

после экспансии указывает на определяющее влияние условий культивирования, тогда как их пролиферативный потенциал зависит от источника клеток. Сохранение высокого удельного содержания ассоциированных со стромальным подслоем CD34⁺ и колониобразующих гемопоэтических клеток при высоком их общем приросте отличает данный метод экспансии от аналогов, описанных ранее [3, 4, 7]. Высокая жизнеспособность культур как гемопоэтической, так и стромальной составляющей позволяет рекомендовать использовать для трансплантации не только суспензионную, но и ассоциированную со стромой фракцию гемопоэтических клеток после экспансии *ex vivo*. Для трансляции метода в клиническую практику необходимы дальнейшие исследования по репопуляции КМ полученной композицией клеток на модели иммунодефицитных мышей.

Коллектив авторов выражает благодарность за предоставленные для исследований образцы КМ, лейкоцитарного концентрата и пуповинной крови заведующему отделением анестезиологии и реанимации №3 УЗ 9-я городская клиническая больница г. Минска Александру Евгеньевичу Оводку и заведующему родильным отделением ГУ РНПЦ «Мать и дитя» Наталье Георгиевне Литвинович.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

- Aljitiwi O.S. Ex vivo expansion of umbilical cord blood: where are we? *Int. J. Hematol.* 2012; 95(4): 371–9. doi: 10.1007/s12185-012-1053-6.
- Delaney C., Heimfeld S., Brashem-Stein C., Voorhies H., Manger R.L., Bernstein I.D. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat. Med.* 2010; 16(2): 232–6. doi: 10.1038/nm.2080.
- de Lima M., McNiece I., Robinson S.N., Munsell M., Eapen M., Horowitz M., et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(24): 2305–15. doi: 10.1056/NEJMoa1207285.
- Robinson S.N., Ng J., Niu T., Yang H., McMannis J.D., Karandish S., et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 37(4): 359–66.
- Jing D., Fonseca A.V., Alakel N., Fierro F.A., Muller K., Bornhauser M., et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells – modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica.* 2010; 95(4): 542–50. doi: 10.3324/haematol.2009.010736.
- Петёвка Н.В., Гончарова Н.В., Северин И.Н., Космачева С.М., Потапнев М.П. Пролиферация и дифференцировка предшественников миелоидного ростка кроветворения пуповинной крови человека при экспансии in vitro. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2012; 1: 40–8.
- [Petyovka N.V., Goncharova N.V., Severin I.N., Kosmacheva S.M., Potapnev M.P. In vitro expansion and lineage commitment of the human umbilical cord blood myeloid progenitors. *Kletchnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2012; 1: 40–8]. (in Russian)
- Yamaguchi M., Hirayama F., Kanai M., Sato N., Fukazawa K., Yamashita K., et al. Serum-free coculture system for ex vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Exp. Hematol.* 2001; 29(2): 174–82.
- Kosmacheva S.M., Seviaryn I.N., Goncharova N.V., Petyovka N.V., Potapnev M.P. Hepatogenic potential of human bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011; 151(1): 142–9.
- Page K.M., Zhang L., Mendizabal A., Wease S., Carter S., Gentry T., et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2011; 17(9): 1362–74. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.01.011.
- Arber C., Halter J., Stern M., Rovó A., Gratwohl A., Tichelli A. Graft source determines human hematopoietic progenitor distribution pattern within the CD34(+) compartment. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 46(5): 650–8. doi: 10.1038/bmt.2010.193.
- Wilson A., Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(2): 93–106.
- Duggleby R.C., Querol S., Davy R.C., Fry L.J., Gibson D.A., Horton R.B., et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34+ cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion.* 2012; 52(3): 549–59. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03305x.

Поступила 20.10.14

Received 20.10.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015
УДК 616-006.441.04-06:616.419]-07

ДЕТЕКЦИЯ В-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ В КОСТНОМ МОЗГЕ ПРИ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

Гаврилина О.А., Звонков Е.Е., Судариков А.Б., Никулина Е.Е., Сидорова Ю.В., Бидерман Б.В., Ковригина А.М., Троицкая В.В., Кравченко С.К., Габеева Н.Г., Куликов С.М., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Резюме. Поражение костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (В-ККЛ) является одним из факторов, определяющих неблагоприятный прогноз при применении как стандартной, так и различных режимов интенсифицированной терапии. Вовлечение костного мозга устанавливается при гистологическом исследовании трепанобиоптата. Имеются данные, что молекулярное исследование костного мозга при верификации диагноза позволяет выявить до 25% дополнительных случаев вовлечения костного мозга при диффузной В-ККЛ. Представлены результаты исследования В-клеточной клональности в костном мозге у 103 больных диффузной В-ККЛ, пролеченных по различным интенсифицированным программам. У 26 (25%) больных выявлена В-клеточная клональность в костном мозге. Гистологическое исследование трепанобиоптата подтвердило поражение костного мозга лимфомой только у 14 (54%) из 26 больных. При дополнительном иммуногистохимическом исследовании (окраска на CD20) подтверждено еще 6 случаев поражения костного мозга у пациентов, у которых была получена В-клеточная клональность. При выполнении многофакторного анализа только В-клеточная клональность в костном мозге являлась независимым предиктором плохого ответа в исследованной когорте пациентов. При медиане наблюдения 22 мес общая и безрецидивная выживаемость больных в груп-

пах с поражением костного мозга и без поражения, подтвержденные молекулярным исследованием, составили 55 и 88%, 58 и 90% соответственно ($p < 0,05$). Детекция В-клеточной клональности является независимым фактором неблагоприятного прогноза при применении интенсифицированной терапии, в отличие от таких факторов, как МПИ, молекулярный тип диффузной В-ККЛ. Обсуждена возможность включения исследования В-клеточной клональности в костном мозге при первичной верификации диагноза диффузной В-ККЛ.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома; химиотерапия; факторы неблагоприятного прогноза; поражение костного мозга; исследование В-клеточной клональности.

Для цитирования: *Гематология и трансфузиология*. 2015; 60 (2): 26-31.

DETECTION OF BONE MARROW B-CELL CLONALITY IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Gavrilina O.A., Zvonkov E.E., Sudarikov A.B., Nikulina E.E., Sidorova Yu.V., Biderman B.V., Kovrigina A.M., Troitskaya V.V., Kravchenko S.K., Gabeeva N.G., Kulikov S.M., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G.

Hematological Research Center, 125167, Moscow, Russia

Summary. Bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma (B-LCL) is one of the factors determining an unfavorable prognosis in standard and intense therapies. Involvement of the bone marrow is detected by histological studies of trephine biopsy specimens. According to some data, molecular studies of the bone marrow in verification of the diagnosis detect up to 25% additional cases of bone marrow involvement in diffuse B-LCL. Bone marrow B-cell clonality was studied in 103 patients with diffuse B-LCL, treated by different intense protocols. Bone marrow B-cell clonality was detected in 26 (25%) patients. Histological studies of trephine biopsy specimens confirmed the bone marrow involvement in lymphoma in only 14 (54%) of 26 patients. Additional immunohistochemical study (CD20 staining) confirmed 6 more cases with bone marrow involvement in the patients with B-cell clonality. Multifactorial analysis showed that only B-cell clonality in the bone marrow was an independent predictor of a poor response in the studied cohort of patients. Overall and relapse-free survival in the groups with and without bone marrow involvement, confirmed by molecular studies, were 55 and 88%, 58 and 90%, respectively ($p < 0.05$) during a period of 22 months. Detection of B-cell clonality was an independent factor of unfavorable prognosis in intensive care, in contrast to such factors as MPI, molecular type of diffuse B-LCL. Addition of evaluation of bone marrow B-cell clonality to the protocol for primary verification of diffuse B-LCL is discussed.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma; chemotherapy; unfavorable prognostic factors; bone marrow involvement; study of B-cell clonality.

Citation: *Gematologiya i transfuziologiya*. 2015; 60 (2): 26-31. (in Russ)

Определение вовлечения костного мозга при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (В-ККЛ) является необходимым критерием диагностики при первичной верификации диагноза. Поражение костного мозга является одним из факторов, определяющих IV стадию заболевания по классификации Энн Арбор, применяемую для стадирования лимфом с 1971 г. [1]. Стадия заболевания в сочетании с такими критериями, как возраст, сывороточная концентрация лактатдегидрогеназы (ЛДГ), вовлечение экстракраниальных органов, общесоматический статус по шкале ECOG, позволяют определить группу прогноза для пациентов на основе Международного прогностического индекса (МПИ) и таким образом выявить больных, нуждающихся в интенсификации терапии [2]. Кроме того, вовлечение костного мозга без учета других факторов неблагоприятного прогноза является независимым предиктором плохого ответа при стандартной терапии, и общая пятилетняя выживаемость этих больных в зависимости от характера поражения костного мозга составляет 10–35%, [3].

Применение моноклонального антитела к CD20 также не привело к значительному улучшению результатов терапии у больных диффузной В-ККЛ с поражением костного мозга. Общая 5-летняя выживаемость больных, получивших полихимиотерапию (ПХТ) по схеме R-СНОР, в группе больных с поражением костного мозга и без поражения составила соответственно 44,3% и 76,3%, а бессобытийная 5-летняя выживаемость – 40,1% и 67,5% [4]. Интенсификация терапии также не позволила улучшить результаты лечения для больных с поражением костного мозга. К тому же многофакторный анализ показал, что поражение костного мозга является чаще всего единственным независимым фактором неблагоприятного прогноза при данной химиотерапии [4, 5]. По данным исследования ученых из Китая [5], при применении режимов R-DA-EPOCH или R-Hyper-CVAD/MA общая выживаемость и беспрогрессивная выживаемость при медиане наблюдения 14 мес в группе больных с поражением костного мозга составила 36 и 33% соответственно. Терапия по программе mNHL-BFM-90 также не улучшила прогноз при диффузной В-ККЛ с поражением костного мозга, и общая 3-летняя выживаемость этих больных составила 37% [6].

Поражение костного мозга определяется при гистологическом исследовании трепанобиоптата. Частота поражения костного мозга при диффузной В-ККЛ достигает 20–30% [3–6]. Общепринятой методикой является выполнение билатеральной биопсии ости подвздошной кости с целью увеличения

Для корреспонденции:

Гаврилина Ольга Александровна, аспирант, врач-гематолог отделения химиотерапии гемобластозов и депрессии кроветворения ФГБУ "Гематологический научный центр" Минздрава России. Адрес: 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4. Телефон: +7(495) 612-45-92 E-mail: dr.gavrilina@mail.ru

Corresponding author:

Gavrilina Olga, MD, postgraduate (dr.gavrilina@mail.ru).

вероятности попадания в очаг поражения при отсутствии диффузного поражения костного мозга [7]. Уточняющими методами диагностики вовлечения костного мозга являются иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов, проточная цитофлюориметрия, цитогенетическое исследование, молекулярное исследование костного мозга. По данным литературы [8–10], проточная цитофлюориметрия позволяет определить 13–20%, а цитогенетическое исследование – 2–5% случаев вовлечения костного мозга, не подтвержденных морфологическим исследованием. Молекулярное исследование, а именно выявление В-клеточной клональности в костном мозге, позволяет выявить до 25% морфологически негативных случаев [11].

Исследование В-клеточной клональности выполнено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по протоколу BIOMED-2. Протокол был создан ввиду ценности метода для диагностики лимфопролиферативных заболеваний, так как была необходима стандартизация данной методики. В работе участвовали 7 европейских стран, около 47 научных центров и учреждений. С 1998 по 2002 гг. шла активная работа по подбору и синтезу праймеров, их тестированию, весь материал анализировала команда экспертов-патологов. В результате были разработаны эффективные праймеры, протестированы и определены качество и концентрации Taq-полимеразы, создана стандартная программа ПЦР, подобраны оптимальные буферы для проведения реакции, утверждены 2 метода детекции полученных результатов. Итоги более чем 4-летней работы опубликованы в 2003 г. в журнале "Leukemia" как отчет BIOMED-2 Concerted Action [12]. При исследовании В-клеточной клональности в качестве анализируемых мишеней выступают гены тяжелых (*IgH*) и легких (*IgK*, *IgL*) цепей иммуноглобулинов, данные гены перестроены в каждом лимфоците уникальным образом, эта перестройка и является предметом анализа. Данный метод обладает высокой чувствительностью и позволяет обнаружить опухолевые клетки при их концентрации от 1% в образце. Однако могут быть ложноположительные результаты, что встречается при доброкачественных опухолях, инфицированности вирусом цитомегалии, вирусом Эпштейна–Барр, вирусами гепатитов В и С [13].

В настоящее время нет данных о значении обнаружения В-клеточной клональности в костном мозге при диффузной В-ККЛ и других неходжкинских лимфом. Соответственно, остается неясным, как можно интерпретировать обнаружение В-клеточной клональности при негативном морфологическом исследовании трепанобиоптата, и есть ли необходимость в выполнении этого исследования при верификации диагноза диффузной В-ККЛ.

Цель настоящей работы – определить значение детекции В-клеточной клональности в пунктате костного мозга при верификации диагноза диффузной В-ККЛ.

Материалы и методы

С января 2009 г. по май 2014 г. в исследование включены 103 больных (56 мужчин и 47 женщин) в возрасте от

17 до 73 лет (медиана возраста 45 лет) с впервые верифицированным диагнозом диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Всем больным установлен диагноз по данным гистологического и иммуногистохимического исследования биоптата опухоли.

Клинико-морфологические характеристики больных: МПИ, группа низкого риска – 19 больных, низко-среднего – 20 больных, высоко-среднего – 20 больных, высокого риска – 44 больных; с молекулярным типом GCB (из клеток герминального центра) – 40 больных, non-GCB (из клеток негерминального центра) – 43 больных, у 20 больных тип не определен. Поражение более одного экстра nodального органа выявлено у 42 больных, вовлечение костного мозга – у 14 больных. У 82 больных выполнена терапия по программе mNHL-BFM-90, у 10 – по программе R-EPOCH, у 11 – R-DA-EPOCH/R-HMA. Трансплантация аутологичных гемопоэтических клеток крови выполнена 10 больным с поражением костного мозга. У всех больных были выполнены гистологическое исследование трепанобиоптата и исследование В-клеточной клональности в пунктате костного мозга. У 68 больных проведено исследование В-клеточной клональности в биоптате опухоли.

ДНК выделяли из свежей или замороженной ткани (биоптата опухоли или пунктата костного мозга) методом, основанным на растворении ткани в концентрированном аммиаке и последующей нейтрализации ледяной уксусной кислотой и высаливании белков [14]. Концентрацию ДНК определяли на UV-спектрофотометре. Образцы ДНК хранили при температуре –20°C.

Определение В-клеточной клональности проводили на основе анализа перестроек варибельного региона генов тяжелой цепи иммуноглобулина. Для этого использовали систему праймеров BIOMED-2 к фрагментам FR1, FR2, FR3 варибельного региона генов *IgH*, консенсусный праймер к *J*-региону *IgH* был помечен флуоресцентной краской FAM [12]. ПЦР проводили на автоматическом термоциклере DNA Engine ("BioRad, Hercules", США). Реакционная смесь в конечном объеме 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 10 мкл смеси 2X для ПЦР (PCR Master Mix, "Promega", США), 5 пмоль каждого праймера. Условия ПЦР: предварительная денатурация при температуре 95°C (5 мин), 35 циклов ПЦР – 92°C (35 с), 60°C (35 с), 72°C (35 с), окончательная элонгация – 72°C (10 мин). Полученный ПЦР-продукт разводили в 40 раз. Разведенные продукты смешивали с формамидом (Hi-di formamid, "Applied Biosystems", США): 2 мкл продукта, 10 мкл формамида, 0,05 мкл внутреннего стандарта Genescan 500LIZ ("Applied Biosystems", США), после чего денатурировали (95°C – 5 мин, 4°C – 10 мин) и проводили фрагментный анализ на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 ("Applied Biosystems", США). Полученные сырые данные анализировали с помощью программного обеспечения GeneMapper 4.0 («Applied Biosystems», США). Результат фрагментного анализа был виден как набор пиков в области амплификации. Отрицательный (поликлональный) результат определяли при наличии множества пиков ПЦР-продукта. Результат считали положительным (моноклональным) при наличии одного или двух четких доминантных пиков ПЦР-продукта (в случае биаллельной реаранжировки). При этом пики ПЦР-продукта должны были преобладать и превышать поликлональный фон более чем в 3 раза. Если имелось 3 четких пика или более, то резуль-

тат оценивали как олигоклональный. При наличии одного или двух четких пиков, которые превышали поликлональный фон менее чем в 3 раза, результат оценивали как сомнительный моноклональный.

При анализе данных были применены стандартные методы описательной статистики, частотного и событийного анализа. Общую выживаемость рассчитывали для всей группы от даты начала лечения до смерти от любых причин, безрецидивную – для группы больных, достигших ремиссии, от даты ремиссии до рецидива или смерти. В стартовый набор признаков включали следующие факторы: возраст, пол, концентрацию сывороточного ЛДГ, МПИ, молекулярный тип диффузной В-ККЛ, количество экстранодалных очагов поражения, поражение костного мозга морфологически и по данным молекулярного исследования. Обработку данных и аналитические расчеты проводили с помощью статистического пакета SAS v. 9.1.3 [15].

Результаты и обсуждение

В-клеточная клональность в пунктате костного мозга обнаружена у 26 (25%) из 103 больных. У 14 (54%) из 26 больных поражение костного мозга подтверждено гистологическими исследованиями, т.е. у всех больных с морфологически выявленным поражением костного мозга обнаружена клональность в пунктате. У остальных 12 (46%) больных выявлена только клональность в костном мозге. У 65 (96%) из 68 больных, которым выполнено исследование В-клеточной клональности в биоптате опухоли, выявлена моноклональная популяция клеток, а у остальных 3 больных – сомнительная моноклональная. Ложноотрицательных результатов по данным исследования биоптатов опухоли не выявлено.

Клиническая и морфологическая характеристика больных, включенных в исследование

Характеристика	Больные без клональности в костном мозге (n = 77)	Больные с клональностью в костном мозге (n = 26)		p
		морфологически подтверждено (n = 14)	морфологически не подтверждено (n = 12)	
Пол:				
м.	37	11	7	
ж.	40	3	5	
Возраст, годы	17–73	23–72	28–67	
медиана	45	55	60	
Международный прогностический индекс:				
I	17 (22%)	0	2 (17%)	
II	17 (22%)	1 (7%)	4 (33%)	
III	12 (16%)	4 (29%)	4 (33%)	
IV	31 (40%)	9 (64%)	4 (33%)	
Молекулярный тип:	n = 65	n = 6	n = 8	
GCB	35 (54%)	0	1 (12%)	0,001
Non-GCB	30 (46%)	6 (100%)	7 (88%)	0,03
Не определялся	12 (16%)	8 (57%)	4 (33%)	
Экстранодалное поражение более 1	30 (39%)	7 (50%)	5 (42%)	0,5
Ki-67 более 80%	33 (43%)	8 (57%)	7 (58%)	0,2
Моноклональная секреция белков в сыворотке и моче	1 (2%)	5 (36%)	6 (43%)	< 0,0001

Примечание. p – статистическая значимость различий при сравнении групп с клональностью и без клональности в костном мозге.

Проведен анализ клинико-морфологических характеристик больных с выявленной и невыявленной В-клеточной клональностью в пунктате костного мозга (см. таблицу). Группа больных с поражением костного мозга в 93% случаев характеризовалась non-GCB молекулярным типом диффузной В-ККЛ, в 46% – поражением более одного экстранодалного органа, в 58% – высоким индексом пролиферативной активности Ki-67, в 42% – моноклональной секреци-

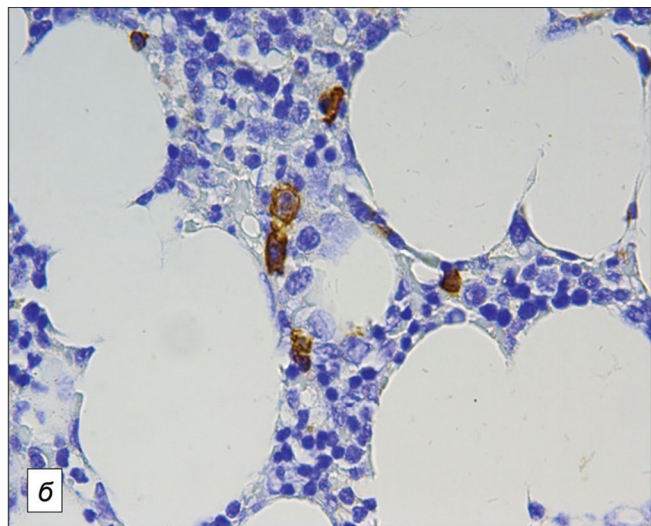
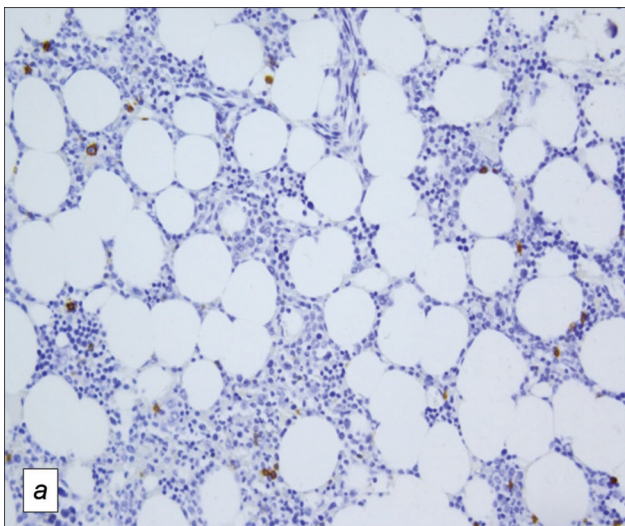


Рис. 1. Экспрессия опухолевыми клетками CD20 у больного с выявленной В-клеточной клональностью в костном мозге без морфологического подтверждения поражения по данным гистологического исследования трепанобиоптата.

a – ув. 200; б – ув. 630.

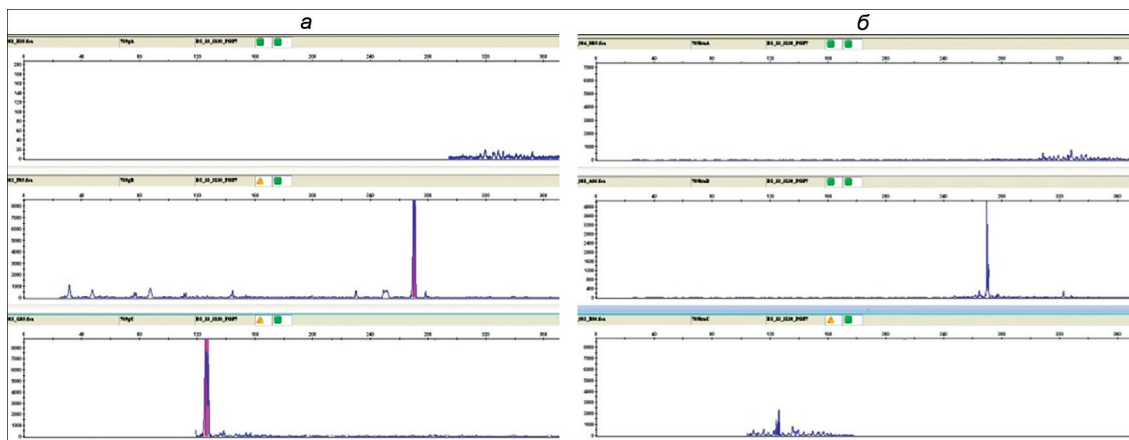


Рис. 2. Выявление моноклональной реаранжировки иммуноглобулинов методом фрагментного анализа. В биоптате опухоли желудка и в пунктате костного мозга у одного пациента выявлены одинаковые моноклональные пики.

a – биоптат опухоли желудка; *б* – пунктат костного мозга.

ей белков в сыворотке крови и моче. В другой группе (без молекулярного поражения костного мозга) моноклональная секреция белков в сыворотке крови и моче выявлена лишь у 1 (2%) больного. Выполнен анализ клинико-морфологических характеристик между группами с выявленной клональностью и без клональности в костном мозге. Были получены статистически значимые различия в молекулярном типе диффузной В-ККЛ: для группы с поражением костного мозга характерен non-GCB-тип ($p = 0,03$) и не характерен GCB-тип ($p = 0,001$). Моноклональная секреция белков в сыворотке и крови является достоверным признаком диффузной В-ККЛ с поражением костного мозга ($p < 0,0001$).

Если поражение костного мозга, выявленное только молекулярным методом, считать критерием, подтверждающим его поражение, то стадия диффузной В-ККЛ могла быть пересмотрена у 7 (7%) из 103 больных. Соответственно в 7% риск по данным МПИ должен был быть пересмотрен.

В 12 случаях, при которых выявлена только В-клеточная клональность в костном мозге, без морфологического подтверждения препараты были

пересмотрены и выполнено иммуногистохимическое исследование с окраской на CD20. По данным иммуногистохимического исследования у 6 (50%) из 12 больных выявлены опухолевые клетки с экспрессией CD20, концентрация которых в препарате не превышала 10%, а в части из этих случаев отмечались лишь единичные опухолевые клетки (рис. 1). У 11 (92%) из этих 12 больных молекулярное исследование выполнено и в биоптате опухоли, и в костном мозге. Подтверждено, что клоны, выявленные в биоптате опухоли и в пунктате костного мозга, были одинаковы (рис. 2).

При анализе всей группы исследованных больных ($n=103$) медиана наблюдения составила 22 мес (4–73 мес). Общая и безрецидивная выживаемость составила 78 и 81% соответственно. По данным мультивариантного анализа при исследовании таких критериев, как возраст, пол, концентрация сывороточной ЛДГ, МПИ, молекулярный тип диффузной В-ККЛ, количество экстранодалных очагов поражения, поражение костного мозга морфологически и по данным молекулярного исследования, только выявление В-клеточной клональности в костном

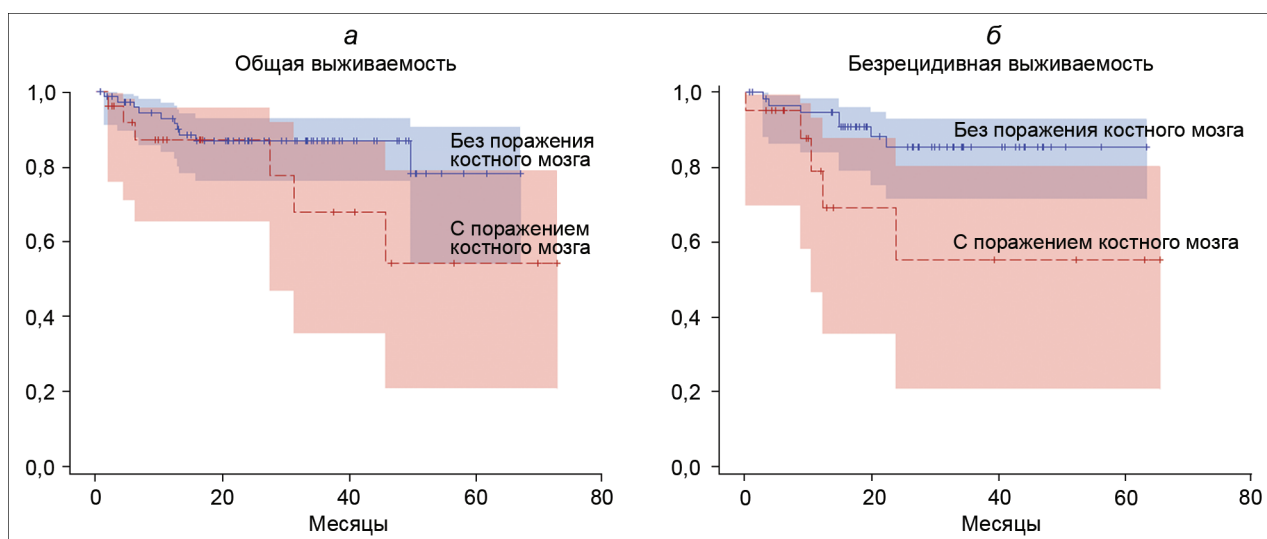


Рис. 3. Общая и безрецидивная выживаемость в группе больных с поражением костного мозга по данным исследования В-клеточной клональности, 55% и 88%, 58% и 90% соответственно ($p < 0,05$).

мозге достоверно предсказывало неблагоприятный прогноз в исследованной когорте больных. Общая и безрецидивная выживаемость больных в группах с поражением костного мозга и без поражения, подтвержденного молекулярным исследованием, составили 55 и 88%, 58 и 90% соответственно ($p < 0,05$) (рис. 3).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что выполнение исследования В-клеточной клональности в костном мозге при первичной верификации диагноза диффузной В-ККЛ может позволить достоверно увеличить количество диагностированных случаев вовлечения костного мозга. Детекция поражения костного мозга необходима с целью определения группы неблагоприятного прогноза даже при выполнении интенсифицированных схем терапии. Были выявлены клинико-морфологические признаки, характерные для диффузной В-ККЛ с поражением костного мозга: non-GCB молекулярная диффузная В-ККЛ и моноклональная секреция белков. Исследование В-клеточной клональности может применяться как метод диагностики с высокой чувствительностью и специфичностью и обсуждаться как критерий, определяющий поражение костного мозга при первичном обследовании.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Smithers D.W. Summary of papers delivered at the Conference on Staging in Hodgkin's Disease (Ann Arbor). *Cancer Res.* 1971; 31(11): 1869–70.
2. Shipp M.A. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has «high-risk» disease? *Blood.* 1994; 83(5): 1165–73.
3. Chung R., Lai R., Wei P., Lee J., Hanson J., Belch A.R., et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood.* 2007; 110(4): 1278–82.
4. Kang B.W., Moon J.H., Chae Y.S., Lee S.J., Kim J.G., Kim Y.K., et al. Clinical outcome of Rituximab-based therapy (RCHOP) in diffuse large B-cell lymphoma patients with bone marrow involvement. *Cancer Res. Treat.* 2013; 45(2): 112–7.
5. Yi S., Liu W., Lyu R., Li Z., Xu Y., Sui W., et al. Dose-intensive immunochemotherapy with or without autologous hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of 29 newly diagnosed young patients with medium/high risk diffuse large B-cell lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2014; 35(6): 546–50.
6. Магомедова А.У., Воробьев А.И. Международный прогностический индекс при диффузной В-крупноклеточной лимфосаркоме. *Терапевтический архив.* 2008; 3; 71–6. [Magomedova A.U., Vorobiev A.I. International prognostic index in diffuse B large cell lymphosarcoma. *Terapevticheskiy arhiv.* 2008; 3; 71–6]. (in Russian)
7. Luoni M., Declich P., De Paoli A., Fava S., Marinoni P., Montalbetti L., et al. Bone marrow biopsy for the staging of non-Hodgkin's lymphoma: bilateral or unilateral trephine biopsy? *Tumori.* 1995; 81(6): 410–3.
8. Gomyo H., Shimoyama M., Minagawa K., Yakushijin K., Urahama N., Okamura A., et al. Morphologic, flow cytometric and cytogenetic evaluation of bone marrow involvement in B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2003; 88(12): 1358–65.
9. Merli M., Arcaini L., Boveri E., Rattotti S., Picone C., Passamonti F., et al. Assessment of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphomas: comparison between histology and flow cytometry. *Eur. J. Haematol.* 2010; 85(5): 405–15.
10. Kim S., Kim H., Kang H., Kim J., Eom H., Kim T., et al. Korean Society of Hematology Lymphoma Working Party. Clinical significance of cytogenetic aberrations in bone marrow of patients with diffuse large B-cell lymphoma: prognostic significance and relevance to histologic involvement. *J. Hematol. Oncol.* 2013; 6:76. doi: 10.1186/1756-8722-6-76.
11. Talaulikar D., Shadbolt B., Dahlstrom J.E., McDonald A. Routine use of ancillary investigations in staging diffuse large B-cell lymphoma improves the International Prognostic Index (IPI). *J. Hematol. Oncol.* 2009; 2: 49. doi: 10.1186/1756-8722-2-49.
12. Van Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M. 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.
13. Мационис А.Э., Повилайте П.Е., Петров А.В. Молекулярно-генетическое исследование клональности В- и Т-лимфоцитов в диагностике неходжкинских лимфом. *Архив патологии.* 2012; 4: 57–62. [Matsionis A.E., Povilaytite P.E., Petrov A.V. Molecular genetic study of clonality of B and T lymphocytes in the diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. *Arkhiv patologii.* 2012; 4: 57–62]. (in Russian)
14. Sidorova Yu.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. 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.
15. SAS Institute Inc. 2004. SAS 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Поступила 08.04.15

Received 08.04.15