

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

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

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ONCOGEMATOLOGY

**Инвазивные микозы
у онкогематологических больных**

**Роль количественной
RNOA Gly17Val аллель-специфичной ПЦР
в диагностике ангиоиммуобластной
Т-клеточной лимфомы**

**Проблемы дифференциальной
диагностики зрелоклеточных
В-линейных лейкозов у детей**

4

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.

В апреле 2017 г. принято решение о включении журнала в базу данных Scopus.

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ

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 медицинский исследовательский 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)

Пушкин 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 медицинский исследовательский 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 медицинский исследовательский 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 «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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: Т.Н. Помилуйко,
Р.В. Журавлева
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.
№ 4. 1–72
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 42167
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 3000 экз.

<http://oncohematology.abvpress.ru>

О С Н О В А Н В 2 0 0 5 Г .

4^{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 медицинский исследовательский 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 «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» 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 медицинский исследовательский 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 «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» 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 Геннадьевна, 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 «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» 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 «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии 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 медицинский исследовательский 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.

In April 2017, the decision was made to include the journal in the Scopus database.

ONCOHEMATOLOGY

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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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 National Medical Research Center of Oncology of Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2005

4^{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: **T.N. Pomiluyko, R.V. Zhuravleva**

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. 4. 1–72
© PH "ABV-Press", 2017

Pressa Rossii catalogue index:
42167

Printed at the Mediicolor 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)

Doubrovin 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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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 National Research Center for Hematology 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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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 National Research Center for Hematology 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 National Research Center for Hematology 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 National Medical Research Center of Oncology 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 Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology 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

<i>О. В. Шадринова, С. Н. Хостелиди, Ю. В. Борзова, Е. А. Десятик, А. Г. Волкова, М. О. Попова, О. С. Успенская, О. С. Ружинская, Т. В. Шнейдер, Т. С. Богомолова, С. М. Игнатьева, Л. С. Зубаровская, Б. В. Афанасьев, Н. Н. Климко</i>	
Сочетание инвазивного аспергиллеза и мукомикоза у онкогематологических больных	8
<i>В. В. Стругов, Е. А. Стадник, А. Ю. Зарицкий</i>	
Эффективность венетоклакса в терапии хронического лимфолейкоза (обзор литературы).	18
<i>Н. Г. Чернова, М. Н. Сеницына, А. М. Ковригина, Ю. В. Сидорова, И. В. Гальцева, С. А. Марына, В. Н. Девирный, Е. Е. Звонков</i>	
Реактивный плазмцитоз в дебюте ангиоимунобластной Т-клеточной лимфомы. Клинический случай	28

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

<i>И. А. Дёмина, Т. Ю. Вержбицкая, С. А. Кашир, Л. В. Байдун, Т. В. Конюхова, С. А. Плясунова, Г. А. Цаур, Е. Б. Русанова, М. В. Горчакова, Е. Е. Зуева, А. Н. Казакова, Е. А. Зеркаленкова, Ю. В. Ольшанская, Ю. Г. Абугова, Л. Г. Фечина, Н. В. Мякова, Е. В. Самочатова, А. А. Масчан, А. М. Попов</i>	
Гетерогенность В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BIV-иммуновариант) у детей.	34
<i>Ю. В. Сидорова, Н. Г. Чернова, И. А. Якутик, С. Ю. Смирнова, Н. В. Рыжикова, Е. Е. Никулина, М. Ю. Алексенко, М. Н. Сеницына, А. М. Ковригина, Т. Н. Моисеева, Е. Е. Звонков, А. Б. Сударинов</i>	
Результаты количественной <i>RHOA</i> Gly17Val аллель-специфичной полимеразной цепной реакции и определения Т-клеточной клональности при ангиоимунобластной Т-клеточной лимфоме	41
<i>М. Л. Канаева, И. В. Гальцева, И. М. Накастоев, Я. Б. Бальжанова, Е. О. Грибанова, Е. Н. Паровичникова, В. Г. Савченко</i>	
Ренин-ангиотензиновая система в регуляции гемопоэза.	50
<i>Г. А. Цаур, Т. О. Ригер, А. М. Попов, Т. Ю. Вержбицкая, Л. В. Вахонина, А. А. Власова, Ю. В. Ольшанская, А. Н. Казакова, О. В. Стрелева, О. В. Макарова, С. В. Цвиренко, Л. И. Савельев, О. Р. Аракаев, Л. Г. Фечина</i>	
Значение определения химерного транскрипта <i>ETV6-RUNX1</i> методом полимеразной цепной реакции у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников с наличием транслокации t(12;21)(p13;q22)	57

HEMATOLOGIC MALIGNANCIES: DIAGNOSIS, TREATMENT, SUPPORTIVE CARE

- O.V. Shadrivova, S.N. Khostelidi, Yu.V. Borzova, E.A. Desyatik, A.G. Volkova, M.O. Popova, O.S. Uspenskaya, O.S. Ruzhinskaya, T.V. Shneyder, T.S. Bogomolova, S.M. Ignatyeva, L.S. Zubarovskaya, B.V. Afanasyev, N.N. Klimko*
Combination of invasive aspergillosis and mucormycosis in oncohematological patients 8
- V.V. Strugov, E.A. Stadnik, A.Yu. Zaritskey*
Effectiveness of venetoclax in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (literature review) 18
- N.G. Chernova, M.N. Sinitsyna, A.M. Kovrigina, Y.V. Sidorova, I.V. Galtseva, S.A. Mar'ina, V.N. Dvirnyk, E.E. Zvonkov*
Reactive plasmacytosis at the onset of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Case report 28

CURRENT BASIC RESEARCH IN PRACTICAL MEDICINE

- I.A. Demina, T.Yu. Verzhbitskaya, S.A. Kashpor, L.V. Baidun, T.V. Koniuhova, S.A. Plyasunova, G.A. Tsaur, E.B. Rusanova, M.V. Gorchakova, E.E. Zueva, A.N. Kazakova, E.A. Zerkalenskaya, Yu.V. Olshanskaya, Yu.G. Abugova, L.G. Fechina, N.V. Miakova, E.V. Samochatova, A.A. Maschan, A.M. Popov*
Heterogeneity of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (EGIL subtype BIV) 34
- Yu.V. Sidorova, N.G. Chernova, I.A. Yakutik, S.Yu. Smirnova, N.V. Ryzhikova, E.E. Nikulina, M.Yu. Aleksenko, M.N. Sinitsyna, A.M. Kovrigina, T.N. Moiseeva, E.E. Zvonkov, A.B. Sudarikov*
Quantitative *RHOA* Gly17Val allele-specific polymerase chain reaction and T-cell clonality analysis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 41
- M.L. Kanaeva, I.V. Galtseva, I.M. Nakastoev, Y.B. Balzhanova, E.O. Gribanova, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko*
Renin-angiotensin system in regulation of hematopoiesis 50
- G.A. Tsaur, T.O. Riger, A.M. Popov, T.Yu. Verzhbitskaya, L.V. Vakhonina, A.A. Vlasova, Yu.V. Olshanskaya, A.N. Kazakova, O.V. Streneva, O.V. Makarova, S.V. Tsvirenko, L.I. Saveliev, O.R. Arakaev, L.G. Fechina*
Significance of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript detection in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with translocation t(12;21)(p13;q22) 57

Сочетание инвазивного аспергиллеза и мукомикоза у онкогематологических больных

О.В. Шадринова¹, С.Н. Хостелиди¹, Ю.В. Борзова¹, Е.А. Десятик¹, А.Г. Волкова², М.О. Попова²,
О.С. Успенская³, О.С. Ружинская³, Т.В. Шнейдер³, Т.С. Богомолова¹, С.М. Игнатьева¹,
Л.С. Зубаровская², Б.В. Афанасьев², Н.Н. Климко¹

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России; Россия, 194291 Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де Куба, 1/28;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8;

³ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница»; Россия, 194291 Санкт-Петербург, пр. Луначарского, 45–49

Контакты: Ольга Витальевна Шадринова olshadr@mail.ru

Цель исследования — анализ данных регистра больных инвазивным аспергиллезом (ИА), созданного в Санкт-Петербурге (1998–2017 гг.). Приводится описание случая успешного лечения сочетанного ИА и мукомикоза легких у больного лимфомой Ходжкина. **Материалы и методы.** В исследование были включены 29 онкогематологических больных ИА и мукомикозом. Контрольную группу составили 483 онкогематологических больных ИА. Для диагностики ИА и мукомикоза использовали критерии Европейской организации по изучению и лечению рака (The European Organisation for Research and Treatment of Cancer) и группы изучения микозов (Mycoses Study Group) Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (The National Institute of Allergy and Infectious Diseases) США (2008 г.).

Результаты. Установлено, что сочетание ИА и мукомикоза достоверно чаще развивается у больных острым лимфобластным лейкозом (32 %, $p = 0,001$) и реципиентов аллогенных трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток (52 %, $p = 0,001$). При сочетанной инфекции достоверно чаще возбудителем является *Aspergillus nidulans* (11 %, $p = 0,001$). Основные возбудители мукомикоза — *Rhizopus* spp. (45 %), *Lichtheimia corymbifera* (20 %). Основным очагом его локализации являются легкие (76 %), достоверно чаще развивается диссеминация процесса (45 %, $p = 0,0001$) и поражаются придаточные пазухи носа (17 %, $p = 0,002$). Характерным клиническим признаком сочетания ИА и мукомикоза выступает кровохарканье (24 %, $p = 0,008$), радиологическими — наличие полостей деструкции (38 %), гидроторакс (29 %) и симптом «обратного ореола» (17 %). Антимикотическую терапию получали 76 % больных, хирургическое лечение — 34 %.

Заключение. Мукомикоз выявлен у 5,7 % больных ИА. Основными факторами риска сочетанной инфекции являлись трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток, длительный агранулоцитоз, лимфоцитопения и терапия глюкокортикостероидами. Общая 12-недельная выживаемость больных с сочетанной инфекцией составляла 38 %, что достоверно ниже, чем у больных ИА ($p = 0,005$). Прогностически неблагоприятным фактором является диссеминация микотического процесса ($p = 0,009$).

Ключевые слова: инвазивный аспергиллез, мукомикоз, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor*

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-8-17

Combination of invasive aspergillosis and mucormycosis in oncohematological patients

O.V. Shadrivova¹, S.N. Khostelidi¹, Yu.V. Borzova¹, E.A. Desyatik¹, A.G. Volkova², M.O. Popova², O.S. Uspenskaya³,
O.S. Ruzhinskaya³, T.V. Shneyder³, T.S. Bogomolova¹, S.M. Ignatyeva¹, L.S. Zubarovskaya², B.V. Afanasyev², N.N. Klimko¹

¹I.I. Mechnikov North-Western State Medical University; 1/28 Santiago de Cuba St., Saint Petersburg 194291, Russia;

²I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 6–8, L'va Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

³Leningrad Regional Clinical Hospital; 45–49 Lunacharskogo Prosp., Saint Petersburg 194291, Russia

Objective. Data analysis of the register of patients with invasive aspergillosis (IA), which was founded in Saint Petersburg (1998–2017), and clinical case description of successful treatment of IA and mucormycosis with lungs involvement in a patient with Hodgkin's lymphoma.

Materials and methods. In the study were included 29 oncohematological patients with IA and mucormycosis. In control group were included 483 oncohematological patients with IA. We used criteria EORTS/MSG, 2008 for IA and mucormycosis diagnosis.

Results. We identified that the combination of IA and mucormycosis significantly often develops in patients with acute lymphoblastic leukemia (32 %, $p = 0.001$), and allogeneic hematopoietic stem cells transplants (allo-HSCT) recipients (52 %, $p = 0.001$). In mixed-infection *Aspergillus nidulans* was frequent IA etiological agent (11 %, $p = 0.001$). The main mucormycosis etiological agents were *Rhizopus* spp. (45 %), *Lichtheimia corymbifera* (20 %). The main sites of the localization were lungs (76 %), disseminated process and paranasal sinuses involvement were identified more frequently (45 % and 17 % ($p = 0.0001$; $p = 0.002$), respectively). Typical clinical feature of IA and mucormycosis combinations was hemoptysis (24 %, $p = 0.008$), radiological signs — lesions with cavities destruction (38 %), hydrothorax (29 %) and a “reverse halo” symptom (17 %). Antifungal therapy received 76 % of patients, surgery — 34 %.

Conclusion. *Mucormycosis was revealed in 5.7 % of patients with IA. The main risk factors for co-infection are allo-HSCT, long-term agranulocytosis, lymphocytopenia and glucocorticosteroid therapy. Overall 12 weeks survival in patients with mixed-infection was 38 %, significantly lower than in patients with IA ($p = 0.005$). An unfavorable prognosis factor was dissemination of mycotic infection ($p = 0.009$).*

Key words: *invasive aspergillosis, mucormycosis, Aspergillus, Rhizopus, Lichtheimia corymbifera, Rhizomucor*

Введение

Инвазивные микозы (ИМ) представляют собой тяжелые инфекционные осложнения у онкогематологических больных. Основными возбудителями ИМ у иммунокомпрометированных пациентов выступают *Aspergillus* и *Candida* spp., однако актуальными становятся инфекции, вызванные мукормицетами [1, 2].

Важнейшим условием успешного лечения ИМ является ранняя диагностика, что часто представляет трудную задачу. Для инвазивного аспергиллеза (ИА) и мукормикоза характерны сходные факторы риска, клинические и рентгенологические признаки. Кроме того, для мукормикоза не разработаны серологические методы диагностики, культуральные имеют низкую чувствительность, а выполнение биопсии не всегда возможно в связи с тяжестью состояния пациентов. Вместе с тем идентификация возбудителя имеет решающее значение, так как мукормицеты отличаются низкой чувствительностью к большинству системных антимикотиков, в том числе к вориконазолу — препарату выбора для лечения ИА [3].

До настоящего времени число публикаций, посвященных описанию сочетанных микозов, остается ограниченным. Мы представляем описание случая успешного лечения сочетанного ИА и мукормикоза легких у больного лимфомой Ходжкина, а также анализ данных регистра больных ИА и сочетанных с ним грибковых инфекций, включая мукормикоз. Регистр был создан на кафедре клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» (СЗГМУ им. И.И. Мечникова) Минздрава России.

Материалы и методы

Настоящее исследование явилось проспективным, динамическим и обсервационным. Нами создан (1998 г.) и по настоящее время ведется регистр больных, в который включены 512 пациентов с «доказанным» и «вероятным» ИА, госпитализированных в период с 1998 по 2017 г. в различные отделения 19 многопрофильных стационаров Санкт-Петербурга. Из них у 29 пациентов (5,7 %) выявлено сочетание ИА и мукормикоза. Учитывали более 120 показателей, включая данные анамнеза заболевания, наличие факторов риска развития ИМ, а также результаты обследования и лечения.

Диагностировали ИМ и оценивали эффективность антифунгальной терапии на основании критериев, предложенных Европейской организацией по изучению и лечению рака (The European Organisation for

Research and Treatment of Cancer, EORTC) и группы изучения микозов (Mycoses Study Group, MSG) Национального института аллергологии и инфекционных заболеваний (The National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID), США [4]. Для диагностики микоза всем пациентам проводили компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения, по показаниям — КТ придаточных пазух носа (ППН), магнитно-резонансную томографию, фиброbronхоскопию, плевральные и люмбальные пункции, пункции ППН, а также биопсию тканей и патоморфологические исследования.

Лабораторная диагностика включала серологическое, микроскопическое и культуральное исследования. Наличие галактоманнана (ГМ) в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) и сыворотке крови определяли иммуоферментным методом с использованием специфической диагностической тест-системы PLATELIA® *Aspergillus* (BIO—RAD Laboratories, США). Диагностически значимым считали индекс $>0,5$ в сыворотке крови и $>1,0$ — в БАЛ. Из образцов биосубстратов (мокрота, БАЛ, отделяемое из ППН и др.) готовили препараты в просветляющей жидкости (10 % раствор гидроксида калия в 10 % водном растворе глицерина) с добавлением флуоресцирующего маркера (калькофлуор белый). Окрашенный препарат просматривали в люминесцентном микроскопе, отмечали наличие нитей мицелия, ветвящихся под углом 90° (несептированный мицелий) или острым углом (септированный). Биопсийный, операционный или секционный материал после фиксации формалином подвергали обезжизиванию и заливали в парафиновые блоки, из которых изготавливали срезы толщиной 4 мкм. В дальнейшем срезы окрашивали гематоксилином и эозином, проводили PAS (periodic acid-Schiff) — реакцию и окраску по методу Гомори—Грокотта для выявления элементов гриба в тканях.

Полученные в процессе исследования медико-биологические данные обрабатывали с помощью программной системы Statistica for Windows (версия 10.0).

Клинический случай

Больной М., 30 лет, поступил в микологическую клинику СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России в августе 2013 г. с жалобами на одышку при минимальной физической нагрузке, нарастающую слабость, сухой кашель. При объективном обследовании частота сердечных сокращений составляла 74 уд/мин; артериальное давление — 125/75 мм рт. ст. При аускультации тоны сердца звучные, шумов нет, сердечный ритм правильный.

Дыхание жесткое, хрипов нет. Перкуторно над легкими ясный легочный звук. Частота дыхательных движений — 17 уд/мин. Живот мягкий, безболезненный, печень не увеличена; нижний край селезенки у края реберной дуги при пальпации безболезненный. Периферических отеков нет.

Из анамнеза заболевания выяснено, что в январе 2006 г. пациент впервые стал отмечать повышение температуры тела до 38 °С и ночную потливость, а также увеличение шейно-надключичных и подмышечных лимфатических узлов. На основании гистологического исследования надключичного лимфатического узла диагностирована лимфома Ходжкина, нодулярный склероз, IVB стадия по Анн-Арборской классификации новообразований.

Пациенту провели 6 курсов высокодозной цитостатической терапии по протоколу ABVD, в результате опухоль частично регрессировала, затем 4 курса по протоколу Increased-dose BEACOPP, после чего отмечен полный регресс образования в соответствии с данными позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Однако через 6 мес с учетом отрицательной динамики результатов ПЭТ диагностировали рецидив лимфомы. Лечение рецидива проводили по протоколу Dexamethasone BEAM. В апреле 2008 г. выполнили аутотрансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, в октябре 2008 г. диагностировали полную ПЭТ-негативную ремиссию. С 2008 г. пациент находился под наблюдением гематолога амбулаторно.

С октября 2011 г. отметили появление В-симптомов (лихорадка, слабость, потливость), увеличение шейных лимфатических узлов. При ПЭТ-исследовании выявили очаги накопления радиофармпрепарата в проекции переднего средостения, внутригрудных лимфатических узлов, чревной области, парааортальных лимфатических узлов, а также двустороннее очаговое поражение легких. Диагностировали прогрессию лимфомы Ходжкина IVB стадии и провели 2 курса цитостатической терапии по протоколу DHAP, а затем 4 курса по протоколу GEMOX. Учитывая резистентность к проводимой цитостатической терапии, в мае 2012 г. провели трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). В раннем посттрансплантационном периоде развилась острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) с поражением кожи 0–I степени, которую купировали топическими глюкокортикостероидами (ГКС). Терапию системными ГКС не проводили.

В июле 2012 г. на КТ органов грудной клетки выявили множественные очаги верхних и средних долей обоих легких и инфильтративные изменения S3–4 левого легкого. Туберкулез был исключен. С учетом отрицательных результатов тестов на ГМ сыворотки крови и БАЛ, а также принимая во внимание отрицательные данные микроскопии и посева БАЛ, изменения в легких расценили как специфические. Кроме того, при гистологическом исследовании костного мозга выявили картину субтотального его поражения. Установили прогрессию лимфомы Ходжкина с поражением периферических, внутри-

грудных, внутрибрюшных лимфоузлов, костного мозга, печени и легких. Клинический эффект от проводимой цитостатической полихимиотерапии (ПХТ) по протоколу ChVPP не был достигнут, после 2-го курса отмечали длительный период постцитостатической панцитопении.

В октябре — ноябре 2012 г. зарегистрировали дальнейшее прогрессирование заболевания с поражением печени, селезенки и паренхимы обоих легких. Введение донорских лимфоцитов осложнилось развитием острой РТПХ печени II степени, кожи I степени, что потребовало применения системных ГКС. В динамике отмечали развитие гипопункции трансплантата, в связи с чем провели терапию брентуксимабом ведотином.

В январе 2013 г. у пациента на фоне продолжающейся цитопении отмечали длительную фебрильную лихорадку, резистентную к антибиотикотерапии, вновь появилась и нарастала одышка. При проведении КТ органов грудной клетки выявили инфильтративные изменения и многочисленные округлые очаги размерами до 10 мм по всем полям легких (рис. 1).

Пациенту М. выполнили фибробронхоскопию. Результат теста на ГМ в БАЛ был положительным (индекс оптической плотности 1,2), при микроскопии БАЛ выявлены нити септированного мицелия (рис. 2), при посеве получен рост *Aspergillus fumigatus*.

На основании результатов исследований у пациента диагностировали инвазивный аспергиллез легких.

Пациент получал 800 мг вориконазола в 1-е сутки, затем — 400 мг/сут с положительной клинической и КТ-динамикой.

В сентябре 2013 г. при контрольном обследовании в микологической клинике (на фоне приема вориконазола) на КТ органов грудной клетки выявили отрицательную динамику в виде новых многочисленных очагов, преимущественно в левых отделах легких, с тенденцией к слиянию в инфильтраты (рис. 3).

Результат теста на ГМ в БАЛ был отрицательным. При посеве получили рост *Rhizopus stolonifer*. Диагностировали сочетанный инвазивный микоз легких, обусловленный



Рис. 1. Компьютерная томография органов грудной клетки (21.01.2013)
Fig. 1. Chest computed tomography (21.01.2013).

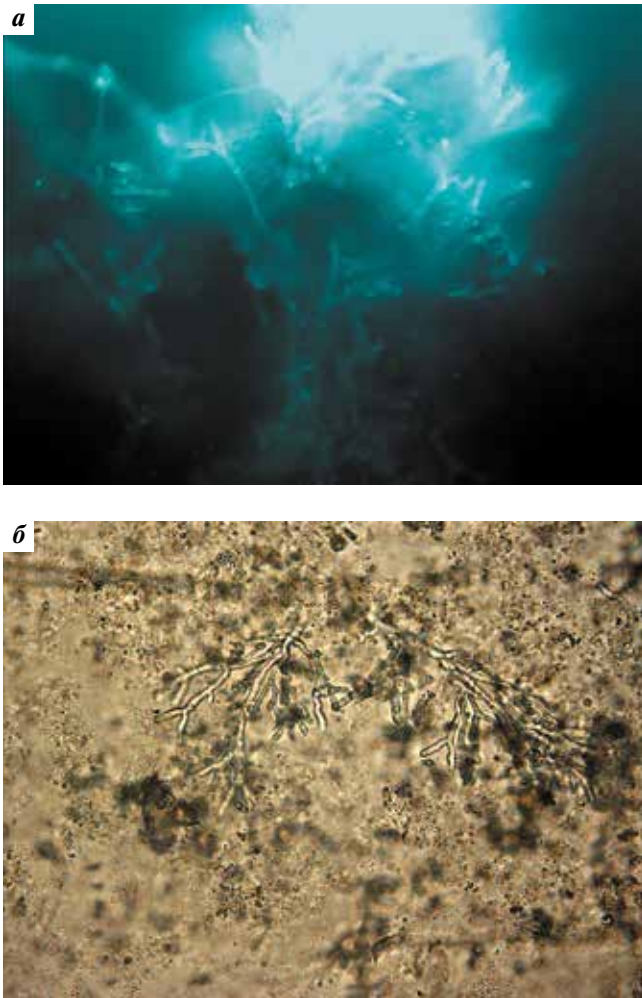


Рис. 2. Микроскопия бронхоальвеолярного лаважа: а — септированный мицелий, ветвящийся под острым углом (окраска калькофлуором белым (слева); $\times 400$), б — нативный мазок

Fig. 2. Broncho-alveolar lavage microscopy: а — septated mycelium, branching at an acute angle (calcofluor white stain; $\times 400$), б — without stain

Aspergillus fumigatus и *Rhizopus stoloniter*. В течение 16 дней пациент получал комбинированную антимикотическую терапию: каспофунгин в дозе 70 мг в 1-й день, затем по 50 мг/сут и липидный комплекс амфотерицина В по 3 мг/кг/сут. Далее проводили монотерапию амфотерицином В (1 мг/кг/сут) в течение 10 дней, затем позаконазолом (800 мг/сут). Получили отчетливый клинический эффект, положительную КТ-динамику в виде уменьшения количества и размеров очагов.

В декабре 2013 г. вновь диагностировали прогрессирование основного заболевания по данным контрольной ПЭТ. Провели лечение бендамустином и брентуксимабом ведотином с положительным эффектом. Продолжали применение позаконазола (800 мг/сут).

Пациенту провели контрольное обследование в микологической клинике в октябре 2014 г. Общая продолжительность применения позаконазола составила 10 мес, побочных эффектов не было. Сохранялась ремиссия фонового заболевания, по данным контрольной ПЭТ признаков метаболической активности выявлено не было.

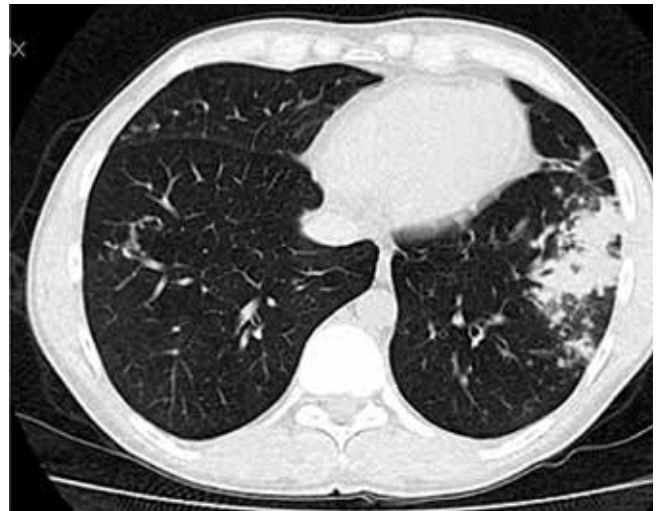


Рис. 3. Компьютерная томография органов грудной клетки (11.09.2013)
Fig. 3. Chest computed tomography (11.09.2013).

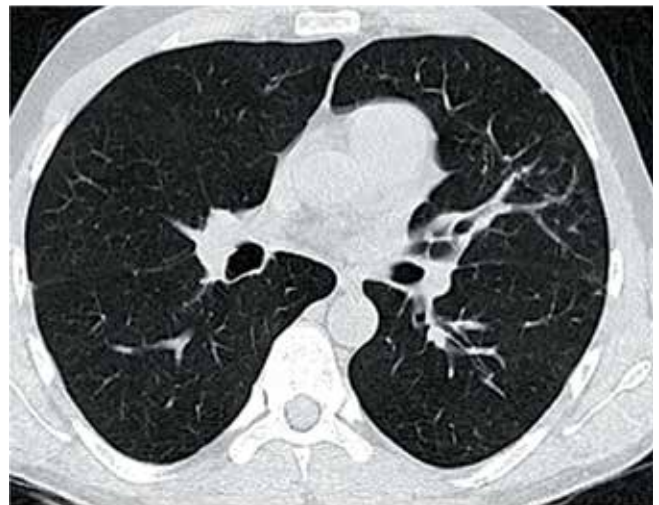


Рис. 4. Компьютерная томография органов грудной клетки (23.01.2015)
Fig. 4. Chest computed tomography (23.01.2015)

По результатам КТ органов грудной клетки очаговых и инфильтративных изменений не обнаружили, в динамике отмечали формирование зон фиброза. При микроскопии и посеве БАЛ микромицеты не выявлены, тест на ГМ дал отрицательный результат. Диагностировали ремиссию инвазивного микоза легких. Однако с учетом низкого уровня $CD4^+$ ($0,113 \times 10^9/\text{л}$) и высокого риска рецидива микотической инфекции продолжили лечение позаконазолом в дозе 800 мг/сут для профилактики рецидива.

На повторном микологическом обследовании в январе 2015 г. клинических признаков рецидива ИМ не обнаружили. По данным КТ органов грудной клетки очаговых и инфильтративных изменений не выявили (рис. 4). Результаты теста на ГМ, микроскопии и посева на микромицеты были отрицательными.

Общая продолжительность применения позаконазола составила 13 мес. Нежелательных явлений на фоне

приема препарата не отмечали. Учитывая отсутствие клинических, лабораторных (серологических, микологических) и КТ-признаков инфекции, а также тенденцию к нормализации уровня $CD4^+$ ($0,343 \times 10^9/\text{л}$), антифунгальную профилактику отменили. Ремиссия ИМ сохраняется на момент написания статьи (ноябрь 2017 г.).

Результаты

С 1998 по 2017 г. мы наблюдали 29 пациентов с сочетанным микозом из 7 стационаров Санкт-Петербурга (1-я группа), которые составили 5,7 % от общего числа больных ИА. Возраст пациентов варьировал от 5 до 65 лет (медиана — 31 ± 12 лет), преобладали пациенты мужского пола (66 %), детей и подростков было 5 (17 %, медиана возраста 15 ± 3 года), взрослых — 24 (83 %, медиана возраста 36 ± 14 лет). Во 2-ю группу (контрольную) включили 483 больных ИА без микст-инфекций со сходными демографическими показателями и фоновыми состояниями. Возраст пациентов исчислялся от 1 года до 78 лет (медиана — 38 ± 15 лет). Пациенты мужского пола составили 55 %. Детей и подростков насчитывалось 89 (18 %, медиана возраста 13 ± 2 года), взрослых — 394 (82 %, медиана возраста 38 ± 13 лет).

У большинства пациентов 1-й и 2-й групп сочетанный ИМ развился на фоне онкогематологических заболеваний, среди которых преобладали острые

лейкозы — 57 и 49 % соответственно (табл. 1). Сочетанная микотическая инфекция достоверно чаще возникала у больных острым лимфобластным лейкозом ($p = 0,001$) и реже у пациентов с множественной миеломой и миелодиспластическим синдромом ($p = 0,001$).

Изучение факторов риска показало, что сочетанный ИМ достоверно чаще развивался после алло-ТГСК (52 % против 25 %, $p = 0,001$), преимущественно на фоне острой или хронической РТПХ (табл. 2). Следует отметить, что у 17 % больных 1-й группы еще до проведения алло-ТГСК был ИА, а вторичная грибковая инфекция развилась на фоне рецидива ИА в посттрансплантационном периоде. В группе контроля реципиенты алло-ТГСК составляли около 25 %, рецидив ИА после трансплантации у них зафиксировали в 3 % случаев ($n = 4$).

В 1-й и 2-й группах в период, предшествовавший развитию сочетанного микоза, 62 и 60 % больных соответственно получали цитостатическую ПХТ по различным протоколам (среднее число курсов достоверно не отличалось в обеих группах); ГКС в составе ПХТ или для профилактики РТПХ применяли у 59 и 50 % пациентов; длительный агранулоцитоз наблюдали у 86 % против 73 % больных (медиана — 25 и 29 дней соответственно), лимфоцитопению — 55 % против 54 % (медиана 15 дней).

Таблица 1. Фоновые заболевания больных инвазивным аспергиллезом (ИА)

Table 1. Nosology in patients with invasive aspergillosis (IA)

Нозология (МКБ-10) Nosology (ICD-10)	Группа 1 (ИА + мукормикоз), $n = 29$ Group 1 (IA + mucormycosis), $n = 29$		Группа 2 (ИА), $n = 483$ Group 2 (IA), $n = 483$	
	абс. total	%	абс. total	%
Острый лимфобластный лейкоз* Acute lymphoblastic leukemia*	9	32	92	19
Острый миелобластный лейкоз Acute myeloid leukemia	7	25	146	30
Неходжкинская лимфома Non-Hodgkin's Lymphoma	4	14	70	15
Лимфома Ходжкина Hodgkin's lymphoma	2	7	60	12
Другие виды острого лейкоза Other acute leukemia	2	7	15	3
Хронический лимфолейкоз Chronic lymphocytic leukemia	1	3	24	5
Хронический миелоидный лейкоз Chronic myeloid leukemia	1	3	21	4
Апластическая анемия Aplastic anemia	1	3	10	2
Первичный миелофиброз Primary myelofibrosis	1	3	1	1
Нейробластома* Neuroblastoma*	1	3	—	—
Множественная миелома* Multiple myeloma*	—	—	26	5
Миелодиспластический синдром* Myelodysplastic syndrome*	—	—	18	4

* $p = 0,001$.

Таблица 2. Факторы риска развития инвазивных микозов

Table 2. Risk factors for invasive fungal infections

Факторы риска и фоновые состояния Risk factors	Группа 1 (ИА + мукормикоз), <i>n</i> = 29 Group 1 (IA + mucormycosis), <i>n</i> = 29		Группа 2 (ИА), <i>n</i> = 483 Group 2 (IA), <i>n</i> = 483	
	абс. total	%	абс. total	%
Алло-ТГСК* Allo-HSCT*	15	52	121	25
РТПХ GVHD	11	38	107	22
Полихимиотерапия Chemotherapy	18	62	292	60
среднее количество курсов average number of courses	5		4	
Агранулоцитоз Agranulocytosis	25	86	355	73
длительность (медиана, дни) duration (median, days)	25		29	
Лимфоцитопения Lymphocytopenia	16	55	262	54
длительность (медиана, дни) duration (median, days)	15		15	
Глюкокортикостероиды Glucocorticosteroids	17	59	242	50

**p* = 0,001.

Примечание. ИА – инвазивный аспергиллез, ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина».

Note. IA – invasive aspergillosis; HSCT – hematopoietic stem cells transplantation; GVHD – “graft versus host” disease.

Первичный очаг аспергиллезной инфекции у всех пациентов в большинстве случаев формировался в легких (табл. 3).

В группе контроля поражение легких развивалось в 97 % случаев. Наше исследование показало, что у пациентов с сочетанной микотической инфекцией достоверно чаще выявляли диссеминацию процесса с вовлечением 2 органов и более (45 % против 7 %, *p* = 0,001), а также поражение ППН (17 % против 5 %, *p* = 0,002).

Клинические признаки ИМ у пациентов обеих групп, как правило, были неспецифичными. Основными проявлениями были: были кашель (86 % против 73 %) и температура тела более 38,5 °C (73 % против 75 %). Тем не менее характерным клиническим признаком у пациентов с ИА и мукормикозом было кровохарканье (24 % против 6 %, *p* = 0,008), также

Таблица 3. Клинические варианты инвазивных микозов

Table 3. Clinical variants of invasive mycoses

Локализация Localization	Группа 1 (ИА + мукормикоз), <i>n</i> = 29 Group 1 (IA + mucormycosis), <i>n</i> = 29		Группа 2 (ИА), <i>n</i> = 483 Group 2 (IA), <i>n</i> = 483	
	абс. total	%	абс. total	%
Легкие Lungs	22	76	470	97
Придаточные пазухи носа* Paranasal sinuses*	5	17	23	5
ЦНС CNS	3	10	17	4
Остеомиелит Osteomyelitis	2	7	1	1
Поражение 2 органов и более* 2 or more organs involvement*	13	45	33	7

p* = 0,002.*p* = 0,001.

Примечание. ИА – инвазивный аспергиллез, ЦНС – центральная нервная система.

Note. IA – invasive aspergillosis; CNS – central nervous system.

пациенты с микст-инфекцией достоверно чаще предъявляли жалобы на боли в грудной клетке – 37 % против 4 % (*p* = 0,0001).

В большинстве случаев рентгенологические признаки сочетанного ИМ были неспецифичными. На КТ органов грудной клетки у всех пациентов с легочной локализацией инфекционного процесса на раннем этапе заболевания выявляли очаговые и инфильтративные изменения, из них у 62 % отмечали двусторонние изменения в легких. Характерно, что в 38 % случаев определяли очаги с полостями деструкции, примерно у 1/3 больных ИА и мукормикозом течение грибковой пневмонии осложнилось развитием гидроторакса (29 %). Другим частым КТ-признаком микст-инфекции был симптом «обратного ореола» (reverse halo) – 17 % (рис. 5).

Серологическое исследование биосубстратов проводили всем пациентам. Положительный результат теста на ГМ в БАЛ и/или сыворотке крови, спинномозговой жидкости был получен у 62 % против 71 % больных соответственно в 1-й и 2-й группах. С целью идентификации возбудителя проводили забор патологического материала из очагов поражения. Исследовали следующие биосубстраты – мокроту, промывную жидкость из бронхов, плевральную и спинномозговую жидкости, промывные воды из ППН, кровь, а также проводили гистологическое исследование биоптатов.

При прямой микроскопии биосубстратов наличие нитей септированного мицелия, ветвящегося под

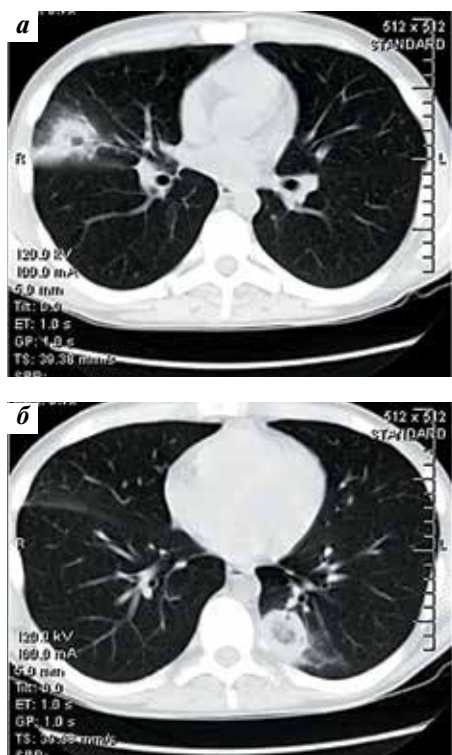


Рис. 5. Компьютерная томография легких пациента с инвазивным аспергиллезом и мукормикозом. Очаговая инфильтрация легких с образованием очагов деструкции: а – правого, б – левого
Fig. 5. Lungs computed tomography in patient with invasive aspergillosis and mucormycosis. Focal infiltration of the lungs with the formation of destruction zones: a – right, б – left

острым углом, достоверно чаще отмечали у пациентов с сочетанным микозом (21 % против 16 %, $p = 0,04$), несептированный мицелий, ветвящийся под прямым углом, выявляли у 100 % больных с сочетанной инфекцией (рис. 6).

При посеве БАЛ и/или промывных вод ППН у пациентов с сочетанным микозом в 1-й и 2-й группах достоверно чаще выделяли *Aspergillus* spp.: 51 % против 26 % ($p = 0,002$). Основными возбудителями были *A. fumigatus* – 55 % против 41 %, *A. niger* 17 % против 36 %. *A. flavus* составил 17 % в обеих группах. Нами установлено, что для сочетанной грибковой инфекции характерно наличие такого редкого возбудителя, как *Aspergillus nidulans* – 11 % ($n = 3, p = 0,001$), а у пациентов без мукормикоза в единичных случаях были выделены также *A. versicolor* ($n = 3$), *A. ustus* ($n = 3$) и *A. ochraceus* ($n = 2$), составившие 2 % всех изолятов.

У 69 % больных с микст-инфекцией получен рост мукормицетов в культуре. Возбудителями мукормикоза были: *Rhizopus* spp. (45 %), *Lichtheimia corymbifera* (20 %), *Rhizomucor* spp. (10 %), *Rhizomucor pusillus* (10 %) и *Mucor* sp. (10 %), *Rhizopus stoloniter* (5 %).

У 59 % пациентов диагноз сочетанного ИМ доказан при гистологическом исследовании биоптатов или аутопсийного материала, «вероятный» ИМ диагностирован в 41 % случаев. В соответствии с критериями EORTC/MSG (2008), «доказанный» ИА был

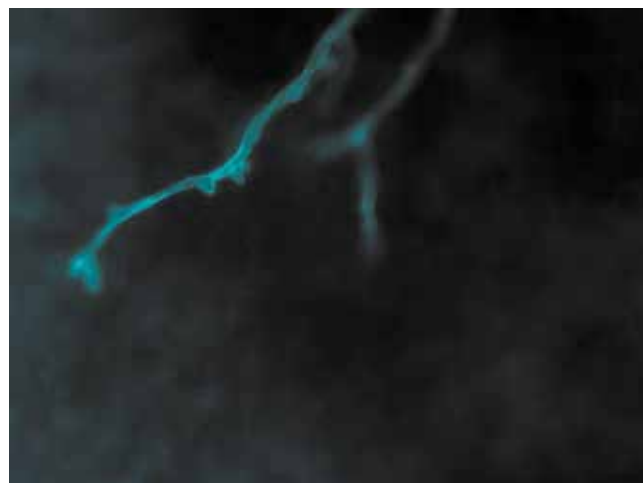


Рис. 6. Микроскопия бронхоальвеолярного лаважа у больного сочетанным микозом легких; окраска калькофлуором белым; $\times 600$
Fig. 6. Broncho-alveolar lavage microscopy in patient with mixed-infection of the lungs; calcofluor white stain, $\times 600$

диагностирован у 5 % пациентов группы контроля ($p = 0,0001$), «вероятный» – у 95 %.

До развития мукормикоза 100 % больных получали антимикотические препараты для лечения ИА, преимущественно вориконазол и каспофунгин. Антифунгальную терапию мукормикоза проводили 76 % больным (у 24 % пациентов диагноз был установлен посмертно). Применяли:

- позаконазол (800 мг/сут) у 62 % больных;
- амфотерицин В (1–1,5 мг/кг/сут) у 50 %;
- липидный комплекс амфотерицина В (3–5 мг/кг/сут) у 41 %;
- каспофунгин (70–50 мг/сут) у 41 %.

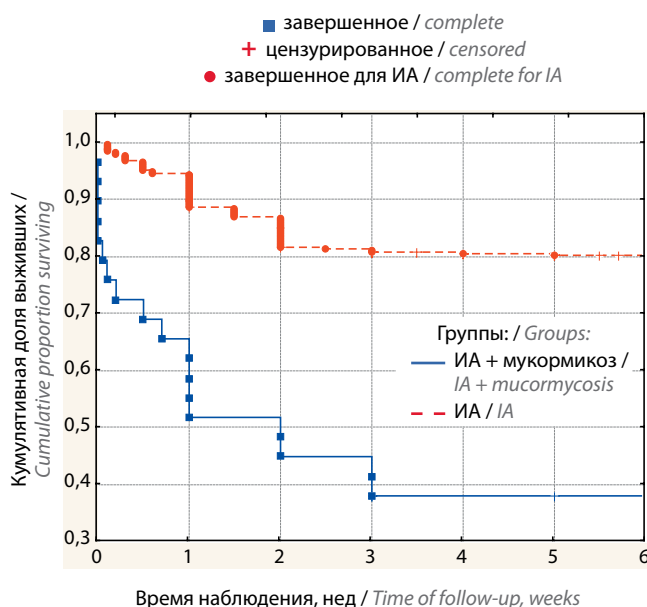


Рис. 7. Общая выживаемость онкогематологических больных с инвазивным аспергиллезом (ИА) (по Каплану–Майеру)
Fig. 7. Overall survival in oncohematological patients with invasive aspergillosis (IA) (Kaplan–Mayer)

Продолжительность лечения составила от 3 до 236 дней (медиана — 45 дней). Почти 1/3 (32 %) больных получила комбинированную антимикотическую терапию. У 34 % пациентов с ИА и мукомикозом применение антимикотиков сочетали с хирургическим лечением. Проводили синусотомию, лобэктомию, резекцию ребер и кишечника, некрэктомию кожи и мягких тканей. Хирургическое лечение у больных ИА применили в 2 % случаев ($p = 0,0008$).

Общая выживаемость больных с сочетанной инфекцией в течение 12 нед составила 38 %, что значительно ниже выживаемости пациентов с ИА без микст-инфекции (81 %), $p = 0,005$ (рис. 7). Исследование показало, что у больных ИА и мукомикозом прогностически неблагоприятным фактором являлась диссеминация микотической инфекции ($p = 0,009$).

Обсуждение

ИА и мукомикоз являются актуальной клинической проблемой у онкогематологических больных. Увеличение частоты развития ИМ связано не только с совершенствованием методов диагностики, но и с широким использованием алло-ТГСК, применением в лечении онкогематологических заболеваний более «агрессивных» схем цитостатической терапии, а также новых поколений иммуносупрессивных препаратов (моноклональных антител, ингибиторов фактора некроза опухоли альфа и др.) [5]. Успешное лечение бактериальных осложнений, а также применение вориконазола для терапии и профилактики ИА у онкогематологических пациентов привели к увеличению когорты больных с высоким риском развития инвазивного мукомикоза, возбудителями которого являются низшие грибы класса *Zygomycetes*. Наше исследование также показало, что часть пациентов с сочетанной грибковой инфекцией (17 %) имели в анамнезе ИА до проведения алло-ТГСК, а мукомикоз развился на фоне применения вориконазола в посттрансплантационном периоде. По данным аутопсий в многопрофильных стационарах различных стран мукомикоз составляет от 8,3 до 13 % всех грибковых инфекций [6]. Во Франции за период с 2005 по 2007 г. зафиксирован 101 случай этого заболевания [7], тогда как в международный регистр больных мукомикозом за этот же период включили 230 пациентов [8].

В соответствии с критериями EORTC/MSG (2008) [4], к основным факторам риска ИМ относят:

- длительную (более 10 дней) нейтропению;
- длительный (более 21 дня) прием ГКС;
- применение иммуносупрессивной терапии;
- РТПХ у пациентов после алло-ТГСК;
- СПИД и первичные иммунодефициты.

Следует отметить, что в последнее время для мукомикоза характерно изменение спектра фоновых заболеваний. Если в конце прошлого столетия мукомикоз развивался преимущественно у больных декомпенсированным сахарным диабетом, то в настоящее

время наиболее частыми фоновыми состояниями являются онкогематологические заболевания, среди которых преобладают острые лейкозы. В наших предыдущих исследованиях показано, что мукомикоз развивается у онкогематологических больных сразу после или во время проведения цитостатической терапии, преимущественно после 4–5-го курса ее проведения [9]. Мы установили, что у включенных в наше исследование больных ИМ также развивался после 4–5-го курса ПХТ, что, вероятно, связано с использованием «агрессивных» схем цитостатической терапии у данной категории пациентов. Мы выявили, что сочетанная микотическая инфекция чаще развивалась у больных на фоне длительного агранулоцитоза (медиана — 25 дней) и лимфоцитопении (медиана — 15 дней) в постцитостатическом периоде или на фоне РТПХ.

Анализ данных нашего регистра больных ИА, результатов проведенного нами исследования, а также данные литературы позволяют говорить о том, что у онкогематологических больных поражение легких является наиболее частой клинической формой как аспергиллеза (90–97 %), так и мукомикоза (61–76 %) [7, 9–11]. В то же время для микст-инфекции характерна более частая диссеминация процесса (45 %), достоверно ухудшающая прогноз заболевания.

Клиническая картина наряду с инфекционным синдромом характеризовалась наличием кровохарканий примерно у 1/4 всех больных. Отличительными радиологическими признаками были наличие полостей деструкции в легочной ткани (38 %), развитие гидроторакса (29 %) и выявление симптома «обратного ореола» (17 %).

Тем не менее основными диагностическими методами остаются определение ГМ в БАЛ и микологические исследования (микроскопия и посев) [12]. Доказано, что наибольшая диагностическая эффективность достигается при использовании всех вышеперечисленных методов [13]. Диагностика мукомикоза основана на выявлении возбудителя при микроскопии, посеве или гистологическом исследовании биосубстратов, требует многократного исследования лабораторного материала из очагов поражения, что является трудно-выполнимой задачей из-за тяжести состояния пациентов. Согласно критериям диагностики микозов всем пациентам проводили микологическое исследование. Микроскопические признаки наличия мукомикоза в биосубстратах выявили у всех больных, культуральные — у 69 %. У 24 % пациентов диагноз мукомикоза установлен при исследовании аутопсийного материала. В то же время в Европе, по данным А. Skiada и соавт., мукомикоты высевали у 74 % больных мукомикозом [8].

В результате микологического обследования нами выявлен широкий спектр возбудителей ИМ у онкогематологических больных. Возбудителями мукомикоза были *Rhizopus* spp., *Lichtheimia corymbifera*, *Rhizomucor* spp., *Rhizomucor pusillus*, *Mucor* sp., а инвазивного

аспергиллеза — *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* и *A. nidulans*. Эти данные сопоставимы с результатами наших предыдущих исследований больных мукомикозом без ИА [14]. Особенностью этиологии ИА при сочетанной инфекции является выделение культуры *A. nidulans* из биосубстратов.

Для эффективной терапии сочетанной микотической инфекции необходима адекватная антифунгальная терапия и хирургическое удаление очага поражения. Результаты наблюдения А. Skiada и соавт. продемонстрировали, что у 40 % больных использовали хирургическое лечение [8]. Хирургическое удаление очага поражения наряду с антимикотической терапией выполнено у 34 % пациентов, включенных в наше исследование.

В международных рекомендациях Европейской конференции по инфекциям при лейкомии (European Conference on Infections in Leukemia, ECIL) 2017 г. для стартовой терапии мукомикоза показано применение липидного комплекса амфотерицина В. Позаконазол рекомендован для применения после стабилизации состояния пациента, а также при невозможности стартовой терапии липидным амфотерицином В [15].

В нашем исследовании основным используемым препаратом для терапии мукомикоза у больных с сочетанной микотической инфекцией был позаконазол (62 %), примерно в половине случаев применяли амфотерицин В, у 1/3 пациентов — липидный комплекс амфотерицина В, реже — каспофунгин. Ранее было показано, что применение комбинированной антимикотической терапии при развитии мукомикоза достоверно улучшает прогноз заболевания [9]. В нашей когорте пациентов комбинированную терапию получили 32 % больных.

Согласно Российским национальным рекомендациям (2015 г.) и международным рекомендациям (ECIL-6, 2017 г.), вориконазол является препаратом 1-й линии для лечения ИА, к альтернативным препаратам отнесены липидный комплекс амфотерицина В, позаконазол и каспофунгин [15, 16].

При выявлении сочетанного ИМ, обусловленного мукомикозом и аспергиллами, необходима ранняя комплексная терапия. Однако, несмотря на применение новых антимикотических препаратов в нашем

исследовании, в течение 12 нед после начала лечения летальный исход наступил у 62 % пациентов. Это свидетельствует о необходимости разработки методов ранней диагностики мукомикоза.

Выводы

По результатам проведенного нами исследования, в которое были включены 29 онкогематологических больных ИА и мукомикозом и 483 онкогематологических больных ИА, получены следующие данные:

1. Мукомикоз выявлен у 5,7 % онкогематологических пациентов с инвазивным аспергиллезом.
 2. Сочетанная микотическая инфекция достоверно чаще развивается у больных острым лимфобластным лейкозом, реже — у больных множественной миеломой и миелодиспластическим синдромом ($p = 0,001$).
 3. Факторы риска: сочетанная микотическая инфекция достоверно чаще развивается у реципиентов алло-ТГСК (52 %, $p = 0,001$). Другими факторами риска являются длительный агранулоцитоз, лимфоцитопения и терапия ГКС.
 4. При развитии сочетанной инфекции достоверно чаще развивается диссеминация процесса (45 %, $p = 0,0001$) и поражение придаточных пазух носа (17 %, $p = 0,002$).
- Характерным клиническим признаком сочетания инвазивного аспергиллеза и мукомикоза является кровохарканье (24 %, $p = 0,008$), КТ-признаками — наличие полостей деструкции (38 %), гидроторакс (29 %) и симптом «обратного ореола» (17 %).
5. Для смешанной инфекции характерно наличие возбудителя *A. nidulans* (17 %); основные возбудители мукомикоза — *Rhizopus* spp. (45 %), *Lichtheimia corymbifera* (20 %), *Rhizomucor* spp. (10 %), *Rhizomucor pusillus* (10 %) и *Mucor* spp. (10 %), *Rhizopus stolonifer* (5 %).
 6. Антимикотическую терапию (позаконазол, амфотерицин В, липидный комплекс амфотерицина В и каспофунгин) получали 76 % больных, хирургическое лечение — 34 %.
 7. Сочетание инвазивного аспергиллеза и мукомикоза снижает общую 12-недельную выживаемость (38 % против 81 %, $p = 0,005$). Прогностически неблагоприятным фактором является диссеминация микотического процесса ($p = 0,009$).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Leventakos K., Lewis R., Kontoyiannis D. Fungal infections in leukemia patients: how do we prevent and treat them. Clin Infect Dis 2010;50(3):405–15. DOI: 10.1086/649879. PMID: 20047485.
2. Imai Y., Adachi Y., Kimura T. et al. An autopsy case of pulmonary fissure induced by zygomycosis. Int J Gen Med 2013;6:575–9. DOI: 10.2147/ijgm.s44701. PMID: 23874118.
3. Skiada A., Lanternier F., Groll A.H. et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections

- in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica* 2013;98(4):492–504.
DOI: 10.3324/haematol.2012.065110.
PMID: 22983580.
4. De Pauw B., Walsh T.J., Donnelly J.P. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;46(12):1813–21.
DOI: 10.1086/588660. PMID: 18462102.
 5. Baddley J.W. Clinical risk factors for invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2011;49(Suppl. 1):7–12.
DOI: 10.3109/13693786.2010.505204.
PMID: 20718606.
 6. Petrikos G., Skiada A., Lortholary O. et al. Epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2012;54(Suppl. 1):23–34.
DOI: 10.1093/cid/cir866.
PMID: 22247442.
 7. Lanternier F., Dannaoui E., Morizot G. et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 2012; 54(Suppl 1):35–43. DOI: 10.1093/cid/cir880. PMID: 22247443.
 8. Skiada A., Pagano L., Groll A. et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(12):1859–67.
DOI: 10.1111/j.1469–0691.2010.03456.x.
PMID: 21199154.
 9. Klimko N.N., Khostelidi S.N., Volkova A.G. et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses* 2014;57(Suppl. 3):91–6.
DOI: 10.1111/myc.12247.
PMID: 25187314.
 10. Saegeman V., Maertens J., Ectors N. et al. Epidemiology of mucormycosis: review of 18 cases in a tertiary care hospital. *Med Mycol* 2010;48(2):245–54.
DOI: 10.1080/13693780903059477.
PMID: 19568978.
 11. Климов Н.Н., Шадрикова О.В., Хостелиди С.Н. и др. Инвазивный аспергиллез: результаты многоцентрового исследования. *Онкогематология* 2014;2:13–9. [Klimko N.N., Shadrivova O.V., Khostelidi S.N. et al. Invasive aspergillosis: results of multicenter study. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2014;2:13–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-13-19.
 12. Ruhnke M., Bohme A., Buchheidt D. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology – guidelines from the Infectious Diseases Working Party in Haematology and Oncology of the German Society for Haematology and Oncology (AGIHO). *Ann Oncol* 2012;23(4):823–33.
DOI: 10.1093/annonc/mdr407.
PMID: 21948809.
 13. Волкова А.Г., Попова М.О., Екушев К.А. и др. Роль бронхоскопии в диагностике инвазивного аспергиллеза легких у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Российский журнал детской гематологии и онкологии* 2015;2:72–6. [Volkova A.G., Popov M.O., Ekushev K.A. et al. The role of bronchoscopy in diagnosis invasive pulmonary aspergillosis in children after hematopoietic stem cell transplantation. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii = Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2015;2:72–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2311-1267-2015-2-2-72-76.
 14. Климов Н.Н., Хостелиди С.Н., Шадрикова О.В. и др. Инвазивный мукормикоз у онкогематологических больных (результаты проспективного исследования). *Онкогематология* 2017;2(12):14–22. [Klimko N.N., Khostelidi S.N., Shadrivova O.V. et al. Mucormycosis in oncohematology patients (results of the prospective study). *Onkogematologiya = Oncohematology* 2017;2(12):14–22. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-2-14-22.
 15. Tissot F., Agrawal S., Pagano L. et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica* 2017;102(3):433–44.
DOI: 10.3324/haematol.2016.152900.
PMID: 28011902.
 16. Диагностика и лечение микозов в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Российские рекомендации. Отв. ред. Н.Н. Климов. 2-е изд. доп. и перераб. М.: Фармтек, 2015. [Diagnosis and treatment of mycoses in intensive care units. Russian recommendations. Ed. N. N. Klimko. Moscow: Farmtek, 2015. (In Russ.)].

Эффективность венетоклакса в терапии хронического лимфолейкоза (обзор литературы)

В.В. Стругов, Е.А. Стадник, А.Ю. Зарицкий

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России;
Россия, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Контакт: Владимир Владимирович Стругов strugov@almazovcentre.ru

В последние годы в терапии хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) произошла революция, связанная с появлением новых таргетных препаратов, которые существенно улучшили результаты лечения всех групп больных ХЛЛ. При этом ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ибрутиниб, акалабрутиниб и др.) и изоформ фосфатидилинозитол-3-киназы (иделалисиб, умбралисиб и др.) находятся на пике популярности, в то время как ингибиторам антиапоптотических белков (венетоклакс) уделяется незаслуженно мало внимания. В данном обзоре мы представляем результаты клинических исследований венетоклакса в монотерапии и комбинированных схемах при ХЛЛ. Отличительной чертой данного препарата является высокая частота достижения полных ответов и эрадикации минимальной остаточной болезни у пациентов с ХЛЛ высокого риска, а также хорошо контролируемый профиль токсичности, что делает его идеальным компонентом негенотоксичных режимов, нацеленных на полное излечение заболевания.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, венетоклакс, антиапоптотический белок Bcl-2

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-18-26

Effectiveness of venetoclax in the treatment of chronic lymphocytic leukemia (literature review)

V.V. Strugov, E.A. Stadnik, A. Yu. Zaritskey

Almazov National Medical Research Centre; 2 Akkuratova St, Saint Petersburg, Russia 197341

Currently we are facing a revolution in therapy of chronic lymphocytic leukemia, related to the development of novel target drugs, which have markedly improved treatment results in all groups of patients. While inhibitors of Bruton's tyrosine kinase (ibrutinib, acalabrutinib etc.) and phosphatidylinositol-3 kinase isoforms (idelalisib, umbralisib etc.) are currently in the spotlight, much less attention is paid to antiapoptotic protein inhibitors such as venetoclax. In this review we summarize the results of venetoclax clinical studies in CLL as monotherapy and in combinations. The drug is distinguished by a high rate of complete responses and minimal residual disease eradication in high risk CLL patients, as well as a favorable toxicity profile. This makes it an ideal component of non-genotoxic regimens, aimed at the cure of the disease.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, venetoclax, antiapoptotic protein Bcl-2

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) (С91.1 по МКБ-10) — одно из наиболее распространенных онкогематологических заболеваний, развивающееся преимущественно у пожилых людей европеоидной расы. В основе заболевания лежит прогрессивное накопление в костном мозге, крови и вторичных лимфоидных органах трансформированных клональных В-лимфоцитов, имеющих «зрелую» морфологию, патогномичный поверхностный фенотип (одновременная экспрессия маркерных молекул CD23, CD19 и CD5) и специфическое строение В-клеточного рецептора. Лишь у небольшой части больных ХЛЛ современные варианты противоопухолевой терапии позволяют добиться полного излечения. В большинстве случаев заболевание рецидивирует. При использовании цитостатиков каждая последующая линия терапии приводит к появлению новых мутаций и индукции клональной эволюции, закономерным итогом которой является выработка химиорефрактерного фенотипа.

Поломки, определяющие нечувствительность к генотоксичным препаратам, представлены в первую очередь мутациями гена *TP53* в варианте делеции хромосомного локуса 17p13 и/или инактивирующих точечных замен. Такие мутации обнаруживаются примерно у 5–10 % больных, ранее не получавших терапию, и примерно у 30 % больных с рефрактерностью к флударабинсодержащим режимам. До появления новых таргетных препаратов выживаемость пациентов с аномалиями гена *TP53* и/или документированной неэффективностью стандартных иммунохимиотерапевтических комбинаций (ХЛЛ высокого риска) редко превышала 1,5–2 года.

Венетоклакс (ABT-199, GDC-0199) — один из новых препаратов, представляет собой низкомолекулярный высокоселективный пероральный ингибитор антиапоптотического белка B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) [1]. Воздействие венетоклакса на клетки Bcl-2-зависимых опухолей, к которым относится ХЛЛ, приводит к быстрому появлению признаков апоптоза *in vitro*.

В клинических исследованиях эффективность венетоклакса показана при различных вариантах лимфом и лейкозов, однако наиболее ценный опыт накоплен при лечении им больных с рецидивами и прогностически неблагоприятными вариантами ХЛЛ. Впечатляющие результаты получены также у пациентов с утратой ответа на ингибиторы В-клеточного сигналинга.

В настоящее время препарат одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA) и Министерством здравоохранения Канады (Health Canada) для применения у больных ХЛЛ с del17p, ранее получавших специфическую терапию [2]. На территории стран Европейского союза использование венетоклакса разрешено у больных ХЛЛ с мутациями в гене *TP53* и del17p с неэффективностью/непереносимостью ингибиторов ВТК и Р13К в анамнезе [3].

В данном обзоре мы постарались обобщить данные по механизму действия, эффективности и токсичности венетоклакса при его использовании в монорежиме и в комбинациях с другими препаратами при хроническом лимфолейкозе. Отдельное внимание уделено механизмам формирования резистентности к препарату.

Механизм действия

Программируемая клеточная гибель (апоптоз) — естественный барьер для опухолевой трансформации. Поэтому нарушение активности ключевых регуляторов апоптоза, белков семейства Bcl-2, наблюдается при многих онкогематологических заболеваниях [4].

В семействе Bcl-2 выделяют группы антиапоптотических и проапоптотических белков [5]. К первой относят Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-W и Bfl-1, ко второй — Bax, Bak, NOXA, Bad, Bim и Bid. Последние 4 белка отличаются тем, что имеют только 1 функциональный BH-домен (моно-BH3-белки), ответственный за гетеродимеризацию с другими членами семейства. Функция белков Bax и Bak — пермеабиллизация митохондриальной мембраны. Активация Bax и Bak в здоровых клетках предотвращается их связыванием с антиапоптотическими белками. Последние дополнительно регулируются моно-BH3-белками (в первую очередь Bik и Bad), которые конкурентно связываются с Bcl-2 и Bcl-X_L, подавляя секвестрацию Bax и Bak и сенсибилизируя клетку к апоптозу. Кроме этого, некоторые моно-BH3-белки, такие как Bim, способны напрямую активировать олигомеризацию Bax и Bak и индуцировать апоптоз (рис. 1).

В ответ на проапоптотические стимулы (дерегуляция онкогенов, цитокиновая депривация, гипоксия, воздействие цитостатиков) «активирующие» моно-BH3-белки взаимодействуют с Bax и Bak, запуская их димеризацию и транслокацию из цитозоля в наружную мембрану митохондрий. Это приводит к высвобождению

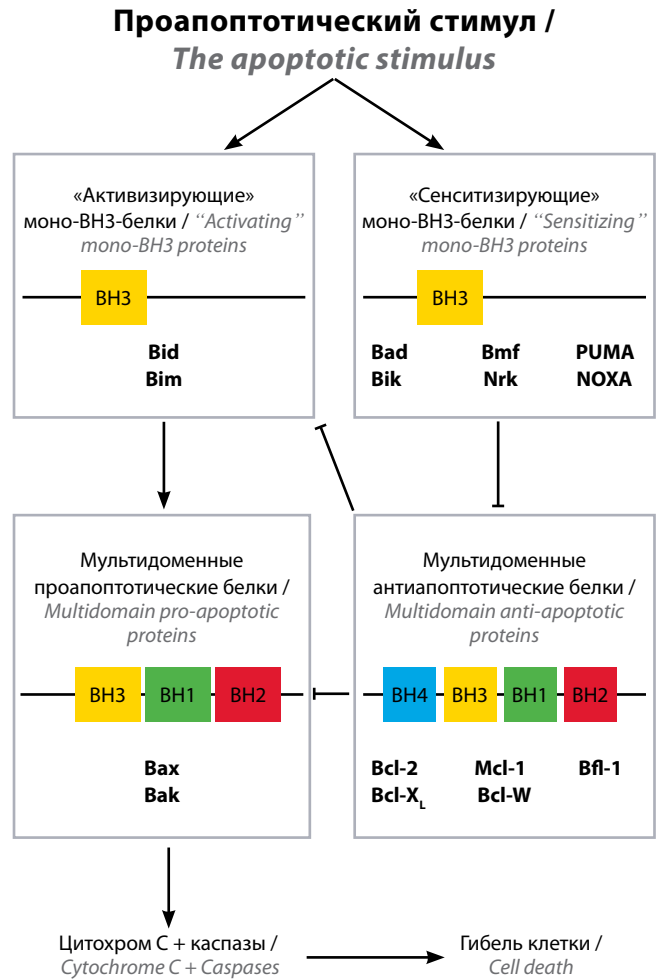


Рис. 1. Участие белков семейства Bcl-2 во внутреннем (митохондриальном) пути апоптоза

Fig. 1. Bcl-2 family proteins in the internal (mitochondrial) pathway of apoptosis

нию цитохрома С, инициации каспазного каскада и последующей гибели клетки.

В клетках ХЛЛ баланс про- и антиапоптотических факторов нарушен за счет гиперэкспрессии Bcl-2 [6]. Причиной этого, возможно, является снижение экспрессии микро-РНК miR-15a и miR-16-1, которая особенно выражена у пациентов с делецией локуса 13q14 [7]. Кроме гиперэкспрессии Bcl-2 клетки ХЛЛ характеризуются повышенным содержанием комплексов Bim: Bcl-2 [8]. Такое «праймированное» состояние делает их избирательно чувствительными к BH3-миметикам — препаратам, блокирующим связывание Bcl-2 с другими белками. Индукция апоптоза в праймированных клетках происходит не только за счет нарушения секвестрации Bax и Bak, но и из-за высвобождения большого количества их активатора Bim. Данные механизмы не зависят от наличия функционально активного p53.

Венетоклакс — представитель класса BH3-миметиков нового поколения [1]. Препарат получен методом оптимизации молекулы другого селективного

перорального ингибитора Bcl-2 — навитоклакса (ABT-263). Последний показал отчетливую эффективность в исследовании II фазы в виде достижения частичной ремиссии у 38 % больных с рецидивами ХЛЛ [9]. Недостатком навитоклакса оказалась его способность ингибировать Bcl-X_L, который критически важен для выживания тромбоцитов, находящихся в периферическом кровотоке. Дозозависимая тромбоцитопения наблюдалась у большинства больных, получавших лечение навитоклаксом, и послужила препятствием для дальнейших исследований препарата в клинике.

В отличие от навитоклакса, венетоклакс практически не связывается с Bcl-X_L, что предотвращает развитие тромбоцитопении. Помимо этого, препарат обладает в 5 раз более высокой аффинностью к Bcl-2 и гораздо сильнее индуцирует апоптоз клеток ХЛЛ *in vitro*. Снижение количества лейкозных клеток в периферической крови наблюдается у пациентов уже через 6–24 ч после приема венетоклакса. При этом редукция лимфоцитоза происходит за счет активации апоптоза, в том числе в клетках с del17p и мутациями в гене TP53 [10].

Особенности фармакокинетики

Пиковая концентрация венетоклакса в крови достигается через 6–8 ч после приема. Время полувыведения препарата после однократного приема 50 мг составляет от 19 до 26 ч. Для достижения целевых фармакокинетических параметров препарат следует принимать с едой (или сразу после нее), поскольку пищевые жиры необходимы для его поступления в кишечную лимфатическую систему [11]. Отслеживать и ограничивать содержание жиров в пище не требуется [12].

Ренальный клиренс препарата составляет менее 0,01 % от принятой дозы, что указывает на возможность его использования у пациентов с нарушением функции почек. В клинических исследованиях элиминация препарата не различалась у больных с легким или умеренным снижением клиренса креатинина и пациентов с нормальной почечной функцией [13].

Венетоклакс является субстратом цитохрома CYP3A4 и Р-гликопротеина (MDR1). Одновременный прием препарата с индуктором CYP3A4 рифампицином приводит к уменьшению пиковой концентрации венетоклакса на 42 % и ускорению времени его полувыведения до 7 ч [14]. Из-за риска развития синдрома лизиса опухоли сильные ингибиторы CYP3A4 (например, вориконазол) противопоказаны в начале приема венетоклакса (период увеличения дозы). При необходимости их назначения в последующем доза ABT-199 должна быть уменьшена минимум на 75 %. Умеренные ингибиторы CYP3A4 (например, ципрофлоксацин) и ингибиторы Р-гликопротеина (например, амиодарон) требуют снижения дозы венетоклакса как минимум на 50 %. Субстраты Р-гликопротеина с узким терапевтическим индексом (дигоксин и др.) должны приниматься не менее чем за 6 ч до препарата.

Эффективность в монотерапии

Результаты наиболее крупного исследования эффективности венетоклакса в монорежиме (M12–175 ветвь А, NCT01328626) были опубликованы А. Roberts с соавт. в 2016 г. [15]. В данное открытое многоцентровое исследование I фазы было включено 116 пациентов с рецидивами ХЛЛ. У большинства (89 %) больных имелись факторы неблагоприятного прогноза: резистентность к флударабину (у 60 %), массивная лимфаденопатия (у 58 %), del17p (у 30 %), del11q (у 27 %), немутированный вариант генов *IGHV* (у 45 %). Медиана числа линий терапии в анамнезе составляла 3 (диапазон от 1 до 11).

Эффект венетоклакса наблюдался в интервале дозировок от 20 до 1200 мг. Максимально переносимая доза не была определена, поскольку дозолимитирующей токсичности не наблюдалось даже при назначении 1200 мг/сут. Объективный ответ на терапию был получен у 79 % больных, причем у 20 % была достигнута полная ремиссия. Пациенты с резистентностью к флударабину достигли ответа в 79 % случаев, в 16 % отмечалась полная ремиссия. У 5 % больных была диагностирована эрадикация минимальной остаточной болезни (МОБ) в костном мозге. Глубина ответа на терапию существенно не различалась у больных, получавших венетоклакс в дозах 400, 800 и 1200 мг/сут. Медиана беспрогрессивной выживаемости (БПВ) составила 25 мес для части когорты с наиболее длительным периодом наблюдения. У пациентов с del17p медиана БПВ достигла 16 мес. Наиболее продолжительные ремиссии наблюдались у пациентов с полным ответом на монотерапию.

Положительное решение FDA в значительной степени было основано на результатах последующего открытого многоцентрового исследования II фазы у пациентов с рецидивирующим и рефрактерным течением ХЛЛ на фоне del17p (M13–982, NCT01889186) [16]. В данное исследование с мая 2013 г. по июнь 2014 г. были включены 107 больных, которые получали венетоклакс в дозе 400 мг после 4–5-недельного периода увеличения дозы. Число предшествующих линий терапии у пациентов составило от 1 до 4 (медиана 2). У 44 % больных имелась рефрактерность к флударабину, у 47 % — массивная лимфаденопатия, у 28 % del17p сочеталась с del11q. Общий ответ был получен у 79,4 % пациентов. У 16 % больных (по оценке исследователей) и у 8 % (по оценке независимых экспертов) была достигнута полная ремиссия или полная ремиссия с неполным восстановлением показателей гемограммы. Медиана времени до достижения начального ответа, по мнению независимого комитета исследователей, составила 0,8 мес, а наилучшего ответа — 8,2 мес. Эрадикация минимальной остаточной болезни в костном мозге отмечена у 6 (5,6 %) больных.

Недостаточное время наблюдения на момент публикации статьи не позволило авторам оценить медиану БПВ. Обновленные данные с включением еще

51 пациента были представлены на конгрессе Европейской гематологической ассоциации (ЕНА) в 2017 г. К 24 мес терапии беспрогрессивная выживаемость отмечалась у 52 % больных и 72 % оставались живы. По данным проточной цитометрии 27 % пациентов имели МОБ-негативность периферической крови. Через 24 мес наблюдения у больных с полной ремиссией и негативной МОБ (по данным проточной цитометрии) беспрогрессивная выживаемость составила 100 % в сравнении с 78,5 % у пациентов с негативной МОБ и частичной ремиссией [17].

В целом венетоклакс показал впечатляющую эффективность в монорежиме у резистентных и рефрактерных больных с ХЛЛ высокого риска. У части больных была достигнута эрадикация МОБ. При этом не наблюдалось высокой токсичности, характерной для комбинаций цитостатиков.

Важно, что на примере монотерапии венетоклаксом продемонстрирована возможность достижения МОБ-негативности [3, 17], которая коррелирует с лучшим ответом на последующую аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Предварительные результаты исследования II фазы (NCT02141282) и данные расширенной когорты исследования M13–982 указывают на то, что венетоклакс в монорежиме эффективен у больных с резистентностью к ибрутинибу и иделалисибу [18]. Как уже упоминалось, применение венетоклакса в данной группе больных разрешено в Европейском союзе.

Эффективность комбинаций

Доклинические исследования показали рациональность комбинации венетоклакса с моноклональными антителами к CD20, в частности, с ритуксимабом и обинутузумабом. В модели *in vitro* эти препараты преодолевали CD40-индуцированную резистентность клеток ХЛЛ к венетоклаксу [19]. Аналогично в лимфомных линиях, резистентных к навитоклаксу, наблюдался синергизм с ритуксимабом в условиях *in vivo* мышинной модели [20]. Комбинация навитоклакса и ритуксимаба показала активность в исследованиях I–II фазы у больных с ХЛЛ.

Наиболее крупное исследование сочетания венетоклакса и ритуксимаба у резистентных больных – протокол Ib фазы (NCT01682616), результаты которого были недавно опубликованы J.F. Seymour с соавт. [21]. Всего было включено 49 больных с медианой возраста 68 лет (диапазон 50–88 лет) и медианой числа предшествующих линий терапии 2 (диапазон 1–5). У 9 (19 %) из 47 больных имелась del17p, у 19 (70 %) из 27 – немутированный вариант генов *IGHV*. Общий ответ был достигнут у 86 % больных, причем у 51 % была документирована полная ремиссия или полная ремиссия с неполным восстановлением показателей гемограммы. Уровень эрадикации МОБ в костном мозге был беспрецедентно высок для рецидивных больных и составил 57 % (у 28 пациентов из 49). Беспрогрессивная выжи-

ваемость к 24 мес достигла 82 %. У 8 пациентов с эрадикацией МОБ, пожелавших прекратить лечение, ремиссия сохранялась после отмены венетоклакса при медиане времени наблюдения в 9,7 мес. Нейтропении III–IV степени наблюдались у 53 % больных, инфекции III–IV степени – у 16 %. Полученные результаты легли в основу исследования III фазы MURANO (NCT02005471), в котором комбинация венетоклакса и ритуксимаба сравнивается с режимом терапии бендамустином и ритуксимабом у пациентов с рецидивами ХЛЛ или рефрактерным течением заболевания.

В настоящее время в нескольких исследованиях Ib и III фазы изучается эффективность комбинации венетоклакса с обинутузумабом. Так, в протоколе CLL14 немецкой группы у пациентов со значимой коморбидностью, ранее не получавших терапию, сравниваются режимы «обинутузумаб + венетоклакс» и «обинутузумаб + хлорамбуцил» [22]. Достижение МОБ-негативности в костном мозге было задокументировано у 5 (38 %) из 13 больных в начальной фазе исследования. На момент написания обзора набор в протокол закончен, все пациенты ($n = 445$) получают лечение.

Изучение экспрессии антиапоптотических белков в опухолевых клетках больных ХЛЛ на фоне терапии ибрутинибом показало снижение в динамике экспрессии Mcl-1 [23]. В другой работе *in vitro* культивирование клеток ХЛЛ с ибрутинибом приводило к повышению экспрессии Bim [24]. Эти наблюдения указывают на возможный синергизм венетоклакса и ибрутиниба. В 2017 г. на конгрессе ЕНА были доложены предварительные данные о переносимости комбинации у больных с рецидивами ХЛЛ (исследование CLARITY). Сочетание препаратов не приводило к развитию избыточной токсичности [25]. В настоящее время итальянская группа проводит исследование IIa фазы, направленное на оценку частоты достижения МОБ-негативных ремиссий на фоне приема ибрутиниба и венетоклакса, причем дизайн протокола предполагает отмену терапии у пациентов с эрадикацией МОБ [26].

Тройная комбинация венетоклакса с ибрутинибом и обинутузумабом в настоящее время изучается в исследовании IB/II фазы, инициированном группой Университета Огайо. Предварительные результаты показали хорошую переносимость режима и достижение МОБ-негативности в костном мозге у 2 (33 %) из 6 больных [27]. Аналогичные протоколы имеются в портфолио немецкой группы (NCT02950051). Предполагается, что двойные и тройные ибрутинибсодержащие схемы улучшат прогноз в тех случаях, когда ибрутиниб недостаточно эффективен в монорежиме (например, для группы больных с del17p), а также, возможно, позволят отменять препарат у пациентов, достигающих МОБ-негативности, что существенно снизит стоимость лечения.

Интересно, что *in vitro* венетоклакс синергичен также с ингибиторами PI3K иделалисибом [28]

и дувелисибом [29], ингибиторами SYK цердулатинибом [30] и энтосплетинибом [31], а также мультики-нальным ингибитором сунитинибом [32], однако результаты использования таких комбинаций в клинике пока систематически не изучены.

Механизмы резистентности

Примерно 20 % больных с рецидивирующим и рефрактерным течением ХЛЛ не отвечают на монотерапию венетоклаксом, и еще у 30 % к 2 годам терапии развивается резистентность к нему. Данные исследований *in vitro* указывают на то, что одним из механизмов резистентности может быть повышение экспрессии и/или стабильности альтернативных антиапоптотических белков семейства Bcl-2 (Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1 и Bfl-1), способных секвестрировать Bim, в опухолевых клетках [28, 33]. Действительно, в модели микроокружения *in vitro* под действием CD40 ± IL-4 клетки ХЛЛ начинают гиперэкспрессировать Bcl-X_L, Bfl-1 и Mcl-1, что приводит к потере их чувствительности к цитостатикам [34], ВНЗ-миметику АВТ-737 (парентеральный аналог навитоклакса) [35] и венетоклаксу [36]. Индукция экспрессии Mcl-1 была показана при совместном культивировании клеток ХЛЛ с мезенхимальными стромальными клетками, моделирующими нишу костного мозга [37]. В исследовании I фазы уровень Mcl-1 коррелировал с ответом на навитоклакс [38].

T. Song с соавт. связали *in vitro* восприимчивость клеток ХЛЛ к ВНЗ-миметикам с уровнем фосфорилированного Bcl-2, показав, что наилучшим предиктором чувствительности является внутриклеточное соотношение (Mcl-1 + pBcl-2)/Bcl-2 [39]. Эти данные пока не были проверены в клинике.

В экспериментальной модели длительной терапии венетоклаксом формирование резистентности в лимфомных линиях происходило за счет точечных мутаций в генах Bax и Bcl-2 [40]. Интересно, что, несмотря на общий участок связывания, мутации в ВНЗ-домене Bcl-2 нарушали взаимодействие последнего с венетоклаксом, но не с Bim и Bad, то есть антиапоптотическая функция белка не страдала. При этом мутации Bcl-2 не приводили к резистентности к цитостатикам, в то время как мутация Bax G179E индуцировала снижение чувствительности к доксорубину и цисплатину.

Наконец, в линиях, гиперэкспрессирующих Bcl-2 вследствие транслокации t(14;18), длительное воздействие венетоклакса могло приводить к снижению внутриклеточного уровня белка Bim, что, по-видимому, также может быть одним из механизмов потери чувствительности [41].

Несмотря на большое количество данных, полученных *in vitro*, механизмы резистентности к венетоклаксу *in vivo* у больных ХЛЛ на сегодняшний день изучены недостаточно. Клинические исследования показали, что факторами риска утраты ответа могут быть предсуществующая рефрактерность к флударабину и/или комплексный кариотип, а также

недостижение полной ремиссии на фоне терапии [42]. При этом количество предшествующих линий терапии и поломки TP53 не имеют независимой прогностической значимости.

В 12–25 % случаев возникновение резистентности связано с трансформацией ХЛЛ в лимфому Ходжкина или диффузную В-крупноклеточную лимфому, которые иногда могут выявляться случайно при рентгенологическом контроле [42, 43]. Заподозрить синдром Рихтера позволяют такие симптомы, как необъяснимая цитопения, повышение уровня лактатдегидрогеназы, потливость, лихорадка, снижение массы тела, изолированный рост отдельных групп лимфоузлов, появление плеврального выпота. При подозрении на трансформацию следует провести позитронную эмиссионную томографию с последующим гистологическим подтверждением диагноза.

Побочные эффекты

Наиболее серьезным побочным эффектом венетоклакса, демонстрирующим одновременно и степень его клинической эффективности, является синдром лизиса опухоли (СЛО). Он развивается в результате высвобождения большого количества калия, фосфора и нуклеиновых кислот из активно разрушающихся лейкозных клеток. Клиническими проявлениями СЛО могут быть жизнеугрожающая почечная недостаточность, аритмии и неврологические нарушения.

В исследовании I фазы быстрое (за 2–3 нед) увеличение дозы венетоклакса или начало терапии с дозы 50 мг/сут и выше приводило к частому развитию СЛО, который в одном случае закончился летальным исходом (внезапная сердечная смерть) [15]. Смерть пациента от СЛО на 1-й день терапии после приема 50 мг была зафиксирована также в исследовании комбинации венетоклакса и ритуксимаба [21]. Модификация схемы приема препарата и внедрение риск-стратифицированного подхода к профилактике позволили минимизировать частоту клинически значимого СЛО в последующих исследованиях.

В соответствии с актуальной инструкцией, одобренной FDA и в Европейском союзе, прием венетоклакса должен начинаться с дозы 20 мг/сут в течение 1 нед. При отсутствии осложнений в последующем следует еженедельно увеличивать дозу до лечебной (рис. 2) [2, 3].

Поскольку риск развития СЛО при ХЛЛ напрямую зависит от объема опухоли, необходимо оценивать у пациентов уровень лейкоцитоза и объем лимфаденопатии (см. таблицу). Перед началом терапии всем пациентам должны быть назначены адекватная гидратация, антигиперурикемический препарат и частый мониторинг лабораторных параметров (калий, фосфор, кальций, мочевая кислота и креатинин). Пациенты с исходно сниженным клиренсом креатинина (менее 80 мл/мин) должны наблюдаться особенно тщательно. Как уже упоминалось, ингибиторы СYP3A4 потенциально

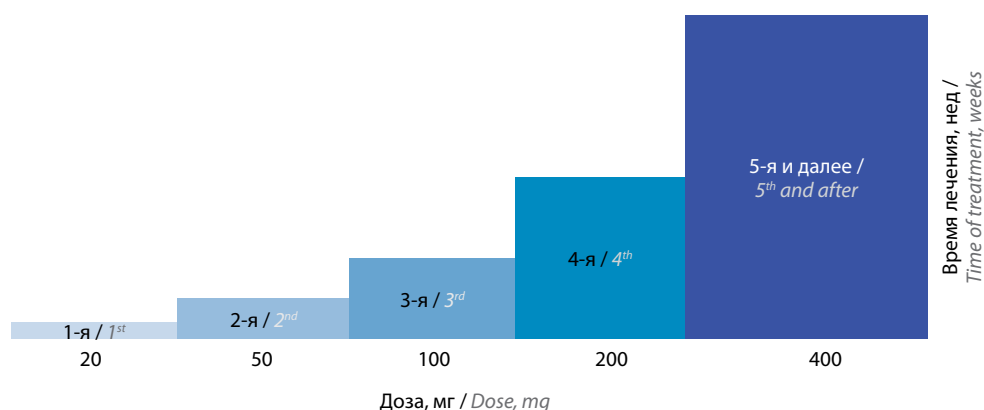


Рис. 2. Схема эскалации дозы венетоклакса в начале терапии (адаптировано из [2, 3])

Fig. 2. Escalation of venetoclax dose at the beginning of therapy (adapted from [2, 3])

Стратификация риска и профилактика синдрома лизиса опухоли на фоне приема венетоклакса (адаптировано из [2, 3])

Risk stratification and tumor lysis syndrome prophylaxis during venetoclax therapy (adapted from [2, 3])

Опухолевая нагрузка Tumor burden		Гидратация Hydration	Условия мониторинга Setting of Monitoring	Антигиперурикемический препарат Antihyperuricemic drug
Низкая Low	Лимфоцитоз $<25 \times 10^9/\text{л}$ и лимфатические узлы <5 см Lymphocytosis $<25 \times 10^9/\text{l}$ and lymph nodes <5 cm	1,5–2 л <i>per os</i> 1.5–2 l <i>per os</i>	Амбулаторно Outpatient	
Промежуточная Medium	Лимфоцитоз $\geq 25 \times 10^9/\text{л}$ и/или хотя бы 1 лимфатический узел 5–10 см Lymphocytosis $\geq 25 \times 10^9/\text{l}$ and/or at least one lymph node 5–10 cm	1,5–2 л <i>per os</i> ± внутривенная инфузия (по необходимости) 1.5–2 l <i>per os</i> ± intravenous infusion if necessary	Амбулаторно (госпитализация на период 1-го приема 20 и 50 мг при клиренсе креатинина <80 мл/мин) Outpatient (hospitalization for 1 st intake of 20 and 50 mg if creatinine clearance <80 ml/min)	Аллопуринол за 2–3 дня до 1-го приема Allopurinol 2–3 days before the first dose
Высокая High	Хотя бы 1 лимфоузел ≥ 10 см или лимфоцитоз $\geq 25 \times 10^9/\text{л}$ + хотя бы 1 лимфатический узел >5 см At least one lymph node ≥ 10 cm or lymphocytosis $\geq 25 \times 10^9/\text{l}$ + at least one lymph node >5 cm	1,5–2 л <i>per os</i> + 150–200 мл/ч внутривенно по переносимости 1.5–2 liters <i>per os</i> + 150–200 ml/h intravenous according to tolerability	Стационарно на период 1-го приема 20 и 50 мг, далее амбулаторно Hospitalization for 1 st intake of 20 and 50 mg, outpatient thereafter	Аллопуринол за 2–3 дня до 1-го приема ± расбуриказа Allopurinol 2–3 days before the first dose ± rasburicase

могут увеличивать концентрацию венетоклакса в крови и за счет этого провоцировать развитие СЛО даже при воздействии минимальных доз препарата. Поэтому важно контролировать сопутствующую терапию.

Недавно М. Davids с соавт. предложили более короткую, 3-недельную, схему увеличения дозы венетоклакса для пациентов с бурной прогрессией ХЛЛ на фоне резистентности к ингибиторам В-клеточного рецептора, у которых отсрочка эффекта препарата может привести к летальному исходу [44]. Из 10 пациентов, пролеченных авторами под тщательным стационарным наблюдением, ни у одного больного не было отмечено признаков СЛО. Возможность более широкого применения данной схемы пока изучена недостаточно, и она не может быть рекомендована для применения.

Наиболее частым побочным эффектом III–IV степени в исследованиях монотерапии венетоклаксом являлось развитие нейтропении (у 31–41 % больных). Инфекции отмечались у 20 % пациентов, однако только у 7 (33 %) из них ($n = 21$) выявлена выраженная нейтропения, что немного, если учитывать сильно предлеченный контингент. В исследовании не использовалась рутинная антибиотикопрофилактика, но активно назначался обычный и пегилированный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Менее чем у 10 % больных приходилось снижать дозу или делать перерыв в терапии из-за нейтропении. Случаев отмены венетоклакса из-за нейтропении не было [2, 3, 16].

Развитие нейтропении наблюдалось и в исследованиях навитоклакса, т. е. этот побочный эффект

является общим для класса ВНЗ-миметиков. Патогенетический механизм нейтропении, вероятнее всего, связан с воздействием на гемопоэтические предшественники, зависимые от уровня Bcl-2 [45].

Заключение и перспективы

Появление венетоклакса стало одним из наиболее существенных прорывов в терапии ХЛЛ. Препарат обладает р53-независимым механизмом действия, что объясняет его эффективность у пациентов, утративших чувствительность к химиопрепаратам. Благоприятный профиль токсичности и независимость фармакокинетики от функции почек делают привлекательным использование препарата у пожилых больных с сопутствующими заболеваниями при условии назначения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и адекватной профилактики СЛО.

Такие известные прогностические факторы, как рефрактерность к флударабину и комплексный кариотип, сохраняют свою прогностическую значимость при использовании венетоклакса в монорежиме. Одной из наиболее частых причин утраты ответа, особенно на ранних сроках терапии, является разви-

тие синдрома Рихтера, что требует настороженности и своевременного выполнения ПЭТ-исследования и биопсии во всех подозрительных случаях.

Несмотря на впечатляющие результаты, полученные в лечении одним только венетоклаксом у пациентов с рецидивами заболевания, наибольшие перспективы данный препарат, по-видимому, имеет в составе комбинаций с ритуксимабом, обинутузумабом, ибрутинибом и другими экспериментальными препаратами, в том числе в 1-й линии терапии. Предварительные результаты исследований двойных и тройных комбинаций позволяют рассчитывать на достижение МОБ-негативности у большей части больных ХЛЛ. Важно, что при этом не используются классические цитостатики, т. е. углубление ответа не влечет за собой увеличение частоты вторичных опухолей. Вопрос снижения стоимости лечения, вероятнее всего, будет решен за счет отмены таргетных препаратов после достижения МОБ-негативности у пациентов. В настоящее время зарегистрировано более 30 клинических исследований венетоклакса при ХЛЛ, что подчеркивает интерес к нему клиницистов. Появление результатов этих исследований имеет все шансы в очередной раз кардинально изменить стандарты лечения.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Souers A.J., Leverson J.D., Boghaert E.R. et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013;19(2):202–8. DOI: 10.1038/nm.3048. PMID: 23291630.
2. SPC (Special Product Characteristics) Venetoclax. Доступно по: www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&applno=208573.
3. SPC (Special Product Characteristics) Venetoclax. Доступно по: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004106/WC500218800.pdf.
4. Delbridge A.R., Strasser A. The BCL-2 protein family, BH3-mimetics and cancer therapy. *Cell Death Differ* 2015;22(7):1071–80. DOI: 10.1038/cdd.2015.50. PMID: 25952548.
5. Cory S., Huang D.C., Adams J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22(53):8590–607. DOI: 10.1038/sj.onc.1207102. PMID: 14634621.
6. Hanada M., Delia D., Aiello A. et al. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993;82(6):1820–8. PMID: 8104532.
7. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(39):13944–9. DOI: 10.1073/pnas.0506654102. PMID: 16166262.
8. Del Gaizo Moore V., Brown J.R., Certo M. et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest* 2007;117(1):112–21. DOI: 10.1172/JCI28281. PMID: 17200714.
9. Seymour J.F., Roberts A.W., Carney D.A. et al. Phase 2 Study of navitoclax (ABT-263) safety and efficacy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: interim results. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(2):258.
10. Anderson M.A., Deng J., Seymour J.F. et al. The BCL2 selective inhibitor venetoclax induces rapid onset apoptosis of CLL cells in patients via a TP53-independent mechanism. *Blood* 2016;127(25):3215–24. DOI: 10.1182/blood-2016-01-688796. PMID: 27069256.
11. Salem A.H., Agarwal S.K., Dunbar M. et al. Effect of low- and high-fat meals on the pharmacokinetics of Venetoclax, a selective first-in-class BCL-2 inhibitor. *J Clin Pharmacol* 2016;56(11):1355–61. DOI: 10.1002/jcph.741. PMID: 27029823.
12. Salem A.H., Dunbar M., Agarwal S.K. Pharmacokinetics of venetoclax in patients with 17p deletion chronic lymphocytic leukemia. *Anticancer Drugs* 2017;28(8):911–4. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000522. PMID: 28562380.
13. Jones A.K., Freise K.J., Agarwal S.K. et al. Clinical predictors of Venetoclax pharmacokinetics in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma patients: a pooled population pharmacokinetic analysis. *AAPS J*

- 2016;18(5):1192–202.
DOI: 10.1208/s12248-016-9927-9.
PMID: 27233802.
14. Agarwal S.K., Hu B., Chien D. et al. Evaluation of Rifampin's transporter inhibitory and CYP3A inductive effects on the pharmacokinetics of Venetoclax, a BCL-2 inhibitor: Results of a single- and multiple-dose study. *J Clin Pharmacol* 2016;56(11):1335–43.
DOI: 10.1002/jcph.730. PMID: 26953185.
 15. Roberts A.W., Davids M.S., Pagel J.M. et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2016;374(4):311–22.
DOI: 10.1056/NEJMoa1513257. PMID: 26639348.
 16. Stilgenbauer S., Eichhorst B., Schetelig J. et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2016;17(6):768–78.
DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30019-5. PMID: 27178240.
 17. Stilgenbauer S., Chyla B., Eichhorst B. et al. Venetoclax in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia with 17P deletion: Outcome and minimal residual disease from the full population of the pivotal M13-982 trial. *Haematologica* 2017;102(Suppl 2):311–2.
PMCID: PMC5492673.
 18. Jones J., Mato A.R., Coutre S. et al. Preliminary results of a phase 2, Open-Label Study of Venetoclax (ABT-199/GDC-0199) monotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia relapsed after or refractory to Ibrutinib or Idelalisib therapy. *Blood* 2015;126(23):715.
 19. Thijssen R., Slinger E., Weller K. et al. Resistance to ABT-199 induced by microenvironmental signals in chronic lymphocytic leukemia can be counteracted by CD20 antibodies or kinase inhibitors. *Haematologica* 2015;100(8):302–6.
DOI: 10.3324/haematol.2015.124560. PMID: 25957396.
 20. Tse C., Shoemaker A.R., Adickes J. et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res* 2008;68(9):3421–8.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5836. PMID: 18451170.
 21. Seymour J.F., Ma S., Brander D.M. et al. Venetoclax plus rituximab in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia: a phase 1b study. *Lancet Oncol* 2017;18(2):230–40.
DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30012-8. PMID: 28089635.
 22. Fischer K., Al-Sawaf O., Fink A.M. et al. Venetoclax and obinutuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2017;129(19):2702–5. DOI: 10.1182/blood-2017-01-761973.
PMID: 28325865.
 23. Cervantes-Gomez F., Lamothe B., Woyach J.A. et al. Pharmacological and protein profiling suggests Venetoclax (ABT-199) as optimal partner with ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2015;21(16):3705–15.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2809. PMID: 25829398.
 24. Deng J., Isik E., Fernandes S.M. et al. Bruton's tyrosine kinase inhibition increases BCL-2 dependence and enhances sensitivity to venetoclax in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2017;31(10):2075–84.
DOI: 10.1038/leu.2017.32. PMID: 28111464.
 25. Hillmen P., Rawstron A., Munir T. et al. The initial report of the bloodwise tap clarity study combining ibrutinib and venetoclax in relapsed, refractory cll shows acceptable safety and promising early indications of efficacy. *Haematologica* 2017;102(s2):1–882. Abstract S770.
 26. Ghia P., Scarfò L., Coscia M. et al. MRD-guided approach for the combination of ibrutinib to venetoclax in relapsed/refractory patients with chronic lymphocytic leukemia (improve study). *Hematol Oncol* 2017;35(Suppl. S2):426–7. DOI: 10.1002/hon.2440_11.
 27. Jones J.A., Woyach J., Awan F.T. et al. Phase 1b results of a phase 1b/2 study of Obinutuzumab, Ibrutinib, and Venetoclax in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2016;128(22):639.
 28. Choudhary G., Al-Harbi S., Mazumder S. et al. MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis* 2015;6:e1593.
DOI: 10.1038/cddis.2014.525. PMID: 25590803.
 29. Patel V., Balakrishnan K., Douglas M. et al. Duvelisib treatment is associated with altered expression of apoptotic regulators that helps in sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to venetoclax (ABT-199). *Leukemia* 2017;31(9):1872–81. DOI: 10.1038/leu.2016.382.
PMID: 28017967.
 30. Blunt M., Koehrer S., Dobson R. et al. The Dual Syk/JAK Inhibitor Cerdulatinib Antagonizes B-cell Receptor and Microenvironmental Signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2017;23(9):2313–24.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1662. PMID: 27697994.
 31. Bojarczuk K., Sasi B., Gobessi S. et al. BCR signaling inhibitors differ in their ability to overcome Mcl-1-mediated resistance of CLL B cells to ABT-199. *Blood* 2016;127(25):3192–201.
DOI: 10.1182/blood-2015-10-675009. PMID: 27095788.
 32. Oppermann S., Ylanko J., Shi Y. et al. High-content screening identifies kinase inhibitors that overcome venetoclax resistance in activated CLL cells. *Blood* 2016;128(7):934–47.
DOI: 10.1182/blood-2015-12-687814. PMID: 27297795.
 33. Yecies D., Carlson N.E., Deng J., Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood* 2010;115(16):3304–13.
DOI: 10.1182/blood-2009-07-233304. PMID: 20197552.
 34. Smit L.A., Hallaert D.Y., Spijker R. et al. Differential Noxa/Mcl-1 balance in peripheral versus lymph node chronic lymphocytic leukemia cells correlates with survival capacity. *Blood* 2007;109(4):1660–8.
DOI: 10.1182/blood-2006-05-021683. PMID: 17038534.
 35. Vogler M., Butterworth M., Majid A. et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113(18):4403–13.
DOI: 10.1182/blood-2008-08-173310. PMID: 19008458.
 36. Geest C.R., de Rooij M.F., Liu N. et al. Possible mechanisms of resistance to the novel BH3-mimetic ABT-199 in *in vitro* lymph node models of CLL – the role of Abl and Btk. *Blood* 2013;122(21):4188.
 37. Kurtova A.V., Balakrishnan K., Chen R. et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009;114(20):4441–50.
DOI: 10.1182/blood-2009-07-233718. PMID: 19762485.
 38. Roberts A.W., Seymour J.F., Brown J.R. et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 2012;30(5):488–96.
DOI: 10.1200/JCO.2011.34.7898. PMID: 22184378.
 39. Song T., Chai G., Liu Y. et al. Bcl-2 phosphorylation confers resistance on chronic lymphocytic leukaemia cells to the BH3 mimetics ABT-737, ABT-263 and ABT-199 by impeding direct binding. *Br J Pharmacol* 2016;173(3):471–83.
DOI: 10.1111/bph.13370. PMID: 26493374.
 40. Fresquet V., Rieger M., Carolis C. et al. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood* 2014;123(26):4111–9.
DOI: 10.1182/blood-2014-03-560284. PMID: 24786774.
 41. Bodo J., Zhao X., Durkin L. et al. Acquired resistance to venetoclax (ABT-199) in t(14;18) positive lymphoma cells.

- Oncotarget 2016;7(43):70000–10.
DOI: 10.18632/oncotarget.12132.
PMID: 27661108.
42. Anderson M.A., Tam C., Lew T.E. et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood* 2017;129(25):3362–70.
DOI: 10.1182/blood-2017-01-763003.
PMID: 28473407.
43. Roberts A.W., Seymour J.F., Eichhorst B. et al. Pooled Multi-Trial Analysis of Venetoclax efficacy in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;128(22):3230.
44. Davids M., Jones J., Eradat H. et al. Modified Venetoclax dose ramp-up in select high-risk patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) with progression after B-cell Receptor pathway inhibitors (BCRi). *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2017;17:302.
45. Levenson J.D., Phillips D.C., Mitten M.J. et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med* 2015;7(279):279ra40.
DOI: 10.1126/scitranslmed.aaa4642.
PMID: 25787766.

Реактивный плазмцитоз в дебюте ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Клинический случай

Н.Г. Чернова, М.Н. Синицына, А.М. Ковригина, Ю.В. Сидорова, И.В. Гальцева,
С.А. Марьина, В.Н. Двирный, Е.Е. Звонков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Наталья Геннадьевна Чернова ngchernova@mail.ru

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома — редкое Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание, протекающее с генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, поликлональной гипергаммаглобулинемией и симптомами интоксикации. Персистенция плазматических клеток в периферической крови может быть проявлением как опухолевого, так и реактивного процесса. В статье описан случай ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, протекающей с увеличением количества плазматических клеток в периферической крови до 28 %, а в пунктате костного мозга — до 9 %. Проведенная комплексная диагностика, включающая иммунофенотипическое исследование плазматических клеток, морфологическое исследование биоптатов лимфатического узла и костного мозга, позволила верифицировать диагноз ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, протекающей с поликлональным плазмцитозом.

Ключевые слова: ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, реактивный плазмцитоз, плазмклеточный лейкоз, множественная миелома

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-28-33

Reactive plasmacytosis at the onset of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Case report

N.G. Chernova, M.N. Sinitsyna, A.M. Kovrigina, Y.V. Sidorova, I.V. Galtseva, S. A. Mar'ina, V.N. Dvirnyk, E.E. Zvonkov
National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia

Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is a rare T-cell lymphoproliferative disease with generalized lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, intoxication and polyclonal hypergammaglobulinemia. The persistence of plasma cells in peripheral blood can be a manifestation of both tumor and reactive processes. In our article, we described the case of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with an increase in the number of peripheral blood plasma cells to 28 %, and in bone marrow to 9 %. The complex diagnostics, including plasma cells immunophenotyping, morphology of the lymph node biopsy and bone marrow samples, made it possible to verify the diagnosis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with polyclonal plasmacytosis.

Key words: angioimmunoblastic T-cell lymphoma, reactive plasmacytosis, plasma-cell leukemia, multiple myeloma

Введение

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) — редкое Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание, протекающее с генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, симптомами интоксикации и поликлональной гипергаммаглобулинемией [1]. АИТЛ занимает 2-е место по частоте встречаемости среди зрелых НК/Т-клеточных лимфом [2, 3]. Мужчины и женщины заболевают с одинаковой частотой, преимущественно в возрасте 50–70 лет. Подавляющее большинство случаев АИТЛ диагностируется на поздних стадиях заболевания [1, 4]. Диагноз верифицируется на основании гистологического исследования биоптата лимфатического узла.

К отличительным морфологическим чертам АИТЛ относят сравнительно небольшое количество опухолевых клеток на фоне выраженного реактивного микроокружения, представленного эозинофилами, плазматическими клетками, гистиоцитами, мелкими

лимфоидными клетками, иммунобластами [5–7]. Морфологическим субстратом АИТЛ являются фолликулярные Т-хелперы с иммунофенотипом зрелых Т-клеток, экспрессирующих антигены CD10, BCL6, CXCL13, PD1, ICOS, SAP. Основная функция фолликулярных Т-хелперов — регуляция пролиферации и дифференцировки фолликулярных дендритных клеток и В-лимфоцитов в герминальном центре лимфоидного фолликула [1]. АИТЛ характеризуется агрессивным клиническим течением и неблагоприятным прогнозом, медиана общей выживаемости не превышает 3 лет [1].

Персистенция плазматических клеток в периферической крови наблюдается крайне редко и может быть свидетельством как опухолевого, так и реактивного процесса. Наличие в периферической крови плазматических клеток с aberrантным иммунофенотипом является характерной чертой первичного плазмклеточного лейкоза, может наблюдаться и при прогрессировании множественной миеломы [1]. Поликлональный

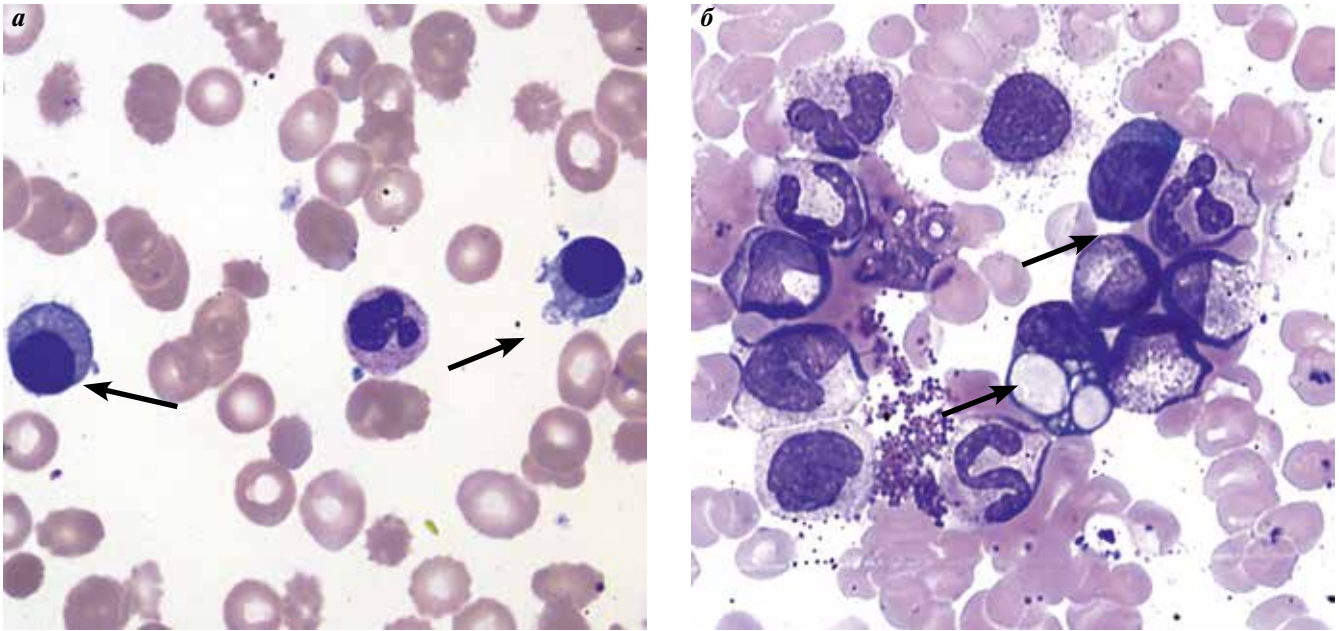


Рис. 1. Цитологическое исследование, окраска по Романовскому–Гимзе: а — мазок периферической крови (стрелками указаны плазматические клетки), $\times 1000$; б — пунктат костного мозга (стрелками указаны плазматическая клетка и клетка Мотта), $\times 1000$

Fig. 1. Cytological examination, Romanovsky–Giemsa stain: а — peripheral blood (the arrows indicate plasma cells), $\times 1000$; б — bone marrow (the arrows indicate plasma cell and Mott cell), $\times 1000$

или реактивный плазмцитоз обнаруживается при инфекционных, аутоиммунных и злокачественных заболеваниях или реакции на лекарственные препараты [8–12].

Появление в периферической крови единичных плазматических клеток наблюдается примерно у 1/3 пациентов при АИТЛ [13]. Большое количество плазмцитов в периферической крови и костном мозге при АИТЛ встречается крайне редко: представлено только несколько случаев в зарубежной литературе. В 2007 г. впервые опубликовано описание реактивного плазмцитоза в периферической крови и костном мозге при АИТЛ с содержанием плазматических клеток в периферической крови и костном мозге 31 и 41 % соответственно [13].

В этой статье мы представляем собственное клиническое наблюдение реактивного плазмцитоза при АИТЛ.

Клинический случай

Пациент Т., 55 лет, поступил в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с направительным диагнозом «первичный плазмклеточный лейкоз». За 1 мес до поступления в клинику у больного появились слабость, головокружение и одышка при незначительной физической нагрузке. При обследовании на догоспитальном этапе в гемограмме выявлены анемия (гемоглобин 43 г/л), тромбоцитопения (тромбоциты $85 \times 10^9/\text{л}$) и увеличение скорости оседания эритроцитов до 75 мм/ч. Уровень содержания лейкоцитов составил $19,4 \times 10^9/\text{л}$. При цитологическом исследовании мазка периферической крови выявлено 10 % проплазмцитов и 18 % плазматических клеток (рис. 1а).

При осмотре обнаружено увеличение периферических лимфатических узлов всех групп до 40×50 мм, анасарка, бледность кожных покровов. Биохимический анализ крови: гиперпротеинемия — до 110 г/л (N 65–85), содержание глобулинов — 85 г/л (N 25–33), повышение активности лактатдегидрогеназы — 1375 Ед/л (N 208–378), щелочной фосфатазы — 112 Ед/л (N 32–92). Остальные биохимические показатели оставались в пределах нормы. При иммунохимическом исследовании белков сыворотки выявлены: поликлональная гипергаммаглобулинемия классов G (до 239 МЕ/мл, N 95–235) и M (до 2288 МЕ/мл, N 60–405); повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов (до 141 усл. ед., N <66), β_2 -микроглобулина (до 5,67 мг/л, N <2,4) и С-реактивного белка (до 22,4 мг/л, N <6,0), активности ревматоидного фактора (до 98,1 МЕ/мл, N <20).

При ультразвуковом исследовании органов брюшной полости отмечалось увеличение селезенки (до 187×72 мм) и всех групп абдоминальных и забрюшинных лимфатических узлов с формированием конгломератов (до 60×50 мм), обнаружена специфическая инфильтрация абдоминальной клетчатки. Мультиспиральная компьютерная томография органов грудной клетки выявила увеличение бифуркационных лимфоузлов (до 42 мм), двусторонний гидроторакс, множественное очаговое поражение легочной ткани с размером очагов до 4 мм.

С диагностической целью больному проведены трепанобиопсия костного мозга и биопсия шейно-надключичного лимфатического узла. При цитологическом исследовании пунктата костного мозга выявлено 9 % плазматических клеток, среди них единичные клетки Мотта (рис. 1б). Иммунофенотипирование клеток периферической крови

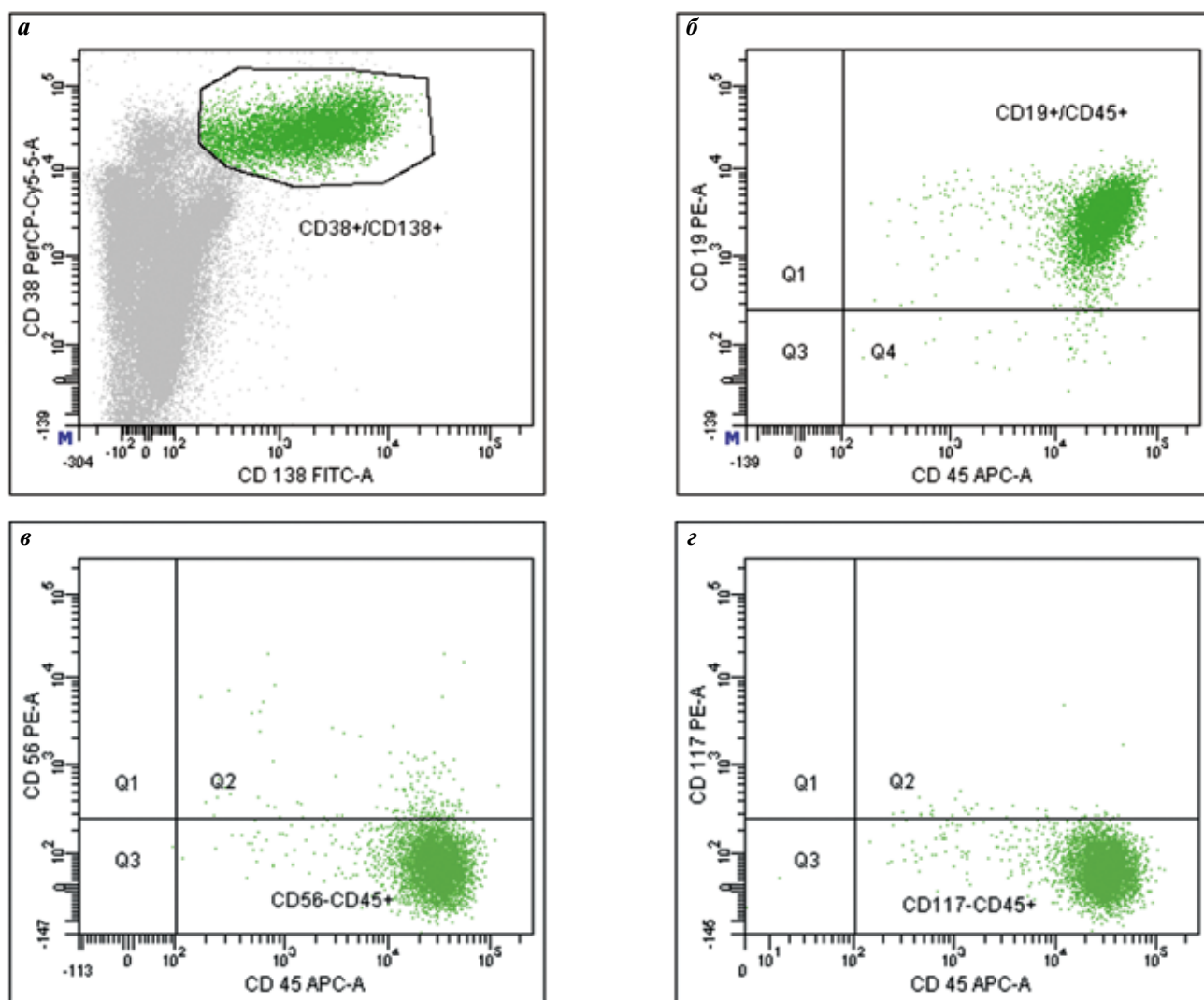


Рис. 2. Иммунофенотипирование реактивных плазматических клеток костного мозга и периферической крови. Популяции плазматических клеток, экспрессирующих антигены CD138 и CD38 (а), CD19 и CD45bright (б) и негативных по антигенам CD56 (в), CD117 (г)
Fig. 2. Immunophenotyping of reactive plasma cells of bone marrow and peripheral blood. Populations of plasma cells expressing CD138 and CD38 (a), CD19 and CD45bright (б), negative for the antigens CD56 (в) and CD117 (г)

и костного мозга методом проточной цитометрии показало наличие популяции плазматических клеток, экспрессирующих CD138, CD38, CD45bright, CD19 и негативных по антигенам CD56, CD117 и CD28 (рис. 2). Данная популяция плазматических клеток по цитометрическим параметрам светорассеяния располагалась ближе к лимфоцитарному гейту. Стандартное цитогенетическое исследование клеток костного мозга выявило нормальный кариотип.

Гистологическое исследование биоптата костного мозга показало в большинстве костномозговых полостей гиперплазированную кроветворную ткань. В клеточном составе преобладали плазматические клетки с эксцентрично расположенным ядром разной степени зрелости, обнаружены единичные клетки Мотта и белковые коагуляты. Среди элементов гемопоэза был определен рыхлый интерстициально-очаговый лимфоидный инфильтрат из клеток небольшого размера со светлой цитоплазмой и неправильной формой ядра. Морфологическое исследо-

вание биоптата лимфатического узла выявило полное стирание рисунка лимфоузла за счет диффузного лимфоидного инфильтрата из клеток среднего и крупного размера, плазматических клеток, эозинофильных гранулоцитов, выраженную пролиферацию сосудов венулярного типа с «пухлым» эпителием с признаками инфильтрации стенок (рис. 3а, б). Клетки лимфоидного инфильтрата средних и крупных размеров с неправильной формой ядра экспрессировали маркеры CD3, CD4, PD1, CD10, CXCL13 (рис. 4). Многочисленные крупные клетки с морфологией иммубластов реактивной природы экспрессировали CD20, CD30, IgM, IgG; в части из них методом гибридизации *in situ* была выявлена не кодирующая малая РНК вируса Эпштейна–Барр. Индекс пролиферативной активности Ki67 составил 60–70 % позитивных клеток опухолевого субстрата. При окрашивании с антителом к CD21 была выявлена выраженная пролиферирующая анастомозирующая сеть фолликулярных дендритных клеток. Плазматические клетки были политипичны,

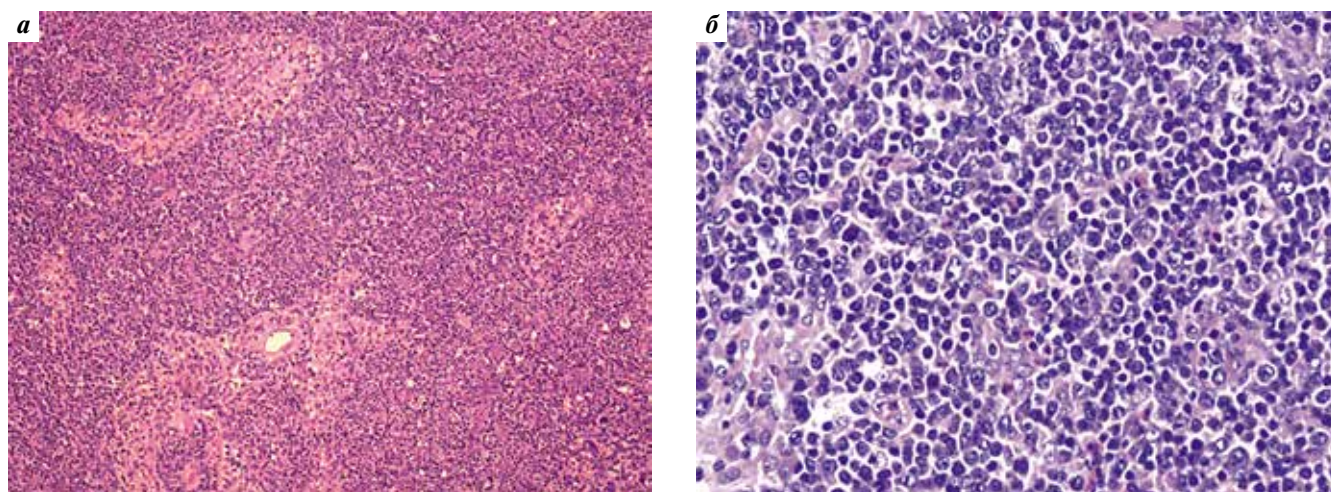


Рис. 3. Гистологическое исследование биоптата аксиллярного лимфатического узла; окраска гематоксилин-эозином; $\times 100$ (а), $\times 200$ (б)
Fig. 3. Histological examination of axillary lymph node; hematoxylin-eosin stain; $\times 100$ (a), $\times 200$ (б)

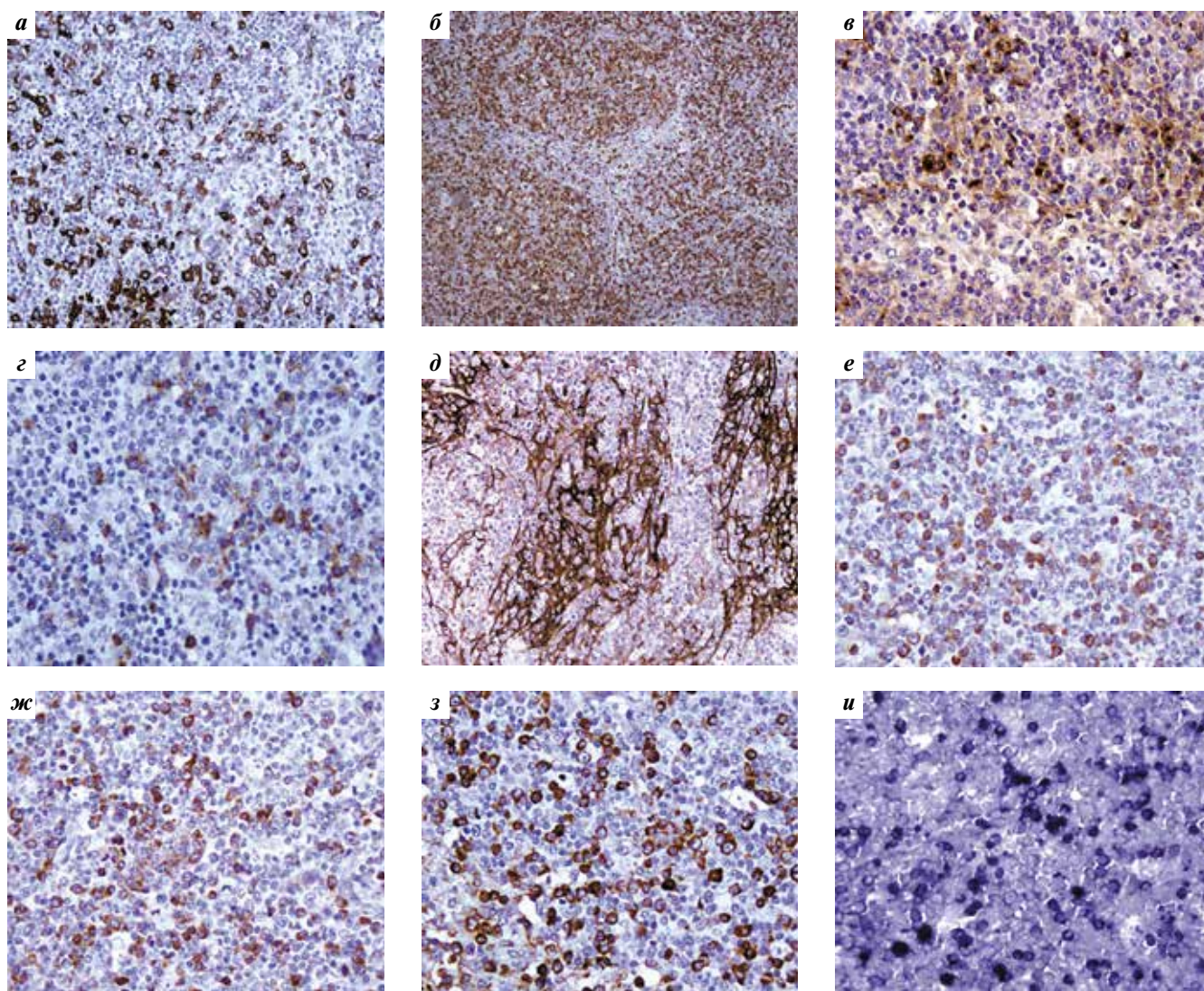


Рис. 4. Иммуногистохимическое исследование лимфатического узла. Экспрессия: а – CD20, б – CD3ε, в – CD10, г – CXCL13, д – CD21, е – CD138, ж – IgG, з – IgM, и – некодирующей малой РНК вируса Эпштейна–Барр
Fig. 4. Immunohistochemical examination of the lymph node. Expression: а – CD20, б – CD3ε, в – CD10, г – CXCL13, д – CD21, е – CD138, ж – IgG, з – IgM, и – non-coding small RNAs of Epstein–Barr

количество κ- и λ-позитивных клеток было сопоставимым. Иммуногистохимическое исследование биоптата лимфатического узла позволило верифицировать ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому с выраженным плазмноклеточным компонентом.

При молекулярно-генетическом исследовании биоптата шейно-надключичного лимфатического узла, образцов периферической крови и костного мозга пациента Т. выявлена Т-клеточная клональность по перестройкам генов γ-цепи Т-клеточного рецептора. Таким образом, на основании проведенного исследования был установлен диагноз: «ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, протекающая с вовлечением околоушных, затылочных, подчелюстных, шейно-надключичных, аксиллярных, паховых, медиастинальных, абдоминальных, забрюшинных лимфатических узлов, миндалин, селезенки, изолированным поражением легочной ткани, плевры и костного мозга. Стадия IV Вв по системе Анн Арбор (Ann Arbor Staging System, 1971 г.), IPI 4».

В результате цитостатической терапии по протоколу ОЛЛ-2009 [4, 14], применяемой в нашей клинике для лечения ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, была достигнута первая полная ремиссия заболевания. Срок наблюдения за больным на момент написания статьи составляет 48 мес.

Обсуждение

В статье мы представили случай ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, протекающей с реактивным плазмцитозом. Выявление поликлональной плазмноклеточной пролиферации в костном мозге было описано многими авторами при различных Т-клеточных лимфомах, но чаще увеличение количества плазматических клеток в пунктате костного мозга выявляли именно при АИТЛ [6, 15, 16]. Наряду с этим в литературе описаны случаи сочетания клональной плазмноклеточной пролиферации и АИТЛ [17]. По нашим данным, персистенция в периферической крови и повышенное содержание плазматических клеток в пунктате костного мозга наблюдается у 12,5 и у 50 % первичных больных АИТЛ соответственно. Повышенное содержание плазматических клеток (>10 %) в пунктате костного мозга является одним из диагностических критериев множественной миеломы при условии их клональности [1]. Иммунофенотипическое исследование плазматических клеток как ключевой диагностический метод позволяет разграничить поли- и моноклональную пролиферацию. В представленном нами случае выявлена экспрессия маркеров CD45 и CD19 на плазматических клетках, не наблюдающаяся при множественной миеломе [1, 18]. Клональные плазматические клетки не экспрессируют CD19, а экспрессия антигена CD45 бывает слабой или очень слабой (CD45dim). Напротив, яркая экспрессия CD45bright

является характерной чертой пролиферирующих реактивных плазматических клеток и позволяет отграничить их от клонального процесса. Выявленная в нашем случае популяция реактивных плазматических клеток отличалась от миеломных не только по иммунофенотипическим характеристикам, но и по цитометрическим параметрам светорассеяния. Популяция реактивных плазматических клеток, в отличие от миеломных клеток, располагалась ближе к лимфоцитарному гейту, что свидетельствовало о меньшем размере клеток.

Пролиферация как реактивных, так и опухолевых плазматических клеток происходит под воздействием интерлейкина-6 (ИЛ-6) [19], играющего важную роль в патогенезе множественной миеломы, АИТЛ и болезни Кастлемана [20–23]. Повышение уровня сывороточного ИЛ-6 было также отмечено в ряде случаев системного и кожного плазмцитоза [24]. Как известно, опухолевые клетки при АИТЛ секретируют в повышенном количестве ИЛ-10 [6] со сходным с ИЛ-6 механизмом действия [13, 25], что приводит к плазмноклеточной пролиферации.

Прогностическое значение реактивного плазмцитоза при АИТЛ до сих пор неясно. В крупном японском ретроспективном исследовании прогностических факторов при АИТЛ поликлональный плазмцитоз не рассматривался из-за своей редкости в качестве фактора прогноза [26]. В другой работе японских коллег, описывающей 15 больных АИТЛ, у 3 из которых наблюдался реактивный плазмцитоз, было показано, что пролиферация поликлональных плазматических клеток сопряжена с более высокой активностью лактатдегидрогеназы, высоким уровнем С-реактивного белка и сывороточных иммуноглобулинов. У остальных 12 больных без реактивного плазмцитоза был отмечен более высокий соматический статус и менее выражены симптомы интоксикации. Эффективность стандартного лечения у больных АИТЛ в группах с реактивным плазмцитозом и без него была одинаковой [27]. В нашем случае наблюдались выраженные симптомы интоксикации, низкий соматический статус, высокая активность лактатдегидрогеназы и ревматоидного фактора, высокий уровень С-реактивного белка, сывороточных иммуноглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов, анемия (до 43 г/л), тромбоцитопения. Противоопухолевая терапия позволила достигнуть длительной полной ремиссии.

Заключение

В данной работе мы продемонстрировали редкий случай ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы, протекающей с реактивным плазмцитозом. Иммунофенотипическое исследование плазматических клеток методом проточной цитометрии позволило разграничить реактивный и опухолевый процессы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

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

1. Swerdlow S.H. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press, 2008. P. 309–11.
2. Vose J., Armitage J., Weisenburger D.; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4124–30. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.4558. PMID: 18626005.
3. Виноградова Ю.Е., Луценко И.Н., Кременецкая А.М. и др. Структура T/NK-клеточных лимфатических опухолей в Гематологическом научном центре РАМН. Проблемы гематологии и переливания крови 2005;4:30–4. [Vinogradova Yu.E., Lutsenko I.N., Kremenetskaya A.M. et al. T/NK-cell lymphatic tumors in the Hematology Research Center of the Russian Academy of Medical Sciences. *Problemy gematologii i perelivaniya krvi* = Problems of Hematology and Blood Transfusion 2005;4:30–4. (In Russ.)].
4. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В. и др. Длительные режимы цитостатической терапии ангиоиммуннобластной Т-клеточной лимфомы. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2014;7(1):57–62. [Chernova N.G., Vinogradova Yu.E., Sidorova Yu.V. et al. Prolonged chemotherapy for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2014;7(1):57–62. (In Russ.)].
5. Lukes R.J., Tindle B.H. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1975;292(1):1–8. DOI: 10.1056/NEJM197501022920101. PMID: 1078547.
6. De Leval L., Gisselbrecht C., Gaulard P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2010;148(5):673–89. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2009.08003.x. PMID: 19961485.
7. Willenbrock K., Renné C., Gaulard P., Hansmann M.L. In angioimmunoblastic T-cell lymphoma, neoplastic T cells may be a minor cell population. A molecular single-cell and immunohistochemical study. *Virchows Arch* 2005;446(1):15–20. DOI: 10.1007/s00428-004-1114-1. PMID: 15480765.
8. Gawoski J.M., Ooi W.W. Dengue fever mimicking plasma cell leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(8):1026–7. DOI: 10.1043/1543-2165(2003)127<1026:DFMPL>2.0.CO;2. PMID: 12873179.
9. Shtalrid M., Shvidel L., Vorst E. Polyclonal reactive peripheral blood plasmacytosis mimicking plasma cell leukemia in a patient with Staphylococcal sepsis. *Leuk Lymphoma* 2003;44(2):379–80. DOI: 10.1080/1042819021000029713. PMID: 12688365.
10. Gorden L., Smith C., Graber S.E. Marked plasmacytosis and immunoglobulin abnormalities following infusion of streptokinase. *Am J Med Sci* 1991;301(3):186–9. PMID: 2000891.
11. Wulf G.G., Jahns-Streubel G., Hemmerlein B. et al. Plasmacytosis in acute myeloid leukemia: two cases of plasmacytosis and increased IL-6 production in the AML blast cells. *Ann Hematol* 1998;76(6):273–7. PMID: 9692816.
12. Lee J., Chang J., Cho Y., Han W.S. A case of reactive plasmacytosis mimicking multiple myeloma in a patient with primary Sjögren's syndrome. *J Korean Med Sci* 2005;20(3):506–8. DOI: 10.3346/jkms.2005.20.3.506. PMID: 15953879.
13. Yamane A., Awaya N., Shimizu T. et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with polyclonal proliferation of plasma cells in peripheral blood and marrow. *Acta Haematol* 2007;117(2):74–7. DOI: 10.1159/000096894. PMID: 17106190.
14. Паровичникова Е.Н., Клясова Г.А., Исаев В.Г. и др. Первые итоги терапии Ph-негативных острых лимфобластных лейкозов взрослых по протоколу научных исследовательских групп гематологических центров России ОЛЛ-2009. *Терапевтический архив* 2011;83(7):11–7. [Parovichnikova E.N., Klyasova G.A., Isaev V.G. et al. First results of Ph-negative adult acute lymphoblastic leukemia therapy according to the protocol of Research Group of Russian Hematological Centers ALL-2009. *Terapevticheskiy arkhiv* = *Ter Arch* 2011;83(7):11–7. (In Russ.)]. PMID: 21894746.
15. Cartron G., Roingeard P., Benboubker L. et al. Sezary syndrome in a patient with multiple myeloma: demonstration of a clonally distinct second malignancy. *Eur J Haematol* 1999;63(5):354–7. PMID: 10580568.
16. Bryant E., Ronan S.G., Iossifides I.A. Plasma cell myeloma in a patient with a cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer* 1982;50(10):2122–5. PMID: 6812941.
17. Xu J., Tang Y., Zhao S. et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma with coexisting plasma cell myeloma: a case report and review of the literature. *Tohoku J Exp Med* 2015;235(4):283–8. DOI: 10.1620/tjem.235.283. PMID: 25816919.
18. Pellat-Deceunynck C., Bataille R. Normal and malignant human plasma cells: proliferation, differentiation, and expansions in relation to CD45 expression. *Blood Cells Mol Dis* 2004;32(2):293–301. DOI: 10.1016/j.bcmd.2003.12.001. PMID: 15003821.
19. Jeco G., Robillard N., Puthier D. et al. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 1999;94(2):701–12. PMID: 10397737.
20. Yoshizaki K., Matsuda T., Nishimoto N. et al. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 1989;74(4):1360–7. PMID: 2788466.
21. Shimizu S., Yoshioka R., Hirose Y. et al. Establishment of two interleukin 6 (B cell stimulatory factor 2/interferon beta 2)-dependent human bone marrow-derived myeloma cell lines. *J Exp Med* 1989;169(1):339–44. PMID: 2783335. PMID: PMC2189192.
22. Hirano T., Kishimoto T. Interleukin 6 and plasma cell neoplasias. *Prog Growth Factor Res* 1989;1(3):133–42. PMID: 2491260.
23. Hsu S.M., Waldron J.A. Jr., Fink L. et al. Pathogenic significance of interleukin-6 in angioimmunoblastic lymphadenopathy-type T-cell lymphoma. *Hum Pathol* 1993;24(2):126–31. PMID: 8432509.
24. Kodama A., Tani M., Hori K. et al. Systemic and cutaneous plasmacytosis with multiple skin lesions and polyclonal hypergammaglobulinaemia: significant serum interleukin-6 levels. *Br J Dermatol* 1992;127(1):49–53. PMID: 1637695.
25. Lai C.F., Ripperger J., Morella K.K. et al. Receptors for interleukin(IL)-10 and IL-6-type cytokines use similar signaling mechanisms for inducing transcription through IL-6 response elements. *J Biol Chem* 1996;271(24):13968–75. PMID: 8662928.
26. Tokunaga T., Shimada K., Yamamoto K. et al. Retrospective analysis of prognostic factors for angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a multicenter cooperative study in Japan. *Blood* 2012;119(12):2837–43. DOI: 10.1182/blood-2011-08-374371. PMID: 22308294.
27. Nagoshi H., Kuroda J., Kobayashi T. et al. Clinical manifestation of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with exuberant plasmacytosis. *Int J Hematol* 2013;98(3):366–74. DOI: 10.1007/s12185-013-1411-z. PMID: 23949915.

Статья поступила: 04.10.2017. Принята в печать: 28.11.2017.

Article received: 04.10.2017. Accepted for publication: 28.11.2017.

Гетерогенность В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (BIV-иммуновариант) у детей

И.А. Дёмина¹, Т.Ю. Вержбицкая^{2,3}, С.А. Кашпор¹, Л.В. Байдун⁴, Т.В. Конюхова¹, С.А. Плясунова¹, Г.А. Цаур^{2,3},
Е.Б. Русанова⁵, М.В. Горчакова⁵, Е.Е. Зуева^{5,6}, А.Н. Казакова¹, Е.А. Зеркаленкова¹, Ю.В. Ольшанская¹,
Ю.Г. Абугова¹, Л.Г. Фечина^{2,3}, Н.В. Мякова¹, Е.В. Самочатова¹, А.А. Масчан¹, А.М. Попов¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1;

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

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

⁴ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России; Россия, 119571 Москва, Ленинский просп., 117;

⁵ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6–8;

⁶кафедра молекулярной биологии факультета естественных наук Ариэльского университета; Израиль, 40700 Ариэль

Контакты: Александр Михайлович Попов uraltcytometry@gmail.com

Введение. При иммунофенотипировании признаком наиболее зрелой формы В-линейного острого лимфобластного лейкоза (BIV-ОЛЛ) является поверхностная экспрессия молекулы иммуноглобулина. Она обнаруживается преимущественно при лимфоме Беркитта (ЛБ), и врачи в этом случае обычно начинают лечение по протоколам, разработанным для терапии зрелоклеточных лимфом. Однако результаты многочисленных клинических наблюдений показывают, что в редких случаях поверхностная экспрессия легких цепей иммуноглобулинов или иммуноглобулина М выявляется на клетках, не имеющих дополнительных признаков зрелой лимфомы.

Цель исследования — оценить гетерогенность острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) с поверхностной экспрессией легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов и степень ассоциации BIV-иммунофенотипа бластных клеток с ЛБ и другими лимфомами у детей.

Материалы и методы. Проанализированы результаты иммунофенотипирования, цитогенетического и морфологического анализа клеток 54 пациентов, у которых был выявлен зрелый В-клеточный иммунофенотип.

Результаты. Клинико-морфологический диагноз ЛБ был поставлен 39 из 54 пациентов, в то время как остальные 15 пациентов по совокупности признаков были отнесены к группе с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ). Все пациенты, у которых была диагностирована ЛБ, имели 1 из вариантов перестройки гена С-МYC: t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11) или t(2;8)(p22;q23). В группе ВП-ОЛЛ эти перестройки не выявлены, однако у 8 пациентов имелись перестройки гена КМТ2А, которые, в свою очередь, не определены ни в одном случае при ЛБ. У остальных пациентов группы ВП-ОЛЛ специфические перестройки не обнаружены. Пациенты с ВП-ОЛЛ не имели L3-морфологии бластов, характерной для ЛБ. Морфология L1/L2 также детектировалась у 2 пациентов с диагнозом ЛБ.

Заключение. Группа пациентов с детектированным поверхностным IgM на бластных клетках достаточно гетерогенна и включает не только ЛБ, но и редкие случаи ВП-ОЛЛ, в том числе с перестройками в КМТ2А. При проведении дифференциальной диагностики только сочетание цитоморфологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических признаков может дать возможность точно дифференцировать ЛБ от ВП-ОЛЛ и выбрать правильную тактику ведения пациента.

Ключевые слова: лимфома/лейкоз Беркитта, острый лимфобластный лейкоз, BIV-иммунофенотип

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-34-40

Heterogeneity of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia (EGIL subtype BIV)

I.A. Demina¹, T. Yu. Verzhbitskaya^{2,3}, S.A. Kashpor¹, L. V. Baidun⁴, T. V. Koniuhova¹, S.A. Plyasunova¹, G.A. Tsaur^{2,3},
E.B. Rusanova⁵, M.V. Gorchakova⁵, E.E. Zueva^{5,6}, A.N. Kazakova¹, E.A. Zerkalenskova¹, Yu. V. Olshanskaya¹,
Yu.G. Abugova¹, L.G. Fechina^{2,3}, N.V. Miakova¹, E.V. Samochatova¹, A.A. Maschan¹, A.M. Popov¹

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, GSP-7, Russia;

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

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

⁴Russian Children Clinical Hospital, Ministry of Health of Russia; 117 Leninskiy Prospect, Moscow, 119571, Russia;

⁵I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6–8 L. Tolstogo St., Saint Petersburg 197022, Russia;

⁶Ariel University, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular Biology; Ariel, Israel, 40700

Introduction. Surface immunoglobulin expression is a main immunophenotypic criteria of mature subtype of B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Although the majority of such cases represents Burkitt leukemia/lymphoma, it was shown for several times that membrane IgM could be detected in the absence of other mature lymphomas signs.

The aim of the study was to evaluate heterogeneity of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) with surface IgM expression and to assess correspondence of BIV EGIL ALL subtype with Burkitt lymphoma (BL) bone marrow dissemination.

Materials and methods. Immunophenotypic, cytomorphic and genetic data of 54 BIV-ALL cases were analyzed.

Results. Among the studied patients 39 had BL, while others belonged to B-cell precursor ALL (BCP-ALL). All BL patients and none of BCP-ALL patients carried C-MYC rearrangement while in BCP-ALL group in 8 cases and in any BL cases KMT2A rearrangements were found. None of BCP-ALL children had L3 morphology according to FAB classification.

Conclusions. B-lineage ALL with surface IgM expression is rather heterogeneous group of cases including typical BL and rare cases of BCP-ALL even with KMT2A-rearrangements. Combination of all available diagnostic technologies will allow precise split of these two different disease and select the appropriate treatment scheme.

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

Введение

Иммунофенотипическое дифференцирование острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) с помощью проточной цитометрии является одним из основных методов их диагностики. Точность и быстрота этого метода позволяют в кратчайшие сроки установить линейную принадлежность опухолевых клеток и начать специфическое лечение. Это особенно актуально в случае выявления опухолевой популяции, несущей маркеры зрелых В-клеток, что может свидетельствовать о наличии как быстро пролиферирующей, чрезвычайно агрессивной лимфомы Беркитта (ЛБ), так и ряда других лимфом или ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ). Важнейшим пунктом диагностики в этом случае становится разграничение ЛБ и ОЛЛ. К тому же в редких случаях ЛБ поражается только костный мозг без лимфопротекции или других объемных образований, что является дополнительной трудностью для дифференцировки ВП-ОЛЛ от ЛБ.

В настоящее время при иммунофенотипировании ОЛЛ используют критерии классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological characterization of Leukemias, EGIL) [1], согласно которым признаками наиболее зрелой формы В-линейного лейкоза (BIV-вариант) являются поверхностная экспрессия μ -цепи молекулы иммуноглобулина и/или экспрессия одной из легких цепей. Зачастую такой иммунофенотип ассоциирован с L3-морфологией бластных клеток, по FAB (French-American-British) классификации острых лейкозов 2008 г., и перестройками в гене C-MYC [2]. В большинстве случаев эта триада признаков выявляется при ЛБ, и обычно после обнаружения при иммунофенотипировании варианта BIV врачи, как правило, начинают лечение по протоколам, разработанным для терапии зрелоклеточных лимфом. Однако результаты многочисленных клинических наблюдений показывают, что в редких случаях экспрессия легких цепей иммуноглобулинов (поверхностная или цитоплазматическая) или IgM выявляется на клетках, не имеющих дополнительных признаков зрелой лимфомы (по FAB морфология L3, транслока-

ция MYC и высокая пролиферативная активность [3–5]). Некоторые исследовательские группы предлагают классифицировать такие случаи как ВП-ОЛЛ и, соответственно, лечить как ОЛЛ, а не как ЛБ [6]. Частота таких находок достаточно велика, чтобы обратить внимание исследователей на отсутствие абсолютной корреляции зрелого В-клеточного иммунофенотипа опухолевых клеток в костном мозге и диагноза ЛБ.

Цель исследования — оценить гетерогенность ОЛЛ с поверхностной экспрессией легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов и степень ассоциации BIV-иммунофенотипа бластов с ЛБ и другими лимфомами у детей.

Материалы и методы

Ретроспективно проанализированы данные иммунофенотипирования, морфологического, цитогенетического и молекулярно-генетического исследований 54 пациентов (40 мальчиков и 14 девочек) в возрасте от 7 мес до 18 лет (медиана 8 лет), у которых методом проточной цитометрии выявлена поверхностная экспрессия IgM на клетках опухолевого клона в костном мозге. Пациенты обследованы в лабораториях ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России (Москва), ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1» и ее Центра детской онкологии и гематологии (Екатеринбург), ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России (Москва) и ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России (Санкт-Петербург).

Анализ иммунофенотипа клеток КМ проводили с использованием 6–8-цветных комбинаций моноклональных антител (МКАТ) к следующим антигенам: CD45, CD19, CD3, CD10, CD34, CD13, CD33, CD117, CD15, CD58, CD38, CD20, CD22, CD79a, CD7, CD5, NG2, IgM, κ - и λ -цепей, TdT, MPO. Окрашивание образцов МКАТ выполняли согласно инструкции фирмы-производителя. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения FACS Diva 6.1 (BD)

и Kaluza 1.5a (Beckman Coulter, США). Анализировали не менее 10 тыс. ядродержащих 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 [1]. В качестве внутреннего контроля использовали сохранившиеся в образце нормальные клетки.

Стандартное кариотипирование проводили методом G-banding после суточного культивирования без митогенной стимуляции по ранее описанной методике [7], результаты записывали согласно международной цитогенетической номенклатуре хромосом человека ISCN (An International System for human Cytogenetic Nomenclature) 2016 г. [8]. При исследовании методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescent *in situ* hybridisation, FISH) использовали ряд специфических проб согласно инструкции производителей. Перестройки гена *C-MYC* определяли с помощью зонда Vysis LSI C-MYC Breakapart (Abbott Molecular, США) на разрыв хромосомного региона 8q24. Перестройки гена *KMT2A* определяли с помощью зонда Vysis LSI KMT2A Breakapart (Abbott Molecular, США) на разрыв хромосомного региона 11q23. Наличие перестройки $t(9;11)(p21.3;q23)/KMT2A-MLLT3$ подтверждали с помощью транслокационного зонда Kreatech ON KMT2/MLLT3 $t(9;11)$ Fusion (Leica Biosystems, ФРГ). Наличие перестройки $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1$ определяли с помощью транслокационного зонда Vysis LSI TCF3/PBX1 Dual Color, Dual Fusion (Abbott Molecular, США).

Для статистической обработки результатов использовали программу XLSTAT-2016. Группы пациентов сравнивали по количеству случаев, позитивных по выбранным маркерам, используя критерий χ -квадрат. Для сравнения количественных показателей в 2 группах применялся критерий Манна–Уитни.

Результаты

Нами проанализированы результаты иммунофенотипирования, цитогенетического и морфологического исследований клеток костного мозга 54 пациентов, у которых на бластных клетках был выявлен BV-иммунофенотип. Из них 39 пациентам был поставлен клинично-морфологический диагноз ЛБ (медиана возраста 11 лет), в то время как остальные 15 пациентов по совокупности признаков были отнесены к группе больных ВП-ОЛЛ (медиана возраста 3 года).

Все пациенты, у которых была диагностирована ЛБ, имели 1 из вариантов перестройки гена *C-MYC*: $t(8;14)(q24;q32)$, $t(8;22)(q24;q11)$ или $t(2;8)(p22;q23)$. Перестройка $t(8;14)(q24;q32)$ была определена у 28 пациентов, $t(8;22)(q24;q11)$ — у 2, $t(2;8)(p22;q23)$ — у 1 пациента (рис. 1). В группе больных ВП-ОЛЛ эти перестройки не выявлены, однако у 8 пациентов присутствовали перестройки гена *KMT2A*: $t(11;19)$

$(q23;p13)$ — у 1 больного, $t(9;11)(p22;q23)$ — у 3, $t(10;11)(p12;q23)$ — у 1 (см. рис. 1). У 3 пациентов с перестройкой *KMT2A* ген-партнер определить не удалось. У остальных пациентов этой группы специфические перестройки выявлены не были. Перестройки гена *KMT2A* не отмечены ни в одном случае при ЛБ.

У 1 пациента 1 года жизни с перестройкой $t(9;11)$ были одновременно идентифицированы 3 субпопуляции лимфобластов: 22,0 % бластных клеток соответствовали VI-варианту ОЛЛ, 55,0 % — VII, 23,0 % — IV.

При анализе морфологии бластных клеток у 4 (10 %) из 39 пациентов с диагнозом ЛБ были обнаружены клетки L1/L2 по классификации FAB. У больных ВП-ОЛЛ такой морфологический вариант выявлялся у 10 (67 %) из 15 пациентов. Морфология L3 была определена в 27 (51 %) случаях при ЛБ и в 2 (13 %) при ВП-ОЛЛ (рис. 2).

Результаты исследования иммунофенотипических особенностей клеток КМ показали, что данные значительно различаются в группах пациентов с ЛБ и ВП-ОЛЛ. Так, была выявлена разная экспрессия маркеров CD20, CD34, CD45, CD133, IgM, iIgM, NG2 (см. таблицу). У пациентов с ВП-ОЛЛ в 25 % образцов был определен NG2 (экспрессируется на глиальных клетках и бластах при ОЛ с перестройками гена *KMT2A*), в 30 % — CD133 (экспрессируется на ранних гемопоэтических предшественниках), в то время как в случае ЛБ эти маркеры не определялись. Заметная разница в количестве позитивных образцов наблюдалась также по экспрессии CD20 и CD34. Более «зрелый» маркер CD20 преимущественно определялся на клетках пациентов с ЛБ, в то

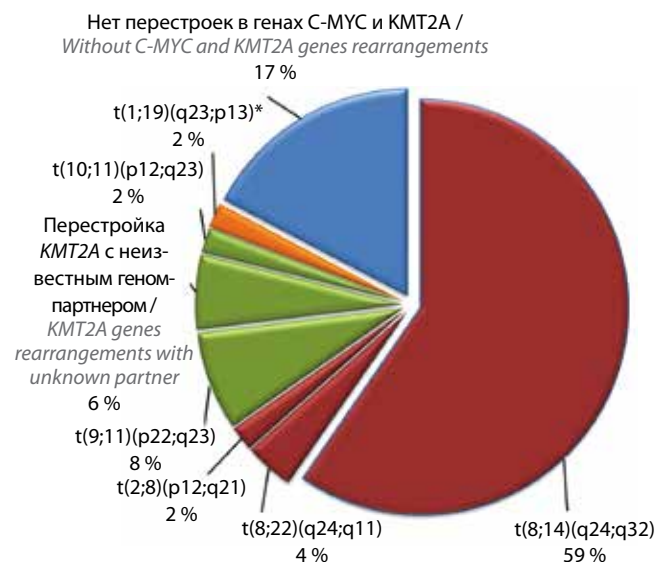


Рис. 1. Перестройки генов *C-MYC* (красный цвет) и *KMT2A* (зеленый цвет) у пациентов со зрелой формой В-линейного острого лимфобластного лейкоза

*Отдельная перестройка, не входящая ни в одну из представленных групп.
Fig. 1. *C-MYC* (red) and *KMT2A* (green) genes rearrangements in patients with mature subtype of B-lineage acute lymphoblastic leukemia

*A rearrangement of genes, not included in any of the represented groups.

время как антиген ранних гемопоэтических предшественников (CD34) чаще детектировался при ВП-ОЛЛ.

На опухолевых клетках 1 из пациентов с ЛБ выявлен CD117. У больных ВП-ОЛЛ экспрессии миелоид-

ных маркеров не отмечено. Несмотря на то что экспрессия IgM определялась во всех случаях и являлась одним из основных критериев отбора пациентов в исследование, в среднем содержание клеток с поверхностным IgM было выше при ЛБ и составило 88,7 % против 55,2 % при ВП-ОЛЛ. Примеры различных случаев ВП-ОЛЛ представлены на рис. 3–5.

Обсуждение

Поверхностный IgM, выявляемый проточной цитофлуориметрией и являющийся диагностическим признаком для определения ВП («зрелого») иммунофенотипа опухолевых клеток, наиболее характерен для ЛБ [6]. Выявление такого иммунофенотипа требует от врача особенно тщательного распределения пациентов по группам ОЛЛ и ЛБ с обязательным учетом клинической картины и результатов морфологического и цитогенетического исследований. Это связано прежде всего с принципиальными различиями в стратегии лечения этих заболеваний.

В литературе опубликованы несколько клинических случаев ОЛЛ с противоречивыми данными основных исследований и описаны варианты диагностического поиска и исходов лечения [4, 5, 9, 10] и среди них небольшое число пациентов, имеющих в опухолевом клоне перестройки генов *KMT2A*, особенно *t(9;11)(p22;q23)* [11, 12]. Еще в 1986 г. J. Van Eys и соавт. описали 4 клинических случая ВП-ОЛЛ с морфологией

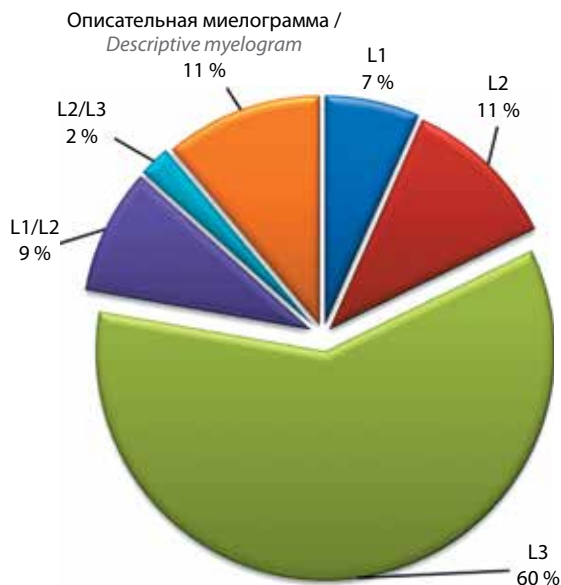


Рис. 2. Распределение цитоморфологических вариантов бластных клеток по классификации FAB у пациентов со зрелой формой В-линейного острого лимфобластного лейкоза

Fig. 2. Cytomorphological variants of blast cells according to FAB classification in patients with mature subtype of B-lineage acute lymphoblastic leukemia

Экспрессия антигенов опухолевыми клетками при лимфобластном лейкозе из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) и лимфоме Беркитта (ЛБ)
Antigens expression by tumor cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) and Burkitt lymphoma (BL)

Антигены Antigens	ВП-ОЛЛ BCP-ALL		ЛБ BL		p
	Число позитивных пациентов / общее число обследованных пациентов Number of positive patients / total number of tested patients				
	абс	%	абс	%	
CD10	14/15	93	31/31	100	0,6950
CD19	15/15	100	39/39	100	0,1340
CD20	10/15	66,6	38/39	100	<0,0001
CD34	7/15	46,6	2/36	5	<0,0001
CD38	10/10	100	31/31	100	0,7570
CD45	10/15	66,6	39/39	100	0,0820
IgM	15/15	100	39/39	100	<0,0001
iIgM	10/11	91	25/28	89	0,0090
NG2	3/12	25	0/23	0	<0,0001
CD133	3/10	30	0/16	0	0,0260
Myelo*	0/15	0	1/34	3	<0,0001

*Миелоидные маркеры CD13/CD33/CD117/CD15.

*Myeloid markers CD13/CD33/CD117/CD15.

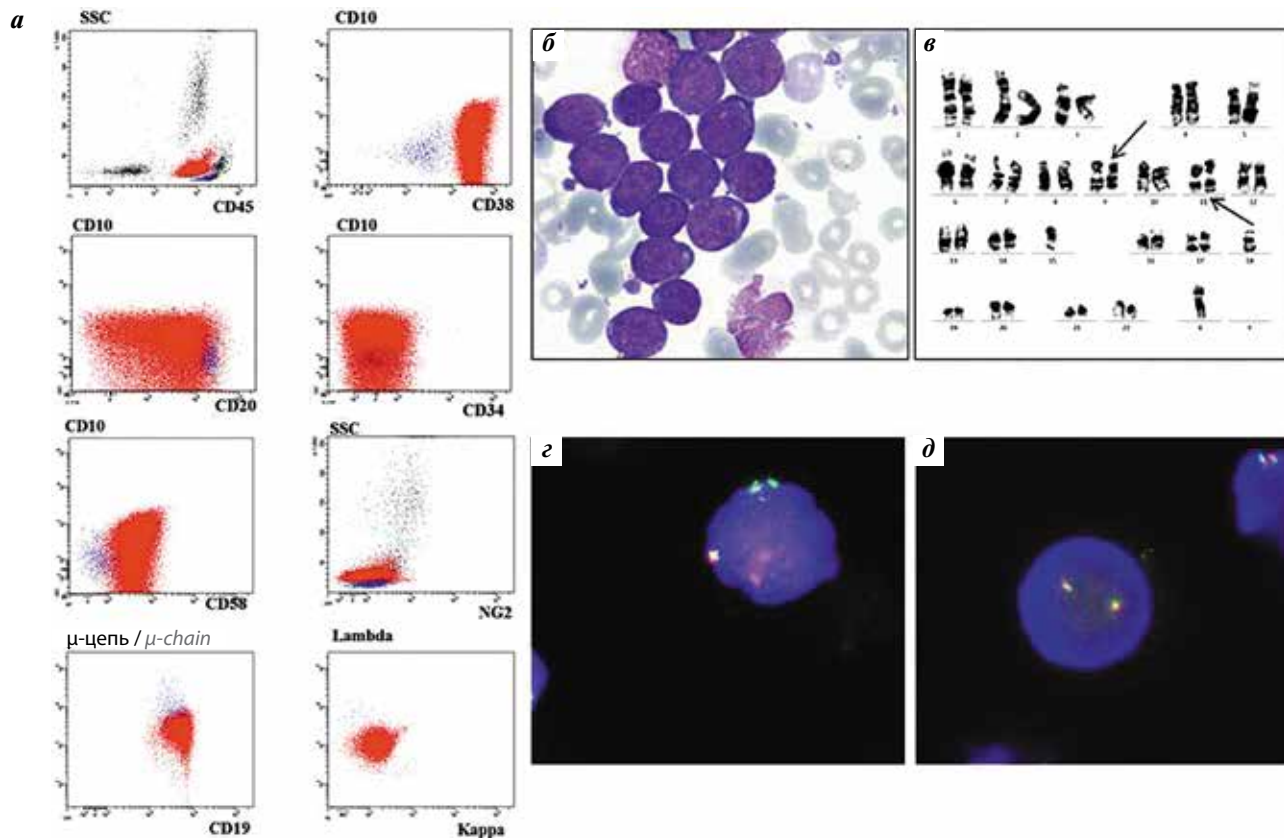


Рис. 3. Исследование клеток костного мозга пациента со зрелой формой В-линейного острого лимфобластного лейкоза и транслокации $t(9;11)(p22;q23)$: а — иммунофенотипирование (красным отмечены опухолевые клетки, синим — нормальные В-лимфоциты); б — морфология бластов L1 по классификации FAB; в — кариотип (стрелками отмечены перестроенные хромосомы 9 и 11); г — перестройка гена KMT2A по данным исследования методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH); д — отсутствие перестройки гена C-MYC по данным FISH-исследования. Lambda и kappa — цепи иммуноглобулина M

Fig. 3. Analysis of bone marrow cells in patients with mature subtype of B-lineage acute lymphoblastic leukemia and translocation $t(9;11)(p22;q23)$: а — immunophenotyping (red marked tumor cells, blue — normal B lymphocytes); б — L1 morphology of blasts cells according to FAB classification; в — karyotype (the arrows indicate the rearranged chromosomes 9 and 11); г — KMT2A gene rearrangement according to fluorescence in situ hybridization (FISH) data; д — absence of C-MYC gene rearrangement according to FISH data. Lambda and kappa — chains of immunoglobulin M

L1 и экспрессией поверхностного IgM [13]. При этом экспрессия CD34 и TdT не определялась. Эти пациенты получали лечение по протоколу для острого лейкоза и по течению заболевания не отличались от пациентов с незрелыми формами ОЛЛ, но отвечали на терапию значительно лучше, чем пациенты с морфологией L3. В 1988 г. J.L. Finlay и W. Borchering сообщили о 2 аналогичных случаях, причем характерной для них перестройки $t(8;14)(q24;q32)$ обнаружено не было [14]. Позже были описаны еще несколько случаев ВП-ОЛЛ с aberrантной экспрессией поверхностного IgM, TdT-положительным фенотипом В-клеток, но без характерной для ЛБ морфологии. Пациенты получали типичное для ОЛЛ лечение и достигли полной ремиссии [15]. Вероятнее всего такие случаи могут рассматриваться как ВП-ОЛЛ с aberrантной экспрессией поверхностного IgM, и данные больные должны получать лечение по протоколам для ОЛЛ. Однако описаны и случаи ЛБ с отсутствием экспрессии поверхностного Ig, причем чаще всего морфология клеток в этих случаях соответствовала L3 и присутствовали характерные хромосомные транслокации [16].

ОЛЛ в классификации FAB разделен на 3 морфологических подтипа (L1, L2 и L3) согласно размеру бластов, соотношению размеров ядра и цитоплазмы, количеству цитоплазмы и наличию ядрышек в препаратах костного мозга, окрашенных по Романовскому—Гимзе [17]. С внедрением в практику методов иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии ОЛЛ стали разделять на типы, условно соответствующие степени зрелости нормальных лимфоцитов [6]. Обычно клетки с морфологией L1 и L2 имеют на своей поверхности маркеры дифференцировки более ранних стадий, чем клетки с морфологией L3, которые обычно классифицируются как ЛБ. Кроме того, для ЛБ характерны перестройки гена C-MYC.

Нами проанализированы результаты обследований 54 пациентов с обнаруженной поверхностной экспрессией IgM. Из них 15 не имели классических перестроек C-MYC и/или L3-морфологии бластов, характерных для ЛБ. У всех пациентов (кроме 2) без перестроек C-MYC с диагнозом ВП-ОЛЛ определялась морфология L1/L2. Также она детектировалась у 2 пациентов с перестройками C-MYC и диагнозом ЛБ.

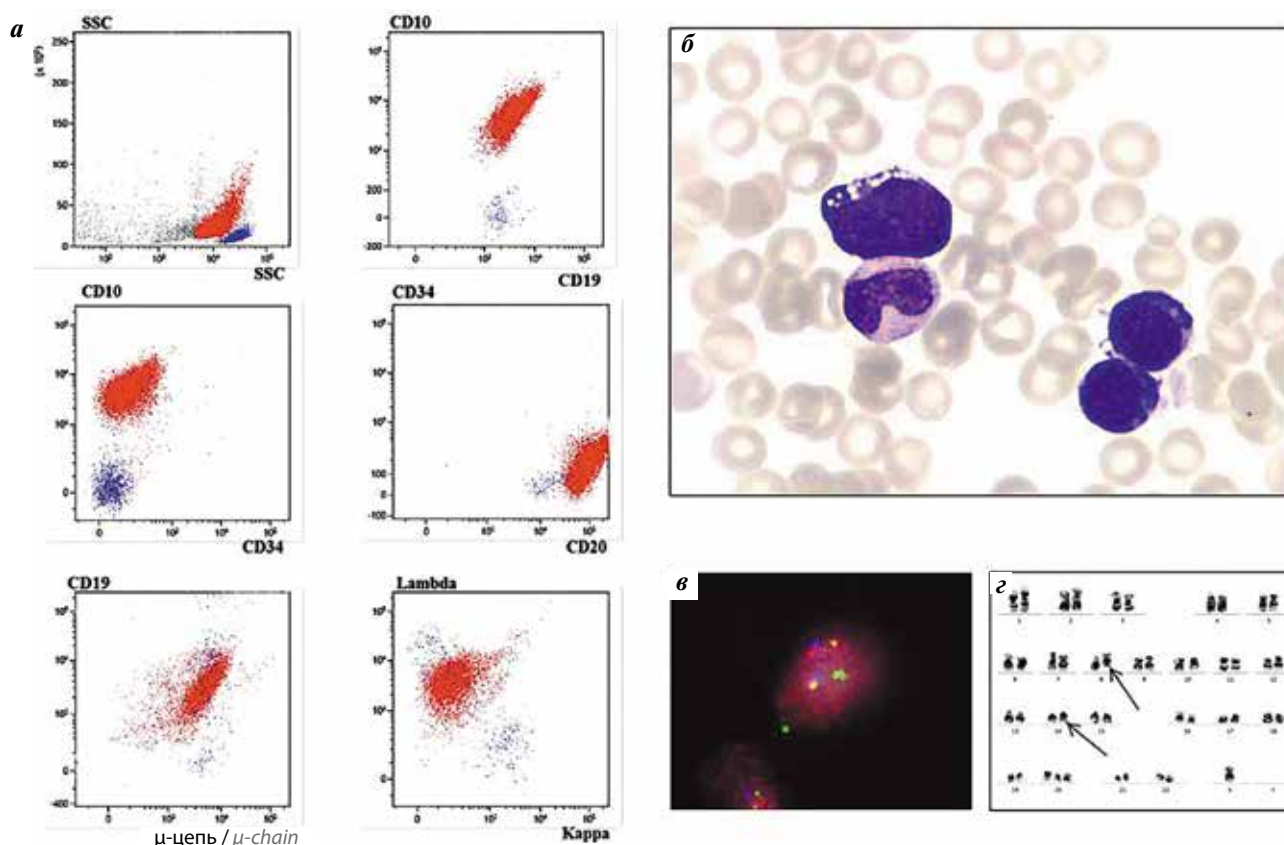


Рис. 4. Исследование клеток костного мозга пациента с диагнозом лимфомы Беркитта и перестройкой $t(8;14)(q24;q32)$: а – иммунофенотипирование (красным отмечены опухолевые клетки, синим – нормальные В-лимфоциты); б – морфологически определяется L3 фенотип по классификации FAB; в – перестройка гена С-MYC по данным исследования методом флуоресцентной гибридизации *in situ*; з – кариотип, стрелками отмечены перестроенные хромосомы 8 и 14. Lambda и kappa – цепи иммуноглобулина М

Fig. 4. Analysis of bone marrow cells in patients with Burkitt lymphoma and translocation $t(8;14)(q24;q32)$: а – immunophenotyping (red marked tumor cells, blue – normal B lymphocytes); б – L3 morphology of blasts cells according to FAB classification; в – C-MYC gene rearrangement according to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) data; з – karyotype (the arrows indicate the rearranged chromosomes 8 and 14). Lambda and kappa – chains of immunoglobulin M

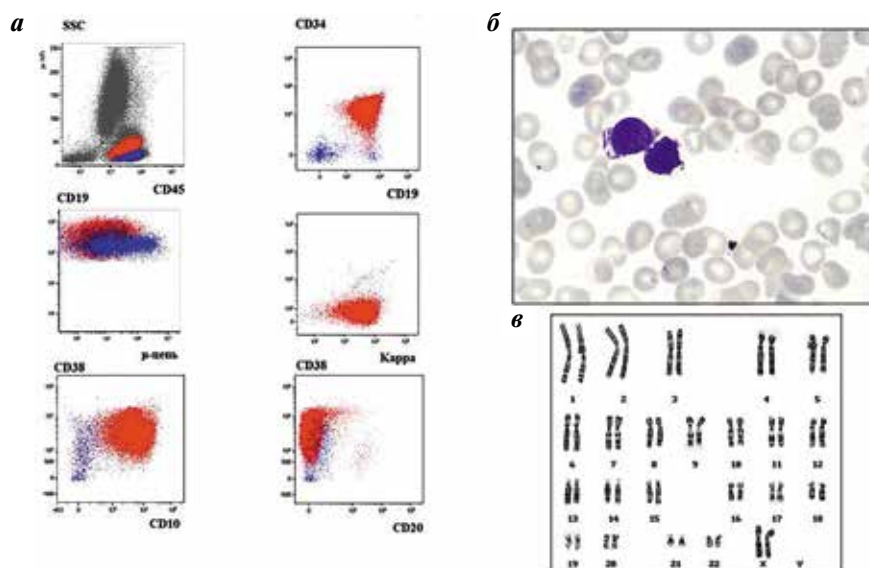


Рис. 5. Исследование клеток костного мозга пациента со зрелой формой В-линейного острого лимфобластного лейкоза и отсутствием специфических хромосомных аберраций: а – иммунофенотипирование (красным отмечены опухолевые клетки, синим – нормальные В-лимфоциты); б – морфологически определяется L2 фенотип по классификации FAB; в – нормальный кариотип. Kappa – цепь иммуноглобулина М

Fig. 5. Analysis of BM cells in patients with mature subtype of B-lineage acute lymphoblastic leukemia and absence of specific chromosomal aberrations: а – immunophenotyping (red marked tumor cells, blue – normal B lymphocytes); б – L2 morphology of blasts cells according to FAB classification; в – normal karyotype. Kappa – chains of immunoglobulin M.

Ранее нами было показано, что иммунофенотип ЛБ значительно отличается от такового при ВП-ОЛЛ, даже без учета экспрессии IgM, в частности, по экспрессии миелоидных маркеров CD20 и CD34 [18]. Полученные в данной работе результаты подтвердили выявленные ранее тенденции.

Заключение

Таким образом, группа пациентов с детектированным поверхностным IgM на бластных клетках достаточно гетерогенна и включает не только ЛБ,

но и редкие случаи ВП-ОЛЛ, в том числе с перестройками в *KMT2A*. При иммунофенотипической диагностике необходимо уделять особое внимание не только наличию IgM, но и другим признакам различия бластов при лимфомах и ОЛЛ. При проведении дифференциальной диагностики только сочетание цитоморфологических, иммунофенотипических и молекулярно-генетических признаков может дать возможность надежно дифференцировать ЛБ от ВП-ОЛЛ и выбрать правильную тактику лечения пациента.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

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

1. 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.
2. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Eds. Swerdlow S., Campo E., Harris N.L. et al. Lyon, France: IARC, 2008. P. 262–264.
3. Kansal R., Deeb G., Barcos M. et al. Precursor B lymphoblastic leukemia with surface light chain immunoglobulin restriction: A report of 15 patients. *Am J Clin Pathol* 2004;121(4):512–25. DOI: 10.1309/WTXC-Q5NR-ACVX-TYBY. PMID: 15080303.
4. Li S., Lew G. Is B-lineage acute lymphoblastic leukemia with a mature phenotype and L1 morphology a precursor B-lymphoblastic leukemia/lymphoma or Burkitt leukemia/lymphoma? *Arch Pathol Lab Med* 2003;127(10):1340–4. DOI: 10.1043/1543-216 (2003)127<1340:IBALLW>2.0.CO;2. PMID: 14521459.
5. Tsao L., Draoua H.Y., Osunkwo I. et al. Mature B-cell acute lymphoblastic leukemia with t(9;11) translocation: A distinct subset of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol* 2004;17(7):832–9. DOI: 10.1038/modpathol.3800128. PMID: 15098014.
6. Dworzak M.N., Buldini B., Gaipa G. et al. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 2017. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/cyto.b.21518. PMID: 28187514.
7. Creutzig U., van den Heuvel-Eibrink M.M., Gibson B. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood* 2012;120(16):3187–205. DOI: 10.1182/blood-2012-03-362608. PMID: 22879540.
8. ISCN 2016: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Eds. J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid. (Reprint of: Cytogenetic and Genome Research 2016;149:1–2). Basel (Switzerland): S. Karger AG, 2016. ISBN: 978-3-318-05857-4.
9. Frater J.L., Batanian J.R., O'Connor D.M., Grosso L.E. Lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype in infancy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26(10):672–7. DOI: 10.1097/01.mph.0000142493.56793.cb. PMID: 15454841.
10. Blin N., Méchinaud F., Talmant P. et al. Mature B-cell lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement: an uncommon and distinct subset of childhood acute leukemia. *Leukemia* 2008;22(5):1056–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2404992. PMID: 18007578.
11. Kim B., Lee S.-T., Kim H.J. et al. Acute lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype and t(9;11)(p22;q23;p11.2): a case study and literature review. *Ann Lab Med* 2014;34(2):166–9. DOI: 10.3343/alm.2014.34.2.166. PMID: 24624357.
12. Krivtsov A.V., Armstrong S.A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007;7(11):823–33. DOI: 10.1038/nrc2253. PMID: 17957188.
13. Van Eys J., Pullen J., Head D. et al. The French-American-British (FAB) classification of leukemia: the Pediatric Oncology Group experience with lymphocytic leukemia. *Cancer* 1986;57(5):1046–51. PMID: 3484662.
14. Finlay J.L., Borchering W. Acute B-lymphocytic leukemia with L1 morphology: a report of two pediatric cases. *Leukemia* 1988;2(1):60–2. PMID: 3123810.
15. Micheils J.J., Adriaansen H.J., Hagemeijer A. et al. TdT positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) without Burkitt characteristics. *Br J Haematol* 1988;68(4):423–6. PMID: 3288272.
16. Angi M., Kamath V., Yuvarani S. et al. The t(8;14)(q24.1;q32) and its variant translocations: A study of 34 cases. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2017;10(3):126–34. DOI: 10.1016/j.hemonc.2017.03.002. PMID: 28390216.
17. Miller D.R., Leikin S., Albo V. et al. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Br J Haematol* 1981;48(2):199–206. PMID: 6940623.
18. Дёмина И.А., Вержицкая Т.Ю., Кашпор С.А. и др. Иммунофенотипическая характеристика опухолевых клеток в костном мозге при лимфоме/лейкозе Беркитта: возможности дифференциальной диагностики с острым лимфобластным лейкозом. *Онкогематология* 2017;12(1):55–61. [Demina I.A., Verzhbitskaya T.Yu., Kashpor S.A. et al. Immunophenotypic features of bone marrow tumor cell in Burkitt lymphoma/leukemia: B-lineage acute lymphoblastic leukemia diagnostics opportunities. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2017;12(1):55–61 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-55-61.

Статья поступила: 01.11.2017. **Принята в печать:** 15.12.2017.

Article received: 01.11.2017. **Accepted for publication:** 15.12.2017.

Результаты количественной *RHOA* Gly17Val аллель-специфичной полимеразной цепной реакции и определения Т-клеточной клональности при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме

Ю.В. Сидорова, Н.Г. Чернова, И.А. Якутик, С.Ю. Смирнова, Н.В. Рыжикова, Е.Е. Никулина, М.Ю. Алексенко, М.Н. Синицына, А.М. Ковригина, Т.Н. Моисеева, Е.Е. Звонков, А.Б. Судариков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Юлия Владимировна Сидорова iouliavl@rambler.ru

Введение. Ангиоиммунобластная лимфома — периферическая Т-клеточная лимфома (АИТЛ), характеризующаяся обильной полиморфной инфильтрацией лимфатических узлов (ЛУ) при небольшом количестве опухолевых CD4⁺ Т-клеток. Сложность представляет дифференциальная диагностика с реактивными процессами и другими лимфомами, например лимфомой Ходжкина. Для подтверждения диагноза применяют молекулярные методы определения клональности. Клональные реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR) в ЛУ могут не совпадать с реаранжировками, выявляемыми в костном мозге (КМ) и других тканях, что затрудняет их интерпретацию. Недавно обнаруженная точечная соматическая мутация *ras*-гомологичной малой гуанозин-трифосфатазы А типа (*RHOA*) Gly17Val выявляется у 53–71 % пациентов с АИТЛ и позволяет определить количество имеющихся опухолевых клеток.

Цель исследования — оценить количество опухолевых клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val в различных тканях у пациентов с АИТЛ и сопоставить его с результатами определения Т-клеточной клональности.

Материалы и методы. Т-клеточную клональность оценивали по реаранжировкам *TCRG* и *TCRB* генов по протоколу *BIOMED-2* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим проведением фрагментного анализа на секвенаторе *ABI Prism 3130*. Мутация *RHOA* Gly17Val анализировалась с помощью количественной *TaqMan* аллель-специфичной ПЦР. Исследованы образцы ЛУ, кожи, КМ и крови у 40 пациентов с диагнозом АИТЛ.

Результаты. Т-клеточная клональность выявлена в ЛУ у 37 из 40 пациентов (92 %) и в КМ у 26 (96 %) из 28 пациентов, однако клональные *TCR*-реаранжировки не совпадали по длине в ЛУ и КМ у 12 (46 %) из 26 пациентов. Мутация *RHOA* Gly17Val выявлена в ЛУ у 24 (60 %) из 40 пациентов. Количество опухолевых клеток в ЛУ в среднем составило 26,7 % от всех клеток, тогда как в КМ клетки с мутацией *RHOA* либо не выявлялись (у 7 из 17 пациентов), либо выявлялись в малом количестве: у 10 из 17 пациентов — в среднем 2 % от общего количества клеток. Образцы кожи, КМ и крови с пиками Т-клеточной клональности, отличающимися от таковых, найденных в ЛУ, были также отрицательны на наличие клеток с мутацией *RHOA*. У 4 пациентов было показано, что клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с ЛУ, относятся к CD8⁺-лимфоцитам.

Выводы. Результаты исследования показывают, что количественное определение клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val необходимо учитывать при стадировании заболевания и интерпретации результатов определения Т-клеточной клональности. Т-клеточные клоны, не совпадающие с клонами, выявляемыми в ЛУ, должны рассматриваться как реактивные.

Ключевые слова: ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, клональность, точечная мутация, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция, *RHOA* Gly17Val

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-41-49

Quantitative *RHOA* Gly17Val allele-specific polymerase chain reaction and T-cell clonality analysis in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.

Yu. V. Sidorova, N. G. Chernova, I. A. Yakutik, S. Yu. Smirnova, N. V. Ryzhikova, E. E. Nikulina, M. Yu. Aleksenko, M. N. Sinitsyna, A. M. Kovrigina, T. N. Moiseeva, E. E. Zvonkov, A. B. Sudarikov

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

Introduction. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is a T-cell lymphoma, characterized by abundant polymorphocellular infiltrate of lymph nodes with the small number of tumor CD4⁺ T-cells. AITL could often be misdiagnosed as reactive processes and other lymphomas, including Hodgkin's lymphoma. Molecular methods of determining clonality are used to confirm the diagnosis. TCR gene rearrangements detected in the lymph nodes may not coincide with those detected in the bone marrow (BM), blood or skin, that makes their interpretation difficult. Recently discovered point somatic *RHOA* (Ras homolog gene family, member A) Gly17Val mutation is present in 53–71 % of angioimmunoblastic T-cell lymphomas.

The aim of the study was to evaluate the number of *RHOA* Gly17Val mutated cells in different tissues of AITL patients and to correlate it with corresponding T-cell clonality results.

Materials and methods. TCRG and TCRB gene rearrangements were PCR-amplified according to BIOMED-2 standardized protocol and analyzed by capillary electrophoresis on ABI Prism 3130. Gly17Val mutation was analyzed by quantitative allele-specific (qAS) TaqMan Real-Time PCR assay. Lymph nodes (LN) and skin biopsies, blood and BM samples were studied for 40 patients with AITL.

Results. The clonal TCR gene rearrangements were found in 37 (92 %) of 40 patients in LN and in 26 (96 %) of 28 patients in BM, but they were not matched in length in LN and BM in 12 (46 %) of 26 patients. RHOA (Gly17Val) mutation in LN was revealed in 60 % (24 of 40) patients. Number of cells with RHOA mutation was highest in the LN (in average 26.7 % of the total cells), while in the BM RHOA mutation were undetectable (in 7 patients), or detected in 10 patients in a low quantity (in average 2 % of the total cells). Skin, blood and BM samples with the T-cell clonality peaks that differ from those found in the LN were also negative for the presence of cells having RHOA Gly17Val mutation. Also, in four patients we showed that clonal products in BM and blood that do not coincide with LN refer to CD8⁺ lymphocytes.

Conclusions. The results of the study demonstrate that the quantitative determination of cells with the mutation of RHOA Gly17Val must be taken into account in staging the disease and interpreting the results of T-cell clonality assay. Clonal cells with rearrangements not matching those identified for the LN should be considered reactive.

Key words: angioimmunoblastic T-cell lymphoma, clonality, point mutation, allele-specific polymerase chain reaction, RHOA Gly17Val

Введение

Ангиоиммунобластная лимфома — периферическая Т-клеточная лимфома (АИТЛ), которая характеризуется генерализованной лимфаденопатией с обильной полиморфноклеточной инфильтрацией лимфатических узлов (ЛУ), пролиферацией сосудов и фолликулярных дендритных клеток [1]. По данным международной группы изучения Т- и НК-клеточных лимфом, выявляемость АИТЛ составляет 18,5 % среди всех периферических Т-клеточных лимфом [2]. Кроме ЛУ, при АИТЛ часто наблюдается поражение селезенки, печени, кожи и костного мозга (КМ). Заболевание практически всегда ассоциировано с вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ), что позволяет предположить его роль в этиологии АИТЛ [3, 4]. Дифференциальная диагностика чаще всего проводится с другими Т-клеточными лимфомами, смешанно-клеточным вариантом лимфомы Ходжкина, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, аутоиммунными или реактивными процессами [5]. При морфологическом исследовании обнаруживаются небольшое количество опухолевых клеток и преобладание реактивных клеточных элементов: В-лимфоциты, иммунобласты, часть из которых может напоминать одно- и двуядерные клетки Ходжкина и Березовского—Штернберга, сеть фолликулярных дендритических клеток, клетки эндотелия, плазматические клетки, гистиоциты, эозинофилы и др. [5, 6]. Опухолевые CD4⁺ Т-клетки в большинстве случаев немногочисленны и экспрессируют пан-Т-клеточные антигены (CD3, CD2, CD5), маркеры нормальных фолликулярных Т-хелперов (CD10, CXCL13, PD-1). Для подтверждения диагноза, оценки распространенности процесса проводят морфологическое, иммуногистохимическое, молекулярно-генетическое исследование биоптатов очагов поражения, образцов крови и КМ [1, 5–7]. В сложных диагностических случаях помогает исследование Т-клеточной клональности методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по ретранжировкам генов Т-клеточных рецепторов (TCR), которые обнаруживаются в большинстве (76–96 %) случаев [7–10]. Однако при первичном обследовании ткани ЛУ при АИТЛ в 20–45 % случаев выявляется

также В-клеточная клональность, которая предположительно носит реактивный, ВЭБ-ассоциированный характер [11–13]. Недавно обнаруженная точечная соматическая мутация RHOA Gly17Val определяется у 53–71 % пациентов с АИТЛ, является хорошей диагностической мишенью и позволяет количественно оценить наличие опухолевых клеток [14–17]. Показано, что данная мутация при АИТЛ обнаруживается только в опухолевых, но не в других кроветворных клетках, в отличие от точечных мутаций в генах TET2 и DNMT3A. Данная мутация приводит к аминокислотной замене в гуанозинтрифосфатсвязывающем районе белка RHOA и его инактивации. Поскольку данный белок участвует в передаче сигнала от Т-клеточного рецептора, нарушается иммунологическое взаимодействие Т-лимфоцитов с другими клетками иммунной системы, что, возможно, является триггерным механизмом развития АИТЛ [18]. В данной работе мы сравнили результаты исследования Т-клеточной клональности и количественной RHOA Gly17Val аллель-специфичной ПЦР у пациентов с АИТЛ.

Цель исследования — сопоставление количества опухолевых клеток с мутацией RHOA Gly17Val с результатами определения Т-клеточной клональности в ЛУ, крови, КМ и коже пациентов с АИТЛ.

Материалы и методы

Пациенты. В исследование включены 40 пациентов с диагнозом АИТЛ, установленным на основании критериев диагностики ВОЗ (2008 г.) [1]. Пациенты наблюдались в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2002 по 2017 г. Мужчин было больше, чем женщин — 25 против 15, медиана возраста составила 65 лет (36–87 лет). Для патоморфологической верификации АИТЛ проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследования опухолевого субстрата с расширенной панелью антител (CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD20, CD30, PD1, CXCL13, BCL6, PAX-5, Ki67). Молекулярные исследования выполняли на материале ЛУ (n = 47), кожи (n = 12), КМ (n = 53), крови (n = 29), селезенки (n = 2). Лейкоциты

и ДНК из крови и КМ выделяли так же, как ранее описано нами в публикации [19]. Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, или свежемороженой ткани также использовали описанную ранее методику [20]. В качестве контрольной использовали ДНК от 10 здоровых доноров и 30 пациентов с В-клеточными лимфомами.

Определение Т-клеточной клональности методом ПЦР. Оценку Т-клеточной клональности проводили по реаранжировкам *TCRG* ($V\gamma-J\gamma$) и *TCRB* ($V\beta-J\beta$, $D\beta-J\beta$) генов. Для этого использовали метод ПЦР с мультиплексными праймерами по протоколу BIOMED-2 [21]. Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез высокого разрешения проводили на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флуоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) оценивали с помощью компьютерной программы GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems, США). Если моноклональный пик более чем в 3 раза превышал поликлональный фон, результат считали моноклональным, если в 2–3 раза, то сомнительным. Чувствительность определения

Т-клеточной клональности варьирует от 1 до 10 % моноклональных клеток от общего количества Т-лимфоцитов и зависит от репертуара поликлональных и клональных лимфоцитов [21].

Количественное определение *RHOA* Gly17Val методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Мутацию *RHOA* Gly17Val определяли с помощью количественной TaqMan аллель-специфичной ПЦР. Для этого использовали следующие праймеры и пробы: прямой (дикого типа wt) TGGTGATGGAGCCTGTAG, прямой (мутантного типа mt) TGGTGATGGAGCCTGTAT, пробу FAM-CAAGGACCAGTTCCCAGAGG-BHQ1, обратный GCTTTCCATCCACCTCGATA. ДНК (200–400 нг) вносили в 25 мкл реакционной смеси (ЗАО «Синтол», Россия), содержащей: 10 пмоль wt или mt прямого праймера, 10 пмоль обратного и 7,5 пмоль пробы к гену *RHOA* (ЗАО «Синтол», Россия). Анализ ПЦР проводился в 3 повторах (3wt и 3mt), ПЦР-РВ и анализ данных – на приборе Step One Real-Time PCR (Applied Biosystems, США). Условия ПЦР – 95 °C 5 мин, затем 50 циклов – 95 °C 30 с, 56 °C 15 с, 54 °C 15 с, 72 °C 30 с. Количество опухолевых клеток рассчитывали относительно амплификации с праймером дикого типа (wt) в соответствии с формулами:

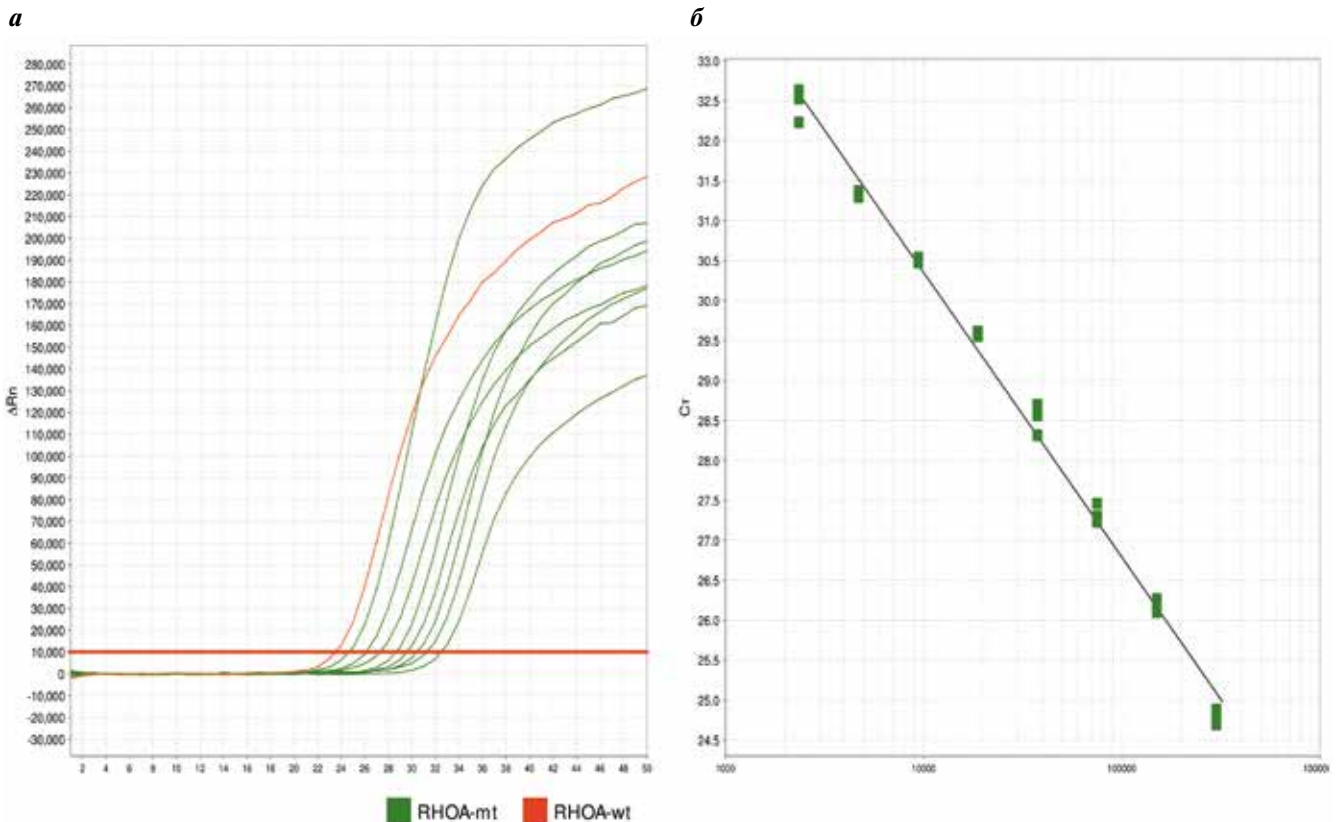


Рис. 1. Результаты количественной аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в реальном времени определения мутации *RHOA* Gly17Val: а) профили амплификации серийных разведений опухолевой ДНК в нормальной: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,0156; 0,0078 (красный цвет – амплификационная кривая с праймерами дикого типа), б) стандартная кривая на основе серийных разведений. ΔRn – уровень относительной флуоресценции, C_t – пороговый цикл

Fig. 1. Real-time quantitative allele-specific polymerase chain reaction data for *RHOA* Gly17Val detection: а) the amplification profiles of serial dilutions of tumor DNA in normal: 1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125; 0.0156; 0.0078. Red color – amplification curve with wild type primers, б) Standard curve based on serial dilutions. ΔRn – relative fluorescence level, C_t – threshold cycle

$$\Delta Ct = Ct (mt) - Ct (wt),$$

$$N = 50 / (2^{\Delta Ct}),$$

где N — искомое количество клеток, выраженное в процентах от исходного уровня; $Ct (mt)$ и $Ct (wt)$ — номер цикла подъема кривой флуоресценции с праймером мутантного и дикого типов соответственно.

На основании анализа серии разведений опухолевого образца в неопухолевой ткани, построения стандартной кривой, а также анализа отрицательных «контролей», т. е. образцов без мутации ($n = 40$), определена чувствительность метода (рис. 1), которая составила 1 % клеток с мутацией от общего количества клеток в образце.

Селекция $CD4^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов. У 4 пациентов выполнена селекция $CD8^+$ - и $CD4^+$ -популяции лимфоцитов периферической крови с последующим определением Т-клеточной клональности в каждой из популяций. Клетки селектировали с помощью набора $CD4^+$, $CD8^+$ MicroBeads (Miltenyi Biotec) согласно стандартному протоколу производителя.

Статистический анализ. Для сравнения результатов, полученных 2 методами, использовали критерий ранговой корреляции Спирмена (rs). Вычисления про-

водили с помощью программы StatPlus 6.0 (AnalystSoft Inc, Walnut, США).

Результаты

Клональные реаранжировки TCR обнаружены в ЛУ у 37 (92 %) из 40 пациентов. При этом клональность носила сомнительный характер в 14 % случаев (у 5 из 37 пациентов). В первичных образцах КМ Т-клеточная клональность выявлена у 26 из 28 исследованных, однако только в 23 % случаев (у 6 из 26 пациентов) реаранжировки TCR совпадали по длине с выявляемыми в ЛУ и других органах. Так, например, на рис. 2 представлены результаты количественного определения мутации $RHOA$ Gly17Val и Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов $TCRG$ пациентки С., 1965 г. р. Т-клеточная моноклональность определяется во всех образцах с одинаковой длиной клональных продуктов (208 и 217 bp), а также во всех тканях выявляется значительное количество клеток с мутацией $RHOA$ Gly17Val. У 8 (30 %) из 26 пациентов реаранжировки совпадали только частично, т. е. в КМ имелись дополнительные пики. У 12 (46 %) из 26 пациентов клональные реаранжировки TCR в КМ полностью не совпадали по длине с таковыми, выявляемыми в ЛУ. Таким образом, для пациентов с АИТЛ

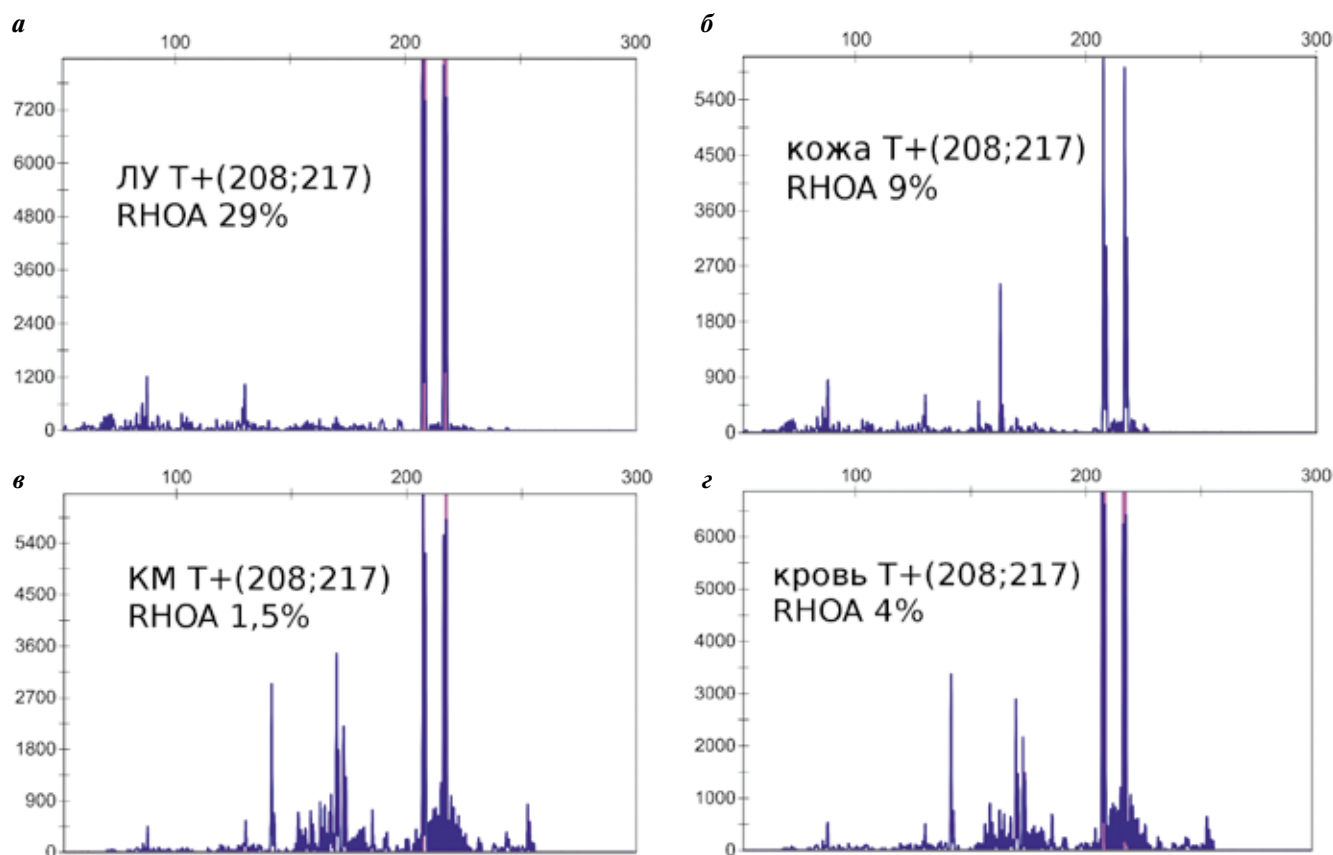


Рис. 2. Пациентка С., 1965 г. р. Результаты количественного определения мутации $RHOA$ Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по реаранжировкам генов $TCRG$: а — в лимфатических узлах (ЛУ), б — коже, в — костном мозге (КМ), г — крови. (Пояснение дано в тексте.)
Fig. 2. Patient С., born in 1965. The results of $RHOA$ Gly17Val mutation quantitative detection and T-cell clonality by $TCRG$ genes rearrangement: а — in lymph nodes (LN), б — in skin, в — in bone marrow (BM), г — in blood. (The description is given in the text)

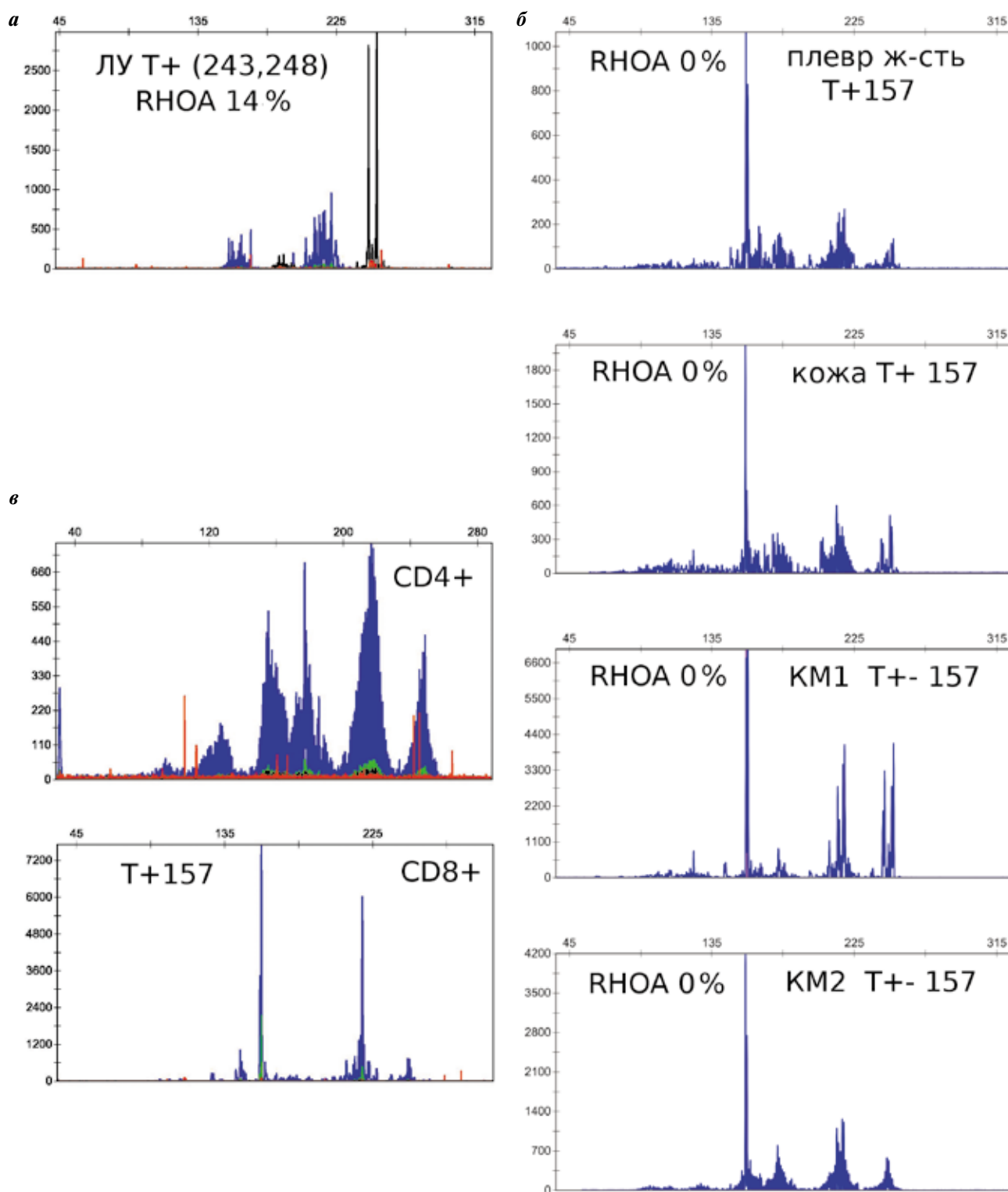


Рис. 3. Пациент А., 1951 г. р. Результаты количественного определения мутации RHOA Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по генам TCRG: а – в лимфатических узлах (ЛУ); б – других тканях: плевральной жидкости, коже, костном мозге (КМ) (КМ1 – первичный образец, КМ2 – образец через 6 мес от начала лечения) – описание в тексте; в – результат селекции клеток периферической крови: CD4⁺-клетки демонстрируют поликлональную картину, тогда как моноклональный пик 157 bp обнаружен только в CD8⁺-лимфоцитах. По оси х отложена длина продуктов амплификации в парах оснований (base pares – bp), по оси у – интенсивность флуоресценции. Плевр ж-сть. – плевральная жидкость; Т + 157 (Т ± 157) – Т-клеточная моноклональность (сомнительная моноклональность) с длиной клонального продукта 157 bp

Fig. 3. Patient A., born in 1951. The results of RHOA Gly17Val mutation quantitative detection and T-cell clonality by TCRG genes rearrangement: a – in lymph nodes (LN); б – other tissues: pleural fluid, skin, bone marrow (BM) (BM1 – primary sample, BM2 – sample after 6 months of starting treatment) – the description is given in the text; в – Result of peripheral blood cells selection: CD4⁺ cells demonstrate a polyclonal pattern, while a monoclonal 157 bp peak is found in CD8⁺ lymphocytes. X-axis – length of PCR product, y-axis – fluorescence intensity. Плевр ж-сть. – pleural fluid; Т + 157 (Т ± 157) – T-cell monoclonality (doubtful monoclonality) with the length of the clonal product of 157 bp

характерной оказалась клональная вариабельность — несовпадение Т-клеточной клональности, выявляемой в ЛУ, с клональностью, выявляемой в КМ, коже, крови и т. д. Так, например, на рис. 3 представлены результаты количественного определения мутации *RHOA* Gly17Val и определения Т-клеточной клональности по генам *TCRG* пациента А., 1951 г. р. В ЛУ выявляются клональные продукты длиной 243 и 248 bp, которые не совпадают с клональным продуктом 157 bp в других тканях, при этом клетки с мутацией *RHOA* Gly17Val выявляются только в ЛУ.

У 24 (60 %) пациентов из 40 была выявлена мутация *RHOA* Gly17Val в ЛУ. Мы исследовали 51 образец различных тканей у пациентов с *RHOA*-положительным результатом в ЛУ. Процент *RHOA*-мутированных клеток сильно варьировал между образцами (рис. 4а). Количество клеток с мутацией *RHOA* было высоким в ЛУ (в среднем 26,7 % от общего количества клеток) (рис. 4б), тогда как в КМ клетки с мутацией *RHOA* либо не выявлялись ($n = 7$), либо выявлялись в малом количестве (в среднем 2 % от общего количества клеток, $n = 10$ (рис. 4в)). Интересно, что при выполнении нескольких биопсий у 1 пациента количество *RHOA*

Gly17Val положительных клеток и результаты определения Т-клеточной клональности могли значительно различаться, при этом во всех биоптатах выявлялась гистологическая и иммуногистохимическая картина, характерная для АИТЛ (рис. 5).

Сопоставление данных гистологии, Т-клеточной клональности, количества *RHOA*-мутированных клеток показало, что поражение КМ обнаруживается у большинства (76 %) пациентов (у 13 из 17) хотя бы одним из методов (см. таблицу).

Одновременно первоначальные образцы крови и КМ исследованы у 7 пациентов с мутацией *RHOA*, при этом количество клеток с мутацией *RHOA* было незначительно выше в крови, чем в КМ, у 5 из 7 пациентов. Первоначальные образцы кожи получены у 6 пациентов с мутацией *RHOA*: у 5 из них выявлены Т-клеточная клональность, совпадающая по длине продукта с ЛУ, и значительный процент клеток с мутацией *RHOA* (в среднем 25 %), у 4 из 5 пациентов при гистологическом исследовании подтверждено специфическое поражение кожи. У 1 пациента в биоптате кожи обнаружен клон Т-лимфоцитов, отличный от ЛУ, при этом мутация *RHOA* не выявлена, и при

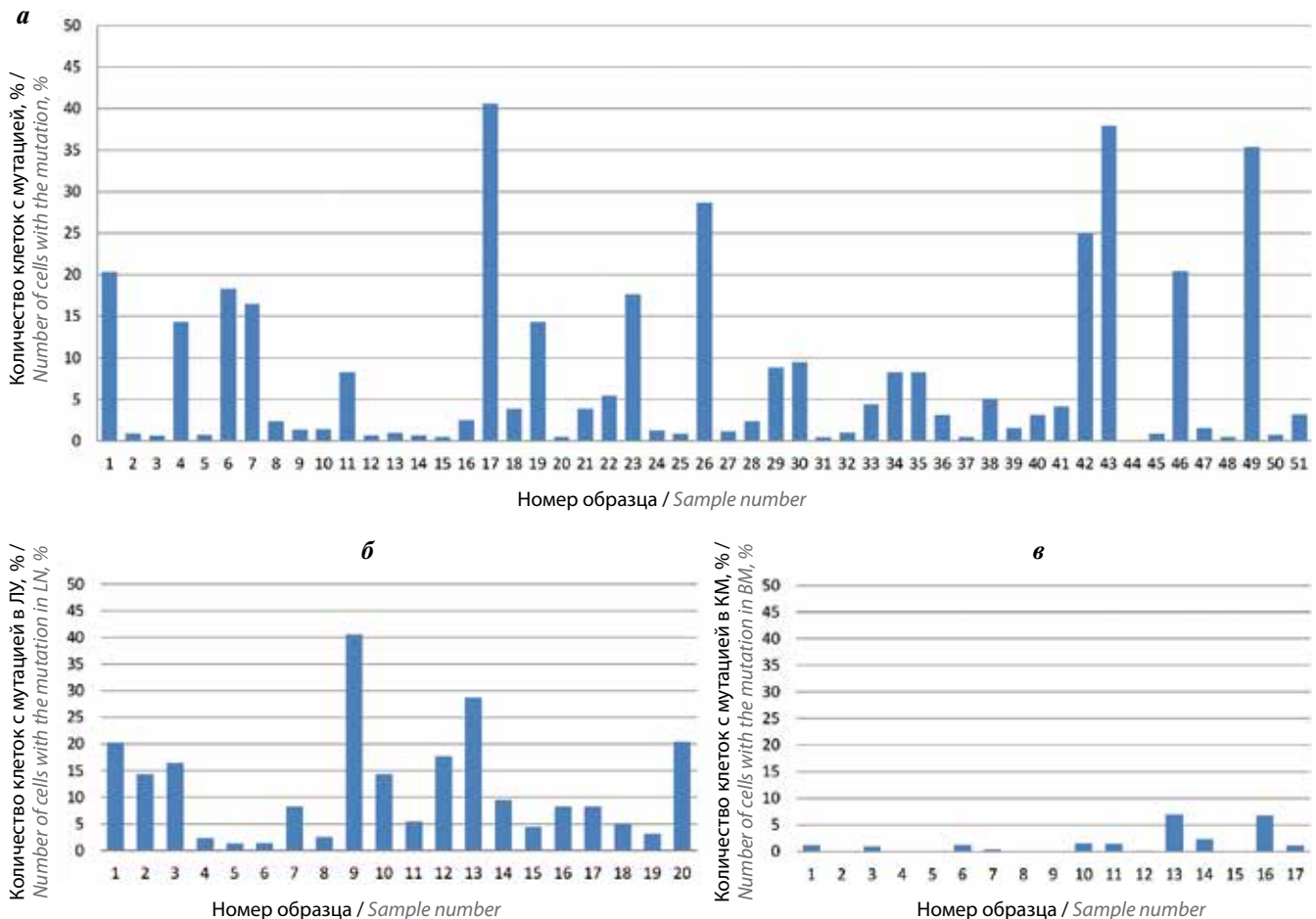


Рис. 4. Количественный результат определения мутации *RHOA* в первоначальных образцах у пациентов с ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой: а — во всех образцах, $n = 51$; б — в лимфатических узлах (ЛУ), $n = 20$; в — в костном мозге (КМ), $n = 17$

Fig. 4. The quantitative result of *RHOA* mutations detection in initial samples of angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients: а) in all samples, $n = 51$; б — in lymph nodes (LN), $n = 20$; в — in bone marrow (BM), $n = 17$

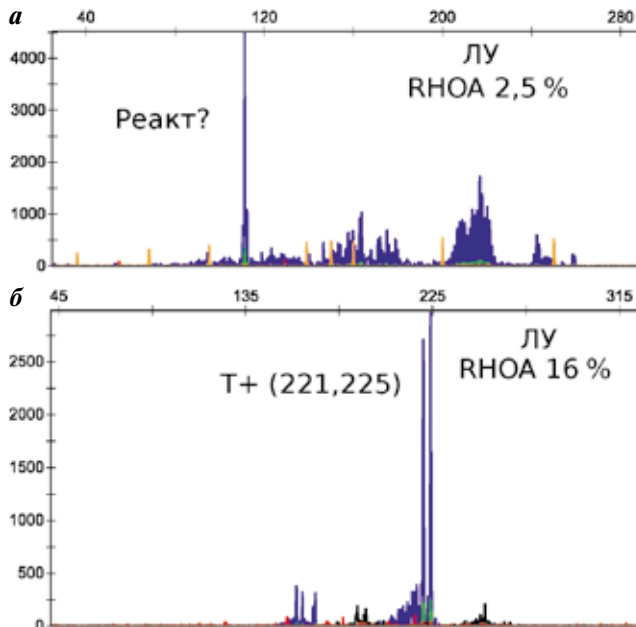


Рис. 5. Пациент В., 1939 г. р. Результаты биопсии шейного (а) и пахового (б) лимфатических узлов (ЛУ) с интервалом в 1 мес без проведения терапии: а – реактивная Т-клеточная клоальность, выявленная в шейном ЛУ, при низком (2,5 %) количестве клеток с мутацией *RHOA Gly17Val*; б – наличие в паховом ЛУ 16 % клеток с мутацией *RHOA Gly17Val* и клоальной реаранжировки *TCRG*. Реакт – реактивный клон

Fig. 5. Patient B. born in 1939. Results of 2 LN biopsies with monthly intervals: neck LN (a) and inguinal LN (б), with no therapy. In the neck LN, reactive T-cell clonality and a low percentage (2.5 %) of cells with a *RHOA Gly17Val* mutation was detected, in contrast to inguinal LN, which contains 16 % of cells with a *RHOA Gly17Val* mutation and a clonal *TCRG* rearrangement. Peakm – reactive clone

гистологическом исследовании опухолевого поражения кожи не обнаружено.

В целом мы зафиксировали хорошую корреляцию ($r = 0,8198$, $p < 0,00001$) в исследованных образцах ($n = 51$) между выраженностью Т-клеточной клоальности (совпадающей с пиками в ЛУ) и количеством *RHOA*-мутированных клеток. Образцы кожи, КМ и крови с пиками Т-клеточной клоальности, отличающимися от таковых, найденных в ЛУ, были также отрицательны на наличие клеток с мутацией *RHOA*. Таким образом, в данных образцах Т-клеточная клоальность носила реактивный характер, возможно, связанный с аутоиммунными, противовирусными или противоопухолевыми реакциями организма. У 4 пациентов в ремиссии заболевания с персистирующей Т-клеточной клоальностью были выделены $CD4^+$ - и $CD8^+$ -популяции Т-лимфоцитов методом магнитной селекции. У всех пациентов клоальные продукты, полученные из КМ и крови, не совпадающие по длине пиков с таковыми, полученными из ЛУ, выявлялись в популяции $CD8^+$ -клеток, но не в популяции $CD4^+$ (см. рис. 3в), что окончательно подтверждает их реактивный характер. У одной пациентки в популяции $CD4^+$ -клеток был обнаружен клоальный продукт, соответствующий таковому, выявленному в ЛУ

Результаты определения Т-клеточной клоальности, количественного определения мутации *RHOA Gly17Val* и гистологического исследования костного мозга (КМ) у пациентов с выявленной мутацией

The results of T-cell clonality assays, the quantitative detection of *RHOA Gly17Val* mutation and histological examination of the bone marrow (BM) in patients with the revealed mutation

Пациенты, $n = 17$ Patients, $n = 17$	Т-клеточная клоальность T-cell clonality	Количество клеток с мутацией <i>RHOA</i> , % Number of cells with an <i>RHOA</i> mutation, %	Морфологическое поражение КМ по данным гистологии Morphological lesion of BM according to histology
1	—	1,2	0
2	—	0,0	1
3	+	1,0	1
4	—	0,0	1
5	—	0,0	0
6	+	1,3	1
7	+	0,8	1
8	—	0,0	0
9	—	0,0	0
10	+	1,6	1
11	+	1,5	0
12	—	0,8	1
13	+	5,3	1
14	—	0,0	0
15	+	0,0	0
16	+	6,8	1
17	+	1,1	1

Примечание. Знаки «—» и «+» обозначают соответственно отсутствие и наличие выявленных клоальных пиков, совпадающих с ЛУ. Цифрами 0 и 1 дано невыявленное и выявленное поражение КМ соответственно.

Note. “—” no clonal peaks coinciding with LN, “+” clonal peaks, coinciding with LN, 0 – no BM involvement, 1 – with BM involvement.

в дебюте заболевания, что, вероятно, указывает на его опухолевую природу. У 14 из 20 пациентов реактивная Т-клеточная клоальность в крови и КМ исследована в динамике, и обнаружено, что у 7 (50 %) из 14 пациентов клоальные продукты персистировали на протяжении длительного времени и не исчезали при достижении ремиссии заболевания. Период наблюдения в среднем составил 12 мес (от 1 до 44 мес.).

По нашим данным, не было выявлено связи между персистенцией реактивных Т-клеточных клонов и активностью ВЭБ. Мы сравнили наличие или отсутствие реактивных клонов в крови и КМ с результатом

количественного определения ДНК ВЭБ в крови, КМ, биоптате ЛУ методом ПЦР. Были исследованы 20 пациентов (8 без реактивных Т-клеточных клонов и 12 с реактивными Т-клеточными клонами), при этом точно у половины пациентов и в той, и в другой группе инфекция ВЭБ была подтверждена методом ПЦР.

Количество клеток в КМ с мутацией *RHOA* Gly17Val исследовано в динамике у 5 пациентов, которые изначально имели *RHOA*-положительный результат по КМ. На фоне лечения все образцы КМ стали *RHOA*-негативными в период от 3 до 12 мес. По чувствительности детекции, которая составила 1 % опухолевых клеток от общей популяции, метод аллель-специфичной ПЦР с данными праймерами оказался сопоставим со стандартным методом определения Т-клональности (10 % клональных клеток от Т-лимфоцитов). В связи с низкой чувствительностью данную методику аллель-специфичной ПЦР нельзя использовать для оценки минимальной остаточной болезни.

Обсуждение

АИТЛ — это одна из самых сложных и запутанных в диагностическом плане лимфом. Из-за необычных клинических аутоиммунных проявлений, спонтанных ремиссий, гистологической картины и обильного реактивного компонента эту лимфому в течение долгого времени считали неопухолевым заболеванием. АИТЛ упоминалась под различными терминами: иммунобластная лимфаденопатия [22] и ангиоиммунобластная лимфаденопатия с диспротеинемией [23]. С появлением иммунофенотипирования и молекулярных методов стало очевидно, что ангиоиммунобластная лимфаденопатия — опухолевый, клональный процесс, что привело к появлению термина «ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома» (ВОЗ, 2001 г.). Тем не менее остаются многочисленные вопросы, связанные с АИТЛ: диагностические сложности, правильная интерпретация данных Т- и В-клеточной клональности (наличие нескольких Т-клеточных клонов у большинства пациентов, одновременное присутствие Т- и В-клональности), стадирование, характер поражения кожи у некоторых пациентов (реактивное или специфическое), выделение пациентов в различные прогностические группы, адекватный выбор терапии и длительности ее проведения [24, 25].

В нашей работе использован новый диагностический маркер АИТЛ — точечная мутация *RHOA* Gly17Val,

которая выявляется у 60 % пациентов и позволяет точно оценить количество опухолевых клеток в том или ином органе. Так, было показано, что процентное содержание опухолевых клеток в КМ при АИТЛ низкое (в среднем менее 2 % от общего количества клеток), но по совокупности данных молекулярного и гистологического исследований КМ поражен у большинства пациентов. Кроме того, было установлено, что при АИТЛ поражение кожи может носить как специфический, так и неспецифический характер. Благодаря этому маркеру стало возможным соотнести данные молекулярного определения клональности и количественной аллель-специфичной ПЦР. Убедительно показано, что несовпадение (полное у 46 % пациентов и частичное у 30 %) клональных пиков в ЛУ и других тканях можно отнести на счет присутствия в крови или КМ иммунных, реактивных Т-клеточных клонов, которые могут давать преимущественную амплификацию при малом количестве опухолевых Т-лимфоцитов. У данной когорты пациентов можно использовать для молекулярной диагностики только ЛУ, так как только в них имеется достаточное для диагностики количество опухолевых клеток. Интересно, что мы не нашли связи между активностью ВЭБ-инфекции и наличием данных реактивных Т-клеточных клонов. Для уточнения генеза реактивной Т-клеточной клональности при АИТЛ необходимо проведение дальнейших исследований. Поскольку АИТЛ богата аутоиммунными феноменами (васкулиты, полиартриты, аутоиммунные тиреоидиты и т. д.) [5], то данные Т-клеточные клоны, возможно, несут иммунный, аутоиммунный или ассоциированный с опухолью характер.

Заключение

Методом аллель-специфичной ПЦР точечная мутация *RHOA* Gly17Val выявляется у 60 % пациентов с АИТЛ, но только в пораженных ЛУ определяется достаточное для диагностики количество опухолевых Т-лимфоцитов. Количественное определение клеток с мутацией *RHOA* Gly17Val необходимо учитывать при стадировании заболевания и интерпретации результатов определения Т-клеточной клональности. Клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с ЛУ, выявляются у большинства пациентов с АИТЛ, относятся к CD8⁺-лимфоцитам, могут персистировать в течение длительного времени и несут реактивный характер.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Vose J., Armitage J., Weisenburger D.; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer / T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008;26(25):4124–30. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.4558. PMID: 18626005.
3. Weiss L.M., Jaffe E.S., Liu X.F. et al. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood* 1992;79(7):1789–95. PMID: 1373088.
4. Zettl A., Lee S.S., Rudiger T. et al. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am J Clin Pathol* 2002;117(3):368–79. DOI: 10.1309/6UTX-GVC0-12ND-JJEU. PMID: 11888076.
5. Dogan A., Attygalle A.D., Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2003;121(5):681–91. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04335.x. PMID: 12780782.
6. Стефанов Д.Н., Ковригина А.М., Поддубная А.М. Новая концепция происхождения ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы: от молекулярной биологии к терапии. Бюллетень СО РАМН 2011;31(2):14–9. [Stefanov D.N., Kovrigina A.M., Poddubnaya A.M. A new concept of of angioimmunoblastic T-cell lymphoma origin: from molecular biology to therapy. Bulletin SO RAMN = Bulletin of the SB RAMS 2011;31(2):14–9. (In Russ.)].
7. Brüggemann M., White H., Gaulard P. et al. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98–3936. *Leukemia* 2007;21(2):215–21. DOI: 10.1038/sj.leu.2404481. PMID: 17170730.
8. Lachenal F., Berger F., Ghesquières H. et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)* 2007;86(5):282–92. DOI: 10.1097/MD.0b013e3181573059. PMID: 17873758.
9. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В. и др. Определение Т-клеточной клональности по гамма-цепи Т-клеточного рецептора: окончательные данные. Терапевтический архив 2006;78(7):52–7. [Nikitin E.A., Sidorova Yu.V., Ryzhikova N.V. et al. Determination of T-cell clonality by T-cell receptor gamma chain: final data. Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic archive 2006;78(7):52–7. (In Russ.)].
10. Сидорова Ю.В., Никулина Е.Е., Чернова Н.Г. и др. Определение клональности методом ПЦР при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2014;7(2):192–6. [Sidorova Yu.V., Nikulina E.E., Chernova N.G. et al. PCR-based clonality detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2014;7(2):192–6. (In Russ.)].
11. Zaki M.A., Wada N., Kohara M. et al. Presence of B-cell clones in T-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2011;86(5):412–9. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2011.01597.x. PMID: 21362051.
12. Attygalle A., Al-Jehani R., Diss T.C. et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood* 2002;99(2):627–33. DOI: 10.1182/blood.V99.2.627. PMID: 11781247.
13. Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A. The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and Epstein-barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J Mol Diagn* 2006;8(4):466–75. DOI: 10.2353/jmoldx.2006.060016. PMID: 16931587.
14. Sakata-Yanagimoto M., Enami T., Yoshida K. et al. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 2014;46(2):171–5. DOI: 10.1038/ng.2872. PMID: 24413737.
15. Palomero T., Couronné L., Khiabani H. et al. Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat Genet* 2014;46(2):166–70. DOI: 10.1038/ng.2873. PMID: 24413734.
16. Kataoka K., Ogawa S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp Hematol* 2016;44(12):1123–9. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.09.002. PMID: 27693615.
17. Nakamoto-Matsubara R., Sakata-Yanagimoto M., Enami T. et al. Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. *PLoS One* 2014;9(10):e109714. DOI: 10.1371/journal.pone.0109714. PMID: 25310466.
18. Saoudi A., Kassem S., Dejean A. et al. Rho-GTPases as key regulators of T-lymphocyte biology. *Small GTPases* 2014;5:e28208. DOI: 10.4161/sgtp.28208. PMID: 24825161.
19. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациент-специфичной ПЦР. Клиническая лабораторная диагностика 2011;12:22–4. [Sidorova Yu.V., Sorokina T.V., Biderman B.V. et al. Minimal residual disease detection in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia by patient-specific PCR. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = (Clinical laboratory diagnostics 2011;12:22–4. (In Russ.)].
20. Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol* 2012;21(1):57–60. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2011.01375.x. PMID: 21995276.
21. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98–3936. *Leukemia* 2003;17(12):2257–317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202. PMID: 14671650.
22. Lukes R.J., Tindle B.H. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1975;292(1):1–8. DOI: 10.1056/NEJM197501022920101. PMID: 1078547.
23. Frizzera G., Moran E.M., Rappaport H. Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet* 1974;1(7866):1070–3. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)90553-4. PMID: 4135245.
24. Сидорова Ю.В., Чернова Н.Г., Рыжикова Н.В. и др. Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме. Acta Naturae (русскоязычная версия) 2015;7(3):130–40. [Sidorova Yu.V., Chernova N.G., Ryzhikova N.V. et al. Clonal rearrangements and Malignant Clones in Peripheral T-cell Lymphoma. Acta Naturae (Russian version) 2015;7(3):130–40. (In Russ.)]. PMID: 26483968.
25. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В. и др. Длительные режимы цитостатической терапии ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2014;7(1):57–62. [Chernova N.G., Vinogradova Yu.E., Sidorova Yu.V. et al. Prolonged chemotherapy for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2014;7(1):57–62. (In Russ.)].

Статья поступила: 23.10.2017. Принята в печать: 14.12.2017.

Article received: 23.10.2017. Accepted for publication: 14.12.2017.

Ренин-ангиотензиновая система в регуляции гемопоэза

М.Л. Канаева, И.В. Гальцева, И.М. Накастоев, Я.Б. Бальжанова, Е.О. Грибанова,
Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России;
Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4

Контакты: Мадина Лечиевна Канаева madinasatto@gmail.com

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) давно известна как эндокринная система, участвующая в регуляции артериального давления и водно-электролитного баланса. Локальная (тканевая) РАС может влиять на клеточную активность, повреждение и регенерацию тканей, рост, продукцию, пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток, а также участвовать в регуляции как нормального, так и патологического гемопоэза. В костном мозге есть активные лиганды пептидов, медиаторов, рецепторов и сигнальных путей РАС. Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) CD143 играет ключевую роль в классической РАС, в которой ренин запускает продукцию ангиотензина I из ангиотензиногена. После дифференцировки из гемангиобластов гемопоэтические клетки-предшественники постоянно экспрессируют АПФ в человеческих эмбриональных, фетальных и взрослых кроветворных тканях, а также на всех стадиях гемопоэтического онтогенеза. АПФ отщепляет C-концевой дипептид, в результате чего формируется октапептид ангиотензин II. Кроме того, АПФ также регулирует группу биологически активных пептидов, таких как субстанция P, гемопоэтический фрагмент ас-SDKP (N-ацетил-серил-аспартил-лизил-пролин) и ангиотензин 1–7. Локальная РАС является также одним из важнейших компонентов клеточного микроокружения опухоли, влияя на ее рост и метастазирование аутокринным и паракринным путями, модулируя многочисленные канцерогенные события (ангиогенез, апоптоз, пролиферация клеток, иммунные реакции и формирование внеклеточного матрикса).

Целью данного обзора является рассмотрение известных функций локальной РАС в регуляции гемопоэза. Более глубокое изучение механизмов действия компонентов РАС позволит расширить терапевтические подходы при неопластических заболеваниях и трансплантации костного мозга.

Ключевые слова: ренин-ангиотензиновая система, ангиотензинпревращающий фермент, гемопоэз

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-50-70

Renin-angiotensin system in regulation of hematopoiesis

M.L. Kanaeva, I.V. Galtseva, I.M. Nakastoev, Y.B. Balzhanova, E.O. Griбанова, E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko
National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Noviy Zыkovskiy proezd, Moscow, Russia, 125167

The renin-angiotensin system (RAS) has long been known as the endocrine system involved in the regulation of arterial pressure and water-electrolyte balance. Local (tissue) RAS can influence cellular activity, tissue damage and regeneration. In the bone marrow there are active ligands of peptides, mediators, receptors and signaling pathways of the RAS. Local RAS can influence the growth, production, proliferation and differentiation of hematopoietic cells and participate in the regulation of both normal and pathological hematopoiesis.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) CD143 plays a key role in the classical RAS. After differentiation from hemangioblast, hematopoietic progenitor cells constantly express ACE in human embryonic, fetal and adult hematopoietic tissues, as well as at all stages of hematopoietic ontogeny. The ACE cleaves the C-terminal dipeptide and thus forms the octapeptide Angiotensin II. In addition to angiotensin II, ACE also regulates a group of biologically active peptides, such as substance P, ac-SDKP and angiotensin 1–7.

Local RAS is also one of the most important components in the tumor microenvironment, affecting tumor growth and metastasis by autocrine and paracrine pathways, modulating numerous carcinogenic events such as angiogenesis, apoptosis, cell proliferation, immune responses, and extracellular matrix formation.

The purpose of this review is to describe the known functions of local RAS in the hematopoiesis regulation. More detailed study of the RAS components mechanisms of action will expand therapy approaches in the neoplastic diseases and in bone marrow transplantation.

Key words: renin-angiotensin system, angiotensin-converting enzyme, hemopoiesis

Введение

Кроветворение представляет собой сложный многостадийный процесс клеточных делений и дифференцировок, в результате которого ранние предшественники дифференцируются в промежуточные и зрелые формы клеток. Реализация процессов самоподдержания и дифференцировки стволовых кроветворных клеток регулируется набором событий, при которых

клетки гемопоэтического микроокружения взаимодействуют друг с другом, с гемопоэтическими факторами роста и межклеточным матриксом. Сочетание этих факторов, которые могут выступать в качестве положительных или отрицательных регуляторов, определяет выживание, пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических предшественников. Проведенные исследования показали, что местная (тканевая)

ренин-ангиотензиновая система (РАС) может влиять на клеточную активность, повреждение и регенерацию тканей. В костном мозге (КМ) есть активные лиганды пептидов, медиаторов, рецепторов и сигнальных путей РАС [1].

Ренин-ангиотензиновая система

РАС давно известна как эндокринная система, участвующая в регуляции артериального давления (АД) и водно-электролитного баланса. Ее роль в регуляции кровяного давления впервые описали R. Tigerstedt и P. Bergman в 1898 г. Авторы опубликовали информацию о веществе, которое влияло на АД: при инъекции гомогената почечной ткани здорового кролика другому здоровому кролику происходило повышение АД у реципиента. Вещество, влияющее на АД, было названо «ренином», поскольку было выделено из ткани почки [2–4]. Позже было показано, что ренин способен расщеплять продуцируемый в печени ангиотензиноген с образованием ангиотензина I. В 1950-е годы был установлен факт преобразования неактивного ангиотензина I в активный сосудосуживающий фактор — ангиотензин II. Это преобразование осуществляется с участием ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) CD143, который продуцируется главным образом эндотелиоцитами легочных и почечных сосудов [5].

В 1996 г. I.C. Haznedaroğlu с соавт. предположили, что в КМ есть локальная РАС, влияющая на рост, продукцию, пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток и участвующая в регуляции как нормального, так и патологического гемопоэза [6]. Это участие РАС в регуляции кроветворения может осуществляться либо с помощью прямого воздействия на гемопоэтические стволовые клетки, либо через стимуляцию высвобождения факторов роста и цитокинов из стромальных клеток [7].

Компоненты РАС присутствуют даже в эмбриональном кроветворении. Изучение культур человеческих эмбриональных стволовых клеток показало, что иммунофенотип CD143⁺CD34⁺CD45⁺ является маркером гемангиобластов, которые продуцируют клетки-предшественники для эндотелиальных и лимфогемопоэтических стволовых клеток. После дифференцировки из гемангиобластов гемопоэтические клетки-предшественники постоянно экспрессируют АПФ в человеческих эмбриональных, фетальных и взрослых кроветворных тканях, а также на всех стадиях гемопоэтического онтогенеза [8].

При определении гемангиобластных и мультипотентных гемопоэтических клеток-предшественников поверхностная экспрессия АПФ была более постоянной, чем экспрессия CD34. Клоногенные мультипотентные гемопоэтические клетки-предшественники присутствовали во фракции клеток CD34⁺ACE⁺ и CD34⁺ACE⁺, но отсутствовали на CD34⁺ACE⁺-эмбриональных клетках [1].

Ангиотензинпревращающий фермент

В настоящее время активно исследуется влияние АПФ на пролиферативную активность клеток КМ. Молекула тканевой формы АПФ состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 2 высокомолекулярных домена (N- и С-домены), каждый из которых имеет активный центр с цинксвязывающей последовательностью [9]. Главной спецификой АПФ является высвобождение С-концевого дипептида путем расщепления пептидной связи [10]. Находясь на поверхности плазматической мембраны, АПФ часто действует совместно с другими мембраносвязанными протеинами на одни и те же субстраты как регулятор пептидомодифицированной активности. При воздействии на физиологические субстраты АПФ может вызывать как превращение неактивной формы в активную, так и инактивацию биологически активного пептида или трансформацию его активности [11]. АПФ играет ключевую роль в классической РАС, в которой ренин запускает продукцию ангиотензина I из ангиотензиногена, а затем АПФ расщепляет ангиотензин I до ангиотензина II. Последний в свою очередь связывается с рецепторами ангиотензина II 1-го (AT₁-рецепторы) либо 2-го типа (AT₂-рецепторы). РАС регулирует кровяное давление и водно-электролитный баланс преимущественно через продукцию ангиотензина II [12].

Ингибиторы АПФ впервые стали доступны в клинической практике в начале 1980-х годов. Использование этих препаратов привело к значительному прогрессу в лечении гипертонической болезни. Однако при их применении отмечался ряд побочных эффектов, в том числе анемия и лейкопения [13]. Было доказано, что ангиотензин II стимулирует пролиферацию эритроидных клеток, влияя на эритропоэтин и другие факторы роста. Кроме того, он усиливает эритропоэз путем стимуляции эритроидных клеток-предшественников, увеличивает пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников и оказывает митогенное действие на гладкомышечные клетки [14]. Для определения механизмов влияния РАС на продукцию красных кровяных клеток М. Муг и соавт. изучили на эритроидных предшественниках экспрессию ангиотензина II и его воздействие на пролиферацию эритроидных клеток-предшественников *in vitro*. Данные их исследования подтвердили гипотезу о том, что ангиотензин II стимулирует эритропоэз и этот эффект достигается через AT₁-рецепторы. Стимулирующий эффект ангиотензина II на эритропоэз *in vitro* наблюдался только в случае, если эритроидные предшественники культивированы с эритропоэтином [15]. Прямым доказательством того, что ангиотензин II может выполнять функцию митогена, послужил результат исследования К.Е. Rodgers и соавт. [16], в котором число недифференцированных колоний увеличилось после добавления ангиотензина II в культуру клеток КМ мышей. Этот эффект наблюдался в отсутствие других колониестимулирующих факторов.

При введении лозартана (антагониста AT_1 -рецепторов) блокируется увеличение числа колоний, это свидетельствует о том, что данный эффект регулируется через AT_1 -рецепторы. Однако лозартан не оказывает подавляющего действия без добавления экзогенного ангиотензина II. Кроме того, блокада AT_1 -рецепторов оказывает влияние на формирование только эритроидных колоний. При исследовании мышей с инактивированными генами АПФ и AT_1 -рецепторов число общих миелоидных, моноцитарных клеток-предшественников и клеточность КМ, а также число циркулирующих в крови лейкоцитов и тромбоцитов было нормальным. Однако в условиях стресса ангиотензин II может значительно облегчить мультилинейное восстановление кроветворения. Когда мыши получали сублетальные дозы облучения или химиотерапию, подкожное введение ангиотензина II увеличило число гемопоэтических клеток-предшественников в КМ и крови и повысило число лейкоцитов в периферической крови быстрее, чем у мышей, которым его не вводили. Лечение ангиотензином II также уменьшило снижение количества тромбоцитов после облучения и увеличило число мегакариоцитов в КМ.

АПФ также гидролизует субстанцию P (SP) и может регулировать миелопролиферацию через нее. SP представляет собой пептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков, принадлежит к семейству тахикининов, кодируется геном *TAC1* и продуцируется из предшественника полипротеина [17]. SP влияет на пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток *in vitro* путем активации функции стромальных клеток. В частности, SP стимулирует секрецию миелоидных факторов роста, таких как IL-1, IL-3, фактор стволовых клеток и гранулоцито-макрофагальный колониестимулирующий фактор [18].

При оценке методом полимеразной цепной реакции АПФ был обнаружен во всех протестированных 72 образцах тканей человеческого организма с самой высокой распространенностью в эндотелии [19]. V.J. Jokubaitis и соавт. в 2008 г. подтвердили, что АПФ экспрессируется на человеческих эмбриональных клетках и клетках взрослых гемопоэтических органов, включая аорту, печень плода и пуповинную кровь. В человеческом организме (до формирования гемопоэтических стволовых клеток и сосудистой стенки аорты) на некоторых $CD34^+CD45^-$ клетках эмбриона обнаружена экспрессия АПФ. Также в результате трансплантации печеночных и костномозговых клеток-предшественников мышам линии NOD/SCID было продемонстрировано, что клетки-предшественники, экспрессирующие $CD34^+CD143^+$, обладают более длительным пролиферативным потенциалом в отличие от $CD34^+$ клеток, не экспрессирующих $CD143$ [1].

Ангиотензин 1–7

Ангиотензин 1–7 является продуктом расщепления ангиотензина I или II. Различные эндопептидазы

катализируют гидролиз ангиотензина I и высвобождение ангиотензина 1–7. Ангиотензин II расщепляется АПФ2 в ангиотензин 1–7 [20]. Было установлено, что Mas-рецептор на поверхности клеток является функциональным связывающим сайтом для ангиотензина 1–7 [21]. Mas — протоонкоген, который относится к классу сопряженных с G-белком рецепторов, осуществляющих передачу внешних сигналов внутрь клетки. Известно, что многие протоонкогены играют важную роль в нормальной пролиферации клеток, особенно на ранних стадиях эмбрионального развития, участвуя в регуляции клеточного цикла и выборе геномной программы развития клетки [22, 23]. У взрослых мышей Mas обильно экспрессируется в головном мозге и семенниках, но также обнаруживается в сердце, почках, селезенке и КМ. Соединяясь с Mas-рецепторами, ангиотензин 1–7 оказывает сосудорасширяющее, антипролиферативное и антиатерогенное действие.

Несмотря на то что ангиотензин 1–7 выступает в роли конкурентного антагониста ангиотензина II, в системе кроветворения он проявляет мультилинейный пролиферативный эффект подобно ангиотензину II. При анализе колоний клеток установлено, что $CD34^+$ клетки человеческой пуповинной крови после добавления ангиотензина 1–7 образуют более крупные колонии (более 50 клеток в колонии). Кроме того, при трансплантации $CD34^+$ клеток человеческой пуповинной крови облученным мышам линии NOD/SCID и при ежедневной инфузии ангиотензина 1–7 наблюдалось более значимое увеличение количества $CD34^+$ клеток. После сублетального облучения или химиотерапии с применением 5-фторурацила инфузия ангиотензина 1–7 ускорила восстановление гемопоэза с повышением мультилинейной дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников в КМ и рост числа лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. Этот результат позволяет предположить, что экспрессия Mas активируется во время стресса кроветворения и обеспечивает биохимическое объяснение эффектов ангиотензина 1–7 [24].

S. Heringer-Walther и соавт. исследовали влияние ангиотензина 1–7 на пролиферацию *in vitro* и приживление *in vivo* человеческих клеток-предшественников в КМ мышей NOD/SCID. Авторами было установлено, что метаболит ангиотензина II, ангиотензин 1–7, стимулирует пролиферацию $CD34^+$ клеток пуповинной крови *in vitro* и что введение моноклеарных пуповинных клеток с последующим добавлением ангиотензина 1–7 улучшает приживление человеческих гемопоэтических клеток-предшественников в КМ у мышей [25, 26].

Тетрапептид N-ацетил-серил-аспартил-лизил-пролин

Тетрапептид N-ацетил-серил-аспартил-лизил-пролин (N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro, ac-SDKP) присутствует в крови в наномолярной концентрации

и является физиологическим регулятором кроветворения. Ас-SDKP высвобождается из N-концевого пептида тимозина бета-4 с помощью олигопептидазы. Предшественник пептида, тимозин бета-4 присутствует во всех клетках, за исключением красных кровяных клеток, и во всех жидкостях организма (слюна, слезы, кровь, плазма, раневые жидкости). АПФ является регулятором тетрапептида ас-SDKP, который, в свою очередь, негативно влияет на пролиферацию стволовых кроветворных клеток в КМ [27]. Увеличение содержания АПФ в стромальных клетках микроокружения значительно уменьшает количество ас-SDKP, что ведет к усилению пролиферации кроветворных клеток КМ. У здоровых людей после однократного приема ингибитора АПФ (каптоприл в дозе 50 мг) уровень ас-SDKP в плазме увеличился примерно в 5 раз [28].

Ас-SDKP предотвращает вхождение покоящихся примитивных кроветворных клеток в S-фазу и, следовательно, уменьшает повреждение стволовых клеток в результате лечения S-фазоспецифическими химиотерапевтическими препаратами [29]. При цитотоксическом или ионизирующем воздействии ингибирующий эффект ас-SDKP был использован в качестве средства защиты от повреждения КМ у животных. В частности, лечение ас-SDKP увеличило процент выживаемости животных, количество гемопоэтических предшественников в КМ и число периферических клеток. Это обусловлено обратимым блокированием клеточного цикла, и максимальный эффект был достигнут при введении ас-SDKP по крайней мере за 24 ч до начала облучения или химиотерапии [30–32].

Эти данные демонстрируют действие экзогенного ас-SDKP, но физиологическая роль данного пептида остается до конца не выясненной. S. Fuchs и соавт. исследовали мышиную модель, в которой были получены 2 точечные мутации, селективно инактивировавшие N-каталитический домен в АПФ. Так как ас-SDKP является субстратом воздействия исключительно этой области АПФ, у мышей отмечалось семикратное повышение пептида в сыворотке, в то время как концентрация ангиотензина II не изменялась, потому что C-концевой каталитический домен АПФ оставался неповрежденным. Эти мыши имели нормальные уровни гематокрита и лейкоцитов периферической крови [33, 34].

Для того чтобы определить, может ли ас-SDKP непосредственно влиять на рост клеток-предшественников даже на самом примитивном уровне, были изучены $CD34^{+}HLA-DR^{high}$ и $CD34^{+}HLA-DR^{low}$ клетки с высокой степенью очистки (сортировка клеток с активированной флуоресценцией). Последняя фракция содержит большее количество примитивных клеток, т. е. клеток, способных к длительной репопуляции и обладающих высоким пролиферативным потенциалом. Две популяции $CD34^{+}$ клеток инкубировали с добавлением ас-SDKP или без него в течение 6 дней (в дозе 10^{-10} ммоль/л), а затем эти клетки высевали

в метилцеллюлозу. В популяции с ас-SDKP было значительно снижено общее число клеток-предшественников: от 49 до 71 % в $CD34^{+}HLA-DR^{high}$ и от 49 до 94 % в $CD34^{+}HLA-DR^{low}$. Также с помощью метода лимитирующего разведения было продемонстрировано, что ас-SDKP действует непосредственно на уровне 1 клетки и его ингибирующее действие является обратимым и зависит от дозы [35].

Ренин-ангиотензиновая система в онкогенезе

Онкогенез — это сложный патофизиологический процесс, в результате которого происходит дисбаланс между клеточной пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом. Локальная РАС является одним из важнейших компонентов в микроокружении опухоли, влияя на рост и метастазирование опухоли ауто- и паракринным путями, модулируя многочисленные канцерогенные события, такие как ангиогенез, апоптоз, пролиферация клеток, иммунные реакции и формирование внеклеточного матрикса [36].

Передача сигналов РАС увеличивает пролиферацию клеток в злокачественных новообразованиях путем непосредственного влияния на опухолевые и стромальные клетки, а также косвенно, модулируя рост сосудистых клеток во время ангиогенеза [37]. Ангиогенез — процесс формирования и развития новых кровеносных сосудов, является центральным процессом в поддержании пролиферативного роста клеток. Способность неопластических клеток стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток связана с 2 основными событиями: прекращением секреции ими факторов, ингибирующих ангиогенез (тромбоспондины и др.), и увеличением продукции цитокинов (стимуляторов ангиогенеза), являющихся факторами роста и митогенами для эндотелиоцитов: в первую очередь фактором роста эндотелия сосудов (VEGF), а также фактором роста фибробластов (FGF), эпидермальным фактором роста и трансформирующим ростовым фактором альфа. Ангиотензин II стимулирует экспрессию нескольких проангиогенных агентов и факторов роста, включая VEGF, ангиопоэтин 2, основной FGF и тромбоцитарный фактор роста. Блокада РАС приводит к снижению экспрессии VEGF [38].

Наиболее изученными компонентами РАС, участвующими в процессе пролиферации клеток, являются ангиотензин II и его рецепторы. Ангиотензин II обладает провоспалительными свойствами. Индуцируя апоптоз, ангиогенез и сосудистое ремоделирование, он вовлекается в развитие некоторых онкологических процессов [39]. Проангиогенные эффекты ангиотензина II, вероятнее всего, реализуются через AT_1 -рецепторы. Через их активацию ангиотензин II способствует реваскуляризации поврежденных сосудов путем увеличения VEGF и уровня эндотелиальной синтазы оксида азота [40]. При передаче сигналов через AT_1 -рецепторы ангиотензин II облегчает клеточную пролиферацию и ангиогенез, в то время как передача

сигналов через AT_2 -рецепторы приводит к антипролиферативному эффекту [41].

В течение постнатального периода в большинстве тканей доля AT_1 - и AT_2 -рецепторов резко меняется. В тканях плода экспрессия AT_2 -рецепторов является доминирующей, а у взрослых преобладает экспрессия AT_1 -рецепторов. Ангиотензин II является потенциально важным стимулятором роста также из-за активации фосфатидилинозитола через AT_1 -рецепторы, который, используя 2 основных вторичных посредника липидной природы (фосфоинозитид-3-киназа и диацилглицерин), вызывает повышение Ca^{2+} в цитозоле. Повышение внутриклеточного кальция может способствовать экспрессии генов факторов роста, кодирующих белки c-fos и c-jun. В свою очередь, эти протеины действуют как факторы транскрипции для различных генов-мишеней, которые могут стимулировать митогенез [42].

Активация AT_1 -рецептора может повлечь за собой прогрессию опухоли и образование метастазов, в то же время применение блокаторов AT_1 -рецепторов и ингибиторов АПФ способствует регрессии опухолей в различных тканях [38]. Сверхэкспрессия АПФ на поверхности лейкозных бластных клеток миелоидной направленности была обнаружена методом проточной цитометрии, экспрессия АПФ и p53 на CD34⁺ клетках у пациентов с острым лейкозом — во время и после индукционной химиотерапии [43]. Также была выявлена экспрессия АПФ на макрофагах лимфатических узлов у пациентов с болезнью Ходжкина.

М. Albayrak и соавт. исследовали уровень АПФ в сыворотке крови у больных с первично диагностированной множественной миеломой ($n = 25$) и у здоровых доноров из контрольной группы ($n = 20$). Уровни АПФ были достоверно выше у больных множественной миеломой ($32,60 \pm 20,26$ Ед/л) по сравнению с донорами ($15,35 \pm 6,47$ Ед/л) [44].

Экспрессия компонентов РАС была изучена методом количественной полимеразной цепной реакции у пациентов с хроническим миелолейкозом в момент диагностики, на 3, 6 и 12-й месяцы лечения иматинибом. У пациентов с *de novo* хроническим миелолейкозом экспрессия АПФ, ангиотензиногена и ренина матричной РНК была повышена, и ее уровень снизился после начала лечения иматинибом [42].

Заключение

Таким образом, проведенные исследования подтверждают не только важную физиологическую роль

РАС в сердечно-сосудистом и почечном гомеостазе, но и участие ее в регуляции как нормального, так и патологического гемопоэза [6]. Активные пептиды РАС оказывают воздействие на регенерацию тканей, клеточную пролиферацию и высвобождение факторов роста и присутствуют на разных стадиях гемопоэза.

Роль АПФ и ангиотензина II в постэмбриональном гемопоэзе привела к исследованиям возможного влияния РАС на примитивный гемопоэз. Первые исследования проводились на куриных эмбрионах. С помощью метода гибридизации *in situ* экспрессия АПФ была обнаружена в экстраэмбриональной мезодерме еще до начала дифференцировки кровяных островков желточного мешка. Экспрессия других компонентов РАС (ренин и ангиотензиноген) присутствовала вблизи кровяных островков через 30 ч развития, что наводило на мысль о роли РАС в эритропоэзе. Введение 2-дневным куриным эмбрионам ингибиторов АПФ привело к значительному снижению гематокрита по сравнению с контрольной группой эмбрионов [45]. После этих наблюдений были проведены исследования для оценки экспрессии компонентов РАС у эмбрионов млекопитающих, которые также подтвердили роль РАС в примитивном гемопоэзе [1].

Наиболее широко используемые стимуляторы гемопоэза (эритропоэтин, гранулоцитарный колоние-стимулирующий фактор) действуют на более поздние клетки-предшественники и стимулируют пролиферацию и дифференцировку 1 клеточной линии. Пептиды РАС являются мощными стимуляторами пролиферации клеток-предшественников [16, 26]. Доклинические исследования ангиотензина 1–7 предполагают возможность увеличения множества линий ранних гемопоэтических клеток-предшественников, культивированных из КМ и периферической крови мышей. Эти исследования показали, что инфузия ангиотензина 1–7 после сублетального облучения или химиотерапии ускорила восстановление гемопоэза с повышением мультилинейной дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников в КМ и рост числа лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови [24].

Будущие экспериментальные и клинические исследования необходимы для более точного понимания функций локальной РАС, что может привести к разработке новых препаратов, ускоряющих мультилинейное восстановление КМ после облучения и агрессивной химиотерапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

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

- Jokubaitis V.J., Sinka L., Driessen R. et al. Angiotensin converting enzyme (CD143) marks hematopoietic stem cells in human embryonic, fetal and adult hematopoietic tissues. *Blood* 2008;111(8):4055–63. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091710. PMID: 17993616.
- Tigerstedt R., Bergman P.G. Niere und Kreislauf. *Scandinav Arch J Physiol* 1898;8:223.
- Bernstein K.E., Martin B.M., Bernstein E.A. et al. The isolation of angiotensin-converting enzyme cDNA. *J Biol Chem* 1988;263(23):11021–4. PMID: 2841312.
- Ferrario C.M. Does angiotensin-(1–7) contribute to cardiac adaptation and preservation of endothelial function in heart failure? *Circulation* 2002;105(13):1523–5. DOI: 10.1161/01.CIR.0000013787.10609.DC. PMID: 11927512.
- Коваленко В.Н., Талаева Т.В., Братусь В.В. Ренин-ангиотензиновая система в кардиальной патологии. *Український кардіологічний журнал* 2012;3:105–29. [Kovalenko V.N., Talaeva T.V., Bratus V.V. Renin-angiotensin system in cardiac pathology. *Ukrainskiy kardiologicheskii zhurnal = Ukrainian Cardiology Journal* 2012;3:105–29. (In Russ.)].
- Haznedaroğlu I.C., Tuncer S., Gürsoy M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. *Med Hypotheses* 1996;46(6):507–10. PMID: 803932.
- Hubert C., Savary K., Gasc J.M. et al. The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(2):80–5. DOI: 10.1038/ncpcardio0449. PMID: 16446776.
- Zambidis E.T., Park T.S., Yu W. et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008;112(9):3601–14. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144766. PMID: 18728246.
- Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C. et al. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(24):9386–90. PMID: 2849100.
- Corvol P., Williams T.A., Soubrier F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol* 1995;248:283–305. PMID: 7674927.
- Кугаевская Е.В. Ангиотензин-превращающий фермент. Доменная структура и свойства. *Биомедицинская химия* 2005;51(6):567–80. [Kugaevskaya E.V. Angiotensin converting enzyme domain structure and properties. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomed Khim* 2005;51(6):567–80. (In Russ.)]. PMID: 16521820.
- Paul M., Mehr A.P., Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol* 2006;86(3):787–803. DOI: 10.1152/physrev.00036.2005. PMID: 16816138.
- Kamper A.-L., Nielsen O.J. Effect of enalapril on haemoglobin and serum erythropoietin in patients with chronic nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50(6):611–8. DOI: 10.3109/00365519009089178. PMID: 2247767.
- Weber H., Taylor D.S., Molloy C.J. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest* 1994;93(2):788–98. DOI: 10.1172/JCI117033. PMID: 7509348.
- Mrug M., Stopka T., Julian V.A. et al. Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors. *J Clin Invest* 1997;100(9):2310–4. DOI: 10.1172/JCI119769. PMID: 9410909.
- Rodgers K.E., Xiong S., Steer R., diZerega G.S. Effect of Angiotensin II on Hematopoietic Progenitor Cell Proliferation. *Stem Cells* 2000;18(4):287–94. DOI: 10.1634/stemcells.18-4-287. PMID: 10924095.
- Pennefather J.N., Lecci A., Candenas M.L. et al. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci* 2004;74(12):1445–63. PMID: 14729395.
- Rameshwar P., Gascón P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood* 1995;86(2):482–90. PMID: 7541664.
- Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett* 2002;532(1–2):107–10. PMID: 12459472.
- Ferrario C.M., Trask A.J., Jessup J.A. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin – converting enzyme 2 and angiotensin-(1 – 7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(6):2281–90. DOI: 10.1152/ajpheart.00618.2005. PMID: 16055515.
- Santos R.A., Haibara A.S., Campagnole-Santos M.J. et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1–7), D-pro7-angiotensin-(1–7). *Hypertension* 2003;41(3 Pt 2):737–43. DOI: 10.1161/01.HYP.0000052947.60363.24. PMID: 12623989.
- Allen L.F., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Cotecchia S. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88(24):11354–8. PMID: 1662393.
- Martin K.A., Hockfield S. Expression of the mas proto-oncogene in the rat hippocampal formation is regulated by neuronal activity. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;19(4):303–9. DOI: 10.1016/0169-328X(93)90129-D. PMID: 8231733.
- Hill C.S., Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 1995;80(2):199–211. PMID: 7834740.
- Ellefson D.D., diZerega G. S., Espinoza T. et al. Synergistic effects of co-administration of angiotensin 1–7 and Neupogen on hematopoietic recovery in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;5391:15–24. DOI: 10.1007/s00280-003-0710-0. PMID: 14569417.
- Heringer-Walther S., Eckert K., Schumacher S.M. et al. Angiotensin-(1–7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica* 2009;94(6):857–60. DOI: 10.3324/haematol.2008.000034. PMID: 19377080.
- Rieger K.J., Saez-Servent N., Papet M.P. et al. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem J* 1993;296(Pt. 2):373–8. PMID: 8257427.
- Azizi M., Rousseau A., Ezan E. et al. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *J Clin Invest* 1996;97(3):839–44. DOI: 10.1172/JCI118484. PMID: 8609242.
- Lenfant M., Wdziejczak-Bakala J., Guittet E. et al. Inhibitor of hematopoietic pluripotent stem cell proliferation: purification and determination of its structure. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86(3):779–82. PMID: 2915977.
- Coutton C., Guigon M., Bohbot A. et al. Photoprotection of normal human hematopoietic progenitors by the tetrapeptide N-AcSDKP. *Exp Hematol* 1994;22(11):1076–80. PMID: 7925774.

31. Watanabe T., Brown G.S., Kelsey L.S. et al. *In vivo* protective effects of tetrapeptide AcSDKP, with or without granulocyte colony-stimulation factor, on murine progenitor cells after sublethal irradiation. *Exp Hematol* 1996;24(6):713–21. PMID: 8635527.
32. Deeg H.J., Seidel K., Hong D.S. et al. *In vivo* radioprotective effect of AcSDKP on canine myelopoiesis. *Ann Hematol* 1997;74(3):117–22. PMID: 9111424.
33. Fuchs S., Xiao H.D., Cole J.M. et al. Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice. *J Biol Chem* 2004;279(16):15946–53. DOI: 10.1074/jbc.M400149200. PMID: 14757757.
34. Bernstein K.E., Shen X.Z., Gonzalez-Villalobos R.A. et al. Different *in vivo* functions of the two catalytic domains of angiotensin-converting enzyme (ACE). *Curr Opin Pharmacol* 2011;11(2):105–11. DOI: 10.1016/j.coph.2010.11.001. PMID: 21130035.
35. Bonnet D., Lemoine F.M., Pontvert-Delucq S. et al. Direct and reversible inhibitory effect of the tetrapeptide acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro(Seraspenide) on the growth of human CD34+ subpopulations in response to growth factors. *Blood* 1993;82(11):3307–14. PMID: 7694679.
36. Ni L., Feng Y., Wan H. et al. Angiotensin-(1–7) inhibits the migration and invasion of A549 human lung adenocarcinoma cells through inactivation of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Oncol Rep* 2012;27(3):783–90. DOI: 10.3892/or.2011.1554. PMID: 22089256.
37. George A.J., Thomas W.G., Hannan R.D. The renin angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer* 2010;10(11):745–59. DOI: 10.1038/nrc2945. PMID: 20966920.
38. Yasumatsu R., Nakashima T., Masuda M. et al. Effects of the angiotensin-I converting enzyme inhibitor perindopril on tumor growth and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130(10):567–73. DOI: 10.1007/s00432-004-0582-7. PMID: 15449186.
39. Kosaka T., Miyajima A., Takayama E. et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate* 2007;67(1):41–9. DOI: 10.1002/pros.20486. PMID: 17044086.
40. Tamarat R., Silvestre J.S., Kubis N. et al. Endothelial nitric oxide synthase lies downstream from angiotensin II-induced angiogenesis in ischemic hindlimb. *Hypertension* 2002;39(3):830–5. PMID: 11897773.
41. Dolley-Hitze T., Jouan F., Martin B. et al. Angiotensin-2 receptors (AT1-R and AT2-R), new prognostic factors for renal clear-cell carcinoma? *Br J Cancer* 2010;103(11):1698–705. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605866. PMID: 21102591.
42. Ager E.I., Neo J., Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis* 2008;29(9):1675–84. DOI: 10.1093/carcin/bgn171. PMID: 18632755.
43. Паровичникова Е.Н., Ходунова Е.Е., Савченко В.Г. и др. Маркеры апоптоза в CD34-позитивных клетках при острых лейкозах. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2013;6(4):373–8. [Parovichnikova E.N., Khodunova E.E., Savchenko V.G. et al. Apoptotic markers in CD34-positive cells in acute leukemias. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika* = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical Practice 2013;6(4):373–8. (In Russ.)].
44. Albayrak M., Celebi H., Albayrak A. et al. Elevated serum angiotensin converting enzyme levels as a reflection of bone marrow renin-angiotensin system activation in multiple myeloma. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13(2):259–64. DOI: 10.1177/1470320312437070. PMID: 22345095.
45. Savary K., Michaud A., Favier J. et al. Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo. *Blood* 2005;105(1):103–10. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1570. PMID: 15367438.

Значение определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* методом полимеразной цепной реакции у детей с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников с наличием транслокации *t(12;21)(p13;q22)*

Г.А. Цаур¹⁻⁴, Т.О. Ригер^{1,2}, А.М. Попов⁵, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Л.В. Вахонина^{1,2}, А.А. Власова¹,
Ю.В. Ольшанская⁵, А.Н. Казакова⁵, О.В. Стренева^{1,2}, О.В. Макарова¹, С.В. Цвиренко^{1,4},
Л.И. Савельев^{1,2,4}, О.Р. Аракаев^{1,2}, Л.Г. Фечина^{1,2}

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

²ГАОУЗ Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий»; Россия, 620026 Екатеринбург, ул. Карла Маркса, 22, корп. А;

³ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН»;
Россия, 620049 Екатеринбург, ул. Первомайская, 106;

⁴ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Россия, 620030 Екатеринбург, ул. Репина, 3;

⁵ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контакты: Григорий Анатольевич Цаур tsaur@mail.ru

Введение. Транслокация *t(12;21)(p13;q22)* является одной из самых частых структурных генетических аномалий, выявляемых у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Ее невозможно обнаружить при стандартном цитогенетическом исследовании, поэтому для ее диагностики используют обратнo-транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) или флуоресцентную гибридизацию *in situ*.

Целью исследования являлась оценка прогностического значения качественного и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ).

Материалы и методы. У 34 из 166 (20,5 %) обследованных пациентов химерный транскрипт *ETV6-RUNX1* был выявлен методами обратнo-транскриптазной и количественной ПЦР в режиме реального времени. Качественное выявление *ETV6-RUNX1* на 36-й и 85-й дни терапии приводило к статистически достоверно более низким показателям выживаемости, в то время как результаты качественного определения *ETV6-RUNX1* на 15-й день лечения не позволили разделить пациентов на прогностически различные группы. Методом анализа характеристических кривых (ROC-анализа, *receiver operator characteristic*) были получены пороговые уровни (ПУ) отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей эффективностью позволяют разделять пациентов с разными исходами терапии.

Результаты. Практически применимые ПУ (приближенные к 10-кратной шкале) составили 500,0; 1,0; 0,1 и 0,01 % для 0, 15, 36 и 85-го дней соответственно. Бессобытийная выживаемость и кумулятивная частота развития рецидива для пациентов со значениями, равными или превышающими ПУ, были достоверно хуже. Кроме того, отношение *ETV6-RUNX1/ABL1* $\geq 500,0$ % на момент диагностики сопровождалось замедленным клиренсом бластных клеток. Также была показана хорошая качественная (84,8 %) и количественная ($R^2 = 0,953$) сопоставимость результатов выявления минимальной остаточной болезни при исследовании методами проточной цитометрии и ПЦР в режиме реального времени с определением величины *ETV6-RUNX1/ABL1*. Прогностически значимые уровни минимальной остаточной болезни для 2 методов на 15, 36 и 85-й дни оказались идентичными.

Заключение. Нами показано, что качественное и количественное определение химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* методом ПЦР на разных этапах терапии ВП-ОЛЛ имеет важное прогностическое значение. На основании этого нами предложены подходы к стандартизации количественного определения *ETV6-RUNX1/ABL1* в рамках многоцентровой кооперативной клинической группы «Москва — Берлин».

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, дети, минимальная остаточная болезнь, транслокация *t(12;21)(p13;q22)*, химерный транскрипт *ETV6-RUNX1*

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-4-57-70

Significance of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcript detection in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with translocation *t(12;21)(p13;q22)*

G.A. Tsauro¹⁻⁴, T.O. Riger^{1,2}, A.M. Popov⁵, T.Yu. Verzhbitskaya^{1,2}, L.V. Vakhonina^{1,2}, A.A. Vlasova¹, Yu.V. Olshanskaya⁵,
A.N. Kazakova⁵, O.V. Strenева^{1,2}, O.V. Makarova¹, S.V. Tsvirenko^{1,4}, L.I. Savelyev^{1,2,4}, O.R. Arakayev^{1,2}, L.G. Fechina^{1,2}

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

²Center for Specialized Types of Medical Care "Institute of Medical Cell Technologies"; 22A Karla Marksa St., Ekaterinburg 620026, Russia;

³Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences; 106 Pervomayskaya St., Ekaterinburg 620049, Russia;

⁴Ural State Medical University, Ministry of Health of Russia; 3 Repina St., Ekaterinburg 620030, Russia;

⁵Dmitriy Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; 1 Samory Mashela Sr., Moscow 117997, Russia

Introduction. Translocation $t(12;21)(p13;q22)$ is one of the most common structural genetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). It cannot be detected by conventional G-banding, so a reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) or fluorescent *in situ* hybridization are used for this purpose.

The aim of the study was to evaluate the prognostic significance of qualitative and quantitative detection of ETV6-RUNX1 fusion gene transcript at various time points in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) patients.

Materials and methods. ETV6-RUNX1 fusion gene transcript was revealed by both reverse-transcriptase PCR and quantitative real-time PCR (RQ-PCR) in 34 out of 166 (20.5 %) children with BCP-ALL. Qualitative ETV6-RUNX1-positivity at days 36 and 85 led to unfavorable outcome (lower event-free survival — EFS and higher cumulative incidence of relapse — CIR). While ETV6-RUNX1 status at day 15 did not allow to divide patients with different outcomes. By ROC curve analysis we determined threshold levels (TL) for ETV6-RUNX1/ABL1 ratio at days 0, 15, 36 and 85. Afterwards we adjusted obtained results to 10-fold scale.

Results. So practically applicable TL were as follows 500.0 %, 1 %, 0.1 % и 0.01 % for days 0, 15, 36 and 85, respectively. EFS and CIR were both worse in patients with ETV6-RUNX1/ABL1 ratio equal or above defined TL. Moreover, initial ratio ≥ 500.0 % corresponded to delayed blast clearance at days 15 and 36. We showed good qualitative (84.8 %) and quantitative ($R^2 = 0.953$) concordance between ETV6-RUNX1/ABL1 ratio and MRD data obtained by flow cytometry at days 15, 36, 85. Of note, defined TL for ETV6-RUNX1/ABL1 at days 15, 36, 85 were equal to prognostically important levels for flow cytometry MRD.

Conclusion. Thus, qualitative detection and quantitative value of ETV6-RUNX1 fusion gene transcript showed prognostic significance in the course of treatment in children with BCP-ALL. Based on these results we propose standardization approaches for Moscow — Berlin ALL study group.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, children, minimal residual disease, translocation $t(12;21)(p13;q22)$, ETV6-RUNX1 fusion gene transcript

Введение

Транслокация $t(12;21)(p13;q22)$, ведущая к образованию химерного гена *ETV6-RUNX1* (ранее известно как *TEL-AML1*) [1–3], является одной из самых частых структурных генетических аномалий, выявляемых у детей с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) [4–6]. Данная транслокация не может быть обнаружена при стандартном цитогенетическом исследовании, поэтому для этих целей используется обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) [3, 7, 8] или флуоресцентная гибридизация *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) [9]. Считается, что при проведении современной интенсивной полихимиотерапии прогноз пациентов с $t(12;21)(p13;q22)$ благоприятный [5, 6, 10–13]. По мнению ряда авторов, улучшение результатов терапии стало возможным также благодаря стратификации пациентов на основании результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) [12, 14]. Чаще всего для этих целей используют данные, полученные в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с выявлением индивидуальных перестроек генов *Ig* и/или *TCR* [15] или при проведении многоцветной проточной цитометрии [12, 16]. При этом имеются только единичные работы, в которых оценивалось прогностическое значение определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*, выявляемого методом ПЦР-РВ на разных этапах лечения, включая инициальную диагностику [17]

и контроль МОБ [13, 18–23], что и послужило целью публикации данного исследования. В то же время представленные в нашей работе данные являются лишь частью проспективного многоцентрового исследования ALL-MB-2008 [24], поэтому относиться к полученным результатам надо с определенной долей осторожности.

Цель исследования — оценить значение качественного и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ), получающих лечение по протоколу ALL-MB-2008.

Материалы и методы

В данное моноцентровое исследование были включены 166 пациентов с ВП-ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-MB-2008 в отделении детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург) с апреля 2008 г. по октябрь 2014 г. В группе исследования было 78 (46,2 %) девочек и 91 (53,8 %) мальчик в возрасте от 1,3 года до 16 лет (медиана возраста 3,15 года). Медиана времени наблюдения составила 5,2 года. Исходя из критериев стратификации протокола ALL-MB-2008 [24] в группу стандартного риска были включены 76 (45,7 %) больных, в группу промежуточного риска — 77 (46,4 %), в группу высокого риска — 13 (7,8 %).

Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании стандартных морфологических показателей [25] и данных

иммунофенотипирования согласно критериям классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL) [26, 27]. При цитогенетическом исследовании применяли краткосрочное культивирование клеток в течение 24 ч. Дифференциальную окраску хромосом на G-полосы проводили красителем Гимза после предварительной обработки препаратов трипсином. В большинстве случаев анализировали не менее 11 метафазных пластинок. Анализ хромосом выполняли в соответствии с международной номенклатурой хромосом человека, принятой на момент выполнения стандартного цитогенетического исследования [28–30]. В ходе данной работы все кариотипы были повторно оценены с учетом рекомендаций International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2016) [31]. У 3 (1,8 %) детей с ОЛЛ диагностирована болезнь Дауна. 22 пациентам дополнительно проведено исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* с использованием зондов Vysis LSI ETV6(TEL)/RUNX1 (AML1) ES Dual Color Translocation Probe (Abbott Molecular, США) ($n = 10$) и XL t(12;21) ETV6/RUNX1 (Metasystems, Германия) ($n = 12$).

Наличие МОБ определяли методом проточной цитометрии по методике, описанной ранее [16, 32–34], с выделением групп риска на основании данных оценки на 15, 36 и 85-й дни (а для группы высокого риска — после 1-го блока интенсификации) [16]. Оценка МОБ на 15-й день выполнена 163 пациентам, на 36-й день — 166, а на 85-й день — 161.

При определении химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* лейкоциты и бластные клетки выделяли из костного мозга путем лизиса в 0,84 % растворе хлорида аммония, после чего проводили подсчет ядросодержащих клеток на гематологическом анализаторе KX-21 (Sysmex, Япония). В работу брали 5×10^6 ядросодержащих клеток. Для выделения РНК использовали TRIreagent (Molecular Research Center, США) в количестве 1,0 мл согласно инструкции производителя. Полученную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fischer Scientific, Латвия) согласно инструкции производителя. Качество выделенной РНК исследовали с использованием микроструйных чипов RNA 6000 Nano LabChip (Caliper Technologies, США) на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, Германия). В дальнейшую работу брались образцы с показателем целостности РНК более 4,2, который достаточен для получения достоверных результатов в ходе ПЦР [35]. Концентрацию полученной РНК определяли спектрофотометрически, после чего 1 мкг РНК переводили в комплементарную ДНК в ходе реакции обратной транскрипции, которая проходила при 37 °C в течение 60 мин с использованием реактива MML–V обратной транскриптазы (Promega, Германия) и смеси случайных нонанов (ДНК-синтез, Россия). Гнездную ОТ-ПЦР проводили в объеме 20 мкл в 2 этапа. На 1-м этапе

гнездной ОТ-ПЦР брали комплементарную ДНК в количестве, эквивалентном 100 нг РНК, на 2-м этапе в ПЦР-смесь вносили 1 мкл ПЦР-продукта, полученного на 1-м этапе. Для проведения ПЦР использовали реагент «ДиаТак-полимераза» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) и амплификатор «GeneAmp PCR system 9700 Gold» (Applied Biosystems, Сингапур). Конечная концентрация ионов магния в ПЦР-реакции составляла 3 ммоль/л. Температурные условия ПЦР и нуклеотидные последовательности праймеров для выявления химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* в ходе гнездной ПЦР были взяты из работы J. Harbott и соавт. [36]. Детекцию проводили методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле. Верификацию выявленных ПЦР-продуктов выполняли с помощью прямого секвенирования на генетическом анализаторе «ABI Prism 3130» (Applied Biosystems, Япония) с использованием набора «BigDye Terminator 3.1» (Applied Biosystems, США) и праймеров из 2-го этапа гнездной ОТ-ПЦР. Чувствительность гнездной ОТ-ПЦР, которую оценивали методом лимитирующих разведений клеточной культуры REN, составила 5×10^{-5} . Для исключения ложно-негативных результатов во всех образцах определялось наличие ПЦР-фрагмента транскрипта нормального гена *ABL1* в ходе ОТ-ПЦР, идентичной гнездной ОТ-ПЦР на 1-м этапе.

Пациенты, у которых в ходе гнездной ОТ-ПЦР в момент установления диагноза был выявлен химерный транскрипт *ETV6-RUNX1*, обследованы также методом ПЦР-РВ согласно рекомендациям международного проекта «Европа против рака» [37, 38]. Нуклеотидная последовательность праймеров, флуоресцентных зондов и температурные условия ПЦР-РВ приведены в табл. 1. Чувствительность ПЦР-РВ составила 1×10^{-4} . В качестве позитивного контроля применяли клеточную культуру REN, калибровочных стандартов — плазмиды, несущие фрагменты транскриптов *ETV6-RUNX1* и *ABL1* (оба Qiagen, Франция). Для анализа брались образцы, в которых экспрессия нормального гена *ABL1* превышала 10 тыс. копий [39]. Для количественной оценки величины МОБ на основании данных, полученных в ходе ПЦР-РВ, использовалось отношение количества копий химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и нормального транскрипта *ABL1* в процентах в конкретной точке наблюдения (ТН), включая момент установления диагноза.

Образцы костного мозга были исследованы в момент установления диагноза, а также в ТН, предусмотренных протоколом терапии для оценки морфологического статуса костного мозга: ТН₁ — 15-й день индукционной терапии, ТН₂ — 36-й день индукционной терапии, ТН₃ — 85-й день для пациентов стандартной или промежуточной групп риска или после первого блока интенсификации для пациентов группы высокого риска. При мониторинге МОБ во избежание случайной ошибки все образцы во всех ТН тестировались

Таблица 1. Праймеры, флуоресцентные зонды и условия проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления и количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*
Table 1. Primers, fluorescent probes and PCR conditions for qualitative and quantitative detection of *ETV6-RUNX1* fusion gene transcripts

Тип ПЦР Type of PCR	Исследуемый транскрипт Detected fusion gene transcript	Прямой праймер Forward primer	Обратный праймер Reverse primer	Флуоресцентный зонд Fluorescent probe
Гнездная обратнотранскриптазная ПЦР: Nested reverse-transcriptase PCR: 1-й этап 1 st phase	<i>ETV6-RUNX1</i>	agccccatcatgcaccctctgatcc	gtggtcggccagcacctccacc	—
		94 °C — 2 мин, 35 циклов: 94 °C 15 с — 64 °C 45 с — 72 °C 45 с, 72 °C — 6 мин 94 °C — 2 min, 35 cycles: 94 °C 15 sec — 64 °C 45 sec — 72 °C 45 sec, 72 °C — 6 min		
2-й этап 2 nd phase	<i>ETV6-RUNX1</i>	gcagaattccactccgtggatttcaa acagtcc	aacgcctcgcctcatcttgccctgggctc	—
		94 °C — 2 мин, 25 циклов: 94 °C 15 с — 60 °C 45 с — 72 °C 45 с, 72 °C — 6 мин 94 °C — 2 min, 25 cycles: 94 °C 15 sec — 60 °C 45 sec — 72 °C 45 sec, 72 °C — 6 min		
Одностадийная ПЦР One-step PCR	<i>ABL1</i>	cggccagtagcatctgactttg	ccttgccatttttggtttgg	—
		94 °C — 2 мин, 35 циклов: 94 °C 15 с — 64 °C 45 с — 72 °C 45 с, 72 °C — 6 мин 94 °C — 2 min, 35 cycles: 94 °C 15 sec — 64 °C 45 sec — 72 °C 45 sec, 72 °C — 6 min		
ПЦР в режиме реального времени Real-time PCR	<i>ETV6-RUNX1</i>	ctctgtctccccgcctgaa	cggctcgtgctggcat	HEX-tcccaatgggcatg gcgtgc-BHQ1
	<i>ABL1</i>	agctccgggtcttaggctat	tagttgcttgggaccagcc	FAM-ccatttttg gtttggcttcacaccatt-BHQ1
		95 °C — 15 мин, 50 циклов: 95 °C 15 с — 60 °C 60 с 95 °C — 15 min, 50 cycles: 95 °C 15 sec — 60 °C 60 sec		

2 методами — гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ. МОБ-негативными считали образцы, в которых химерный транскрипт не был обнаружен в ходе как ОТ-ПЦР, так и ПЦР-РВ.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение XLSTAT 2016. При сравнении по качественным признакам использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса, а при сопоставлении по количественным признакам — критерий Манна-Уитни. Для выявления пороговых уровней (ПУ) отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей диагностической эффективностью позволяют разделять образцы пациентов с различными исходами терапии, был использован метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [40, 41]. Для удобства практического применения полученные ПУ приводили к ближайшим значениям, кратным 10 %. Результаты терапии оценивали по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ), построенным по методу Каплана-Майера [42]. При расчете БСВ под событиями понимали рецидив, смерть вследствие любой причины как первое событие, выход из-под наблюдения, развитие вторичной опухоли. Стандартную ошибку рассчитывали по формуле Гринвуда. Также оценивали кумулятивную частоту развития рецидива (КЧР) [43]. Для сравнения кривых использовали непараметрические критерии: для БСВ — log-rank (логарифмический ранговый тест), для КЧР — Грея. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Химерный транскрипт *ETV6-RUNX1* выявлен у 34 (20,5 %) из 166 обследованных пациентов с ВП-ОЛЛ при проведении гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ во время установления диагноза. Несмотря на разницу в чувствительности гнездной ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ (5×10^{-5} и 1×10^{-4} соответственно), нами не выявлено дискордантных результатов между этими методами ни в момент установления диагноза, ни при мониторинге МОБ. При сравнении инициальных характеристик пациентов и показателей ответа на терапию на 8, 15 и 36-й дни терапии не зафиксировано статистически достоверной разницы между пациентами с наличием t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* и без нее (табл. 2).

В ТН₁ (на 15-й день терапии) из 33 обследованных 9 (27,3 %) пациентов с наличием химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* достигли МОБ-негативности. К окончанию индукционной терапии (в ТН₂ — на 36-й день) уже 22 (64,7 %) из 34 пациентов находились в молекулярной ремиссии. В ТН₃ (на 85-й день) доля МОБ-негативных пациентов возросла до 85,3 % (29 из 34 больных). Мы последовательно проанализировали прогностическое значение определения МОБ в качественном формате в 3 последовательных ТН (рис. 1). Результаты определения МОБ в ТН₂ и ТН₃ приводили к разделению пациентов на группы с различным прогнозом, в то время как качественное выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* в ТН₁ не дало статистически достоверных различий.

Таблица 2. Инициальные показатели и ответ на терапию пациентов с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников в зависимости от наличия или отсутствия транслокации t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1

Table 2. Initial parameters and treatment response criteria in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on presence or absence of translocation t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1

Показатель Parameter	Число больных с транслокацией t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1 и без нее, абс. (%) Number of patients with translocation t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1 and without it, abs. (%)		p
	наличие, n = 34 presence, n = 34	отсутствие, n = 132 absence n = 132	
Медиана возраста, годы (диапазон) Median age, years (range)	3 (2–10)	3 (1,1–16,0)	0,443
Мальчики/девочки Boys/girls	18 (52,9) / 16 (47,1)	71 (53,8) / 61 (46,2)	0,917
Группа риска (по протоколу ALL-MB-2008): Risk group (Protocol ALL-MB-2008): стандартная, n = 76 standard, n = 76 промежуточная, n = 77 intermediate, n = 77 высокая, n = 13 high, n = 13	18 (52,9) 15 (44,1) 1 (2,9)	58 (43,9) 62 (47,0) 12 (9,1)	0,447
Инициальный лейкоцитоз более $30 \times 10^9/\text{л}$ Initial WBC count $>30 \times 10^9/\text{л}$	7 (20,6)	32 (24,2)	0,825
Размер селезенки ≥ 4 см ниже реберной дуги Spleen size ≥ 4 sm below coastal edge	10 (29,4)	56 (42,4)	0,236
Выявление бластов в ЦНС (ЦНС2- и ЦНС3-статусы)* Detection of blast cells in the CNS (CNS2- and CNS3-status)*	5 (14,7)	24 (18,2)	0,824
Более 1000 бластов в 1 мкл периферической крови на 8-й день терапии More than 1000 blast cells in 1 microliter of peripheral blood at day 8 of remission induction	1 (2,9)	5 (3,8)	0,780
М3 статус костного мозга на 15-й день терапии M3 status of bone marrow at day 15 of induction remission	1 (2,9)	13 (9,8)	0,344
Отсутствие ремиссии на 36-й день терапии Not achieved remission at the end of induction (day 36)	—	6 (4,5)	0,453
МОБ на 15-й день терапии: Flow-MRD at day 15 of induction remission: <0,1 % 0,1–10 % ≥ 10 %	14 (41,1) 15 (44,1) 3 (8,8)	49 (37,4) 63 (48,1) 19 (14,5)	0,707
МОБ на 36-й день терапии: Flow-MRD at day 36 of treatment: <0,1 % $\geq 0,1$ %	30 (88,2) 4 (11,8)	110 (83,3) 22 (16,7)	0,662
МОБ на 85-й день терапии: Flow-MRD at day 85 of treatment: <0,01 % $\geq 0,01$ %	31 (91,2) 3 (8,8)	116 (90,6) 12 (9,4)	0,815

*Выявление бластов в спинномозговой жидкости после центрифугирования при клеточности менее 10 кл/мкл (статус ЦНС2) и более 10 кл/мкл (статус ЦНС3) и нетравматичной люмбальной пункции. ЦНС – центральная нервная система.

*Identification of blasts cells in the cerebrospinal fluid after centrifugation with cellularity less than 10 cells/ $\mu\text{л}$ (CNS2) and more than 10 cells/ $\mu\text{л}$ (CNS3) and non-traumatic lumbar puncture. CNS – central nervous system.

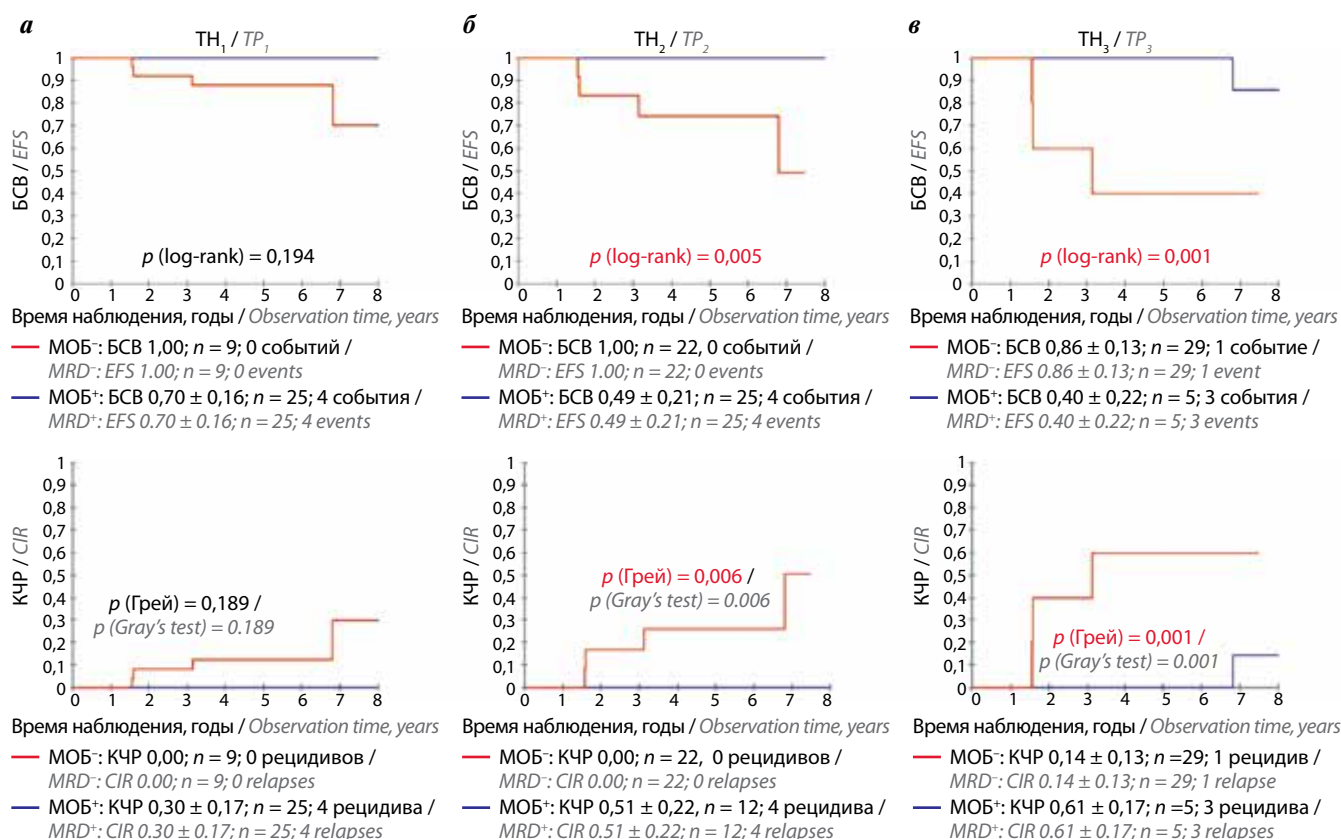


Рис. 1. Прогностическое значение качественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* у *t(12;21)*-позитивных пациентов ($n = 34$) с острым лимфобластным лейкозом из В-линейных предшественников. Для каждой точки наблюдения (TH) определены бессобытийная выживаемость (БСВ) и кумулятивная частота развития рецидивов (КЧР): а, б, в — соответственно TH_1 , TH_2 , TH_3 на 15, 36, 85-й день лечения. МОБ⁺ и МОБ⁻ — минимальная остаточная болезнь с позитивным и негативным статусом соответственно

Fig. 1. Prognostic significance of *ETV6-RUNX1* qualitative detection in *t(12;21)*-positive BCP-ALL patients ($n = 34$). For each time-point (TP) event-free survival (EFS) (upper row) and cumulative incidence of relapse (CIR) (lower row) were calculated: а, б, в, respectively TH_1 , TH_2 , TH_3 on the days 15, 36, 85. MRD⁺ and MRD⁻ — minimal residual disease with positive and negative status respectively

Для выявления ПУ отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, которые с наибольшей эффективностью позволяют разделять пациентов с разными исходами терапии, был выполнен ROC-анализ для $TH_1 - TH_3$, а также во время установления диагноза (TH_0). Он проведен 30 пациентам, у которых имелись данные о количестве копий *ETV6-RUNX1* и *ABL1* в каждой из TH . Практически применимые ПУ составили 500,0; 1,0; 0,1 и 0,01 % для TH_0 , TH_1 , TH_2 и TH_3 соответственно (рис. 2). БСВ и КЧР для групп пациентов, выделенных в соответствии с этими ПУ в $TH_0 - TH_3$, представлены на рис. 3. Для всех 4 TH результаты оказались высокостепенными. Инициальная гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* (*ETV6-RUNX1/ABL1* $\geq 500,0$ %) сопровождалась замедленным клиренсом бластных клеток: прогностически неблагоприятный уровень МОБ сохраняли 4 пациента из 5 в TH_1 , а 3 — в TH_2 и TH_3 . У 3 последних пациентов в дальнейшем развились рецидивы. Среди 8 пациентов с высоким уровнем МОБ в TH_1 у 5 определялась МОБ более 0,1 % в TH_2 . Все 4 рецидива были зафиксированы именно у этих больных.

Данные ПЦР-РВ, полученные в $TH_1 - TH_3$, были сопоставлены с результатами определения МОБ методом проточной цитометрии в качественном и количе-

ственном форматах. Общая качественная сопоставимость результатов в 99 образцах составила 84,8 % (рис. 4). При этом она была несколько ниже в TH_2 (76,5 %) по сравнению с TH_1 и TH_3 (83,9 и 94,1 % соответственно). Интересно отметить, что 11 из 15 дискордантных образцов были негативны по данным ПЦР, но слабо-позитивны по данным проточной цитометрии; медиана МОБ в этих образцах составляла 0,003 % (диапазон 0,001–0,013 %). К настоящему моменту ни у одного из пациентов, у которых были получены дискордантные результаты как в сторону ПЦР-РВ, так и в сторону проточной цитометрии, рецидивов не наблюдалось.

При сравнении количественных результатов определения МОБ разными методами мы попарно сопоставляли процентное соотношение *ETV6-RUNX1/ABL1* с процентом опухолевых клеток, выявленным при проведении проточной цитометрии и рассчитанным от общего количества исследованных ядросодержащих клеток в образце. Исследование было проведено в 95 образцах, 40 из которых были негативны по данным обоих методов. Выявлена высокая степень корреляции между количественными данными по определению МОБ методами ПЦР-РВ и проточной цитометрии ($R^2 = 0,953$, $p < 0,0001$) (рис. 5). Ранее нами было показано, что при

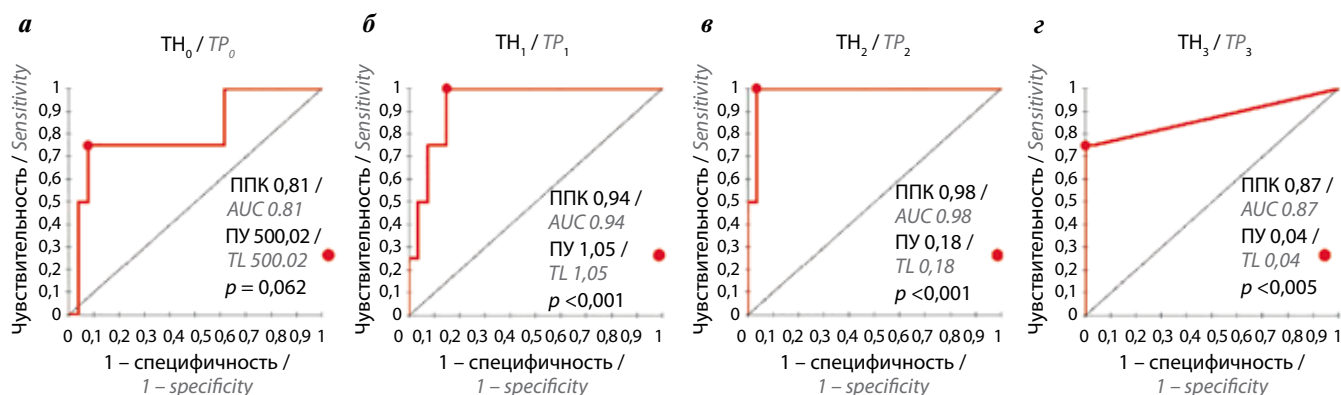


Рис. 2. Результаты ROC-анализа. ППК — площадь под кривой (показатель, отражающий достоверность полученного результата), ● — оптимальные пороговые уровни (ПУ), позволяющие с наибольшей эффективностью разделять пациентов с разными исходами терапии, TH — точка наблюдения

Fig. 2. Results of ROC-curve analysis. AUC — area under curve (represent the reliability of the results), ● — optimal threshold level (TL), allowing the most effective stratification of patients with different therapy outcomes, TP — time point

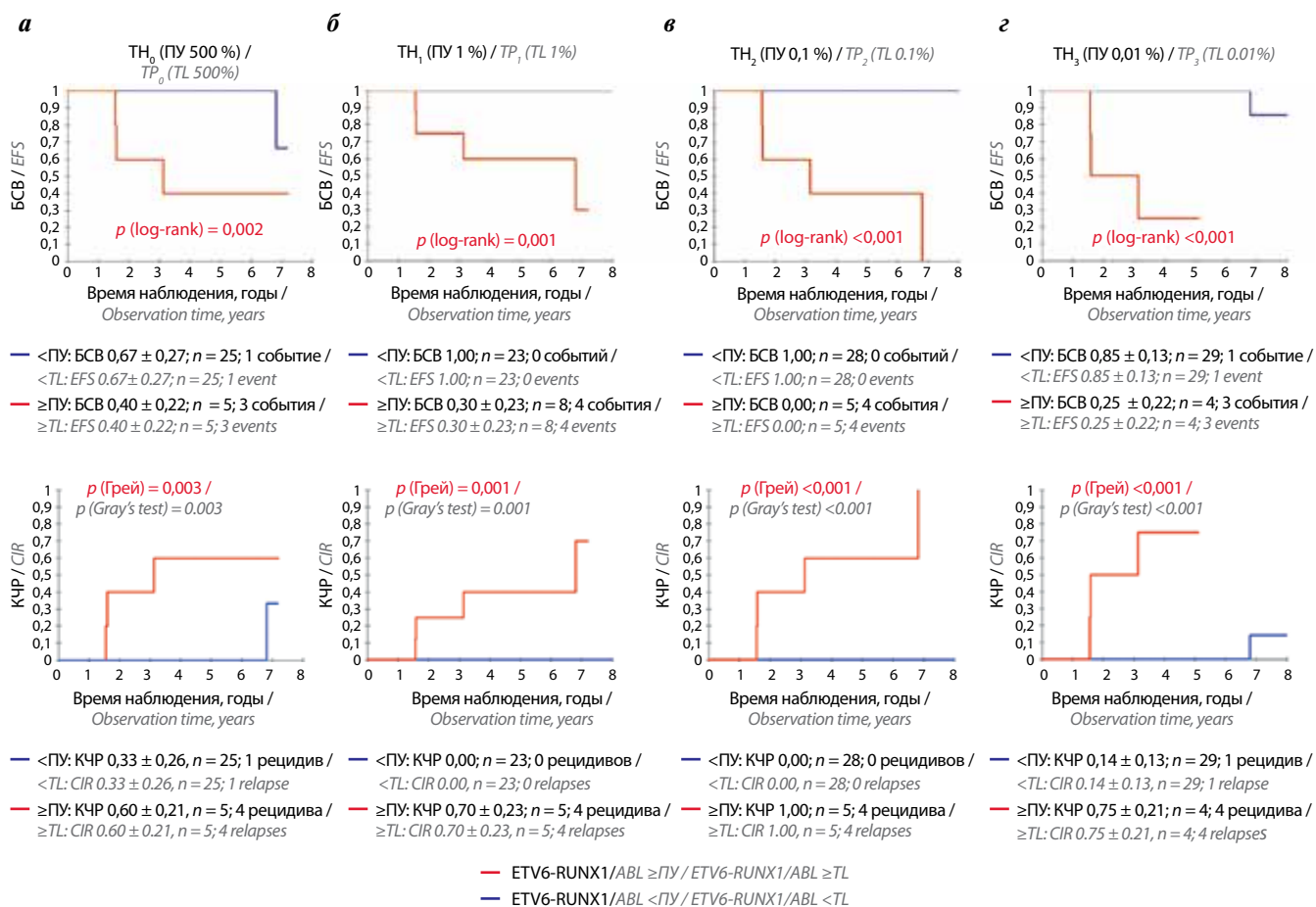


Рис. 3. Прогностическое значение отношения ETV6-RUNX1/ABL1 с учетом выявленных пороговых уровней (ПУ) для времени установления диагноза (точка наблюдения 0 — TH_0) и 3 последовательных точек наблюдения (TH_1 — TH_3), бессобытийная выживаемость (БСВ) и кумулятивная частота развития рецидивов (КЧР) для каждой TH : а, б, в, г — соответственно TH_0 , TH_1 , TH_2 , TH_3

Fig. 3. Prognostic significance of ETV6-RUNX1/ABL1 ratio based on identified threshold levels (TL) for diagnosis time (day 0 — TP_0) and 3 consecutive time-points (TP_1 — TP_3); event-free survival (EFS) (upper row) and cumulative incidence of relapse (CIR) (lower row) for each TP : а, б, в, г — TP_0 , TP_1 , TP_2 , TP_3 respectively

ETV6-RUNX1-позитивных ОЛЛ для результатов определения МОБ проточной цитометрией в TH_1 и TH_2 прогностически значимыми также являются ПУ в 1,0 и 0,1 %

соответственно [16]. В табл. 3 (см. на с. 22) показано, что оба метода при использовании одинаковых ПУ позволяют выделять в целом одинаковые группы пациентов.

OT-ПЦР / RT-PCR Не обнаружено / Обнаружено / Not detected / Detected	а Все образцы (n = 99) / All samples (n = 99)	б ТН ₁ (n = 31) / ТР ₁ (n = 31)	в ТН ₂ (n = 34) / ТР ₂ (n = 34)	г ТН ₃ (n = 34) / ТР ₃ (n = 34)																
	<table><tr><td>37</td><td>4</td></tr><tr><td>11</td><td>47</td></tr></table>	37	4	11	47	<table><tr><td>22</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>4</td></tr></table>	22	2	3	4	<table><tr><td>11</td><td>1</td></tr><tr><td>7</td><td>15</td></tr></table>	11	1	7	15	<table><tr><td>4</td><td>1</td></tr><tr><td>1</td><td>28</td></tr></table>	4	1	1	28
	37	4																		
	11	47																		
	22	2																		
3	4																			
11	1																			
7	15																			
4	1																			
1	28																			
Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected	Обнаружено / Detected	Не обнаружено / Not detected													
Проточная цитометрия / Flow cytometry																				
Сопоставимость 84,8 % / Concordance 84.8%		Сопоставимость 83,9 % / Concordance 83.9%		Сопоставимость 76,5 % / Concordance 76.5%		Сопоставимость 94,1 % / Concordance 94.1%														

Рис. 4. Качественное сопоставление выявления *ETV6-RUNX1* и минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии в 3 последовательных точках наблюдения (ТН): а – все образцы (n = 99), б – ТН₁ на 15-й день лечения, в – ТН₂ на 36-й день лечения, г – ТН₃ на 85-й день лечения. ОТ-ПЦР – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция

Fig. 4. Qualitative concordance of *ETV6-RUNX1* detection and flow-cytometric minimal residual disease in 3 consecutive time-points (TP): а – all samples (n = 99); б – ТР₁ – day 15 of remission induction; в – ТР₂ – day 36 of remission induction; г – ТР₃ – day 85 of treatment. RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction

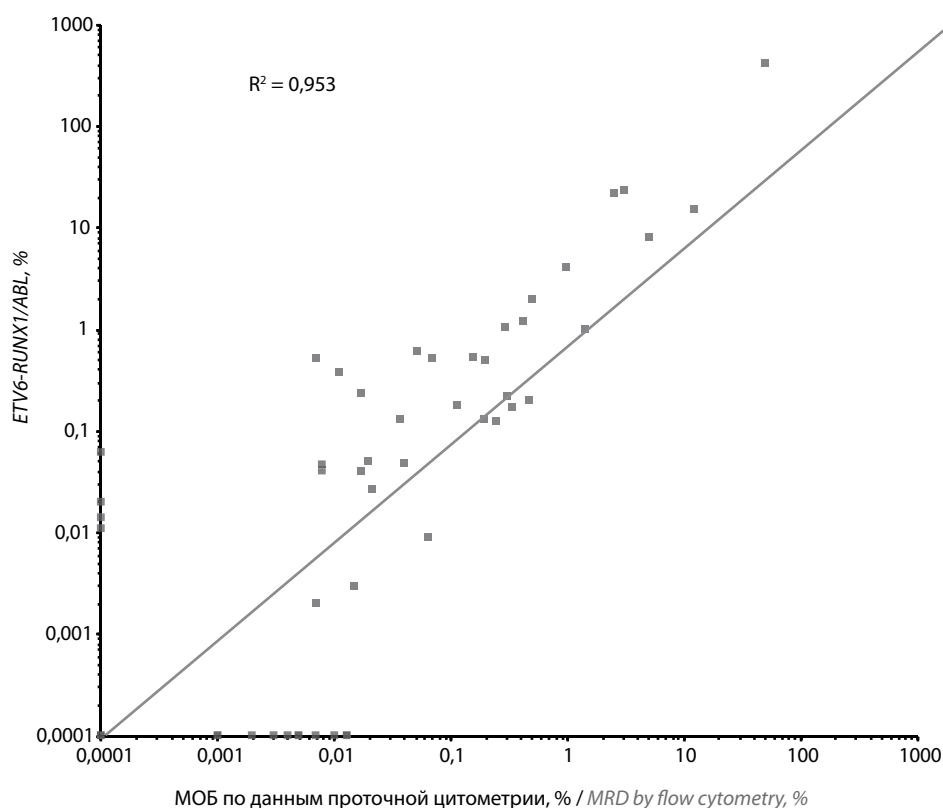


Рис. 5. Количественное сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни (МОБ) методом проточной цитометрии и отношения *ETV6-RUNX1/ABL1*, определенного в ходе полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Fig. 5. Quantitative concordance of minimal residual disease (MRD) by multicolor flow cytometry and *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio revealed by real-time quantitative PCR

Обсуждение

Нами установлено, что инициальная гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* предопределяет неблагоприятный прогноз t(12;21)-позитивного ОЛЛ у детей. В работе W. Stams и соавт. также было показано, что

у пациентов с транслокацией t(12;21)(p13;q22) высокий уровень экспрессии нормального *RUNX1*, химерного *ETV6-RUNX1* и реципрокного *RUNX1-ETV6* транскриптов были ассоциированы с плохим прогнозом. Интересно отметить, что этот эффект не был связан

Таблица 3. Сравнение результатов количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и проточной цитометрии для выделения групп пациентов с различным риском развития рецидива на 15-й и 36-й дни индукционной терапии

Table 3. Comparison of results of real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) and flow cytometry for identification patients' groups with various risk of relapse on days 15 and 36 of remission induction

Значение транскрипта при исследовании методом ПЦР-РВ Transcript value in the RQ-PCR assay	Число больных (количество рецидивов) Number of patients (number of relapses)		
	Проточная цитометрия Flow cytometry		Итого Total
	МОБ <1 % MRD <1.0 %	МОБ ≥1 % MRD ≥1.0 %	
День 15-й Day 15			
ETV6-RUNX1/ABL1 <1 %	20 (0)	1 (0)	21 (0)
ETV6-RUNX1/ABL1 ≥1 %	3 (1)	5 (3)	8 (4)
Итого Total	23 (1)	6 (3)	29 (4)
День 36-й Day 36			
	МОБ <0,1 %	МОБ ≥0,1 %	
ETV6-RUNX1/ABL1 <0,1 %	28 (0)	0 (0)	28 (0)
ETV6-RUNX1/ABL1 ≥0,1 %	2 (1)	3 (3)	5 (4)
Итого Total	30 (1)	3 (3)	33 (4)

с резистентностью к преднизолону, винкристину и L-аспарагиназе — стандартным препаратам для лечения ОЛЛ [17].

Использование качественной ОТ-ПЦР, обнаруживающей наличие химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* для оценки МОБ, началось в середине 1990-х годов, почти сразу же после описания методики ПЦР-диагностики данной генетической аберрации [44, 45]. К. Seeger и соавт. не смогли выявить прогностическую роль различной скорости клиренса *ETV6-RUNX1* у пациентов с первичным ОЛЛ, получавших терапию по протоколу ALL-BFM-95, в отличие от пациентов с рецидивом ОЛЛ, лечившихся по протоколу ALL-REZ BFM-96 [20]. Также отсутствие взаимосвязи между прогнозом и количеством химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на момент окончания индукционной терапии (день 33) по протоколам 58881 и 58951 *Европейской организации по изучению и лечению рака* (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC) было зафиксировано в исследовании S. Drunat и соавт. [19]. Противоположные данные были получены J. Madzo и соавт. на относительно большой группе детей с t (12;21)-позитивным ОЛЛ ($n = 57$), получавших терапию по протоколу ALL-BFM-95: сохранение МОБ на 33-й день было связано с повышенной вероятностью рецидива ОЛЛ [22]. Схожие результаты были описаны J. Lee и соавт.: выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* по окончании индукции ремис-

сии являлось независимым прогностическим фактором, ведущим к снижению бессобытийной и общей выживаемости [13].

В нашем исследовании качественное выявление химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* имело прогностическое значение только при определении на 36-й и 85-й дни терапии, но не на 15-й день. В то же время 9 МОБ-негативных в ТН₁ пациентов безусловно представляют собой группу с наилучшим ответом на терапию и являются возможными кандидатами на снижение интенсивности или продолжительности лечения в будущем. ТН₂ и ТН₃ оказались более предпочтительными для выявления пациентов с высоким риском развития рецидива с помощью качественной ОТ-ПЦР. Тем не менее более точные результаты были получены при исследовании МОБ методом количественной ПЦР-РВ. Определенные с помощью ROC-анализа ПУ позволили очень точно выделить группы пациентов с плохим прогнозом во всех 3 ТН. Однако если в группе высокого риска, сформированной по результатам выявления МОБ в ТН₁, рецидивировали 50 % пациентов, то при определении такой группы по данным ТН₂ рецидивы были зафиксированы уже в 80 % случаев. Кроме того, не было ни одного пациента с высоким уровнем МОБ в ТН₂, кто не был бы отнесен к группе с плохим прогнозом в ТН₁. Таким образом, определение МОБ на момент окончания индукционной терапии позволило максимально уточнить группу высокого

риска, избежав избыточного включения в нее пациентов с медленным клиренсом опухолевых клеток по данным, полученным в ТН₁. В то же время, если для выделения группы детей с плохим прогнозом предпочтительнее использовать результаты определения МОБ в ТН₁, то для выявления пациентов с хорошим ответом на терапию, наоборот, более подходит день 15-й [16]. Эта задача крайне актуальна именно при *ETV6-RUNX1*-позитивном ОЛЛ, так как традиционно наличие данной генетической аберрации считается благоприятным фактором риска и именно в этой группе пациентов в перспективе может оказаться обоснованным снижение интенсивности или продолжительности химиотерапии. Последнее с успехом было предпринято японскими исследователями при лечении по протоколу TCCSG L92–13, в рамках которого БСВ у пациентов с наличием *ETV6-RUNX1*, достигших клинко-гематологической ремиссии, составляла $93,8 \pm 6,1$ % [46].

Сравнительный анализ определения МОБ различными методами выполнялся неоднократно, и чаще всего это делалось для сопоставления данных проточной цитометрии и определения индивидуальных перестроек *Ig/TCR* [47–53]. Сравнение метода выявления химерных транскриптов [23, 54–56] или химерных генов [57] с 1 из 2 упомянутых методов проводится значительно реже. Так, Т. Таубе и соавт. выявили конкордантные результаты количественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и индивидуальных перестроек *Ig/TCR* в 34 из 36 образцов от детей

с рецидивом ОЛЛ [23]. В 2 дискордантных образцах (5,5 %) величина МОБ, определенная по данным индивидуальных перестроек *Ig/TCR*, была значительно выше, чем по результатам мониторинга химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*, несмотря на сопоставимую чувствительность обоих тестов. Схожие результаты получены также Е. Fronkova и соавт. Они выявили высокую корреляцию между этими методами ($R^2 = 0,903$) при прямом количественном сравнении [54]. Также авторами было показано, что только 8 из 117 образцов (6,8 %) различались между собой более чем в 10 раз, причем эта тенденция чаще всего проявлялась тем, что результаты определения *ETV6-RUNX1* были ниже по сравнению с *Ig/TCR*. Это несколько расходится с нашими данными, опубликованными ранее и свидетельствующими о более высокой частоте обнаружения химерных транскриптов в РНК, нежели при подходах, основанных на мониторинге химерных генов в геномной ДНК для выявления МОБ. Однако необходимо отметить, что проведенное нами сравнение касалось перестроек гена *MLL* [58].

Также хорошо сопоставимые результаты получены в работе S. Alm и соавт. при сравнении количества химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и МОБ, определяемой методом проточной цитометрии. Однако в этом исследовании процент опухолевых клеток, выявленный методом проточной цитометрии, сравнивался с частным от деления *ETV6-RUNX1* / нормальный ген в каждой из ТН к этой же величине в момент установления диагноза (ТН₀) [55]. Нам представляется

Таблица 4. Различный подход к определению минимальной остаточной болезни

Table 4. Various approaches for the minimal residual disease detection

Метод Method	Способ Method
Определение клональных перестроек генов <i>Ig/TCR</i> Detection of clonal <i>Ig/TCR</i> rearrangements	Логарифмическое снижение количества ДНК из клеток, имеющих клоноспецифические перестройки генов <i>Ig/TCR</i> , относительно ДНК из исходной опухолевой популяции Log10 decline of DNA isolated from cells, carrying clonal <i>Ig/TCR</i> rearrangements, in relation to DNA from an initial blast cells population
Определение химерных генов Detection of fusion genes in DNA	Логарифмическое снижение количества ДНК из клеток, несущих химерный ген, относительно ДНК из исходной опухолевой популяции Log10 decline of DNA isolated from cells, carrying fusion gene in relation to DNA from an initial blast cells population
Определение химерных транскриптов (вариант 1) Detection of fusion gene transcripts in RNA (option 1)	Отношение нормализованной экспрессии химерного гена в определенной точке наблюдения по отношению к инициально диагностированной Ratio of normalized expression of fusion gene transcript at a precise time-point in relation to initial the normalized expression
Определение химерных транскриптов (вариант 2) Detection of fusion gene transcripts in RNA (option 2)	Отношение экспрессии химерного гена опухолевыми клетками к экспрессии нормального гена всеми клетками костного мозга на момент проведения исследования Ratio of fusion gene transcript expression in blast cells to expression of control gene from all nucleated cells at a precise time-point
Многоцветная проточная цитометрия Multicolor flow cytometry	Процентное содержание опухолевых клеток среди всех ядросодержащих клеток костного мозга на момент проведения исследования Percentage of blast cells out of all nucleated cells at a precise time-point

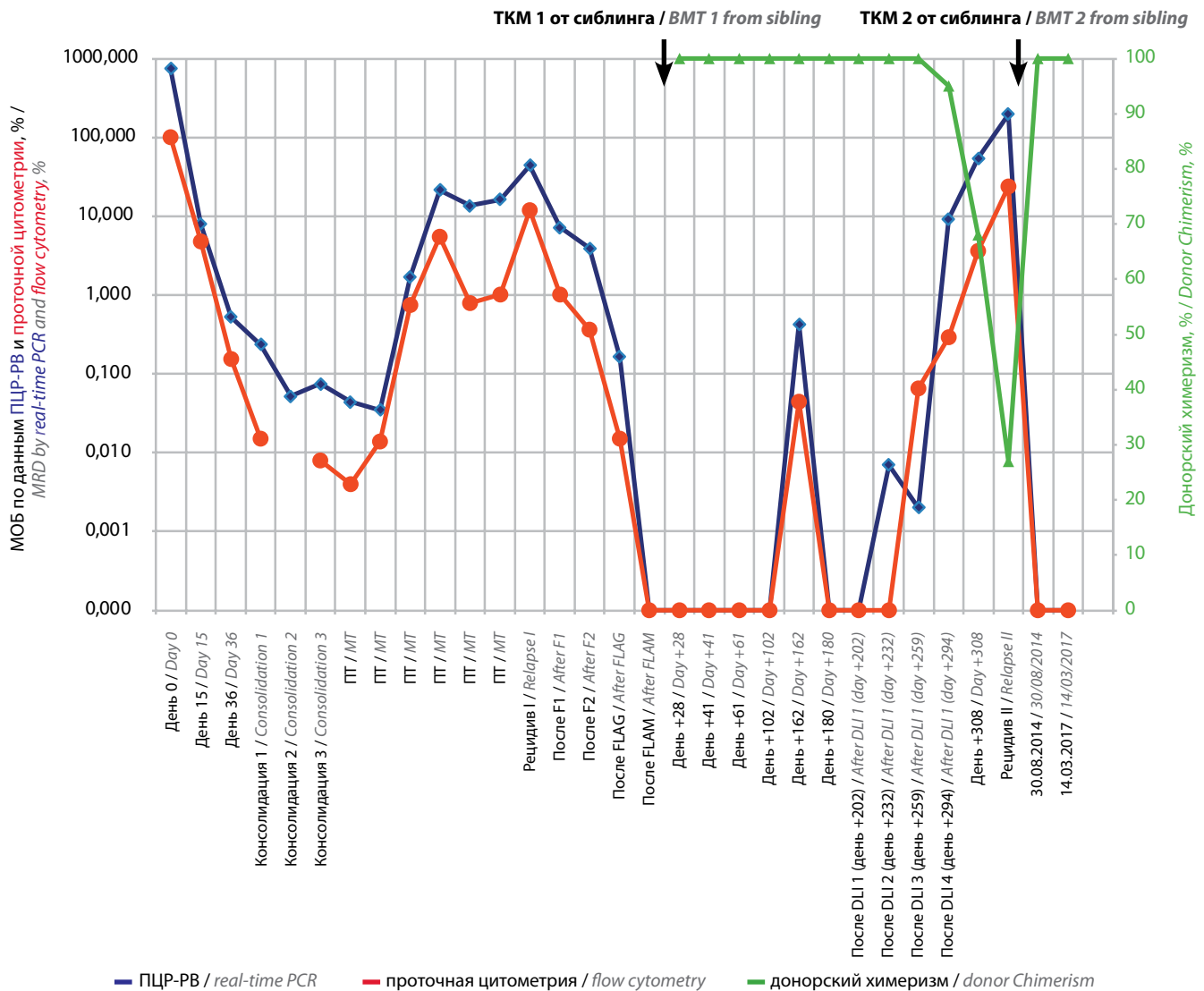


Рис. 6. Пример совместного мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) методами полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с определением значения *ETV6-RUNX1/ABL1* и проточной цитометрии. ТКМ — трансплантация костного мозга, DLI — инфузия донорских лимфоцитов, F1, F2, FLAG, FLAM — химиотерапевтические блоки при лечении рецидива, ПТ — поддерживающая терапия
Fig. 6. Example of combined minimal residual disease (MRD) monitoring by real-time quantitative PCR (RT-PCR) with detection of *ETV6-RUNX1/ABL1* ratio and by multicolor flow cytometry. BMT — bone marrow transplantation, DLI — donor lymphocyte infusion, F1, F2, FLAG, FLAM — blocks of chemotherapy in the treatment of relapse, MT — maintenance therapy

более логичным для сопоставления с данными проточной цитометрии применять в качестве величины МОБ отношение количества транскриптов химерного и нормального генов (табл. 4, вариант 2), так как такой способ расчета величины МОБ наиболее близок к методике ее измерения иммунофенотипированием (см. табл. 4). Более того, полученный нами коэффициент корреляции между данными ПЦР-РВ и проточной цитометрии ($R^2 = 0,953$) практически не отличается от этого же показателя, если бы мы проводили расчет по методике S. Alm и соавт. ($R^2 = 0,964$).

Принципиально важным является и то, что выявленные нами ранее для *ETV6-RUNX1*-позитивного ОЛЛ прогностически значимые уровни цитометрически определяемой МОБ как для TH_1 , так и для TH_2 [16] оказались идентичными тем ПУ, которые были

получены в данном исследовании для количественной ПЦР-РВ. Кроме того, при длительном мониторинге МОБ параллельно 2 методами кинетика элиминации опухолевых клеток оказалась сходной (рис. 6). Полученная нами в данной работе высокая качественная и количественная сопоставимость результатов ПЦР и проточной цитометрии свидетельствует о валидности полученных результатов и минимизирует возможные случайные ошибки при анализе прогностического значения МОБ, определяемой методом ПЦР-РВ как отношение *ETV6-RUNX1/ABL1*. Важно отметить, что методы как проточной цитометрии [16], так и выявления химерных транскриптов [59] являются наиболее воспроизводимыми и относительно недорогими для мониторинга МОБ, а идентичность прогностически значимых ПУ МОБ для обоих методов делает

их наиболее удобными для совместного применения у пациентов с t(12;21).

Сравнение результатов с нашей собственной более ранней работой показало снижение сопоставимости качественного определения химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* и данных проточной цитометрии с 96,3 % [56] до 84,8 %. Возможно, отчасти это связано с более чем 3-кратным увеличением числа исследованных t(12;21)-позитивных образцов.

Однако, несмотря на статистическую значимость полученных результатов, сложно делать однозначные выводы о прогностической роли выявления МОБ по данным, полученным на относительно небольшой когорте пациентов в моноцентровом исследовании. Поэтому крайне актуальным является вопрос проведения стандартизации определения МОБ данным методом в рамках многоцентрового исследования. Наиболее целесообразным представляется обследование всех *ETV6-RUNX1*-позитивных пациентов в нескольких референсных лабораториях, использующих единые протокол анализа, условия проведения обратной транскрипции и ПЦР и контрольные материалы. При этом на 1-м этапе необходимо проведение сравнительного анализа результатов на разведениях клеточной линии REN, затем на образцах пациентов, после чего станет возможным перейти к мониторингу МОБ в многоцентровом формате. Ранее неоднократно было показано, что *ETV6-RUNX1* представляет собой маркер, экспрессия которого остается стабильной не менее 48 ч с момента взятия биологического мате-

риала [20, 22, 23], что существенно облегчает исследование в многоцентровом режиме.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного нами анализа было показано, что определение количества химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* на разных этапах терапии ВП-ОЛЛ имеет важное прогностическое значение. Гиперэкспрессия *ETV6-RUNX1* при установлении диагноза, а также величина МОБ, определяемая как отношение количества копий химерного транскрипта *ETV6-RUNX1* к транскрипту нормального гена *ABL1*, на 15-й и 36-й дни терапии по протоколу ALL-MB-2008 являются важными факторами риска, влияющими на прогноз t(12;21)-позитивного ОЛЛ у детей. Также была показана хорошая качественная и количественная сопоставимость результатов определения МОБ при исследовании методом проточной цитометрии и выявления химерного транскрипта *ETV6-RUNX1*. Прогностически значимые уровни МОБ для 2 методов оказались идентичными. Поскольку включенные в данное исследование пациенты представляют собой часть группы многоцентрового исследования ALL-MB-2008, полученные результаты обязательно должны быть валидированы в проспективном режиме в многоцентровом формате. Дальнейшее обсуждение прогностического значения результатов определения МОБ при t(12;21)-позитивном ОЛЛ у детей может позволить включить данную технологию в систему стратификации этих пациентов на группы риска в будущем.

Благодарности. Авторы выражают благодарность всем врачам и медицинским сестрам отделения детской онкологии и гематологии Областной детской клинической больницы № 1 (Екатеринбург).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Romana S.P., Le Coniat M., Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:186–91. PMID: 7515661.
2. Golub T., Barker G., Bohlander S. et al. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(11):4917–21. PMID: 7761424.
3. Romana S.P., Mauchauffe M., Le Coniat M. et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995;85(12):3662–70. PMID: 7780150.
4. Liang D., Shih L., Yang C. et al. Frequencies of ETV6-RUNX1 fusion and hyperdiploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia are lower in Far East than West. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55(3):430–3. DOI: 10.1002/pbc.22628. PMID: 20658612.
5. Moricke A., Zimmermann M., Reiter A. et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia* 2010;24(2):265–84. DOI: 10.1038/leu.2009.257. PMID: 20010625.
6. Moorman A., Ensor H., Richards S. et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol* 2010;11(5):429–38. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70066–8. PMID: 20409752.
7. Shurtleff S., Buijs A., Behm F. et al. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* 1995;9(12):1985–9. PMID: 8609706.
8. Borkhardt A., Cazzaniga G., Viehmann S. et al. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood* 1997;90(2):571–7. PMID: 9226156.
9. Kobayashi H., Rowley J. Identification of cytogenetically undetected 12p13 translocations and associated deletions with fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;12(1):66–9. PMID: 7534114.
10. Loh M., Goldwasser M., Silverman L. et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber

- Cancer Institute Consortium Protocol 95–01. *Blood* 2006;107(11):4508–13. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3451. PMID: 16493009.
11. Forestier E., Heyman M., Andersen M.-K. et al. Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: frequent late relapses but good overall survival. *Br J Haematol* 2008;140(6):665–72. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2008.06980.x. PMID: 18241254.
12. Bhojwani D., Pei D., Sandlund J. et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia* 2012;26(2):265–70. DOI: 10.1038/leu.2011.227. PMID: 21869842.
13. Lee J., Kim S., Jang P. et al. Outcome and prognostic factors for ETV6/RUNX1 positive pediatric acute lymphoblastic leukemia treated at a single institution in Korea. *Cancer Res Treat* 2017;49(2):446–53. DOI: 10.4143/crt.2016.211. PMID: 27506214.
14. Pui C.-H., Pei D., Raimondi S. et al. Clinical impact of minimal residual disease in children with different subtypes of acute lymphoblastic leukemia treated with Response-Adapted therapy. *Leukemia* 2017;31(2):333–9. DOI: 10.1038/leu.2016.234. PMID: 27560110.
15. Conter V., Bartram C., Valsecchi M.-G. et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* 2010;115(16):3206–14. DOI: 10.1182/blood-2009-10-248146. PMID: 20154213.
16. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Применение проточной цитометрии для определения минимальной остаточной болезни у детей с острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколам со сниженной интенсивностью. *Онкогематология* 2015;10(4):44–55. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.Yu., Tsaur G.A. et al. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with acute lymphoblastic leukemia treated by regimens with reduced intensity. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2015;10(4):44–55. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2015-10-4-44-55.
17. Stams W., den Boer M., Beverloo B. et al. Expression levels of TEL, AML1, and the fusion products TEL-AML1 and AML1-TEL versus drug sensitivity and clinical outcome in t(12;21)-positive pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11(8):2974–80. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-04–1829. PMID: 15837750.
18. Ballerini P., Landman Parker J., Laurendeau I. et al. Quantitative analysis of TEL/AML1 fusion transcripts by real-time RT-PCR assay in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2000;14(8):1526–8. PMID: 10942253.
19. Drunat S., Olivi M., Brunie G. et al. Quantification of TEL-AML1 transcript for minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;114(2):281–9. PMID: 11529845.
20. Seeger K., Kreuzer K.-A., Lass U. et al. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood all by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res* 2001;61(6):2517–22. PMID: 11289124.
21. Bolufer P., Barragán E., Verdeguez A. et al. Rapid quantitative detection of TEL-AML1 fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labeled probes. *Haematologica* 2002;87(1):23–32. PMID: 11801462.
22. Madzo J., Zuna J., Muziková K. et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer* 2003;97(1):105–13. DOI: 10.1002/cncr.11043. PMID: 12491511.
23. Taube T., Eckert C., Körner G. et al. Real-time quantification of TEL–AML1 fusion transcripts for MRD detection in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Comparison with antigen receptor-based MRD quantification methods. *Leuk Res* 2004;28(7):699–706. DOI: 10.1016/j.leukres.2003.11.006. PMID: 15158091.
24. Литвинов Д.В., Карелин А.Ф., Романова К.И. и др. Лечение острого лимфобластного лейкоза у детей: современные возможности и нерешенные проблемы. *Доктор.ру* 2015;10(11):30–7. [Litvinov D.V., Karelin A.F., Romanova K.I. et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children: current possibilities and unsolved problems. *Doctor.ru* 2015;10(11):30–7. (In Russ.)].
25. Bennett J., Catovsky D., Daniel M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976;33(4):451–8. PMID: 188440.
26. Bene M.C., 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.
27. Béné M.C., Nebe T., Bettelheim P. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 2011;25(4):567–74. DOI: 10.1038/leu.2010.312. PMID: 21252983.
28. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Eds.: L. Shaffer, N. Tommerup. Basel: S. Karger, 2005.
29. ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Eds.: L. Schaffer, M. Slovak, L. Campbell. Basel: S. Karger, 2009.
30. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). Eds.: L. Schaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid. Basel: S. Karger, 2013.
31. ISCN 2016 An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016). Eds.: J. McGowan-Jordan, A. Simons, M. Schmid. Basel: S. Karger, 2016.
32. Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Цаур Г.А. и др. Особенности мониторинга минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах методом проточной цитометрии у детей первого года жизни. *Детская онкология* 2008;2:32–5. [Popov A.M., Verzhbitskaya T.J., Tsaur G.A. et al. Peculiarities of minimal residual disease monitoring by flow cytometry in infants with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Detskaya onkologiya = Pediatric Oncology* 2008;2:32–5. (In Russ.)].
33. Цаур Г.А., Попов А.М., Фечина Л.Г., Румянцев С.А. Методические основы диагностики и мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лейкозах у детей первого года жизни. *Онкогематология* 2016;11(1):62–74. [Tsaur G.A., Popov A.M., Fechina L.G., Rumyantsev S.A. Methodological aspects of diagnostics and minimal residual disease monitoring in infant acute leukemias. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(1):62–74. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-62-74.
34. Попов А.М., Белевцев М.В., Божкова Е.В. и др. Стандартизация определения минимальной остаточной болезни методом проточной цитометрии у детей с В-линейным острым лимфобластным лейкозом. Опыт работы российско-белорусской кооперативной группы. *Онкогематология* 2016;11(4):64–73. [Popov A.M., Belevtsev M.V., Boyakova E.V. et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease monitoring in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Russia–Belarus multicenter group experience. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2016;11(4):64–73. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-64-73.
35. Цаур Г.А., Друй А.Е., Попов А.М. и др. Возможность использования микроструйных биочипов для оценки качества и количества РНК у пациентов с онкологическими и онкогематологическими заболеваниями. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2011;4:107–11. [Tsaur G.A., Druy A.E., Popov A.M. et al. Microfluidic

- biochips for RNA quantity and quality evaluation in patients with oncological disorders. *Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki* = Bulletin of the Ural Medical Academic Research 2011;4:107–11. (In Russ.).
36. Harbott J., Viehmann S., Borkhardt A. et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 1997;90(12):4933–7. PMID: 9389711.
 37. Gabert J., Beillard E., van der Velden V. et al. Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2318–57. DOI: 10.1038/sj.leu.2403135. PMID: 14562125.
 38. Beillard E., Pallisaard N., van der Velden V. et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using “real-time” quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia* 2003;17(12):2474–86. DOI: 10.1038/sj.leu.2403136. PMID: 14562124.
 39. Cross N., White H., Müller M. et al. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2012;26(10):2172–5. DOI: 10.1038/leu.2012.104. PMID: 22504141.
 40. Zweig M., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;31:561–77. PMID: 8472349.
 41. Obuchowski N. ROC analysis. *Am J Roentgenol* 2005;184(2):364–72. DOI: 10.2214/ajr.184.2.01840364. PMID: 15671347.
 42. Kaplan E., Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–81.
 43. Слинин А.С., Быданов О.И., Карачунский А.И. Анализ выживаемости и вероятности возникновения отдельных событий у пациентов с острым лейкозом. *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2016; 15(3):34–9. [Slinin A.S., Bydanov O.I., Karachunskiy A.I. Analysis of survival and possibility of certain events in patients with acute leucosis. *Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii* = Pediatric hematology/oncology and immunopathology 2016;15(3):34–9. (In Russ.)]. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-3-34-39.
 44. Cayuela J.-M., Baruchel A., Orange C. et al. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88(1):302–30. PMID: 8704188.
 45. Satake N., Kobayashi H., Tsunematsu Y. et al. Minimal residual disease with TEL-AML1 fusion transcript in childhood acute lymphoblastic leukaemia with t(12;21). *Br J Haematol* 1997;97(3):607–11. PMID: 9207408.
 46. Kato M., Ishimaru S., Seki M. et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia* 2017;31:580–4. DOI: 10.1038/leu.2016.274. PMID: 27698447.
 47. Neale G., Coustan-Smith E., Pan Q. et al. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999;13(8):1221–6. PMID: 10450750.
 48. Malec M., Björklund E., Söderhäll S. et al. Flow cytometry and allele-specific oligonucleotide PCR are equally effective in detection of minimal residual disease in ALL. *Leukemia* 2001;15(5):716–27. PMID: 11368431.
 49. Neale G., Coustan-Smith E., Stow P. et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18(5):934–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403348. PMID: 15029212.
 50. Malec M., van der Velden V., Björklund E. et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: comparison between RQ-PCR analysis of Ig/TcR rearrangements and multicolor flow cytometry immunophenotyping. *Leukemia* 2004;18(10):1630–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2403444. PMID: 15295608.
 51. Kerst G., Kreyenberg H., Roth C. et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol* 2005; 128(6):774–82. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05401.x. PMID: 15755280.
 52. Robillard N., Cavé H., Méchinaud F. et al. Four-color flow cytometry bypasses limitations of IG/TCR polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in certain subsets of children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2005;90(11):1516–23. PMID: 16266899.
 53. Gaipa G., Cazzaniga G., Valsecchi M.G. et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2012;97(10):1582–93. DOI: 10.3324/haematol.2011.060426. PMID: 22581001.
 54. Fronkova E., Madzo J., Zuna J. et al. TEL/AML1 real-time quantitative reverse transcriptase PCR can complement minimal residual disease assessment in childhood ALL. *Leukemia* 2005;19(7):1296–7. DOI: 10.1038/sj.leu.2403759. PMID: 15858617.
 55. Alm S., Engvall C., Asp J. et al. Minimal residual disease monitoring in childhood B lymphoblastic leukemia with t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1: concordant results using quantitation of fusion transcript and flow cytometry. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(2):121–8. DOI: 10.1111/ijlh.12593. PMID: 28004528.
 56. Попов А.М., Цаур Г.А., Вержбицкая Т.Ю. и др. Сравнение результатов определения минимальной остаточной болезни методами проточной цитометрии и ПЦР химерного транскрипта у детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников. *Гематология и трансфузиология* 2010;55(2):3–9. [Popov A.M., Tsaur G.A., Verzhbitskaya T.Y. et al. Comparison of the results of evaluating the minimum residual disease by flow cytometry and by detecting the chimeric transcript by the polymerase chain reaction in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya* = Hematology and transfusiology 2010;55(2):3–9. (In Russ.)].
 57. Metzler M., Mann G., Monschein U. et al. Minimal residual disease analysis in children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison of Ig/TCR rearrangements and the genomic fusion gene. *Haematologica* 2006;91(5):683–6. PMID: 16627248.
 58. Цаур Г.А., Попов А.М., Плеханова О.М. и др. Транслокация t(1;11)(p32;q23) с образованием химерного гена *MLL-EP35* при острых лейкозах: обзор литературы и описание 6 новых случаев. Подходы к мониторингованию минимальной остаточной болезни. *Онкогематология* 2013;1:17–32. [Tsaur G.A., Popov A.M., Plekhanova O.M. et al. Translocation t(1;11)(p32;q23) with *MLL-EP35* fusion gene formation in acute leukemias: a review and 6 new cases report. Approaches to minimal residual disease monitoring. *Onkogematologiya* = Oncohematology 2013;1:17–32. (In Russ.)].
 59. Цаур Г.А., Попов А.М., Наседкина Т.В. и др. Прогностическое значение минимальной остаточной болезни, определенной путем выявления химерных транскриптов у детей первого года жизни, больных острым лимфобластным лейкозом, получающих терапию по протоколу MLL-Baby. *Гематология и трансфузиология* 2012;57(4):12–22. [Tsaur G.A., Popov A.M., Nasedkina T.V. et al. Prognostic significance of the minimal residual disease evaluated by detection of MLL fusion gene transcripts in infants under 1 year of age with acute lymphoblastic leukemia treated by the MLL-Baby protocol. *Gematologiya i transfuziologiya* = Hematology and transfusiology. 2012;57(4):12–22. (In Russ.)].

Статья поступила: 22.07.2017. Принята в печать: 17.11.2017.

Article received: 22.07.2017. Accepted for publication: 17.11.2017.

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Онкогематология» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

1. Общие правила

- Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным разрешением на публикацию, заверенным печатью учреждения, в котором работает первый в списке автор. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- Название статьи.
- Инициалы и фамилии всех авторов.
- Ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов.
- Полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа.
- Адрес учреждения с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - Фамилия, имя, отчество полностью.
 - Занимаемая должность.
 - Ученая степень, ученое звание.
 - Персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>).
 - Персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp).
 - Контактный телефон.
 - Рабочий адрес с указанием индекса.
 - Адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт — Times New Roman, размер 14, междустрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья — не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев — не более 8 страниц.

Обзор литературы — не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию — 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме — не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- Введение.
- Цели.
- Материалы и методы.
- Результаты.
- Обсуждение.
- Заключение (выводы).
- Конфликт интересов.
- При наличии финансирования исследования — указать его источник (грант и т. д.).
- Благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи.

Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, онкогематология (ОГ)).

9. Список литературы

На следующей странице после текста статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Литература приводится в порядке цитирования. Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на литературные источники в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 20–25 источников, в обзорах литературы — не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты.

Ссылки на тезисы возможны исключительно на зарубежные издания, опубликованные на английском языке.

Ссылки на авторефераты диссертаций, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из Internet, не допускаются.

Ссылки на литературные источники должны быть оформлены следующим образом.

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

Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

10. Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»/ «Authors declare no conflict of interest».

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

Общие положения

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях, см. информацию на сайте.
- Материалы для публикации принимаются по электронному адресу j.roumiantseva@mail.ru с пометкой «Ответственному секретарю. Публикация в ОГ».**

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

