитов» для того, чтобы заменить тромбоконцентраты в заместительной терапии. Поскольку

тромбоцитарные микровезикулы несут те же самые белки и обладают той же прокоагулянтной активностью, потенциально они способны быть гемостатически эффективны. Метод получения и лиофилизации таких везикул для переливания был впервые успешно разработан одной из биотехнологических компаний в США в конце 1990-х гг. [50]. Они действительно сохраняли частичную функциональность; первые испытания на животных и первые фазы клинических испытаний показали их способность сокращать время кровотечения (рис. 8). По статусу на 2003 г. тромбоцитарные микрочастицы Cyprlex находились в III фазе клинических испытаний. После этого разработку приостановили, и только несколько лет назад один из авторов поведал о ее судьбе [51]. По его словам, исследование затормозилось из-за редкости кровотечений тромбоцитарной природы, затрудняющей надежное доказательство эффективности.

Везикулы мезенхимальных стволовых клеток могут использоваться для подавления роста опухоли и ускорения регенерации [52]. Еще один пример — использование микровезикул в иммунотерапии рака, например, для генерации естественных киллеров при лечении острого миелобластного лейкоза [53]. В обоих этих случаях ВВ дают интересные возможности, как и терапия мезенхимальными стволовыми клетками, и иммунотерапия рака — новые и сложные подходы, сопряженные с многочисленными проблемами.

Взаимодействие ВВ с их клетками-мишенями не только является источником проблем, но и может быть выигрышно — например, его логично использовать для направленной доставки лекарств. Эти подходы пока на стадии испытаний на животных [54].

Наконец, механизмы формирования разных типов ВВ в разных клетках организма в зависимости от типа

стимуляции или в ходе жизнедеятельности постепенно проявляются. Для некоторых из этих механизмов уже существуют ингибиторы, и формирование

некоторых микровезикул сейчас рассматривается как мишень для терапии при онкологических и аутоиммунных заболеваниях [55].

Работа авторов поддержана Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий», грантами Президента РФ МД-229.2017.4, МК-2706.2017.4, МК-9245.2016.4 и МК-5879.2016.4, а также грантами РФФИ 17-04-01309, 16-04-01163, 16-04-00125, 16-34-00651 и 16-34-01342.

This work was supported by the «Basic Research for Development of Biomedical Technologies» Program for Basic Research of the RAS Presidium, grants of the President of the Russian Federation MD-229.2017.4, MK-2706.2017.4, MK-9245.2016.4, and MK-5879.2016.4, as well as grants of the Russian Foundation for Basic Research 17-04-01309, 16-04-01163, 16-04-00125, 16-34-00651, and 16-34-01342.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269–88. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x. PMID: 6025241.
2. Pantelev M.A., Dashkevich N.M., Ataulakhanov F.I. Hemostasis and thrombosis beyond biochemistry: roles of geometry, flow and diffusion. *Thromb Res* 2015;136:699–711. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.07.025. PMID: 26278966.
3. Pantelev M.A., Saenko E.L., Ananyeva N.M., Ataulakhanov F.I. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa. *Biochem J* 2004;381:779–94. DOI: 10.1042/BJ20031748. PMID: 15104540.
4. Podoplelova N.A., Sveshnikova A.N., Kotova Y.N. et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood* 2016;128:1745–55. DOI: 10.1182/blood-2016-02-696898. PMID: 27432876.
5. Pantelev M.A., Ananyeva N.M., Greco N.J. et al. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex. *J Thromb Haemost* 2005;3:2545–53. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01616.x. PMID: 16241952.
6. Abaeva A.A., Canault M., Kotova Y.N. et al. Procoagulant platelets form an alpha-granule protein-covered “cap” on their surface that promotes their attachment to aggregates. *J Biol Chem* 2013;288:29621–32. DOI: 10.1074/jbc.M113.474163. PMID: 23995838.
7. Hargett L.A., Bauer N.N. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication. *Pulm Circ* 2013;3:329–40. DOI: 10.4103/2045-8932.114760. PMID: 24015332.
8. Ferru E., Pantaleo A., Carta F. et al. Thalassemic erythrocytes release microparticles loaded with hemichromes by redox activation of p72Syk kinase. *Haematologica* 2014;99:570–8. DOI: 10.3324/haematol.2013.084533. PMID: 24038029.
9. Melki I., Tessandier N., Zufferey A., Boilard E. Platelet microparticles in health and disease. *Platelets* 2017;19:1–8. DOI: 10.1080/09537104.2016.1265924. PMID: 28102737.
10. Herring J.M., McMichael M.A., Smith S.A. Microparticles in health and disease. *J Vet Intern Med* 2013;27:1020–33. DOI: 10.1111/jvim.12128. PMID: 24038029.
11. Dostert G., Mesure B., Menu P., Velot E. How Do Mesenchymal Stem Cells Influence or Are Influenced by Microenvironment through Extracellular Vesicles Communication? *Front Cell Dev Biol* 2017;5:6. DOI: 10.3389/fcell.2017.00006. PMID: 28224125.
12. Tamir A., Sorrentino S., Motahedeh S. et al. The macromolecular architecture of platelet-derived microparticles. *J Struct Biol* 2016;193:181–7. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.12.013. PMID: 26767592.
13. Lipets E., Vlasova O., Urnova E. et al. Circulating contact-pathway-activating microparticles together with factors IXa and XIa induce spontaneous clotting in plasma of hematology and cardiologic patients. *PLoS One* 2014;9:e87692. DOI: 10.1371/journal.pone.0087692. PMID: 24498168.
14. Sinauridze E.I., Kireev D.A., Popenko N.Y. et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 2007;97:425–34. DOI: 10.1160/TH06-06-0313. PMID: 17334510.
15. Cocucci E., Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol* 2015;25:364–72. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.01.004.
16. Raposo G., Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013;200(4):373–83. DOI: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871.
17. Arraud N., Linares R., Tan S. et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* 2014;12:614–27. DOI: 10.1111/jth.12554. PMID: 24618123.
18. Sarkar S., Dasgupta A.K. Microparticle of drug and nanoparticle: a biosynthetic route. *Pharmacol Res Perspect* 2015;3:e00188. DOI: 10.1002/prp2.188. PMID: 26516592.
19. Loyer X., Vion A.C., Tedgui A., Boulanger C.M. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res* 2014;114:345–53. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300858. PMID: 24436430.
20. Schindler S.M., Little J.P., Klegeris A. Microparticles: a new perspective in central nervous system disorders. *Biomed Res Int* 2014;2014:756327. DOI: 10.1155/2014/756327. PMID: 24860829.
21. Agouni A., Andriantsitohaina R., Martinez M.C. Microparticles as biomarkers of vascular dysfunction in metabolic syndrome and its individual components. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12:483–92. PMID: 24846237.
22. Gonzalez E., Falcon-Perez J.M. Cell-derived extracellular vesicles as a platform

- to identify low-invasive disease biomarkers. *Expert Rev Mol Diag* 2015;15:907–23. DOI: 10.1586/14737159.2015.1043272. PMID: 25948243.
23. Royo F., Falcon-Perez J.M. Liver extracellular vesicles in health and disease. *J Extracell Vesicles* 2012;11:1. DOI: 10.3402/jev.v1i0.18825. PMID: 24009882.
24. Aharon A., Brenner B. Placenta-derived microparticles. *Thromb Res* 2013;131(1):22–4. DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70014-8. PMID: 23452734.
25. Shapiro I.M., Landis W.J., Risbud M.V. Matrix vesicles: Are they anchored exosomes? *Bone* 2015;79:29–36. DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.013. PMID: 25980744.
26. Cui L., Houston D.A., Farquharson C., MacRae V.E. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone* 2016;87:147–58. DOI: 10.1016/j.bone.2016.04.007. PMID: 27072517.
27. Westerman M., Porter J.B. Red blood cell-derived microparticles: An overview. *Blood Cells Mol Dis* 2016;59:134–9. DOI: 10.1016/j.bcmd.2016.04.003. PMID: 27282583.
28. Halim A.T., Ariffin N.A., Azlan M. Review: the Multiple Roles of Monocytic Microparticles. *Inflammation* 2016;39:1277–84. DOI: 10.1007/s10753-016-0381-8.
29. Curtis A.M., Edelberg J., Jonas R. et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med* 2013;18:204–14. DOI: 10.1177/1358863X13499773. PMID: 23892447.
30. Hwang I. Cell-cell communication via extracellular membrane vesicles and its role in the immune response. *Mol Cells* 2013;36:105–11. DOI: 10.1007/s10059-013-0154-2. PMID: 23807045.
31. Nomura S., Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care* 2015;3(1):2. DOI: 10.1186/s40560-014-0066-z. PMID: 25705427.
32. Redzic J.S., Balaj L., van der Vós K.E., Breakefield X.O. Extracellular RNA mediates and marks cancer progression. *Semin Cancer Biol* 2014;28:14–23. DOI: 10.1016/j.semcancer.2014.04.010. PMID: 24783980.
33. Obydenyy S.I., Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. Dynamics of calcium spiking, mitochondrial collapse and phosphatidylserine exposure in platelet subpopulations during activation. *J Thromb Haemost* 2016;14:1867–81. DOI: 10.1111/jth.13395. PMID: 27343487.
34. Sveshnikova A.N., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. Compartmentalized calcium signaling triggers subpopulation formation upon platelet activation through PAR1. *Mol Biosyst* 2015;11:1052–60. DOI: 10.1039/c4mb00067d. PMID: 25627921.
35. Shakhidzhanov S.S., Shaturny V.I., Pantelev M.A., Sveshnikova A.N. Modulation and pre-amplification of PAR1 signaling by ADP acting via the P2Y12 receptor during platelet subpopulation formation. *Biochim Biophys Acta* 2015;1850:2518–29. DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.09.013. PMID: 26391841.
36. Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Pantelev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. *J Thromb Haemost* 2008;6:1603–5. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03052.x. PMID: 18541002.
37. Topalov N.N., Yakimenko A.O., Canault M. et al. Two types of procoagulant platelets are formed upon physiological activation and are controlled by integrin alpha(IIb)beta(3). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2475–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.253765. PMID: 22837472.
38. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation. *Br J Haematol* 2012;157:105–15. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.09021.x. PMID: 23379894.
39. Ignatova A.A., Karpova O.V., Trakhtman P.E. et al. Functional characteristics and clinical effectiveness of platelet concentrates treated with riboflavin and ultraviolet light in plasma and in platelet additive solution. *Vox Sang* 2016;110:244–52. DOI: 10.1111/vox.12364. PMID: 26646605.
40. Artemenko E.O., Yakimenko A.O., Pichugin A.V. et al. Calpain-controlled detachment of major glycoproteins from the cytoskeleton regulates adhesive properties of activated phosphatidylserine-positive platelets. *Biochem J* 2016;473:435–48. DOI: 10.1042/BJ20150779. PMID: 26607836.
41. Zakharova N.V., Artemenko E.O., Podoplelova N.A. et al. Platelet surface-associated activation and secretion-mediated inhibition of coagulation factor XII. *PLoS One* 2015;10: e0116665. DOI: 10.1371/journal.pone.0116665. PMID: 25688860.
42. Stegmayr B., Ronquist G. Promotive effect on human sperm progressive motility by prostasomes. *Urol Res* 1982;10:253–7. PMID: 6219486.
43. Gross J.C., Chaudhary V., Bartscherer K., Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol* 2012;14:1036–45. DOI: 10.1038/ncb2574. PMID: 22983114.
44. Bakhti M., Winter C., Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem* 2011;286:787–96. DOI: 10.1074/jbc.M110.190009. PMID: 20978131.
45. Anderson H.C., Garimella R., Tague S.E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 2005;10:822–37. PMID: 15569622.
46. Stott Sh., Breakefield X., Nahed B. Exosomes and circulating vesicles as biomarkers. The Center for Surgery, Innovation & Bioengineering. Available at: <http://cfsib.com/bioengineering/exosomes/>
47. Zmigrodzka M., Guzera M., Miskiewicz A. et al. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumour Biol* 2016;37:14391–401. DOI: 10.1007/s13277-016-5358-6. PMID: 27629289.
48. Pihusch V., Rank A., Steber R. et al. Endothelial cell-derived microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Transplantation* 2006;81:1405–9. DOI: 10.1097/01.tp.0000209218.24916.ba. PMID: 16732177.
49. Li W.Y., Chen X.M., Xiong W. et al. Detection of microvesicle miRNA expression in ALL subtypes and analysis of their functional roles. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2014;34:640–5. DOI: 10.1007/s11596-014-1330-0. PMID: 25318871.
50. Chao F.C., Kim B.K., Houranieh A.M. et al. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion* 1996;36:536–42. PMID: 8669086.
51. Nasiri S. Infusible platelet membrane as a platelet substitute for transfusion: an overview. *Blood Transfus* 2013;11:337–42. DOI: 10.2450/2013.0209-12. PMID: 23736926.
52. Akyurekli C., Le Y., Richardson R.B. et al. A systematic review of preclinical studies on the therapeutic potential of mesenchymal stromal cell-derived microvesicles. *Stem Cell Rev* 2015;11:150–60. DOI: 10.1007/s12015-014-9545-9. PMID: 25091427.
53. Oyer J.L., Igarashi R.Y., Kulikowski A.R. et al. Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(4):632–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.12.037. PMID: 25576425.
54. Tang K., Zhang Y., Zhang H. et al. Delivery of chemotherapeutic drugs in tumour cell-derived microparticles. *Nat Commun* 2012;3:1282. DOI: 10.1038/ncomms2282. PMID: 23250412.
55. Nielsen C.T., Rasmussen N.S., Heegaard N.H., Jacobsen S. “Kill” the messenger: Targeting of cell-derived microparticles in lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 2016;15:719–25. DOI: 10.1016/j.autrev.2016.03.009. PMID: 26970484.

Особенности морфологии и иммунофенотипа опухолевых клеток лимфомы из клеток маргинальной зоны селезенки (исследование с помощью клеточного биочипа)

А.Н. Хвастунова^{1,2}, Л.С. Аль-Ради³, О.С. Федянина^{1,2}, У.Л. Джулакян³, Н.М. Капранов^{2,3},
А.О. Закирова^{1,2}, С.А. Луговская⁴, Е.В. Наумова⁴, Ф.И. Атауллаханов^{1,2}, С.А. Кузнецова^{1,2}

¹Лаборатория биофизики ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4а;

⁴ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Алина Николаевна Хвастунова alina_shunina@mail.ru

В работе исследованы морфология и иммунофенотип циркулирующих опухолевых клеток, выделенных из периферической крови 22 пациентов с лимфомой из клеток маргинальной зоны селезенки, и показана их морфологическая и иммунофенотипическая гетерогенность. С помощью клеточного биочипа показано, что опухолевые клетки положительны по CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %), поверхностному IgM (73 %), CD38 (23 %), CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %), и полученные иммунофенотипы подтверждены результатами проточной цитометрии для каждого из пациентов. Высокая плотность связывания лимфоцитов на клеточном биочипе по сравнению с мазком позволяет выявить клетки с патологической морфологией даже при глубокой лейкопении.

Ключевые слова: клеточный биочип, лимфома из клеток маргинальной зоны селезенки, морфологический анализ, иммунофенотип, маркеры CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-71-77

Determination of morphology and immunophenotype of circulating lymphoma cells in patients with splenic marginal zone lymphoma using an anti-CD antibody microarray

A.N. Khvastunova^{1,2}, L.S. Al-Radi³, O.S. Fedyanina^{1,2}, U.L. Julhakyan³, N.M. Kapranov^{2,3},
A.O. Zakirova^{1,2}, S.A. Lugovskaya⁴, E.V. Naumova⁴, F.I. Ataulakhonov^{1,2}, S.A. Kuznetsova^{1,2}

¹Laboratory of Biophysics, National Scientific and Practical Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

²Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology RAS; 4 Kosygina St., Moscow 119991, Russia;

³Hematological Research Center; 4A, Noviy Zykovsky Proezd, Moscow, Russia, 125167

⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Bild. 1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia

We have studied the morphology and immunophenotype of circulating tumor cells isolated from peripheral blood of 22 patients with splenic marginal zone lymphoma and show that both of them are highly heterogeneous. Using a cell-binding microarray we have demonstrated that the circulating lymphoma cells are positive for CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %), surface IgM (73 %), CD38 (23 %), CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %) and these immunophenotypes are confirmed in all cases by flow cytometry. Higher surface density of lymphocyte binding onto anti-CD antibody microarray spots compared to blood smears permits to find circulating lymphoma cells even in leukopenic patients.

Key words: anti-CD antibody microarray, splenic marginal zone lymphoma, morphology, immunophenotype, CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103

Введение

Лимфома из В-клеток маргинальной зоны селезенки (ЛКМЗС) составляет около 1 % всех лимфоидных опухолей. Впервые это заболевание было описано R.A. Hickling в 1961 г. и G. Duhamel и соавт. в 1978 г. В 1982 г. А.И. Воробьев и М.Д. Бриллиант выделили ЛКМЗС как самостоятельную нозологическую фор-

му [1]. Заболевание чаще всего возникает у больных в возрасте старше 50 лет и характеризуется опухолевой пролиферацией В-лимфоцитов в зародышевых центрах белой пульпы селезенки. Ведущими симптомами являются выраженная спленомегалия и поражение костного мозга и крови без вовлечения перифериче-

ских лимфатических узлов. У 50 % больных ЛКМЗС в периферической крови наблюдаются умеренная анемия, тромбоцитопения и лейкоцитоз, редко превышающий $25 \times 10^9/\text{л}$ [2].

Обычно опухолевые клетки представлены атипичными лимфоцитами среднего и большого размера, имеющими округлое ядро, часто с вмятинами, расщепленное, с глыбчатой или сглаженной структурой хроматина, возможно, с наличием ядрышек. Цитоплазма этих клеток широкая, голубого цвета с перинуклеарным просветлением, может иметь тонкие короткие выросты, часто локализованные на одном из полюсов клетки, или широкие выпячивания цитоплазмы на противоположных полюсах клетки [2–4]. В цитоплазме может наблюдаться вакуолизация. Если в крови более 20 % лимфоцитов имеют выросты цитоплазмы, то речь идет о ЛКМЗС с ворсинчатыми клетками [2]. Однако наличие лимфоцитов с выростами цитоплазмы свойственно также волосатоклеточному лейкозу (ВКЛ), его вариантной форме ВКЛ-В [5, 6] и мелкоклеточной лимфоме из клеток красной пульпы селезенки (ЛКПС) [7–10].

Для опухолевых клеток ЛКМЗС характерна экспрессия поверхностных иммуноглобулинов (Ig) классов IgM⁺, IgD^{+/–}, экспрессия маркеров CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD24⁺, CD79a⁺, FMC7⁺ [2, 11–13]. Как правило, опухолевые клетки не экспрессируют CD5, CD10, CD23, CD43 и CD103 [11]. Активационные

маркеры CD25 и CD38 либо не экспрессируются, либо определяются в небольшом числе клеток [12]. Может встречаться экспрессия маркера CD5 (у 12–50 % пациентов, по данным F. Berger и соавт. [11]). Известны случаи, когда опухолевые клетки экспрессировали маркер CD103 [14], CD23 (в 10–31 % случаев) [11], а в работе E. Matutes и соавт. [12] указано, что экспрессия CD11c может встречаться в 50 % случаев и более.

Таким образом, необходимо отличать ЛКМЗС от хронического В-клеточного лимфолейкоза (В-ХЛЛ), лимфомы из клеток мантийной зоны, ВКЛ и ВКЛ-В, ЛКПС и др. Морфологическое и иммунофенотипическое сходство ЛКМЗС с указанными лимфопролиферативными заболеваниями, протекающими с преимущественной спленомегалией, создает трудности в ее диагностике.

Ранее мы показали, что клеточный биочип дает заметное преимущество в диагностике гемобластозов, сопровождающихся лейкопенией [15, 16]. На биочипе достигается высокая, по сравнению с мазком, поверхностная концентрация клеток (рис. 1в), что дает возможность обнаружить даже редкие опухолевые клетки. Кроме того, биочип позволяет «сортировать» клетки по их поверхностным антигенам (рис. 1а, б), благодаря чему можно провести корреляцию морфологии опухолевых клеток с иммунофенотипом (рис. 1е) [15, 16]. Таким образом, биочип оказывается чрезвычайно

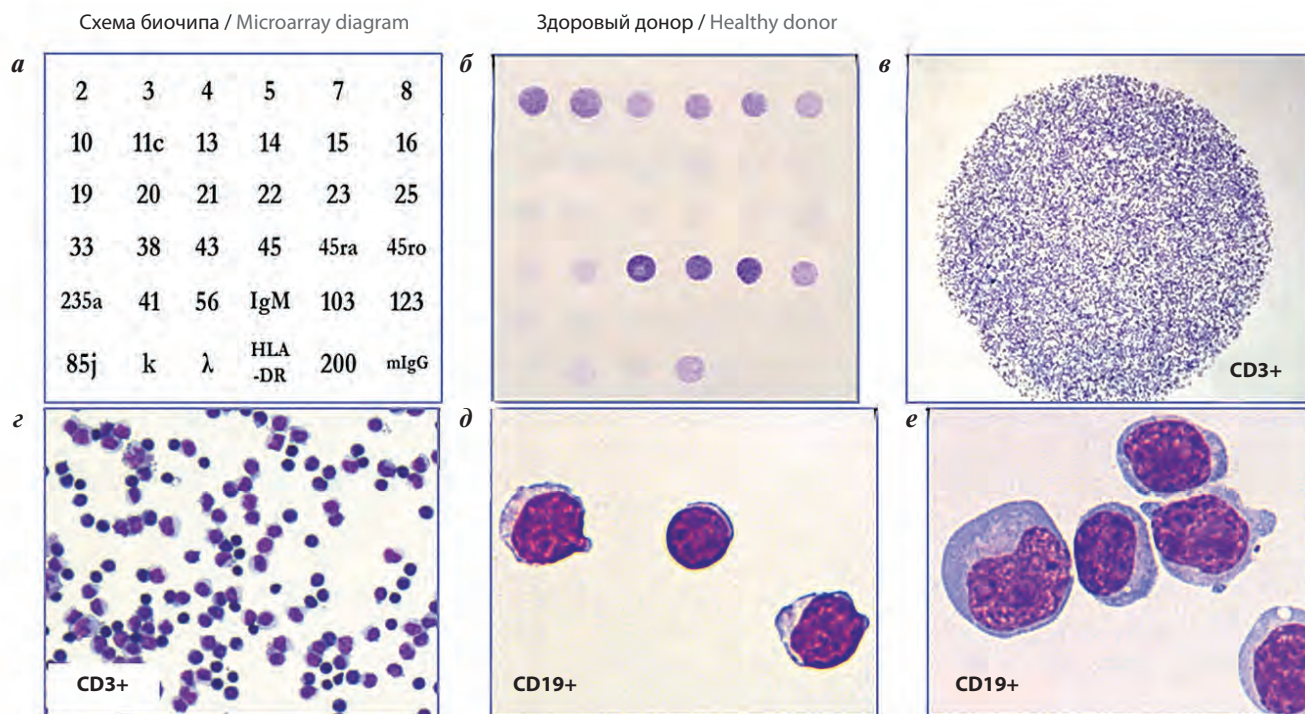


Рис. 1. Принцип работы биочипа: а – схема расположения пятен антител на биочипе; б – биочип со связавшимися мононуклеарами периферической крови здорового донора; в, г – морфология клеток, связавшихся с иммобилизованным антителом к CD3, при $\times 40$ (в), $\times 200$ (г); д, е – морфология клеток, связавшихся с антителами к CD19 (при $\times 1000$), у здорового донора (д), у пациента с лимфомой из В-клеток маргинальной зоны селезенки (е). Окрасивание по Паппенгейму

Fig. 1. Microarray design: а – diagram of antibody spots on the microarray; б – microarray with bound peripheral blood mononuclear cells of a healthy donor; в, г – morphology of cells bound to immobilized CD3 antibodies at magnification $\times 40$ (в), $\times 200$ (г); д, е – morphology of cells bound to CD19 antibodies (at $\times 1000$), in a healthy donor (д), in patient with splenic marginal zone lymphoma (е). Papanicolaou stain

удобным инструментом для исследования опухолевой популяции клеток, имеющей определенный иммунофенотип, а следовательно, и для проведения дифференциальной диагностики заболеваний со схожей морфологией опухолевых клеток.

Цель данной экспериментальной исследовательской работы — детальное изучение морфологических характеристик и иммунофенотипа опухолевых клеток при ЛКМЗС с помощью разработанного в нашей группе клеточного биочипа.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе лаборатории биофизики на базе ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава России. Исследование с помощью биочипа выполняли А.Н. Хвастунова, С.А. Кузнецова, О.С. Федянина, Н.М. Капранов, А.О. Закирова, Ф.И. Атауллаханов и С.А. Кузнецова — руководители работы.

Кровь пациентов поступила из ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России при участии врачей Л.С. Аль-Ради и У.Л. Джулакяна.

Иммунофенотипы опухолевых лимфоцитов всех исследованных пациентов подтверждены результатами проточной цитометрии, которые предоставили С.А. Луговская и Е.В. Наумова (ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России).

Пациенты. В работе исследованы образцы периферической крови 22 пациентов с диагнозом ЛКМЗС. Медиана возраста больных составила 64 года (51–78 лет). Наблюдалось преобладание лиц женского пола с соотношением 1 : 2. Во всех случаях были выявлены спленомегалия, лимфоцитоз. Лейкопения встречалась в 2/3 случаев, медиана количества лейкоцитов в общем анализе крови составляла $7,3 \times 10^9/\text{л}$ (с разбросом от $2 \times 10^9/\text{л}$ до $28 \times 10^9/\text{л}$).

Анализ лимфоцитов с помощью клеточного биочипа.

Клеточный биочип — прозрачная пластиковая подложка размером 22×22 мм из пластифицированного поливинилхлорида (Fisher Scientific, США), на которой иммобилизованы антитела к следующим CD-антигенам лейкоцитов: CD2, CD3, CD5, CD7, CD10, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD38, CD45, CD56 (ООО «Сорбент», Москва), CD4, CD8, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD25, CD33, CD41a, CD43, CD45RA, CD45R0, CD64, CD85j, CD103, CD123, CD200, CD235a, HLA-DR, IgM, κ и λ легким цепям Ig, а также смесь мышиных IgG (eBioscience, США) (см. рис. 1а).

Биочип инкубировался 30 мин при 4°C с суспензией моноклеарных клеток, полученной путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 из периферической крови: 5×10^6 клеток/мл в фосфатном буфере (PBS) с 1 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 20 % эмбриональной телячьей сыворотки. Лимфоциты, несущие опре-

деленный поверхностный антиген, связывались с иммобилизованными на биочипе антителами. Далее биочип отмывали от неспецифически связавшихся клеток, высушивали и окрашивали по Паппенгейму (см. рис. 1б).

Морфологическое исследование клеток проводили с помощью микроскопа Olympus BX45 с фотокамерой SP10.0238 Moticam 1300. При этом исследовали от 200 до 500 клеток, связавшихся с каждым из антител, иммобилизованных на биочипе.

Определение иммунофенотипа клеток с патологической морфологией. Поскольку маркер CD19 присутствует на поверхности всех В-лимфоцитов, то клетки, связавшиеся с антителом к CD19, представляли собой чистую популяцию В-клеток, значительно обогащенную опухолевыми лимфоцитами. Поэтому морфологическое исследование опухолевых клеток и определение размера опухолевой популяции проводили для лимфоцитов, связавшихся на биочипе с анти-CD19. Опухолевые клетки считали положительными по маркеру CDx, если плотность клеток с патологической морфологией, связавшихся с анти-CDx, превышала 75 % от плотности данных клеток на анти-CD19. Клональность определяли по связыванию опухолевых клеток с антителами к легким κ - и λ -цепям Ig.

Результаты и обсуждение

Морфологические характеристики опухолевых клеток. В периферической крови всех 22 пациентов с ЛКМЗС были обнаружены опухолевые клетки в количестве от 22 до 96 % (медиана 66 %) от всех лимфоцитов.

У 11 пациентов (50 %) морфология опухолевых клеток была представлена лимфоцитами малых и средних размеров диаметром 8–12 мкм, со зрелой глыбчатой или сглаженной структурой хроматина, округлой или овальной формой ядра (рис. 2а, б), а также пролимфоцитами, которые составляли от 6 до 25 % от всех В-клеток. У других 11 пациентов (50 %) опухолевые клетки имели морфологию широкоплазменных лимфоцитов диаметром 12–18 мкм, с округлой или овальной формой ядра, рыхлой или сглаженной структурой хроматина, светло-голубой цитоплазмой и перинуклеарным просветлением (рис. 2в, г).

У 5 пациентов (23 %) были также обнаружены клетки с фестончатым краем цитоплазмы (рис. 2д) или с короткими цитоплазматическими выростами или выпячиваниями, часто расположенными неравномерно по контуру клетки (рис. 2е). Данная морфология клеток больше характерна для ВКЛ, ВКЛ-В или ЛК-ПС. Однако ворсинчатые клетки были обнаружены в небольшом количестве (от 6 до 33 % всех CD19⁺ В-лимфоцитов), и только у 2 из 5 пациентов они были найдены среди клеток, связавшихся с антителами к CD11c, CD25.

У 9 пациентов (41 %) примерно в трети опухолевых клеток (медиана 30 %) отмечена вакуолизация цитоплазмы (см. рис. 2з).

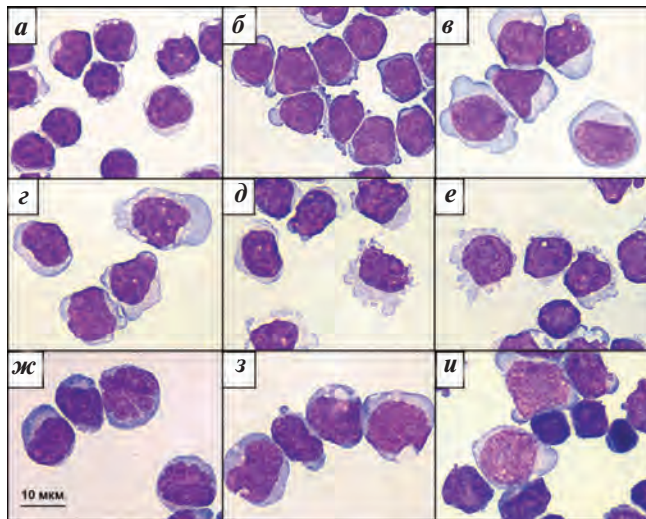


Рис. 2. Морфологические варианты опухолевых клеток, связавшихся в пятнах биочипа анти-CD19 при лимфоме из В-клеток маргинальной зоны селезенки. Окрасивание по Паппенгейму, $\times 1000$: а – малые зрелые лимфоциты (пациент К.); б – средние лимфоциты с гомогенной структурой хроматина (пациент В.); в – широкоплазменные лимфоциты с перинуклеарным просветлением и сглаженной структурой хроматина (пациент О.); г – лимфоциты с вакуолизированной цитоплазмой (пациент С.); д – лимфоцит с фестончатым краем цитоплазмы среди лимфоцитов (пациент А.); е – лимфоциты с закругленными отростками цитоплазмы (пациент М.); ж – широкоплазменные лимфоциты с перинуклеарным просветлением, сглаженной структурой хроматина, трещинами в ядре (пациент П.); з – широкоплазменные лимфоциты с одиночными ядрышками в ядре (пациент Р.); и – зрелые лимфоциты малых размеров, пролимфоциты и опухолевые лимфоциты с широкой цитоплазмой, волокнистым хроматином и крупными светлыми округлыми ядрышками (пациент Ш.)

Fig. 2. Morphological variants of tumor cells bound to anti-CD19 microarray spots in splenic marginal zone lymphoma. Papanheim stain, $\times 1000$: а – small mature lymphocytes (patient K.); б – intermediate-size lymphocytes with homogenous structure of chromatin (patient V.); в – mononuclear lymphocytes with clear perinuclear area and smoothed chromatin structure (patient O.); г – lymphocytes with vesicularized cytoplasm (patient S.); д – lymphocyte with scalloped cytoplasm margin among other lymphocytes (patient A.); е – lymphocytes with rounded cytoplasm projections (patient M.); ж – mononuclear lymphocytes with clear perinuclear area, smoothed chromatin structure, cracks in the nucleus (patient P.); з – mononuclear lymphocytes with solitary nucleoli in the nucleus (patient R.); и – small mature lymphocytes, prolymphocytes and tumor lymphocytes with wide cytoplasm, fibrous chromatin, and large light rounded nucleoli (patient Sh.)

У 7 пациентов (32 %) в среднем в 20 % CD19⁺ клеток визуализировалось 1 округлое ядрышко (рис. 2з), и у 2 из этих пациентов среди циркулирующих опухолевых клеток присутствовали лимфоциты с базофильной цитоплазмой, волокнистым или в виде толстых нитей хроматином и крупными светлыми округлыми ядрышками (от 1 до 4 в ядре) (рис. 2и). У 2 пациентов наблюдались клетки с омоложенной, бластоподобной структурой хроматина. Среди клеток, содержащих четкие, видимые ядрышки, встречались двоядерные лимфоциты, клетки с дольчатой, бобовидной, гантелевидной формой ядра или с тонкими расщелинами в ядре (рис. 2жс).

В целом данные о морфологической разнородности опухолевых клеток при ЛКМЗС на биочипе

хорошо согласуются с литературой [3, 17, 18]. Использование клеточного биочипа значительно упрощает поиск опухолевых клеток за счет их концентрирования в пятнах антител, облегчая подсчет и морфологический анализ.

Иммунофенотип опухолевых клеток. В работе была использована достаточно широкая панель антител, включающая в себя антитела к В- и Т-клеточным маркерам и маркерам, используемым при дифференциальной диагностике ЛКМЗС: CD5, CD11c, CD23, CD25, CD103 и др. (см. рис. 1а). Иммунофенотип клеток с патологической морфологией определяли на биочипе по их присутствию в пятнах соответствующих антител.

Результаты исследования особенностей иммунофенотипа опухолевых лимфоцитов представлены в таблице. Во всех 22 случаях ЛКМЗС опухолевые клетки экспрессировали CD19 (100 %), CD20 (100 %), CD22 (100 %) и были отрицательны по CD2, CD10, CD123, у части пациентов было показано связывание опухолевых клеток с анти-IgM (73 %), анти-CD38 (23 %). При определении клональности соотношение к и λ клонов составило 55 и 45 % соответственно. У некоторых пациентов было обнаружено связывание опухолевых клеток с антителами к CD5 (9 %), CD11c (36 %), CD103 (5 %), CD25 (32 %), CD23 (23 %). Иммунофенотипы опухолевых клеток всех пациентов с ЛКМЗС, полученные при исследовании на клеточном биочипе, включая aberrantную экспрессию маркеров, были подтверждены результатами проточной цитометрии.

Экспрессия маркера CD5 является типичной для В-ХЛЛ и лимфомы из клеток мантийной зоны. Тем не менее она может встречаться и при ЛКМЗС с частотой от 12 до 50 % случаев, по данным различных исследований [5, 11]. В некоторых наблюдениях наличие CD5 коррелировало с плохим прогнозом, таким как бластная трансформация [21], резистентность к терапии [22] и присутствие делеции в коротком плече хромосомы 17 [23]. В некоторых случаях сообщалось о коэкспрессии CD5, CD23 и CD43 в опухолевых клетках при ЛКМЗС, что имитирует классический иммунофенотип опухоли при В-ХЛЛ [11].

В нашей работе опухолевые клетки, положительные по CD5, были найдены у 2 пациентов. Приведем данные исследования одной из них.

Большая Ш., 52 года, с ЛКМЗС с трансформацией в диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому с вовлечением висцеральных и периферических лимфоузлов, костного мозга с лейкокемизацией. Общий анализ крови: гемоглобин – 148 г/л, эритроциты – 5×10^{12} /л, тромбоциты – 344×10^9 /л, лейкоциты – 20×10^9 /л, лимфоидные клетки – 50 %. В периферической крови популяция опухолевых В-клеток с иммунофенотипом CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD25⁺, CD38⁺, CD11c⁺, CD23⁺, CD103⁺ составляла 88 %. Клеточный состав был

полиморфен. Наряду со зрелыми лимфоцитами малых размеров и пролимфоцитами присутствовало 20 % клеток с омоложенным хроматином бластоподобной структуры (см. рис. 2и).

L. Baseggio и соавт. показали, что пациенты с CD5⁺-опухолевыми клетками составляют подгруппу ЛКМЗС с более высоким лимфоцитозом и большим количеством клональных В-лимфоцитов в периферической крови [24]. Циркулирующий в периферической крови субстрат опухоли у данной подгруппы пациентов морфологически разнороден и представлен малыми лимфоцитами, центроцитоподобными и лимфоплазмацитоидными клетками, лимфоцитами с короткими выростами цитоплазмы на одном из полюсов клетки и крупными лимфоцитами с широкой бледно окрашенной цитоплазмой и омоложенным хроматином (схожие с показанными на рис. 2в, з) [24], что хорошо согласуется с нашими данными. Клетки с ядрышками, обнаруженные у пациентки Ш. (см. рис. 2и), в работе L. Baseggio и соавт. [24] не были обнаружены.

В нашем исследовании антигены CD10 и CD123 не были выявлены ни у одного из пациентов. В литературе описаны единичные случаи CD10⁺ ЛКМЗС [11] и показано, что при ЛКМЗС опухолевые клетки могут быть положительными по CD123 менее чем в 25 % случаев, но всегда с низким уровнем экспрессии [5, 25].

Ранее было показано, что маркер CD11с всегда присутствует на опухолевых клетках при ВКЛ и ВКЛ-В [3, 5], в большинстве случаев (до 50 %) — при ЛКМЗС [12, 19] и изредка экспрессируется на поверхности опухолевых клеток при В-ХЛЛ и лимфоме из клеток мантийной зоны [26]. В нашей работе у 36 % пациентов с ЛКМЗС опухолевые клетки экспрессировали CD11с. Одновременное связывание опухолевых клеток с антителами к CD11с и CD103 не наблюдалось ни у одного из пациентов.

Маркер CD23, как правило, используется в дифференциальной диагностике В-ХЛЛ с лимфомой из клеток мантийной зоны, но при ЛКМЗС опухолевые клетки также могут экспрессировать данный антиген в 10–31 % случаев [11, 12], что коррелирует с отсутствием del7q31 [27]. В данном исследовании опухолевые клетки CD23⁺ были найдены в 23 % случаев (у 5 пациентов из 22), что хорошо согласуется с данными F. Berger и соавт. и E. Matutes и соавт. [11, 12].

При ЛКМЗС с ворсинчатыми лимфоцитами экспрессия маркеров CD23 и CD11с является взаимоисключающей, что было показано D. Treton и соавт. [28]. В нашем исследовании также ни у одного из пациентов опухолевые клетки не связывались одновременно с антителами к CD23 и CD11с.

В публикациях показано, что антиген CD25 всегда обнаруживают на поверхности опухолевых клеток при ВКЛ и никогда при ВКЛ-В [3, 5] или ЛКПС [7, 10], а при ЛКМЗС маркер CD25 выявляется в 25 % случаев [12]. В данном исследовании экспрессия CD25

на опухолевых клетках при ЛКМЗС была обнаружена в 32 % (7/22) случаев, что хорошо согласуется с результатами E. Matutes и соавт. [12].

По данным литературы, CD38 экспрессируется на поверхности опухолевых клеток при ЛКМЗС в 22–30 % случаев [5, 12], и его наличие на опухолевых клетках характеризует подгруппу ЛКМЗС с более агрессивным течением [29]. Среди исследованных нами пациентов маркер CD38 на опухолевых клетках встречался с частотой 23 % (5/22).

CD103 является высокоспецифичным маркером типичной формы ВКЛ и в меньшей степени — ВКЛ-В [3, 5, 14, 26], но может встречаться и при других лимфопрлиферативных заболеваниях [14]. По данным литературы [12, 20], экспрессия CD103 на опухолевых клетках обнаружена у 15 и 40 % пациентов с ЛКМЗС соответственно. В нашем исследовании экспрессия CD103 на опухолевых клетках присутствовала у 1 из 22 пациентов.

Заключение

Морфологические особенности циркулирующих опухолевых клеток при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки до сих пор изучены мало, прежде всего в связи с невысокой частотой данного заболевания и низкой концентрацией опухолевых клеток в периферической крови. Хотя все источники указывают на морфологическую разнородность опухолевых клеток при ЛКМЗС, подробное описание

Частота выявления иммунофенотипов опухолевых лимфоцитов при лимфоме из клеток маргинальной зоны селезенки по данным собственного исследования и литературных публикаций [5, 11, 12, 19, 20]

Frequency of identification of tumor lymphocyte immunophenotypes from splenic marginal zone lymphoma according to our data and literature [5, 11, 12, 19, 20]

Маркер Marker	Собственные данные, % (n/N) Authors' data, % (n/N)	Данные публика- ций, % Literature data, %
CD19	100 (22/22)	100
CD20	100 (22/22)	89–100
CD22	100 (22/22)	100
CD11c	36 (8/22)	50–67
CD103	5 (1/22)	15–40
CD123	0 (0/18)	0–25
CD5	9 (2/22)	12–50
CD10	0 (0/22)	0
CD23	23 (5/22)	10–38
CD38	23 (5/22)	22–30
CD25	32 (7/22)	22–25

возможных морфологических типов клеток при данном заболевании в литературе не встречается, что может затруднить диагностику ЛКМЗС [30]. Наиболее полное сравнительное описание морфологии и иммунофенотипа циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС, ВКЛ и ВКЛ-В содержится в работе Н. Shao и соавт. [5], однако в нее включены лишь 6 пациентов с ЛКМЗС. Использование клеточного биочипа, сортирующего клетки по поверхностным CD-антигенам, позволяет исследовать чистую популяцию В-лимфоцитов и получить более подробную картину морфологического разнообразия циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС. Выделенные в данной работе морфологические варианты циркулирующих опухолевых клеток при ЛКМЗС в целом

хорошо согласуются с данными других авторов [5, 24]. Полученные результаты по иммунофенотипу опухолевых клеток во всех случаях совпадают с результатами проточной цитометрии и хорошо соответствуют литературным данным (см. таблицу).

Инфильтрация костного мозга опухолевыми лимфоцитами и присутствие в периферической крови циркулирующих опухолевых клеток наблюдается практически у всех пациентов с ЛКМЗС на момент постановки диагноза [31]. Исследование лимфоцитов периферической крови с помощью биочипа позволяет обнаружить опухолевые клетки при ЛКМЗС, определить их иммунофенотип и выявить aberrantную экспрессию маркеров на их поверхности, что облегчает дифференциальную диагностику ЛКМЗС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Воробьев А.И., Бриллиант М.Д. Лимфоцитома селезенки и классификация лимфоцитом. *Терапевтический архив* 1982;8:8–14. [Vorob'ev A.I., Brilliant M.D. Spleen lymphocytoma and Lymphocytomas classification. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Therapeutic Archive* 1982;8:8–14. (In Russ.)].
2. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас. М. – Тверь: Триада, 2011. [Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E. *Hematologic Atlas*. Moscow – Tver: Triada, 2011 (In Russ.)].
3. Bain B.J. *Leukemia Diagnosis*. 4th Ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010.
4. Julhakyen U., Magomedova A., Kravchenko S. et al. Splenic marginal zone lymphoma: characteristics and treatment. *Haematologica* 2011;96(S2):393–4.
5. Shao H., Calvo K.R., Grönberg M. et al. Distinguishing hairy cell leukemia variant from hairy cell leukemia: Development and validation of diagnostic criteria. *Leuk Res* 2013;37:401–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2012.11.021. PMID: 23347903.
6. Robak T. Hairy-cell leukemia variant: recent view on diagnosis, biology and treatment. *Cancer Treat Rev* 2011;37(1):3–10. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.05.003. PMID: 20558005.
7. Traverse-Glehen A., Baseggio L., Callet-Bauchu E. et al. Splenic red pulp lymphoma with numerous basophilic villous lymphocytes: a distinct clinicopathologic and molecular entity? *Blood* 2008;111:2253–60. DOI: 10.1182/blood-2007-07-098848. PMID: 18042795.
8. Ковригина А.М., Коржова С.М., Аль-Ради Л.С. и др. Патоморфологическая диагностика диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):287–95. [Kovrigina A.M., Korzhova S.M., Al-Radi L.S. et al. *Pathomorphological diagnosis of splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma*. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Oncohematology* 2016;9(3):287–95. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-287-295.
9. Аль-Ради Л.С., Моисеева Т.Н., Джулакян У.Л. и др. Опыт изучения лимфомы красной пульпы селезенки. *Терапевтический архив* 2016;88(2):78–80. [Al-Radi L.S., Moiseeva T.N., Julhakyen U.L. et al. Experience in investigating splenic red pulp lymphoma. *Terapevticheskiy Arkhiv* = *Therapeutic Archive* 2016;88(2):78–80. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/terarkh201688453-60. PMID: 27070164.
10. Julhakyen H.L., Al-Radi L.S., Moiseeva T.N. et al. A single-center experience in splenic diffuse red pulp lymphoma diagnosis. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk* 2016;16 (S1):166–9. DOI: 10.1016/j.clml.2016.03.011. PMID: 27131623.
11. Berger F., Felman P., Thieblemont C. et al. Non-MALT marginal zone B-cell lymphomas: a description of clinical presentation and outcome in 124 patients. *Blood* 2000;95(6):1950–6. PMID: 10706860.
12. Matutes E., Morilla R., Owusu-Ankomah K. et al. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994;83(6):1558–62. PMID: 8123845.
13. Джулакян У.Л., Гриншпун Л.Д. Селезеночная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфоцитомы селезенки) у пожилых пациентов: клиника, диагностика, лечение. В кн.: *Гериатрическая гематология. Заболевания системы крови в старших возрастных группах*. Т. 2. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивника. М.: Медиум, 2012. С. 237–44. [Julhakyen U.L., Grinshpun L.D. Splenic lymphoma from marginal zone cells (spleen lymphocytoma) in elderly patients: symptoms, diagnosis, treatment. In: *Geriatric hematology. Blood diseases in elderly patients*. Eds.: L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. Moscow: Medium, 2012. Vol. 2. Pp. 237–44. (In Russ.)].
14. Dong H.Y., Weisberger J., Liu Z. et al. Immunophenotypic analysis of CD103+ B-lymphoproliferative disorders: hairy cell leukemia and its mimics. *Am J Clin Pathol* 2009;131(4):586–95. DOI: 10.1309/AJCLP13YDUHFKPJU. PMID: 19289595.
15. Khvastunova A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S. et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep* 2015;5:12573. DOI: 10.1038/srep12573. PMID: 26212756.
16. Хвастунова А.Н., Аль-Ради Л.С., Капранов Н.М. и др. Использование клеточного биочипа в диагностике волосатоклеточного лейкоза. *Онкогематология* 2015;1:37–45. [Khvastunova A.N., Al-Radi L.S., Kapranov N.M. et al. Cell-binding microarray application in diagnosis of hairy cell leukemia. *Onkogematologiya* = *Oncohematology* 2015;1:37–45. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-1-37-45.
17. Thieblemont C., Felman P., Callet-Bauchu E. et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol* 2003;4:95–103.

- DOI: 10.1016/S1470-2045(03)00981-1.
PMID: 12573351.
18. Oscier D., Owen R., Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood Rev* 2005;19:39–51.
DOI: 10.1016/j.blre.2004.03.002.
PMID: 15572216.
19. Kost C., Holden J., Mann K. Marginal zone B-cell lymphoma: A retrospective immunophenotypic analysis. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74B(5):282–6.
DOI: 10.1002/cyto.b.20426.
PMID: 18500740.
20. Ocio E., Hernandez J.M., Mateo G. et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin Lymphoma* 2005;5(4):241–5. PMID: 15794856.
21. Kuwayama M., Machii T., Yamaguchi M. et al. Blastic transformation of splenic lymphoma with villous lymphocytes after a well-controlled chronic phase of more than 10 years. *Int J Hematol* 2000;71(2):167–71.
PMID: 10745627.
22. Giannouli S., Paterakis G., Ziakas P.D. et al. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 2004;89(1):113–4.
PMID: 14754618.
23. Gimeno E., Salido M., Solé F. et al. CD5 negative and CD5 positive splenic marginal B-cell lymphomas have differential cytogenetic patterns. *Leuk Res* 2005;29(8):981–2.
DOI: 10.1016/j.leukres.2005.02.001.
PMID: 15978952.
24. Baseggio L., Traverse-Glehen A., Petinataud F. et al. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 2010;95(4):604–12.
DOI: 10.3324/haematol.2009.011049.
PMID: 20015887.
25. Venkataraman G., Aguhar C., Kreitman R.J. et al. Characteristic CD103 and CD123 Expression Pattern Defines Hairy Cell Leukemia Usefulness of CD123 and CD103 in the Diagnosis of Mature B-Cell Lymphoproliferative Disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136:625–30.
DOI: 10.1309/AJCPKUM9J4IXCWEU.
PMID: 21917686.
26. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. John Wiley & Sons, 2011.
27. Boonstra R., Bosga-Bouwer A., van Imhoff G.W. et al. Splenic marginal zone lymphomas presenting with splenomegaly and typical immunophenotype are characterized by allelic loss in 7q31–32. *Mod Pathol* 2003;16(12):1210–17.
DOI: 10.1097/01.MP.0000095895.19756.77.
PMID: 14681321.
28. Treton D., Valensi F., Troussard X. et al. Cytokine response of B lymphocytes from splenic lymphoma with villous lymphocytes: correlation with TNF-RII (p75) and CD11c expression. *Hematol Cell Ther* 1996;38(4):345–52.
PMID: 8891726.
29. Ruiz-Ballesteros E., Mollejo M., Rodriguez A. et al. Splenic marginal zone lymphoma. Proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 2005;106(5):1831–8.
DOI: 10.1182/blood-2004-10-3898.
PMID: 15914563.
30. Sorigue M., Juncà J., Gassiot S. et al. A case of splenic marginal zone lymphoma with mismatched morphology and phenotype, karyotype and clinical course. *Ann Hematol Oncol* 2015;2(1):id1016. Available at: <http://austinpublishinggroup.com/hematology/fulltext/hematology-v2-id1016.php>.
31. Piris M.A., Onaindia A., Mollejo M. Splenic marginal zone lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2017;30(1–2):56–64.
DOI: 10.1016/j.beha.2016.09.005.

Дифференциальная диагностика тромбоцитопений

А.Л. Меликян, Е.И. Пустовая, Е.К. Егорова, М.В. Калинина, Т.И. Колошейнова,
И.Н. Суборцева, Е.А. Гилязитдинова, В.Н. Двирнык

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

Контакты: Анаит Леоновна Меликян anoblood@mail.ru

В статье представлен систематизированный диагностический подход при тромбоцитопении, а также результаты внедрения в гематологическую практику протокола дифференциальной диагностики тромбоцитопений у взрослых пациентов.

Среди 183 пациентов, впервые обратившихся в ФГБУ ГНЦ по поводу тромбоцитопении неуточненного генеза, диагноз первичной иммунной тромбоцитопении (ИТП) был установлен только у 48 % пациентов, у 52 % тромбоцитопения была симптомом другой патологии (соотношение составило 1 : 1). В результате повторного обследования 118 пациентов с многолетним анамнезом ИТП при рецидиве заболевания диагноз был подтвержден в 85 % случаев, в 15 % диагноз ИТП был изменен на другую нозологию.

Полученные результаты показывают, что для установления истинных причин тромбоцитопении необходимо проведение расширенного диагностического поиска согласно протоколу, представленному в настоящей работе.

Дифференциальную диагностику для разграничения первичной иммунной и вторичных тромбоцитопений следует проводить не только в дебюте заболевания, но и при рецидиве уже установленной ранее ИТП.

Ключевые слова: тромбоцитопения, первичная иммунная тромбоцитопения, вторичная иммунная тромбоцитопения, протокол дифференциальной диагностики тромбоцитопений

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-78-87

Differential diagnosis of thrombocytopenes

A.L. Melikyan, E.I. Pustovaya, E.K. Egorova, M.V. Kalinina, T.I. Kolosheynova, I.N. Subortseva, E.A. Gilyazitdinova, V.N. Dvirnyk
Hematological Research Center; 4A Noviy Zykovsky Proezd, Moscow 125167, Russia

The article presents a systematic diagnostic approach for thrombocytopenia, as well as the results of practical implementation of thrombocytopenia diagnostic protocol in adult patients. Among 183 patients first admitted to HRC with unspecified origin thrombocytopenia, primary immune thrombocytopenia (ITP) was established only in 48 % of patients, while in 52 % of cases it was a symptom of another pathology (the ratio was 1 : 1). As a result of re-examination of 118 relapse patients with long-term history of ITP diagnosis was confirmed in 85 % of cases, in 15 % the diagnosis has been changed to a different nosology.

The results show that to establish the true causes of thrombocytopenia is necessary to conduct an extensive diagnostic search according to presented protocol.

Differential diagnosis between primary immune and secondary thrombocytopenia should be carried out not only in the onset of the disease, but also in the relapse of an earlier established ITP.

Key words: thrombocytopenia, primary immune thrombocytopenia, secondary immune thrombocytopenia, protocol of thrombocytopenia differential diagnosis

Введение

Тромбоцитопения является часто встречающимся гематологическим симптомом при различных патологиях, отличающихся как патогенетически, так и клинически, что требует проведения расширенного диагностического поиска. Установление истинных причин тромбоцитопении имеет важное значение, поскольку тактика ведения больных может существенно различаться. Международная рабочая группа на Консенсусной конференции в 2008 г. с учетом того, что тромбоцитопения в основном развивается по иммунному механизму, предложила классифицировать иммунную тромбоцитопению (ИТП) как первичную и вторичную. Было также предложено идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, или болезнь Верльгофа,

обозначать как первичную ИТП, а термин «тромбоцитопения» употреблять при количестве тромбоцитов менее $100,0 \times 10^9/\text{л}$ [1, 2].

Первичная ИТП является аутоиммунным заболеванием, характеризующимся изолированной тромбоцитопенией (количеством тромбоцитов в периферической крови менее $100 \times 10^9/\text{л}$), при отсутствии других причин или нарушений, которые могут быть связаны с тромбоцитопенией.

Вторичная ИТП является симптомом других аутоиммунных заболеваний: системной красной волчанки (СКВ), антифосфолипидного синдрома (АФС), ревматоидного артрита и др. По данным литературы, соотношение первичной и вторичных тромбоцитопений составляет 80 к 20 %, однако выявление новых

причин снижения количества тромбоцитов может переводить пациентов из группы первичной в группу вторичных тромбоцитопений [3].

В Международной классификации болезней 10-го пересмотра заболевания, протекающие с тромбоцитопенией, представлены следующими кодами: D69.3 — идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП), D69.4 — тромбоцитопения, D69.5 — вторичная тромбоцитопения, D69.6 — тромбоцитопения неуточненная.

Патогенез иммунной тромбоцитопении

Иммунная реакция, лежащая в основе развития тромбоцитопений, является сложным многоступенчатым циклическим процессом, в котором принимают участие В-лимфоциты, Т-лимфоциты, НК-клетки, макрофаги, цитокины. Антитромбоцитарные антитела ускоряют клиренс тромбоцитов из циркуляции. Связывание антител с тромбоцитами приводит к опосредованному рецептором $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$) разрушению тромбоцитов фагоцитами [4].

У пациентов с ИТП вырабатываются главным образом IgG_1 -аутоантитела против гликопротеинов GPIIb/IIIa или GPIb/IX поверхности тромбоцитов [5–7]. Возможна выработка антител других подклассов IgG , комплементфиксирующих IgM и реже IgA к иным гликопротеинам или их комплексам, таким как Ib-IX-V, Ia/IIa, IV или VI. Поскольку мегакариоциты экспрессируют гликопротеин IIb/IIIa, Ib и другие антигены тромбоцитов, они также являются мишенью для аутоантител. Разрушение патологического комплекса антиген — антитело происходит не только путем его деструкции (опсонизации) в основном в селезенке, реже в печени, но также и путем цитотоксического и комплементзависимого лизиса. В формировании иммунного ответа при ИТП существенную роль играют Т-лимфоциты. Отмечается увеличение соотношения субпопуляций Th1/Th2 ($CD4^+$ -хелперы) и Tc1/Tc2 (цитотоксические $CD8^+$ клетки), наблюдается уменьшение числа регуляторных $CD4^+CD25^+$ Т-лимфоцитов, что демонстрирует дисбаланс Т-клеточного звена иммунного ответа [8, 9]. Последние исследования показали, что при ИТП увеличивается число других подтипов Т-клеток (Th17), секретирующих интерлейкины 17. Интересно, что многие характеристики иммунной дисрегуляции, описанные при ИТП, такие как изменение баланса Th1/Th2, повышение Th17 и изменение профилей Т-клеток, отмечаются и при других аутоиммунных заболеваниях [10–13].

Патогенетические механизмы вторичных тромбоцитопений более сложны, чем таковые первичной ИТП. Эта сложность обусловлена гетерогенностью тесно связанных иммунных нарушений. Они характеризуются образованием нескольких клонов антитромбоцитарных антител, так как аутоагрессия и нарушение иммунной регуляции первоначально происходят

вследствие основного заболевания пациента. В результате пациенты со вторичной тромбоцитопенией могут иметь перекрестные патогенетические механизмы.

Патогенез неиммунной тромбоцитопении

Неиммунные тромбоцитопении могут быть обусловлены 2 механизмами: повышенным потреблением тромбоцитов в результате спонтанной агрегации в терминальных артериолах и капиллярах, при заболеваниях, сопровождающихся повреждением эндотелия либо угнетением пролиферации клеток костного мозга вследствие медикаментозного, токсического или радиационного воздействия.

Неиммунные тромбоцитопении могут стимулировать и запускать иммунные механизмы в результате образования антитромбоцитарных или антимидаментозных антител. В таких случаях патогенез тромбоцитопении носит сочетанный характер.

Вторичные тромбоцитопении

Механизмы развития вторичных тромбоцитопений разнообразны и могут быть обусловлены как врожденными дефектами (наследственные тромбоцитопатии), так и приобретенной патологией.

В клинической практике нередко встречается и так называемая ложная, *псевдотромбоцитопения*, возникающая за счет формирования тромбоцитарных агрегатов в мазке при контакте с консервантом. Аггезия тромбоцитов под действием зависимых от этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) антитромбоцитарных антител — распространенная причина псевдотромбоцитопении. Она наблюдается приблизительно у 1 взрослого здорового человека из 1000 и не ассоциирована с кровотечениями или тромбозами. При заборе крови в пробирки с цитратом у пациентов наблюдается нормальное количество тромбоцитов. Подобная тактика забора крови помогает избежать выполнения ненужных дополнительных исследований у данной группы пациентов.

Наследственные тромбоцитопении характеризуются не только снижением числа тромбоцитов, но и их врожденной дисфункцией. С современных позиций данные патологии относятся к тромбоцитопатиям, которые сопровождаются тромбоцитопенией. К таким заболеваниям относятся тромбастения Гланцмана, синдром Бернара—Сулье, синдром «серых» тромбоцитов, синдром Вискотта—Олдрича, аномалия Мая—Хегглина. Отдельно выделена врожденная амегакариоцитемия и анемия Фанкони.

Приобретенные тромбоцитопении могут быть обусловлены разными механизмами.

Ко *вторичным неиммунным приобретенным тромбоцитопениям* относится тромбоцитопения потребления при синдроме диссеминированного внутрисосудистого свертывания, тромботической тромбоцитопенической пурпуре (болезни Мошковица),

гемолитико-уремическом синдроме, тромботических микроангиопатиях на фоне заболеваний, сопровождающихся повреждением эндотелия (атеросклероз сосудов, аневризмы, пороки сердца, стентирование сосудов, сахарный диабет). Данные патологии характеризуются образованием внутрисосудистых тромбов, окклюзией сосудов и повышенной деструкцией тромбоцитов.

Два менее распространенных варианта — это секвестрация тромбоцитов и гемодилюция. Секвестрация тромбоцитов встречается при застойной спленомегалии в связи с портальной гипертензией и характеризуется их перераспределением из пула циркулирующих тромбоцитов в пользу селезеночного пула. Гемодилюция наблюдается у пациентов, перенесших массивную кровопотерю и получавших инфузионную терапию коллоидами, кристаллоидами и другими средами, не содержащими тромбоциты.

Вторичные иммунные приобретенные тромбоцитопении могут встречаться при таких заболеваниях, как СКВ, АФС, ревматоидный артрит, при других коллагенозах, аутоиммунном тиреоидите, лимфопролиферативных заболеваниях, лекарственно-индуцированной тромбоцитопении, герпес-вирусных инфекциях, хронических вирусных гепатитах, инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), посттрансфузионной пурпуре.

Отдельно выделяют **приобретенные тромбоцитопении вследствие нарушения продукции тромбоцитов**. Типичными примерами недостаточной продукции тромбоцитов являются апластическая анемия за счет жировой инфильтрации костного мозга, миелодиспластический синдром вследствие дисмегакариопоэза, острый лейкоз, хронические миело- и лимфопролиферативные заболевания, метастатическое поражение костного мозга при злокачественных опухолях (сужение плацдарма мегакариоцитарного ростка пролиферирующими клетками опухолевого субстрата), тромбоцитопения, индуцированная химио- и лучевой терапией, лекарственно-опосредованная реакция, токсическое воздействие (алкоголь и др.).

Диагностический подход к больным с тромбоцитопениями

Тромбоцитопения как симптом регистрируется при широком спектре заболеваний гематологической и негематологической природы, требующих проведения систематизированного диагностического поиска и структурированного подхода, который подразумевает сопоставление анамнестических и клинических показателей с результатами лабораторных исследований. Анализ данных литературы и наш многолетний опыт ведения пациентов с тромбоцитопениями позволили разработать протокол дифференциальной диагностики пациентов с тромбоцитопениями [14–19].

Протокол дифференциальной диагностики тромбоцитопении: анамнестические, клинические, лабораторные и инструментальные исследования и их клиническое значение

Анамнез. При тщательном изучении анамнеза пациента с тромбоцитопенией можно получить ценную информацию, которая в значительной степени облегчит постановку диагноза. Особое внимание следует обращать:

- на наличие семейного анамнеза тромбоцитопении (наследственная тромбоцитопения у взрослых диагностируется нередко);
- вариант течения тромбоцитопении или кровопотери (впервые выявленная, хроническая или рецидивирующая);
- сопутствующие заболевания, особенно аутоиммунные, инфекционные или опухолевые;
- недавнюю вакцинацию или применение лекарственных препаратов, недавние путешествия (опасны развитием таких заболеваний, как малярия, риккетсиоз, лихорадка Денге), недавние трансфузии, пересадку органов в анамнезе;
- употребление алкогольных и хининсодержащих напитков, особенности питания;
- факторы риска ретровирусных инфекций или вирусных гепатитов;
- наличие беременности для женщин в пременопаузе.

В случае, если в анамнезе отмечались рецидивирующие, клинически выраженные тромбоцитопении, при которых уровень тромбоцитов возвращался к норме в течение нескольких дней даже без специфического лечения, необходимо обследовать пациента на предмет лекарственно-индуцированной тромбоцитопении.

Объективный осмотр. Важными для диагностики тромбоцитопении безусловно являются проведение объективного осмотра кожных покровов и видимых слизистых оболочек, оценка геморрагического синдрома (тип, выраженность) по отношению к уровню тромбоцитов. У пациентов с тромбоцитопенией обычно наблюдается геморрагический синдром в виде петехий и экхимозов на коже и слизистых оболочках. Наличие внутрисуставных кровоизлияний или обширных кровоизлияний в мягкие ткани предполагает нарушение в коагуляционном звене гемостаза.

Объективное физикальное обследование, направленное на выявление патологии со стороны других органов и систем (спленомегалия, гепатомегалия, лимфаденопатия, патология молочных желез, сердца, легких, щитовидной железы), необходимо для определения тактики поиска причин тромбоцитопении.

Лабораторная диагностика. **Общий анализ крови** с обязательным оптическим подсчетом числа тромбоцитов (по Фонию), определением количества ретикулоцитов, оценкой морфологии тромбоцитов (микроформы и гигантские тромбоциты), эритроцитов, нейтрофилов, скорости оседания эритроцитов. Необ-

ходимо обращать внимание на наличие агрегатов тромбоцитов, в том числе для исключения ложной тромбоцитопении при заборе крови с использованием в качестве консерванта ЭДТА.

Цитологическое исследование мазка периферической крови. Исследование мазка периферической крови до сих пор остается наиболее важным диагностическим мероприятием при тромбоцитопении, так как правильная и тщательная оценка морфологии клеток всех 3 ростков кроветворения дает нужное направление дифференциально-диагностическому поиску, подробно описанному и представленному в виде алгоритма в статье R. Stasi [14] (рис. 1).

Важное диагностическое значение имеют размер тромбоцитов, характеристика их гранул. При тромбоцитопении, обусловленной повышенным разрушением клеток, наряду с тромбоцитами нормального размера часто наблюдаются микро- и макроформы.

Выявление однотипной фракции тромбоцитов большого размера предполагает наличие наследственной макротромбоцитопении. Большие тромбоциты серого цвета при окраске по Райту–Гимзе свидетельствуют о синдроме «серых» тромбоцитов, встречающихся при аутосомно-доминантной наследственной макротромбоцитопении со склонностью к кровоточивости по причине отсутствия или значительного снижения в тромбоцитах количества α -гранул.

При тромбоцитопении, обусловленной недостаточной продукцией, например, после химиотерапии, тромбоциты имеют нормальный размер. При миелодиспластическом синдроме тромбоциты различного размера (встречаются гигантские формы) и часто содержат мало гранул. При синдроме Вискотта–Олдрича и X-сцепленной тромбоцитопении, которые обусловлены мутациями гена *WAS*, регистрируются микроформы.

Тромбоцитопения нередко сопровождается онкогематологическими заболеваниями (лейкозы и лимфомы),

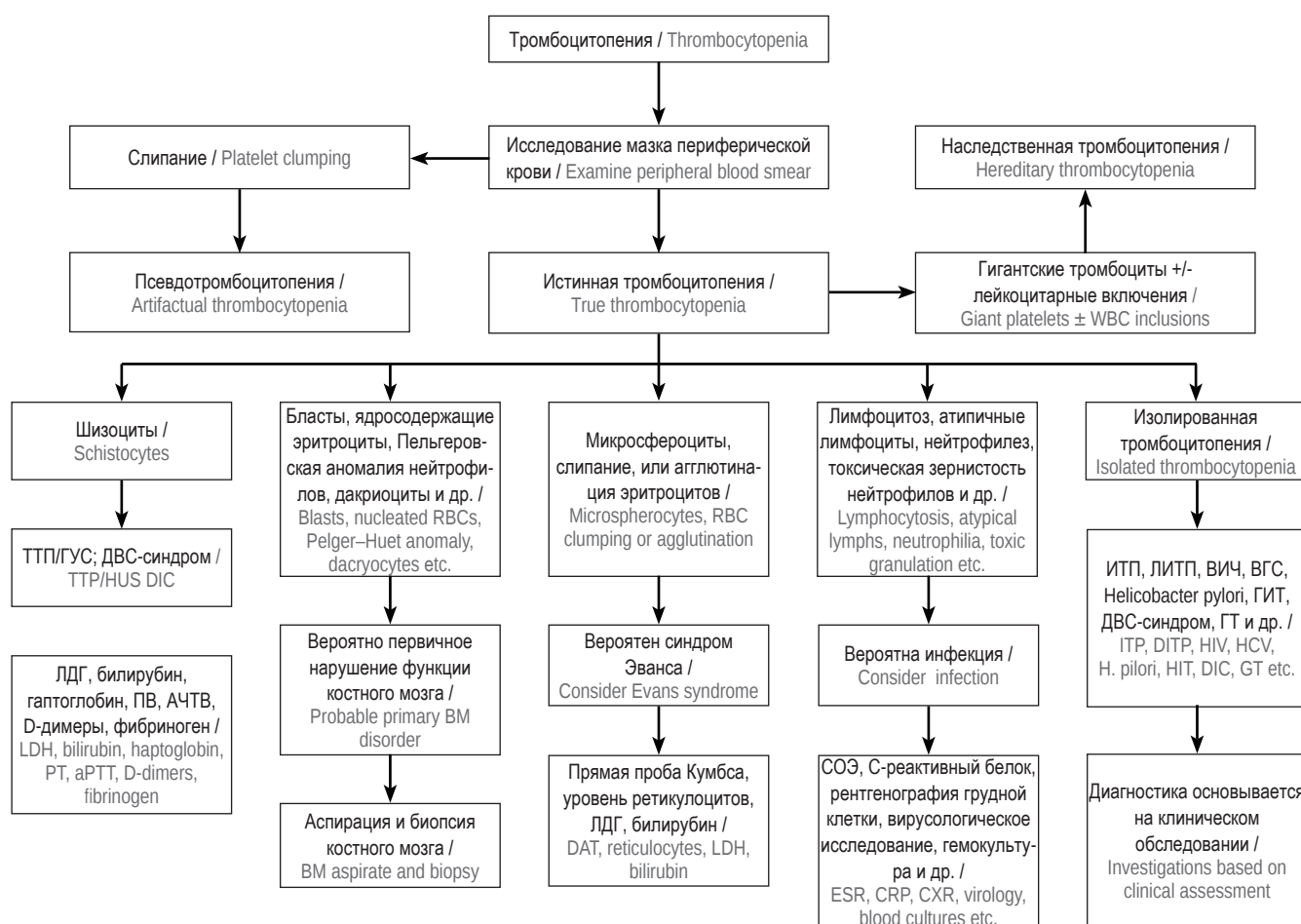


Рис. 1. Алгоритм диагностики пациентов на основании мазка периферической крови.

Сокращения: АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; ВГС — вирус гепатита С; ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ГИТ — гепарининдуцированная тромбоцитопения; ГУС — гемолитико-уремический синдром; ДВС — диссеминированное внутрисосудистое свертывание; ИТП — иммунная тромбоцитопения; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ЛИТП — лекарственная иммунная тромбоцитопения; ПВ — протромбиновое время; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; ТТП — тромботическая тромбоцитопеническая пурпура

Fig. 1. Algorithm of diagnostics based on peripheral blood smear.

Abbreviations: aPTT — activated partial thromboplastin time, HCV — hepatitis C virus, HIV — human immunodeficiency virus, HIT — heparin-induced thrombocytopenia, HUS — hemolytic-uremic syndrome, DIC — disseminated intravascular coagulation, ITP — immune thrombocytopenia, LDH — lactate dehydrogenase, DITP — drug-induced immune thrombocytopenia, PT — prothrombin time, ESR — erythrocyte sedimentation rate, TTP — thrombotic thrombocytopenic purpura

но при этом никогда не бывает единственной находкой. Необходимо обратить внимание на неспецифические отклонения от нормы в лейкоформуле (например, нейтрофилия, лимфоцитоз, лейкопения и др.), которые ассоциируются с тромбоцитопенией и встречаются при многих состояниях. Наличие гипосегментированных нейтрофилов (Пельгеровская аномалия) дает основание заподозрить миелодиспластический синдром, наличие темных грубых гранул (токсическая зернистость) в нейтрофилах — сепсис, атипичных лимфоцитов — вирусную инфекцию. Наличие лейкоцитарных включений (тельца Деле) и большого количества крупных тромбоцитов должно послужить основанием для тщательного исследования, чтобы исключить МУН9-зависимую врожденную макротромбоцитопению [20].

Фрагменты эритроцитов в мазках периферической крови (шизоциты) указывают на тромботическую микроангиопатию (тромботическая тромбоцитопеническая пурпура / гемолитико-уремический синдром) или синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания (коагулопатия потребления). Сочетание тромбоцитопении с микросфероцитозом предполагает синдром Эванса, может наблюдаться и при тромботических микроангиопатиях. Макроцитоз и гиперсегментированность нейтрофилов предполагает недостаточность витамина В₁₂ или фолиевой кислоты, наличие дакриоцитов — миелофиброз. Ядродержащие эритроциты косвенно указывают на гемолитическую анемию и миелофиброз, а обнаружение внутриклеточных паразитов (например, при малярии) свидетельствует об инфекции.

В зависимости от клинической картины и изменений в мазке периферической крови при тромбоцитопении дифференциально-диагностическое значение имеют следующие рутинные методы исследования [14–19].

Биохимический анализ крови с определением всех основных параметров для оценки состояния внутренних органов и выявления сопутствующей патологии крови (общий белок, аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, билирубин общий и его фракции, креатинин, мочевины, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза, лактатдегидрогеназа, глюкоза).

Коагулограмма (активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, фибриноген, антифibrин, фибринолитическая активность, растворимые фибрин-мономерные комплексы, Д-димер, активность протеина С), агрегация тромбоцитов с аденозиндифосфатом, коллагеном, ристомидином и адреналином для оценки функционального состояния свертывающей системы и тромбоцитов.

Количественный иммунохимический анализ крови для диагностики первичных или приобретенных иммунодефицитных заболеваний и состояний, при которых может измениться тактика лечения.

Цитологическое и гистологическое исследование костного мозга обязательно для исключения острых лейкозов, лимфопролиферативных заболеваний, ми-

елодиспластического синдрома (МДС) и апластической анемии, метастазов опухолей в костный мозг и др. Для ИТП характерно повышенное или нормальное количество мегакариоцитов, их нормальные или гигантские формы без морфологических аномалий. Проведение трепанобиопсии показано при рецидивирующих и резистентных формах ИТП, у пациентов старше 60 лет, при малом числе мегакариоцитов в миелограмме, подозрении на вторичный генез тромбоцитопении.

Вирусологические исследования необходимы для исключения заболеваний вирусной природы, протекающих с тромбоцитопенией. Это исследования на ВИЧ, антитела к вирусам гепатита В и С, диагностический мониторинг семейства герпес-вирусов (IgM и IgG). С целью определения вирусной нагрузки проводится исследование методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Диагностика *Helicobacter pylori* у больных с гастритами и язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки.

Прямая проба Кумбса проводится у больных с анемией и ретикулоцитозом для исключения аутоиммунной гемолитической анемии и синдрома Фишера–Эванса).

Маркеры тромбофилии определяют при отягощенном тромботическом анамнезе, наличии агрегатов тромбоцитов в мазке крови, нормальной агрегации тромбоцитов при глубокой тромбоцитопении.

Специфические тромбоцитассоциированные антитела

- Высокий титр тромбоцитассоциированных антител к гликопротеинам мембраны тромбоцитов является дополнительным показателем, указывающим на иммунный генез тромбоцитопении, а повышение гликокалицина — показателем разрушения тромбоцитов. Анализ на антитромбоцитарные антитела не характеризуется высокой чувствительностью, хотя его специфичность достигает 90 % [21, 22].
- Волчаночный антикоагулянт, антиядерные антитела, антитела к нативной (двухспиральной) ДНК, антитела к кардиолипинам (IgM и IgG) и антитела к β -2-гликопротеину 1 (IgM и IgG) позволяют заподозрить или отвергнуть СКВ и АФС.
- Антитела к тиреоидной пероксидазе служат тестом для исключения аутоиммунного тиреоидита.

Ультразвуковое исследование или компьютерную томографию (КТ) органов брюшной полости и брюшинного пространства, рентгенографию или КТ органов грудной клетки назначают для исключения других заболеваний (лимфопролиферативных, опухолей и др.), протекающих с тромбоцитопенией. Другие обследования (эзофагогастродуоденоскопия, маммография, колоноскопия и др.) проводят для исключения онкологических заболеваний.

Цель исследования — оценка результатов применения протокола дифференциальной диагностики тромбоцитопений в клинической практике.

Материалы и методы

В настоящее исследование включен 301 пациент, впервые обратившийся в научно-клиническое отделение стандартизации методов терапии ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России за период с января 2014 по сентябрь 2016 г. (32 мес) с тромбоцитопенией неуточненного генеза ($n = 183$) и с многолетним анамнезом ИТП ($n = 118$).

Для дифференциальной диагностики применяли расширенный протокол обследования пациентов с симптомом тромбоцитопении, представленный в настоящей статье и основанный на Национальных клинических рекомендациях по диагностике и лечению ИТП взрослых от 2014 г. [23]. Диагноз ИТП устанавливали на основании следующих критериев:

- изолированная тромбоцитопения менее $100,0 \times 10^9/\text{л}$ как минимум в 2 анализах крови;
- отсутствие морфологических и функциональных аномалий тромбоцитов;
- отсутствие патологии лимфоцитов, гранулоцитов и эритроцитов;
- нормальные показатели гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов, если не было существенной кровопотери;
- повышенное или нормальное количество мегакариоцитов в миелограмме;
- нормальные размеры селезенки;
- отсутствие других патологических состояний, вызывающих тромбоцитопению;

- наличие антитромбоцитарных антител в высоком титре (нормальный титр не исключал ИТП).

Характеристика пациентов. Больные ($n = 301$) были подразделены на 2 группы: 183 пациента с тромбоцитопенией неуточненного генеза (1-я группа) и 118 пациентов с рецидивом ИТП с целью определения тактики дальнейшей терапии (2-я группа).

Медиана возраста пациентов в обеих группах составила 36 лет (18–83 года).

В 1-й группе соотношение мужчины/женщины составило 1 : 2. По анамнестическим данным снижение количества тромбоцитов в периферической крови наблюдалось в период от 1 до 96 мес, в среднем 36 мес.

Во 2-й группе соотношение мужчины/женщины составило 1 : 4. Средняя длительность заболевания 108 (3–552) мес. Все пациенты 2-й группы до обращения в ГНЦ по поводу ИТП получали терапию 1–3-й линий. У 17 (14 %) пациентов заболевание дебютировало в детском и подростковом возрасте (<18 лет), остальным ($n = 101$, или 86 %) диагноз был установлен в возрасте >18 лет.

Число тромбоцитов в гемограмме при первичном обращении в ГНЦ у пациентов обеих групп представлено в табл. 1. В 1-й группе преобладали пациенты с уровнем тромбоцитов более $50 \times 10^9/\text{л}$ – 87 % случаев. Во 2-й группе среди пациентов с ИТП в подавляющем большинстве случаев (94 %) наблюдалось снижение уровня тромбоцитов ниже безопасного ($<50 \times 10^9/\text{л}$) с геморрагическим синдромом разной степени выраженности. Среди пациентов 1-й группы

Таблица 1. Распределение пациентов в исследуемых группах по количеству тромбоцитов

Table 1. Distribution of patients in the studied groups by number of platelets

Группа Group	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)			
	$<50 \times 10^9/\text{л}$ $<50 \times 10^9/\text{l}$	$(50-100) \times 10^9/\text{л}$ $(50-100) \times 10^9/\text{l}$	$>100 \times 10^9/\text{л}$ $>100 \times 10^9/\text{l}$	Суммарно Total
1-я 1st	23 (13)	123 (67)	37 (20)	183 (100)
2-я 2nd	111 (94)	7 (6 %)	0 (0)	118 (100)

Таблица 2. Распределение пациентов в исследуемых группах по степени развития геморрагического синдрома

Table 2. Distribution of patients in the studied groups by hemorrhagic syndrome severity grade

Группа Group	Число пациентов, n (%) Number of patients, n (%)				
	0 степень Grade 0	I степень Grade I	II степень Grade II	III–IV степени Grade III–IV	Суммарно Total
1-я 1st	92 (50)	61 (33)	30 (17)	0 (0)	183 (100)
2-я 2nd	14 (12)	79 (67)	23 (19)	2 (2)	118 (100)

геморрагический синдром у половины пациентов (50 %) отсутствовал даже при уровне тромбоцитов менее $50 \times 10^9/\text{л}$. Поводом для обращения их к гематологу была случайно выявленная тромбоцитопения, тогда как во 2-й группе в подавляющем большинстве (88 %) — геморрагический синдром: геморрагии на коже и слизистых, в 2 % случаев — жизнеугрожающие кровотечения (маточное и желудочно-кишечное).

Распределение пациентов по степени выраженности геморрагического синдрома в обеих группах представлено в табл. 2.

Результаты

Все пациенты обеих групп проходили обследование согласно расширенному протоколу, представленному в Национальных клинических рекомендациях по диагностике и лечению ИТП у взрослых, разработанному в 2014 г.

На основании результатов обследования в 1-й группе у 88 (48 %) пациентов был установлен диагноз ИТП, а в 95 (52 %) случаях имела место вторичная тромбоцитопения различного генеза.

Наиболее частой причиной вторичной тромбоцитопении являлся синдром повышенного потребления

с тромбогенными осложнениями — у 16 (9 %) пациентов. Среди них у 14 (8 %) — на фоне кардиоваскулярной патологии и диабетической ангиопатии — 2 (1 %) пациента. Аутоиммунные заболевания, протекающие с изолированной тромбоцитопенией, диагностированы у 13 (7 %) пациентов, из них СКВ — у 4 (2 %), АФС — у 7 (4 %), аутоиммунный тиреоидит — у 1 (0,5 %), склеродермия — у 1 (0,5 %). Вирусассоциированная тромбоцитопения выявлена в 12 (7 %) случаях, лекарственно-индуцированная тромбоцитопения — у 8 (4 %) пациентов с кардиологическими заболеваниями, находящихся на длительном лечении антикоагулянтами, кардиотропными и гипотензивными лекарственными препаратами, в 7 (4 %) случаях выявлен вирусный гепатит С, в 4 (2 %) случаях — цирроз печени невирусной этиологии, в 4 (2 %) — обнаружена ВИЧ-инфекция. В 4 (2 %) случаях лимфопролиферативное заболевание, в 2 (1 %) острый лейкоз и в 3 (2 %) случаях МДС дебютировали с тромбоцитопенией. У 14 (8 %) женщин, у которых тромбоцитопения была выявлена во время II–III триместра беременности, был установлен диагноз гестационной тромбоцитопении. Восстановление уровня тромбоцитов после родов окончательно подтвердило диагноз

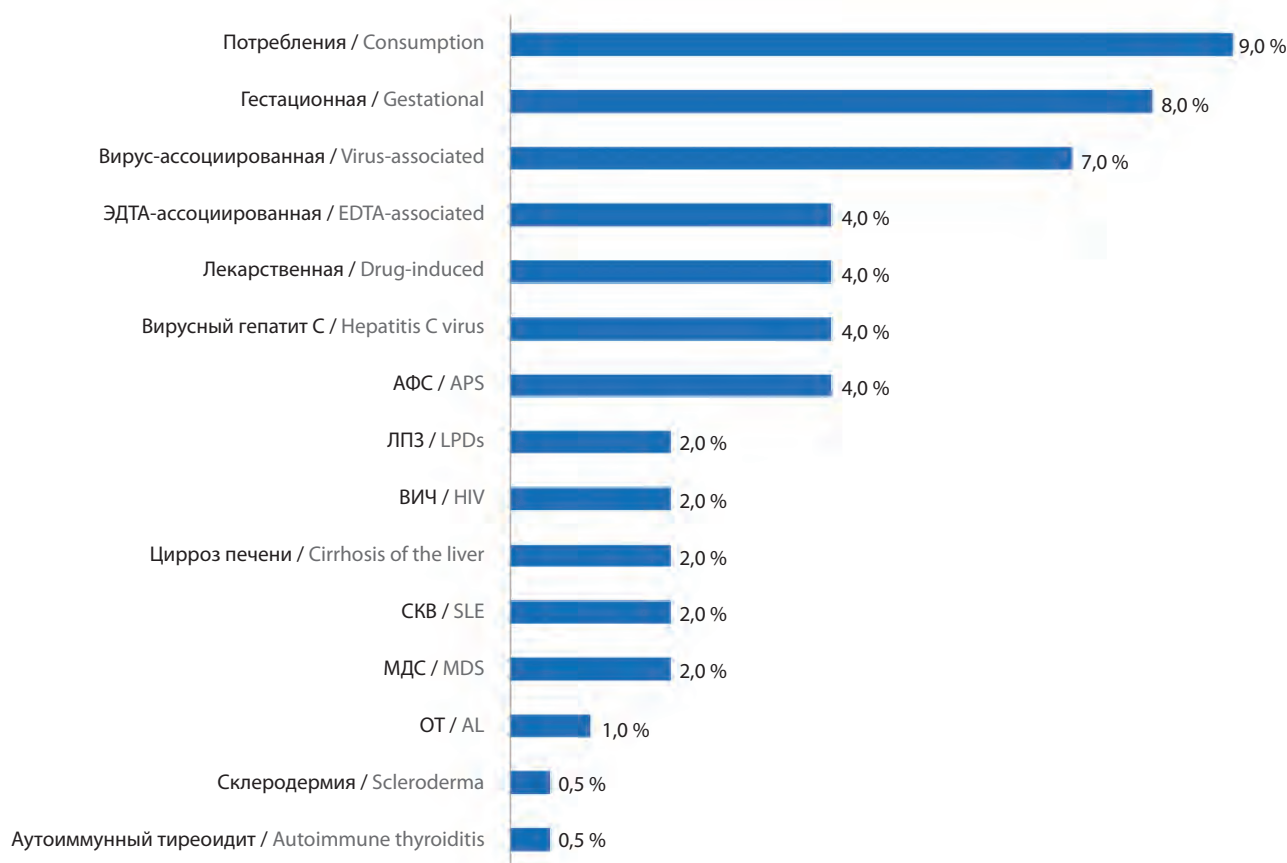


Рис. 2. Распределение по нозологиям среди пациентов со вторичной тромбоцитопенией.

Сокращения: АФС — антифосфолипидный синдром, ВИЧ — вирус иммунодефицита человека, ЛПЗ — лимфопролиферативное заболевание, МДС — миелодиспластический синдром, ОЛ — острый лейкоз, СКВ — системная красная волчанка, ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Fig. 2. Distribution of patients with secondary thrombocytopenia by nosologies.

Abbreviations: AL — acute leukemia, APS — antiphospholipid syndrome, EDTA — ethylenediaminetetraacetic acid, HIV — human immunodeficiency virus, LPDs — lymphoproliferative disorders, MDS — myelodysplastic syndrome, SLE — systemic lupus erythematosus

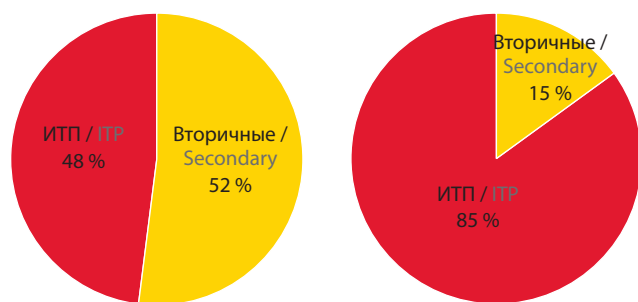


Рис. 3. Процентное соотношение пациентов по вторичным и первичной иммунной (ИТП) тромбоцитопениям в исследуемых группах
Fig. 3. Percentage of patients with immune (ITP) and secondary thrombocytopenias in the studied groups

во всех случаях. ЭДТА-ассоциированная ложная тромбоцитопения выявлена у 8 (4 %) пациентов, у которых при подсчете уровня тромбоцитов по методу Фонио в гемограмме наблюдалось нормальное количество тромбоцитов ($>150 \times 10^9/\text{л}$), что само по себе опровергало диагноз тромбоцитопении.

Распределение пациентов по нозологиям среди пациентов со вторичной тромбоцитопенией представлено на рис. 2.

Вторую группу составили 118 пациентов, имеющие длительный анамнез ИТП и получавшие специфическую терапию по поводу тромбоцитопении до обращения в ГНЦ. Среди них ранее установленный диагноз ИТП был подтвержден в 100 (85 %) случаях, а у 18 (15 %) пациентов диагноз ИТП был изменен на другую нозологию в результате проведенного обследования по расширенному протоколу.

Показаниями к пересмотру диагноза ИТП с целью поиска иной причины тромбоцитопении явились ранний рецидив, резистентность к глюкокортикостероидам (ГКС), наличие геморрагического синдрома при безопасном уровне тромбоцитов, тромбозы в анамнезе, отсутствие эффекта от спленэктомии. При повторном обследовании у 4 пациентов выявлен АФС, у 4 — МДС, у 2 — СКВ. В дебюте заболевания у них имела место изолированная тромбоцитопения с геморрагическим синдромом, в связи с чем все пациенты получали терапию преднизолоном, а 3 пациента в возрасте 20, 22 и 25 лет с диагнозом рецидивирующей ИТП лечились ГКС неоднократно и длительно. По анамнестическим данным у этих больных с детского возраста отмечались хронические часто рецидивирующие инфекционные заболевания (пневмония, бронхит, гайморит, отит). При иммунохимическом анализе сыворотки крови у 2 пациентов выявлен первичный иммунодефицит (селективный дефицит IgA), у 1 пациента гипер-IgM-синдром. В этих случаях ИТП развилась вследствие врожденной дисрегуляции иммунной системы. У 2 пациентов в возрасте 40 и 44 лет, наблюдавшихся с диагнозом ИТП, выявлена наследственная патология — аномалия Мая–Хегглина (базофильные включения в нейтрофилах, обнаружение

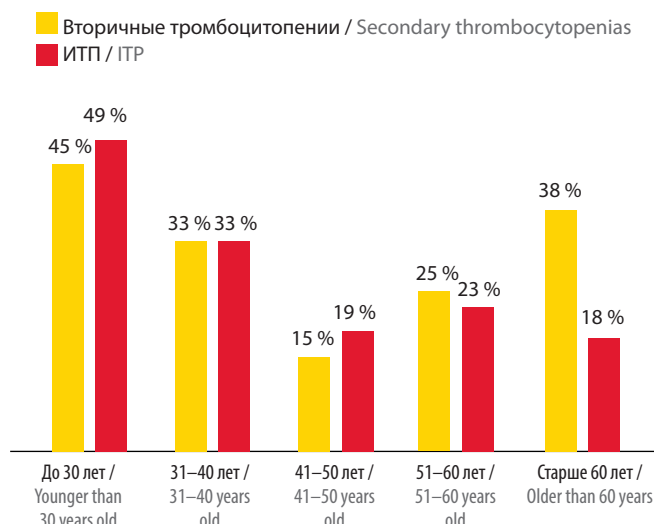


Рис. 4. Распределение пациентов по возрастным группам при вторичных и иммунной первичной (ИТП) тромбоцитопениях
Fig. 4. Distribution of patients with secondary and immune (ITP) thrombocytopenias by age

дополнительных хорд в сердце, характерных для данной патологии) и тромбастения Гланцмана.

Таким образом, в 1-й группе среди пациентов, впервые обратившихся к гематологу по поводу тромбоцитопении неуточненного генеза, диагноз ИТП установлен только у 88 (48 %) пациентов, а у 95 (52 %) тромбоцитопения была симптомом другой патологии. Соотношение числа пациентов с ИТП к числу больных тромбоцитопенией вторичного генеза составило 1 : 1.

Процентное соотношение пациентов по ИТП и вторичным тромбоцитопениям в каждой группе представлено на рис. 3.

Сопоставление числа пациентов с диагнозом ИТП и со вторичными тромбоцитопениями по возрастным группам (рис. 4) показало, что вторичная тромбоцитопения, в особенности на фоне онкогематологических заболеваний, в 2 раза чаще встречается у пациентов старше 60 лет (38 % против 19 %).

Заключение

Разнообразие гематологических и негематологических заболеваний, протекающих с тромбоцитопенией в гемограмме, представленное в настоящем исследовании, включившем 301 пациента, указывает на то, что симптом изолированной тромбоцитопении не всегда равнозначен диагнозу первичной ИТП.

Низкий уровень тромбоцитов может являться результатом целого ряда состояний и быть обусловлен множеством различных патогенетических механизмов. Раннее установление причины тромбоцитопении зачастую является решающим в выборе тактики и достижения успеха лечения пациента. Примерами могут быть острый лейкоз, МДС, АФС или тромботическая микроангиопатия, когда соответствующую терапию необходимо назначить незамедлительно.

Первоначальный подход к диагностике причин тромбоцитопении основывается на анамнезе пациента (его фоновых заболеваниях и предшествующей медикаментозной терапии), объективном физикальном осмотре, тщательном изучении мазка периферической крови, дополнительных лабораторных и инструментальных исследованиях. Проведение диагностических тестов на фоне приема ГКС снижает информативность результатов. Поэтому при необходимости немедленного назначения терапии при тромбоцитопении и геморрагическом синдроме рекомендуется до назначения ГКС взятие анализа крови на дополнительные иммунологические исследования (тесты на СКВ, АФС и др.). Цитологическое и гистологическое исследование костного мозга необходимо для пациентов с тромбоцитопенией неясного генеза. В клинических рекомендациях при изолированной тромбоцитопении мы предлагаем проведение цитологического исследования костного мозга на момент постановки диагноза у пациентов всех возрастов, гистологическое исследование у пациентов старше 60 лет, ввиду того что изолированная тромбоцитопения может выступать в качестве первого проявления МДС.

Обследование пациентов при тромбоцитопении не является однократной процедурой. Представленные данные подтверждают, что для дифференциальной диагностики первичной и вторичной тромбоцитопении повторное обследование следует проводить не только в дебюте, но и при рецидиве ИТП. Его следует повторять при «потере» ответа на лечение, при наличии резистентности к терапии, при сомнениях в диагнозе или при появлении признаков, не характерных для первичной ИТП (например, анемии нежелезодефицитного характера, лейкопении, увеличении СОЭ, наличии тромбозов и др.). Пациенты часто не проходят тщательное обследование на предмет вторичной тромбоцитопении, и патогенетическая причина может быть скрыта в клинической картине и особенностях течения болезни.

Для установления истинных причин тромбоцитопении необходимо проведение расширенного диагностического поиска согласно протоколу, представленному в настоящей работе и основанному на материалах Национальных клинических рекомендаций по диагностике и лечению ИТП у взрослых.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Provan D., Stasi R., Newland A.C. et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010;115:168–86. DOI: 10.1182/blood-2009-06-225565.
- Rodeghiero F., Stasi R., Gernsheimer T. et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from international working group. *Blood* 2009;113:2386–93. DOI: 10.1182/blood-2008-07-162503.
- Cines D.B., Bussell J.B., Liebman H.A., Luning Prak E.T. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood* 2009;113(26):6511–21. DOI: 10.1182/blood-2009-01-129155.
- Semple J.W., Milev Y., Cosgrave D. et al. Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T cell reactivity. *Blood* 1996;87:4245–54. PMID: 8639783.
- Kuhne T. *Immune Thrombocytopenia (ITP)*. 2nd edition. Bremen: UNI-MED, 2012.
- Kuwana K., Kaburaki J., Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of antiplatelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102(7):1393–402. DOI: 10.1172/JCI4238.
- McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37:239–48. PMID: 10942218.
- Mouzaki A., Theodoropoulou M., Gianakopoulos I. et al. Expression patterns of Th1 and Th2 cytokine genes in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) at presentation and their modulation by intravenous immunoglobulin G (IVIg) treatment: their role in prognosis. *Blood* 2002;100:1774–9. PMID: 12176899.
- Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:306–12. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.306.
- Sakakura M., Wada H., Tawara I. et al. Reduced Cd4+ Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2007;120(2):187–93. DOI: 10.1016/j.thromres.2006.09.008.
- Hu Y., Ma D.X., Shan N.N. et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One* 2011;6(10):e26522. DOI: 10.1371/journal.pone.0026522.
- Hu Y., Li H., Zhang L. et al. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol* 2012;73(6):629–35. DOI: 10.1016/j.humimm.2012.04.015.
- Zhu X., Ma D., Zhang J. et al. Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol* 2010;30(2):253–9. DOI: 10.1007/s10875-009-9353-1.
- Stasi R. How to approach thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012:191–7. DOI: 10.1182/asheducation-2012.1.191.
- Liebman H.A., Stasi R. Secondary immune thrombocytopenic purpura. *Curr Opin Hematol* 2007;14(5):557–73. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3282ab9904.
- Aledort L.M., Hayward C.P., Chen M.G. et al. Study Group. Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. *Am J Hematol* 2004;76(3):205–13. DOI: 10.1002/ajh.20104.
- Liebman H. Other immune thrombocytopenias. *Semin Hematol* 2007;44(4 Suppl 5):24–34. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2007.11.004.
- Cines D.B., Liebman H., Stasi R. Pathobiology of secondary immune thrombocytopenia. *Semin Hematol* 2009;46(1 Suppl 2):2–14. DOI: 10.1053/j.seminhematol.2008.12.005.
- Меликян А.Л., Пустовая Е.И., Калинина М.В. и др. Диагностический подход при тромбоцитопении. *Гематология и трансфузиология* 2016;61(1, Приложение 1): 23. [Melikyan A.L., Pustovaya E.I., Kalinina M.V. et al. Diagnostic approach for thrombocytopenia. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusion* 2016; 61(1 Suppl 1):23 (In Russ.).]

20. Kamath V., Gnanasekaran K.K., Mammen J. MYH9-related disorder, a probable May-Hegglin anomaly case series: A tertiary care experience. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2016;9(4):137–40. DOI: 10.1016/j.hemonc.2016.08.002.
21. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Мазуров А.В., Маркова М.Л. Тромбоцитопении. *Акушерство, гинекология и репродукция* 2014;(2):112–25. [Vasiliev S.A., Vinogradov V.L., Mazurov A.V., Markova M.L. Thrombocytopenias. *Akusherstvo, ginekologiya i reproduksiya* = Obstetrics, gynecology and reproduction 2014;(2):112–25 (In Russ.)].
22. Мазуров А.В. Лабораторная диагностика иммунных тромбоцитопений. В кн.: А.В. Мазуров. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. С. 220–222. [Mazurov A.V. Laboratory diagnostic of immune thrombocytopenias. In: A.V. Mazurov. Physiology and pathology of platelets. M.: Litterra, 2011. Pp. 220–222 (in Russ.)].
23. Меликян А.Л., Пустовая Е.И., Цветаева Н.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению первичной иммунной тромбоцитопении (идиопатической тромбоцитопенической пурпуры) у взрослых. *Гематология и трансфузиология* 2015;(1):44–56. [Melikyan A.L., Pustovaya E.I., Tsvetaeva N.V. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of primary immune thrombocytopenia (idiopathic thrombocytopenic purpura) in adults. *Gematologiya i transfuziologiya* = Hematology and Transfusiology 2015;(1):44–56 (In Russ.)].