

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. ПЕТРОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**ХАРЧЕНКО**

**Евгения Владимировна**

**ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ,  
ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ  
И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
ДИФфуЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ**

14.01.12 – онкология

14.03.02 – патологическая анатомия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, доцент

Семиглазова Татьяна Юрьевна

кандидат медицинских наук

Артемьева Анна Сергеевна

Санкт-Петербург – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	14
1.1 Эпидемиология неходжкинских лимфом.....	14
1.2 Нормальное созревание В-клеток.....	15
1.3 Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома в новой классификации Всемирной организации здравоохранения 2017 года.....	16
1.4 Морфологические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы .....	19
1.4.1 Морфологические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS.....	19
1.4.2 Морфологические особенности В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS .....	21
1.4.3 Морфологические особенности В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 .....	22
1.5 Иммуногистохимические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6.....	23
1.6 Молекулярно-генетические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6.....	27

1.7 Дифференциальная диагностика диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL6 .....	32
1.8 Клинические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы .....	35
1.9 Особенности Double-hit и Double-expressor лимфом и их оптимальное лечение .....	38
<b>Глава 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>42</b>
2.1 Характеристика больных .....	42
2.2 Обследование больных .....	44
2.2.1 Клиническое обследование больных .....	44
2.2.2 Стадирование пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой .....	46
2.2.3 Морфологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследования .....	47
2.3 Схемы лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой .....	54
2.4 Критерии оценки противоопухолевого ответа .....	55
2.5 Статистический анализ .....	57
<b>Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>	<b>59</b>
3.1 Клиническая характеристика пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года) ..	59
3.2 Иммуногистохимическая и молекулярно-генетическая характеристика диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (новая классификация по ВОЗ 2017 года) .....	61
3.3 Оценка выживаемости без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой	

(новая классификация ВОЗ 2017 года) .....	64
3.4 Унивариантный анализ выживаемости без прогрессирования пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года) .....	65
3.5 Мультивариантный анализ выживаемости без прогрессирования пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года).....	86
3.6 Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от коэкспрессии белков с-тус и bcl-2 (новая классификация ВОЗ 2017 года) .....	89
3.7 Сравнительная характеристика пациентов с наличием транслокаций в генах С-МУС, BCL-2 или BCL-6.....	93
<b>Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>101</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>112</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>114</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>115</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>117</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – это самая часто встречающаяся неходжкинская лимфома (НХЛ), на долю которой приходится около 25-50% всех случаев НХЛ [41, 127]. Несмотря на успехи лечения после внедрения в практику моноклонального антитела ритуксимаб, 30-40% больных с ДВККЛ по-прежнему резистентны к проводимому лечению [71]. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома представляет собой гетерогенную группу заболеваний, имеющих общие звенья патогенеза, но при этом различные клинические и иммуногистохимические (ИГХ) особенности, чувствительность к терапии и прогноз [78].

Современная классификация Всемирной организации здравоохранения ВОЗ 2017 года включает более 40 подтипов лимфом, тем самым определяя различные подходы в диагностике, лечении и разработке новых перспективных терапевтических направлений [127]. В новой классификации ВОЗ 2017 года, ДВККЛ без дополнительного уточнения (not otherwise specified – NOS) разделена на различные морфологические подтипы, не имеющие прогностической значимости: центробластный, иммунобластный, анапластический и другие редкие подтипы.

В то же время разделение на новые молекулярные подтипы ДВККЛ NOS в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года (лимфома с фенотипом клеток герминального центра (Germinal B-cell like-GCB) и из клеток с фенотипом активированных В-клеток (activated B-cell-ABC)) не только помогает определить прогноз заболевания, но и позволяет применить персонализированный подход в лечении. В ежедневной клинической практике разделение ДВККЛ NOS на ABC и GCB подтипы посредством анализа профиля экспрессии генов малодоступно,

поэтому для данной цели может быть использован ИГХ Hans-алгоритм. Hans-алгоритм оценивает наличие или отсутствие экспрессии белков CD10, bcl-6, tum-1 и разделяет ДВККЛ NOS на 2 типа: non-GCB подтип (включает в себя «неклассифицируемые» случаи и ABC-подтипы ДВККЛ, имеет худший прогноз заболевания) и GCB-подтип [44]. Согласно имеющимся литературным данным, в 79% случаев результаты использования Hans-алгоритма сопоставимы с профилем экспрессии генов [114].

В 2017 году ВОЗ также впервые выделила крайне редкую группу В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности: лимфома с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности NOS (без перестроек в вышеупомянутых генах). В данную группу вошли случаи лимфом из предыдущей классификации ВОЗ (2008): В-клеточная лимфома, неклассифицируемая, с признаками промежуточными между ДВККЛ и лимфомой Беркитта, а также случаи атипичической лимфомы Беркитта.

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 (альтернативным названием является DOUBLE-HIT (DH) лимфома, а при наличии перестроек во всех трех генах – TRIPLE-HIT (TH) лимфома)) – крайне редкий и агрессивный подтип зрелых В-клеточных лимфом, который с учетом клинических и биологических характеристик должен быть выделен в отдельную нозологию из группы ДВККЛ с помощью анализа флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Данный метод не всегда доступен в условиях современной лаборатории, поэтому нередко исследование ограничивается ИГХ анализом, что является недостаточным для полноценной диагностики.

Агрессивность течения и низкие показатели выживаемости DH и TH лимфом обусловлены транслокациями в вышеупомянутых генах. Ген MYC регулирует апоптоз, пролиферацию, рост, клеточный цикл, миграцию клеток и метаболизм, что определяет особенности клинического течения лимфомы при его дисрегуляции. Онкоген BCL-2 расположен на 18q21 хромосомы. Данный онкоген кодирует белок,

поддерживающий жизнеспособность клеток посредством ингибирования апоптоза. В нормальных лимфоцитах окислительный стресс, нестабильность генома и другие патологические процессы индуцируют экспрессию белков семейства ВНЗ, функцией которых является ингибирование белка bcl-2 и, соответственно, инициация апоптоза [17]. В случае малигнизации клона гиперэкспрессия c-тус, bcl-2 являются причинами прогрессирования лимфомы и резистентности к химиотерапии [24]. Онкоген BCL-6 расположен на 3q27 хромосоме. Белок bcl-6 функционирует как транскрипционный ингибитор и участвует в нескольких клеточных процессах, таких как активация, дифференцировка, клеточный апоптоз. В нормальных В-клетках bcl-6 является ключевым регулятором реакций в герминальном центре и подавляет активность семейства белков p53, c-тус и bcl-2 [18, 51]. В настоящее время недостаточно данных о влиянии моноперестройки в генах MYC или BCL-2 или BCL-6 на прогноз пациентов с ДВККЛ.

Клиническими особенностями ДН и ТН лимфом являются: высокая частота выявления болезни в III-IV стадиях, тяжелое общее состояние больных (ECOG 2-4) в период манифестации болезни, поражение костного мозга, повышение уровня ЛДГ [45, 105].

Кроме того, ДВККЛ NOS может экспрессировать белки c-тус и bcl-2, не имея перестройки в одноименных генах. Данный подтип, называемый Double-expressor (DE) лимфома или ДВККЛ с коэкспрессией c-тус и bcl-2, не был выделен в отдельную нозологическую группу в новой классификации ВОЗ 2017 года, однако, по данным ретроспективных исследований, обладает не только отличающимися ИГХ характеристиками, но и иным клиническим течением заболевания [33]. Коэкспрессия белков c-тус, bcl-2 без транслокации в генах определяет лучший прогноз по сравнению с подгруппой ДН и ТН лимфом, но худший в сравнении с ДВККЛ NOS без экспрессии. В частности, S. Hu с соавт. продемонстрировали, что больные ДВККЛ NOS с коэкспрессией белков c-тус, bcl-2, получившие химиотерапию «R-CHOP» [ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон], имели неполный ответ на лечение, более низкие показатели безрецидивной выживаемости [БРВ] и 5-летней общей

выживаемости [ОВ] в сравнении с больными из группы ДВККЛ NOS без экспрессии [92, 107]. В настоящее время остается не до конца изученным влияние ряда других ИГХ маркеров на прогноз пациентов с ДВККЛ, таких как CD30, CD10, CD5, p53, bcl-6, а также транслокаций только в генах BCL-2 или BCL-6 или MYC (single-hit-SH) лимфома.

Все вышесказанное определяет актуальность данного исследования, направленного на разработку алгоритма четкого разграничения различных подтипов В-клеточных лимфом с использованием иммуногистохимических и молекулярно-генетических маркеров в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года с целью улучшения диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.

### **Степень разработанности темы исследования**

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с 2016 года применяется более интенсивный подход в лечении пациентов с высокоагрессивной В-клеточной лимфомой: полихимиотерапия по схеме «R-EPOCH»; высокодозная химиотерапия с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток в первой линии терапии.

Разделение ДВККЛ на молекулярно-генетические подтипы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года важно не только для точной постановки диагноза, но и для применения индивидуального подхода в лечении. По-прежнему не существует единого стандарта в лечении пациентов с ДВККЛ NOS и коэкспрессией с-тус, bcl-2, также как и лимфом высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2, BCL-6. Очевидно, что данная подгруппа пациентов нуждается в более агрессивном подходе, так как результаты лечения с применением схемы «R-CHOP» остаются неудовлетворительными. Помимо этого, в настоящее время неподдельный интерес вызывает влияние ряда ИГХ маркеров, таких как CD30, CD10, CD5, p53, bcl-6, на прогноз заболевания.

Новая классификация ВОЗ 2017 года насчитывает более 50 подтипов лимфом. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома является наиболее часто встречающимся типом В-клеточных лимфом. С учетом различного клинического течения и ответа на терапию очевидно, что ДВККЛ является крайне разнородной, и современные диагностические инструменты помогают более четко выполнить разделение на подтипы.

Для четкого разделения ДВККЛ на молекулярно-генетические подтипы, согласно требованиям новой классификации ВОЗ 2017 года, необходимо выполнение трудоемких и дорогостоящих диагностических процедур, таких как анализ профиля экспрессии генов и флуоресцентной гибридизации *in situ* [FISH]. Данные диагностические процедуры позволяют выделить высокоагрессивные подтипы В-клеточных (ДВККЛ NOS и коэкспрессией *c-myc*, *bcl-2*, также как и лимфом высокой степени злокачественности с перестройками в генах *MYC*, *BCL2*, *BCL6*), которые, согласно мировым исследованиям, продемонстрировали более низкие показатели БРВ и ОВ в сравнении с пациентами с ДВККЛ без экспрессии и перестроек вышеупомянутых генов. Тем не менее, в условиях большинства лабораторий выполнение молекулярно-генетического анализа не всегда является возможным, в связи с чем существует необходимость создания суррогатной диагностической модели, основанной на более доступном ИГХ анализе.

### **Цель исследования**

Повышение эффективности диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой путем определения клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик заболевания.

### **Задачи исследования**

1. Оценить клинические, иммуногистохимические и молекулярно-генетические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в том числе

с перестройками в генах MYC/BCL-2/BCL-6 и с коэкспрессией белков c-тус и bcl-2).

2. Оценить прогностическое значение клинических, иммуногистохимических, молекулярно-генетических особенностей у больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.
3. Оценить выживаемость без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS с коэкспрессией белков c-тус, bcl-2 в сравнении с общей популяцией больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS.
4. Оптимизировать диагностический алгоритм для диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в том числе с перестройками в генах MYC/BCL-2/BCL-6) при отсутствии возможности рутинного использования метода флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.

### **Научная новизна исследования**

1. С учетом новой классификации ВОЗ 2017 года определена прогностическая значимость клинических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (в т.ч. наличие или отсутствие В-симптомов, стадии заболевания, первично-рефрактерного течения, экстранодального поражения).
2. Определена ранее не исследованная частота встречаемости ряда ИГХ (c-тус, bcl-2, bcl-6, p53, CD30, CD5, входящих в Hans-алгоритм) и, молекулярно-генетических маркеров (транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.
3. В рамках новой классификации ВОЗ 2017 года определена ранее не исследованная прогностическая значимость ряда ИГХ (c-тус, bcl-2, bcl-6, p53, CD30, CD5, входящих в Hans-алгоритм) и, молекулярно-генетических

маркеров (транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой.

4. С учетом новой классификации ВОЗ 2017 года оптимизирован алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, в том числе на предмет выявления перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

### **Практическая значимость исследования**

1. Выделение групп неблагоприятного прогноза диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы с помощью иммуногистохимического и молекулярно-генетического анализа позволит улучшить результаты лечения пациентов, благодаря ранней интенсификации терапии.
2. Внедрен оптимальный алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Наличие В-симптомов, первично-резистентное течение заболевания и распространенные стадии заболевания (III-IV стадии) ассоциированы с более низкими показателями выживаемости без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS (новая классификация ВОЗ 2017 года).
2. Пациенты с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS и коэкспрессией c-myc и bcl-2 не продемонстрировали разницы в показателях выживаемости без прогрессирования в сравнении с группой без экспрессии, что может быть связано с проведением ранней интенсификации лечения в первой группе.

3. Положительная экспрессия CD10 (GCB-подтип) у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой NOS ассоциирована с меньшим риском рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии.
4. Лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах С-МУС, BCL2 и/или BCL6 обнаружены не были, тогда как диффузные В-клеточные крупноклеточные лимфомы с перестройками в одном из генов: С-МУС или BCL2 или BCL6 встречались редко. С учетом этих данных был оптимизирован алгоритм диагностики диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы, в том числе на предмет выявления перестроек в генах МУС, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

### **Апробация работы**

Апробация диссертации состоялась на собрании научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России с кафедрами онкологии ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западного государственного медицинского университета имени академика И.И. Мечникова» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на II-онкологическом форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2016), на конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2017), на постерной сессии ежегодного конгресса European Society of Medical Oncologists (Мюнхен, Германия 2018), на постерной сессии ежегодного конгресса European Blood and Marrow Transplantation Society (Лиссабон, Португалия, 2018).

### **Внедрение результатов работы в практику**

Результаты исследования отражены в научных статьях, внедрены и используются в практической и научно-исследовательской работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

## **Публикации**

По материалам диссертационного исследования опубликовано 7 печатных работ, включая 5 работ в журналах, рецензируемых ВАК.

## **Личный вклад автора**

Автор участвовала в разработке дизайна исследования, проводила выполнение всех этапов работы: ведение и лечение пациентов, обобщение, интерпретацию статистических данных, выполнение иммуногистохимического и молекулярно-генетического исследований под руководством патоморфологов, обсуждение результатов исследования, формирование выводов.

## **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа «Прогностическое значение клинических, иммуногистохимических и молекулярно-генетических характеристик диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует специальностям 14.01.12 – онкология, согласно Пунктам 2 и 6; 14.03.02 – патологическая анатомия.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов, выводов и практических рекомендаций. Работа содержит 16 таблиц, 51 рисунок. Библиографический указатель включает 10 отечественных и 119 зарубежных источников.

# ГЛАВА 1

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Эпидемиология неходжкинских лимфом

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – самый распространенный тип неходжкинских лимфом (НХЛ), и частота встречаемости варьирует от 25% до 50% всех НХЛ в зависимости от литературных данных [41, 111, 127].

Под НХЛ понимают разнородную группу злокачественных опухолей лимфатической ткани с определенными клиническими, морфологическими, иммуногистохимическими (ИГХ) и генетическими особенностями, различным прогнозом и подходом в лечении [35]. Диагноз ДВККЛ ставится чаще в развивающихся странах, чем в развитых, как правило, после 60 лет, пациенты-мужчины преобладают над женщинами [127].

В 2020 году в США ожидается более 77 000 впервые выявленных НХЛ и около 20 000 смертей от этого заболевания [112]. В Европе в 2018 г. количество новых случаев достигло 115 000, зарегистрированных смертей от НХЛ – около 50 000 [25]. Неходжкинские лимфомы составляют примерно 5% всех злокачественных новообразований и являются пятым по значимости онкологическим заболеванием в развитых странах [112]. Данные, собранные национальным институтом рака США, демонстрируют почти двукратный рост заболеваемости в период между 1975 и 2010 гг (с 11,07/100 000 до 20,98/100 000) [111]. В России, согласно статистике злокачественных новообразований, в 2017 году было зарегистрировано 9 883 пациентов с НХЛ [5].

## 1.2 Нормальное созревание В-клетки

Для лучшего понимания патогенеза ДВККЛ и влияния на характер течения заболевания различных ИГХ и молекулярно-генетических факторов необходимо сперва рассмотреть механизм нормального развития В-клетки. В-клетки – это лимфоциты, специализирующиеся на синтезе и секреции иммуноглобулинов (Ig). Костный мозг – это первичный лимфоидный орган, где происходит начальное и терминальное созревание В-лимфоцитов. Про-лимфоцит является первым предшественником в линии клеточной дифференцировки В-лимфоцитов. После реанжировки гена, кодирующего тяжелую цепь Ig, про-В лимфоцит становится пре-В клеткой. Последующие перестройки легких цепей приводят к появлению экспрессии IgM и дифференцировке в незрелый В-лимфоцит [91]. Дальнейшие этапы развития незрелого В-лимфоцита продолжаются в кровяном русле. Превращение в плазматическую клетку и экспрессия IgM происходит после взаимодействия с антиген-презентирующей клеткой (АПК) [76].

В-клетки памяти в свою очередь переходят из экстрафолликулярной зоны в лимфатический узел к первичным фолликулам, где также происходит взаимодействие с АПК, в результате чего развивается вторичный иммунный ответ. На данном этапе первичные фолликулы изменяются на вторичные, содержащие герминальный центр. Находясь в постоянном взаимодействии с АПК, в клонах В-лимфоцитов (на данной стадии их называют центробластами) начинаются процессы соматических гипермутаций переменных участков генов, кодирующих тяжелые цепи [116]. Выживают и пролиферируют в дальнейшем те В-клетки, у которых Ig, в результате гипермутаций, приобрел способность связываться с антигеном.

Клональная экспансия и соматический гипермутагенез В-лимфоцитов происходит в герминальном центре фолликула. После завершения процессов клональной экспансии и соматического гипермутагеназа, центробласты формируют светлые зоны герминального центра. Многократная миграция между двумя зонами приводит к формированию В-клеточного рецептора [128]. Центробласты затем превращаются в центроциты и начинают экспрессировать

Ig G, A или E, теряя способность к экспрессии IgM. Центроциты с высокоаффинными антителами дифференцируются либо в В-клетки памяти или плазмобласты, которые мигрируют в костный мозг и становятся плазматическими клетками. В костном мозге плазматические клетки вырабатывают различные иммуноглобулины и длительность их жизни в среднем составляет 1 месяц [55].

Все вышеперечисленные этапы развития клетки демонстрируют высокую вероятность появления генетических аномалий, возникающих как в герминальном, так и негерминальных центрах клеточного фолликула, что ведет к малигнизации клона и неконтрольной клеточной экспансии. Этиология возникновения ДВККЛ по-прежнему не до конца изучена. Данная группа опухолей возникает *de novo* (и называются первичными) или в связи с гистологической трансформацией из индолентных лимфопролиферативных заболеваний (вторичные), таких как фолликулярная лимфома, хроническая лимфоцитарная лейкемия, лимфома маргинальной зоны, нодулярная лимфома Ходжкина с лимфоцитарным преобладанием [127].

### **1.3 Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома в новой классификации Всемирной организации здравоохранения 2017 года**

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ДВККЛ – это опухоль из крупных и средних В-лимфоцитов, чьи ядра имеют размер, сопоставимый или превышающий размер нормального макрофага или в два раза превышающие размер нормального лимфоцита.

При ДВККЛ наблюдается диффузный рост опухолевых клеток с инфильтрацией лимфатических узлов и/или нелимфатических органов и тканей крупными лимфоидными В-клетками.

Морфологические, биологические и ИГХ исследования разделили ДВККЛ на различные морфологические и молекулярно-генетические подтипы, выделив отдельные нозологические единицы (таблица 1).

Таблица 1 – В-клеточные крупноклеточные лимфомы в новой классификации ВОЗ 2017 года

<p>В-клеточные крупноклеточные лимфомы</p>
<p><b>ДВККЛ, NOS</b></p> <p>Молекулярные подтипы:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лимфома с фенотипом клеток герминального центра (Germinal B-cell like-GCB)</li> <li>• Лимфома с фенотипом активированных В-клеток (activated B-cell-ABC)</li> </ul> <p>Морфологические варианты:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Центробластный</li> <li>• Иммунобластный</li> <li>• Анапластический</li> <li>• Другие редкие варианты</li> </ul>
<p><b>Другие В-крупноклеточные лимфомы</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Т-клеточная/богатая гистиоцитами В-клеточная крупноклеточная лимфома</li> <li>• Первичная ДВККЛ центральной нервной системы</li> <li>• Первичная кожная ДВККЛ, тип нижних конечностей</li> <li>• Первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная крупноклеточная лимфома</li> <li>• В-клеточная крупноклеточная лимфома с перестройками в IRF4</li> <li>• Интраваскулярная крупноклеточная В-клеточная лимфома</li> <li>• EBV+ ДВККЛ, неклассифицируемая</li> <li>• ALK + крупноклеточная В-клеточная лимфома</li> <li>• ДВККЛ ассоциированная с хроническим воспалением</li> <li>• Плазмобластная лимфома</li> <li>• HHV8+ ДВККЛ</li> <li>• Первичная выпотная (эффузионная) лимфома</li> </ul>
<p><b>В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лимфома высокой степени злокачественности, неклассифицируемая</li> <li>• Лимфома высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 (синонимы-Double-hit и Triple-hit лимфомы)</li> </ul>

## Продолжение таблицы 1

В-клеточные крупноклеточные лимфомы
<p><b>В-клеточная лимфома неклассифицируемая</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• В-клеточная лимфома, неклассифицируемая, с признаками, промежуточными между ДВККЛ и классической лимфомой Ходжкина</li> </ul>
Примечание – ДВККЛ – диффузная В-клеточная лимфома крупноклеточная; NOS – неклассифицируемая (not otherwise specified).

Тем не менее по-прежнему встречаются биологически гетерогенные случаи ДВККЛ, не соответствующие критериям для выделения отдельных подтипов. Данная группа получила название ДВККЛ NOS (not otherwise specified).

В-клеточная лимфома, неклассифицируемая, с признаками, промежуточными между ДВККЛ и лимфомой Беркитта, а также случаи атипической лимфомы Беркитта из классификации ВОЗ (2008) были пересмотрены и вошли в новую группу В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности (таблица 1).

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности – редкий и агрессивный подтип зрелых В-клеточных лимфом, который с учетом клинических и биологических характеристик должен быть выделен в отдельную нозологическую единицу от ДВККЛ [32, 115]. В новую классификацию ВОЗ 2017 года вошли 2 новые категории В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности. В первую были включены все В-клеточные лимфомы (кроме редких случаев фолликулярных лимфом и В-лимфобластных лейкозий/лимфом), у которых обнаружена перестройка MYC (8q24) в комбинации с BCL-2 (18q21) и/или BCL-6 (3q27), (данную группу также называют Double-hit (DH) и Triple-hit (TH) лимфомами). Вторая категория - В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, неклассифицируемая (NOS), включает в себя случаи, промежуточные между ДВККЛ и лимфомой Беркитта, или проявляет себя как бластоидный тип, но не имеет перестроек вышеупомянутых генов. Данная

гетерогенная группа зрелых В-клеточных лимфом имеет схожие морфологические, ИГХ, молекулярно-генетические характеристики с ДВККЛ и лимфомой Беркитта, но не отвечает критериям включения в данные нозологии согласно новой классификации.

## **1.4 Морфологические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы**

### ***1.4.1 Морфологические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS***

Гистоархитектоника пораженных лимфоузлов или тканей частично или полностью стирается за счет диффузной инфильтрации опухолевыми клетками. В опухоли часто присутствуют участки некроза и характерно распространение на соседние структуры. Реже встречается интерфолликулярный или синусоидальный тип поражения лимфоузлов. Изредка опухолевые клетки формируют симпласты и узлы, симулирующие карциному. Может встречаться картина по типу «звездного неба», что ассоциировано с высокой пролиферативной активностью [1]. Количество реактивных клеток фонового инфильтрата может значительно варьировать, но, как правило, преобладают малые лимфоциты (преимущественно Т-клетки), встречаются плазматические клетки, гистиоциты и полиморфноядерные лейкоциты [103].

Крупными и средними лимфоидными клетками с морфологическими чертами центробластов, иммунобластов и клеток с промежуточными характеристиками представлена ДВККЛ NOS. Клетка считается крупной, если ее размер превышает размер ядра нормального гистиоцита в одном образце опухоли. В настоящее время описано несколько вариантов ДВККЛ в зависимости от

особенностей морфологии, но самыми часто встречающимися являются центробластный, иммунобластный и анапластический.

Центробластный вариант – наиболее распространённый морфологический подтип ДВККЛ, встречающийся в 80% случаев. Центробласты – крупные клетки с умеренным количеством амфофильной или базофильной цитоплазмы. У центробластов округлые или овальные везикулярные ядра, которые могут быть дольчатыми или угловатыми, с множественными мелкими, чаще базофильными ядрышками, расположенными у ядерной мембраны. Этот вариант может быть представлен как мономорфными опухолями, состоящими в основном из центробластов (>90%), так и полиморфными опухолями, содержащими и центробласты, и центроциты, и иммунобласты.

Иммунобластный подтип встречается в 8-10% случаев ДВККЛ. Традиционно иммунобластным считается вариант, при котором в неоплазме наблюдается не менее 90% иммунобластов. Иммунобласты – это большие лимфоидные клетки с округло-овальными везикулярными ядрами, единичным крупным, центрально расположенным ядрышком, относительно широким ободком базофильной цитоплазмы. В некоторых случаях иммунобласты могут демонстрировать плазмощитоидную дифференцировку, что требует дальнейшей дифференциальной диагностики между плазмобластной лимфомой и плазмноклеточной миеломой с проведением ИГХ и генетических тестов [42].

Анапластический вариант встречается реже двух вышеперечисленных подтипов и наблюдается в среднем в 3% случаев ДВККЛ. Данный подтип характеризуется наличием крупных и очень крупных лимфоидных клеток с плеоморфными или эксцентричными ядрами, многоядерных клеток и обширной цитоплазмой. Лимфомные клетки могут имитировать клетки Ходжкина и Рид-Штейнберга или клетки анапластической лимфомы. При анапластическом варианте также частично может присутствовать синусоидный рисунок.

Кроме этого, существует несколько дополнительных морфологических подтипов ДВККЛ, относящихся к редким. Клетки лимфомы могут иметь дольчатое ядро или по форме напоминать клевер. Как правило, данные подтипы встречаются

при экстранодальных лимфомах. В других случаях лимфомные клетки по размеру меньше, чем типичная крупноклеточная лимфоидная клетка (центробластная мелкоклеточная). Редко (<1%) лимфомные клетки имеют перстневидноклеточное строение (имитирующее перстневидноклеточную карциному желудка). При редких вариантах ДВККЛ в клетках также могут наблюдаться цитоплазматические гранулы с микроворсинчатыми выступами или межклеточными соединениями. Несмотря на множество морфологических подтипов, ДВККЛ может отличаться выраженным клеточным полиморфизмом в пределах одной опухоли [70].

Прогностическая значимость морфологических подтипов ДВККЛ в настоящее время является спорной. Некоторые исследования продемонстрировали неблагоприятный прогноз у иммунобластного варианта [42, 60], другие у анапластического [16]. Данные морфологические группы являются гетерогенными, в связи с чем необходима их дальнейшая стратификация с учетом ИГХ и молекулярно-генетических особенностей [42].

#### ***1.4.2 Морфологические особенности***

##### ***В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS***

В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности NOS встречается крайне редко. Диагноз должен быть выставлен только при условии отсутствия критериев включения в подгруппы ДВККЛ или лимфомы Беркитта. В предыдущей классификации ВОЗ (2008), большинство случаев В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS и В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 относили к неклассифицируемой В-клеточной лимфоме с признаками, промежуточными между ДВККЛ и лимфомой Беркитта [19].

Так как новая классификация ВОЗ (2017) выделила ДН и ТН лимфомы как отдельную нозологическую единицу, случаи без перестроек, а также зрелые

бластоидные В-клеточные лимфомы вошли в группу В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS.

В большинстве случаев морфологическая картина данной В-клеточной лимфомы больше сходна с лимфомой Беркитта, чем с ДВККЛ. Как правило, наблюдается диффузный рост средних и крупных клеток и отсутствие стромальной реакции и фиброза. Клеточная морфология различна: некоторые случаи мономорфны и напоминают лимфому Беркитта, другие имеют различные вариации по размеру ядра и особенности, отличные от классической картины лимфомы Беркитта. Как правило, цитоплазма менее базофильна, а цитоплазматические вакуоли отсутствуют. В случаях, когда морфологическая картина крайне схожа с лимфомой Беркитта, для исключения данного диагноза необходимо выполнить ИГХ исследование и молекулярно-генетический анализ.

#### ***1.4.3 Морфологические особенности В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC и BCL2 и/или BCL6***

По данным литературы, большинство лимфом высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 имеют морфологическую картину, схожую с ДВККЛ NOS [81, 110]. В недавнем исследовании Li и соавт. [56] 69% ДН лимфом с перестройками MYC и BCL-2 и 85% MYC и BCL-6 имели морфологическую картину ДВККЛ NOS.

Принимая во внимание сложность разделения на подтипы В-клеточных лимфом, в т.ч. ДВККЛ NOS и ДН лимфом с учетом морфологических характеристик, необходимо использование ИГХ маркеров и молекулярно-генетического анализа посредством флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) для точной постановки диагноза.

### **1.5 Иммуногистохимические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL2 и/или BCL6**

Оценка иммунофенотипа опухоли является необходимым этапом постановки диагноза В-клеточных лимфом и может быть выполнена как методом проточной цитометрии, так и ИГХ анализа. Иммуногистохимическая панель включает в себя CD20, CD22, CD79а, PAX 5, bcl-6, CD10, c-мыс, bcl-2, Ki67, IRF4 (mum1), Cyclin D1, CD19, CD5, CD23, CD30, CD58, p53. Клетки опухоли экспрессируют пан-В клеточные маркеры, такие как CD20, CD19, CD22, а также транскрипционные факторы PAX-5, BOB.1 и OCT-2 [8, 43, 73, 103].

При ДВККЛ NOS монотипическая поверхностная или цитоплазматическая экспрессия иммуноглобулинов наблюдается в 50-75% случаев. Чаще всего наблюдается экспрессия IgM, далее IgG, реже всего – IgA. Некоторые случаи ДН- и ТН- лимфом не экспрессируют иммуноглобулины по причине вовлечения локусов гена иммуноглобулина за счет транслокации.

Некоторые из ИГХ маркеров используются не только для диагностики и определения прогноза заболевания, но и для выбора дальнейшей тактики лечения (таблица 2). Экспрессия CD20 может отсутствовать, быть слабой или положительной. Наличие экспрессии CD20 является необходимым условием для назначения таргетной терапии. CD20 участвует в регуляции обмена кальция, внутриклеточного цикла и апоптоза, а также является идеальной мишенью для иммунотерапии. Лечение моноклональными антителами, в частности препаратом анти-CD20 Ритуксимаб, внесло значительный прогресс в лечение В-клеточных лимфом, достоверно улучшив результаты терапии ДВККЛ в сравнении со стандартными подходами. Препарат был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в США в 1997 году.

Таблица 2 – Практическая значимость ИГХ маркеров, экспрессируемых при ДВККЛ

ИГХ маркер	Частота	Значимость
CD19	Часто	Диагностика, таргетная терапия
CD20	Часто	Диагностика, таргетная терапия
CD22	Часто	Диагностика, таргетная терапия
CD79a/ CD79b	Часто	Диагностика, таргетная терапия
PAX5	Часто	Диагностика
CD5	5-10%	Прогностическая
CD30	Вариабельная экспрессия	Прогностическая, таргетная терапия
CD10	30-60%	Прогностическая (Hans-алгоритм), диагностика
bcl-6	60-90%	Прогностическая (Hans-алгоритм), диагностика
mum1	35-65%	Прогностическая (Hans-алгоритм), диагностика
Ki67	Вариабельная экспрессия	Маркер пролиферативной активности
c-myc	20-40%	Прогностическая (в случае коэкспрессии sbcl-2)
bcl-2	Частота	Прогностическая (в случае коэкспрессии cc-myc)
p53	Вариабельная экспрессия	Прогностическая
Примечание – ИГХ – иммуногистохимический анализ; ДВККЛ – диффузно-крупноклеточная В-клеточная лимфома.		

К суперсемейству рецептора фактора некроза опухоли относится белок CD30, который является трансмембранным поверхностным белком и

экспрессируется активированными В и Т клетками в нормальных тканях [74]. Первоначально идентифицированный как маркер поверхности клеток Рид-Штейнберга при классической лимфоме Ходжкина, CD 30 также экспрессируется при ДВККЛ NOS в 10-20% случаев [26], особенно при анапластическом типе. В 2013 году в исследовании S. Ну и соавт. было показано, что пациенты с экспрессией CD30 имеют более высокий показатель 5-летней общей выживаемости, чем пациенты без экспрессии (79% против 59%;  $p=0,01$ ) [59], в то время как в исследовании Collie и соавт. были получены противоположные результаты [27]. Тем не менее, большинство работ продемонстрировали корреляцию между экспрессией CD30 и лучшим прогнозом заболевания. Анализ профиля экспрессии генов показал, что у CD30+ ДВККЛ нарушен процесс регуляции пути NF- $\kappa$ B и сигнального пути В-клеточного рецептора. Другим фактором, определяющим благоприятный прогноз заболевания, может выступать взаимоисключающая экспрессия CD30 и перестройки в гене MYC, приводящие к неконтрольной пролиферации (см. раздел 1.5). В новой классификации ВОЗ 2017 года CD30 не обозначен как необходимый маркер для диагностики впервые выявленной ДВККЛ. Тем не менее, брентуксимаб ведотин – конъюгированное моноклональное антитело к CD30 – может использоваться у группы пациентов с наличием экспрессии после рецидива при проведении стандартной химиотерапии [23, 125].

Помимо вышеупомянутых потенциальных «мишеней», исследуемых посредством ИГХ анализа, необходимо также отметить важность определения маркеров CD19, CD22, CD79a, которые могут быть индикаторами возможного ответа на лечение различными конъюгатами моноклональных антител [75].

В 20-25% случаев ДВККЛ позитивны по экспрессии PD-L1 и PD-L2, что ассоциировано с амплификацией хромосомы 9p24.1. Белок программируемой клеточной гибели (PD1) экспрессируют Т-клетки, инфильтрирующие опухоль, а PD-L1 и PD-L2 (CD274 и CD273) являются лигандами PD-1. Клетки лимфомы или АПК экспрессируют PD-L1 и PD-L2. При ДВККЛ прогностическая ценность PD1+ Т-клеток, инфильтрирующих опухоль, остается не до конца изученной, но уровень экспрессии PD-L1 в тканях и уровень PD-L1 в периферической крови несет

предиктивную значимость для ответа на иммунотерапию ингибиторами PD1 [47, 52, 122, 129].

В норме CD5 экспрессируется Т-клетками и популяцией малых В-лимфоцитов крови и мантийной зоны лимфоидных фолликулов. В большинстве случаев экспрессия CD5 наблюдается при хронической лимфоцитарной лейкемии и лимфоме зоны мантии, но иногда наблюдается и при В-клеточных крупноклеточных лимфомах. При ДВККЛ частота встречаемости экспрессии CD 5 составляет 5-10% [30]. Выживанию В-клеток способствуют не только CD5 за счет продукции интерлейкина-10, но и влияние по типу отрицательной регуляции на сигнальный путь В-клеточного рецептора.

Лимфома CD5+ ДВККЛ ассоциирована с пожилым возрастом, распространённой стадией на момент постановки диагноза, наличием В-симптомов, высоким уровнем лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и экстранодальным поражением. Генетический анализ данного типа лимфомы позволяет предположить, что источником ее развития может быть соматическая мутация CD5-предшественников В-клеток. С помощью цитогенетического анализа были идентифицированы подгруппы пациентов с *de novo* CD5+ ДВККЛ с хромосомными абберациями в 8p21 или 11q13. Лимфомы CD5+ ДВККЛ имеют комплексный кариотип и, как правило, происходят из клеток с фенотипом активированных В-клеток (activated B-cell-ABC). Данная подгруппа имеет неблагоприятный прогноз и неудовлетворительный ответ как на стандартные схемы лечения, так и на более интенсивные режимы с высокодозной химиотерапией (ВДХТ) с аутологичной трансплантацией клеток костного мозга стволовых клеток (АутоТКМ) [40, 95]. Таким образом, *de novo* CD5+ ДВККЛ составляют уникальную подгруппу ДВККЛ, в связи с чем в новой классификации ВОЗ рекомендовано рутинное определение CD5 во всех случаях впервые диагностированной ДВККЛ.

Индекс пролиферативной активности Ki-67 при ДВККЛ отличается своей вариабельностью и составляет от 20% до 100% [127]. Ядерный негистоновый белок Ki-67 синтезируется в начале клеточной пролиферации и экспрессируется на

протяжении всех фаз клеточного цикла, за исключением фазы G0. Экспрессия Ki-67 широко используется в клинической практике для оценки пролиферативной активности при В-клеточных лимфомах. Результаты исследований последних лет, как в эру до ритуксимаба так и после, продемонстрировали противоречивые результаты: как правило, в этих работах не учитывались возраст, соматический статус больных, другие биологические особенности опухоли, такие как происхождение опухолевой клетки [57, 58, 69, 72].

Индекс пролиферативной активности Ki-67% у лимфом высокой степени злокачественности достигает 95%, но не может служить индикатором для выбора лимфом, которым необходимо исследование FISH на транслокации MYC.

Таким образом, с точки зрения ИГХ особенностей, наибольшую значимость среди вышеперечисленных прогностических маркеров ДВККЛ для дальнейшего изучения имеют экспрессия CD5, а также белки c-myc, bcl-2, p53 и маркеры, входящие в Hans-алгоритм (см. раздел 1.6).

### **1.6 Молекулярно-генетические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL2 и/или BCL6**

Лимфома ДВККЛ происходит из незрелых В-клеток, находящихся на различных этапах дифференцировки. Несколько генных мутаций потенцируют изменения в В-клетках, меняя экспрессию генов, что приводит к малигнизации клеточного клона [91]. Протоонкогены контролируют клеточную пролиферацию при отсутствии различных генетических аномалий, таких как хромосомные транслокации, генные мутации и амплификации. Гены опухолевой супрессии потенцируют клеточную дифференцировку. При опухолевой трансформации, как правило, наблюдается активация онкогенов и подавление генов опухолевой

супрессии, что приводит к бесконтрольной пролиферации малигнизированного клона В-клеток [107].

Помимо новых подтипов, выделенных ВОЗ в 2017 году, полное геномное секвенирование позволило выделить 4 дополнительных группы ДВККЛ: MCD (наличие мутаций MYD88L265P и CD 79B), BN2 (мутации BCL-6 и NOTCH2), N1 (NOTCH1 мутации), и EZB (EZH2 мутации и BCL-2 транслокации) [53, 54, 79].

Молекулярная гетерогенность опухоли также обусловлена различным происхождением опухолевых клеток. На основе данных анализа профиля экспрессии генов, новая классификация ВОЗ 2017 года разделила ДВККЛ неклассифицируемую (not-otherwise specified) на 2 подгруппы: лимфома с фенотипом клеток герминального центра (Germinal B-cell like-GCB) и лимфому с фенотипом активированных В-клеток (activated B-cell-ABC). GCB и ABC подтипы различаются хромосомными aberrациями, активацией сигнальных путей и клиническим течением заболевания.

Подтип ABC лимфомы ДВККЛ NOS характеризуется постоянной активацией сигнального пути В-клеточного рецептора (BCR-signaling) с активацией ядерного фактора  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), являющегося центральным механизмом, способствующим выживанию клеток [44]. Более половины случаев ABC-подтипа несут в себе соматические мутации различных генов, включающие как негативные (A20), так и позитивные (CARD11, TRAF2, TRAF5, MAP3K7, и TNFRSF11A) регуляторы пути NF- $\kappa\text{B}$  [13]. Кроме того, 29% ABC-подтипа имеют активирующие мутации гена MYD88, кодирующего белок, отвечающий за регуляцию сигнального пути Toll и рецептора интерлейкина-1 (IL-1) [109]. Выживанию клеток способствует MYD-88 за счет спонтанной сборки протеинового комплекса, содержащего рецептор IL-1 ассоциированной киназы (IRAK1) и IRAK4, ведущей к активации киназы IRAK4, фосфорилированию IRAK1, активации пути NF- $\kappa\text{B}$  и киназы JAK сигнального пути STAT3, и в итоге к секреции IL-6, IL-10, и интерферона- $\beta$ . Поскольку профиль экспрессии генов не всегда доступен в рутинной клинической практике, более доступной альтернативой при определении подтипа ДВККЛ NOS может выступать Hans-алгоритм (рисунок 1) [38]. Маркеры

CD10, bcl-6, и IRF4/mum1, входящие в Hans-алгоритм, позволяют разделить ДВККЛ NOS на GCB и non-GCB подтипы [109]. При использовании Hans-алгоритма, 42% случаев ДВККЛ NOS классифицируются как GCB и 58% как non-GCB подтип. Последний включает в себя неклассифицируемые случаи, то есть ABC-подтип, определяемый профилем экспрессии генов, не является синонимом non-GCB. Профиль экспрессии генов сопоставим с результатами Hans-алгоритма в 79% случаев при GCB-подтипе и в 88% при non-GCB подтипе [106]. В эру ритуксимаба многие исследования продемонстрировали худшие показатели общей и бессобытийной выживаемости пациентов с non-GCB подтипом в сравнении с GCB-подтипом лимфомы ДВККЛ NOS [44].

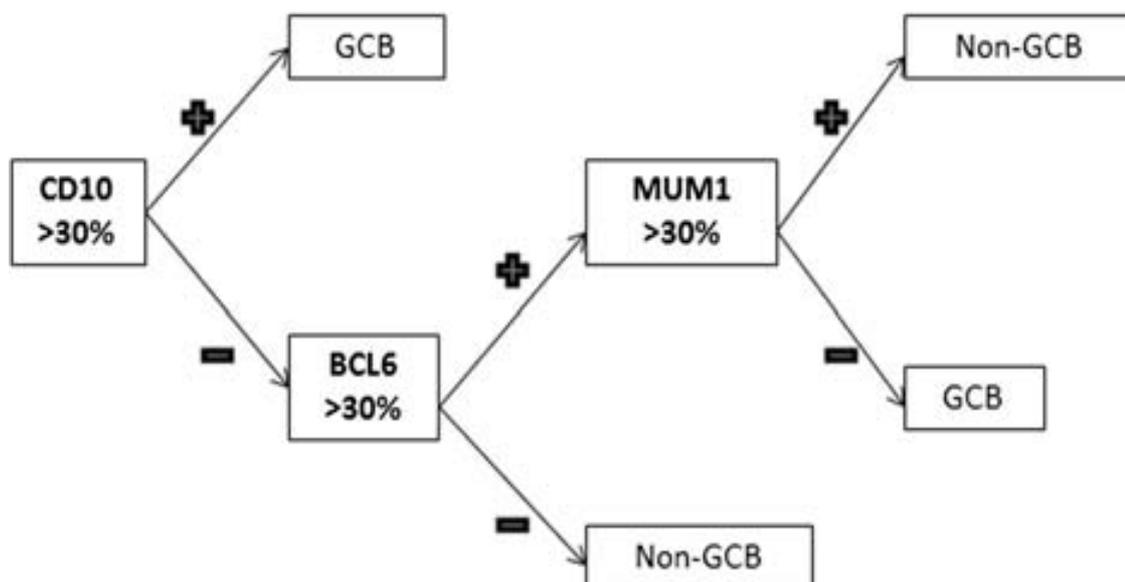


Рисунок 1 – Hans-алгоритм при определении подтипа ДВККЛ.

Мутация TP53 представлена примерно в 20% случаев ДВККЛ и является независимым предиктивным фактором неблагоприятного прогноза заболевания [65, 99]. Ген опухолевой супрессии TP53 регулирует несколько этапов пролиферации клеток, таких как репарация ДНК, апоптоз [99].

Потеря функции гена при мутации TP53 приводит к бесконтрольной пролиферации малигнизированного клона. Частота встречаемости мутации в гене TP53 примерно одинакова у GCB и ABC-подтипов ДВККЛ. При ДН лимфомах

с перестройками в генах MYC/BCL-2 мутация TP53 встречается в трети случаев, а при MYC/BCL-6 – практически никогда [124]. Известно, что мутированный белок p53 имеет более длинный период полужизни чем белок p53 дикого типа, таким образом, гиперэкспрессия белка p53, определяемая ИГХ исследованием, может являться суррогатным показателем наличия мутации в гене TP53. Наличие мутации в гене TP53, как и гиперэкспрессия белка p53, ассоциированы с неблагоприятным прогнозом у пациентов с ДВККЛ [100, 101]. Гиперэкспрессия p53 (так же, как и мутация TP53) усиливает неблагоприятное влияние мутации MYC на прогноз заболевания [93, 120].

Ген MYC был описан более 30 лет назад как клеточный гомолог вирусного онкогена (v-MYC) птичьего вируса миелоцитоматоза. Перестройки гена MYC были впервые упомянуты при лимфоме Беркитта, но впоследствии появились данные об их наличии при ДВККЛ, фолликулярной лимфоме, лимфоме зоны мантии и острой лимфобластной лимфоме. Ген MYC является прото-онкогеном, расположенным на 8q24 хромосомы, кодирующим транскрипционный фактор, отвечающий за метаболизм, синтез белков, дифференцировку клеток. В контексте лимфомы, экспрессия гена MYC ведет к нестабильности генома и клеточной пролиферации. Парадоксально, но белок с-тус способен увеличивать экспрессию белка опухолевого супрессора TP53 [100], и для того, чтобы изменить данный сценарий, необходимо присутствие других аномалий, таких как экспрессия bcl-2 и мутация TP53, стимулирующих пролиферацию и онкогенез.

Высокая экспрессия белка с-тус может быть обусловлена множеством механизмов, включающих транслокации хромосом, амплификацию гена MYC, и повторяющимися перестройками [82, 85]. Самой частой генетической аномалией, приводящей к гиперэкспрессии гена является транслокация гена MYC и локуса гена иммуноглобулина (IG). Активность IG-промотора приводит к увеличению копий и-РНК, что напрямую ведет к увеличению экспрессии белка с-тус. Перестройка MYC-IG является отличительной чертой лимфомы Беркитта, но также может встречаться при ДВККЛ (single-hit лимфома-SH лимфома) [37, 81].

В настоящее время имеется ограниченное количество исследований о влиянии перестроек только в гене MYC и отсутствие таковых в BCL-2 и BCL-6 [113].

Однако в 5% случаев перестройки с вовлечением гена MYC вовлекают других партнеров, таких как BCL-6, BCL11A, или PAX5. Интересно, что перестройки MYC-IG ведут к меньшей активации и-РНК по сравнению с другими партнерами, такими как BCL-2, что говорит об отсутствии связи с неблагоприятным прогнозом [22, 83]. По-прежнему в мировой литературе остается открытым вопрос о влиянии амплификации гена MYC, наблюдаемой в 2-20% случаев ДВККЛ, на уровень экспрессии белка с-тус и на прогноз заболевания [84].

Онкоген BCL-2 расположен на 18q21 хромосомы и кодирует белок, поддерживающий жизнеспособность клеток посредством ингибирования апоптоза. В нормальных лимфоцитах окислительный стресс, нестабильность генома и другие патологические процессы индуцируют экспрессию белков семейства BНЗ, функцией которых является ингибирование bcl-2 и, соответственно, инициация апоптоза [17]. В случае малигнизации клона, гиперэкспрессия с-тус, bcl-2 и других белков является причиной прогрессирования лимфомы и резистентности к химиотерапии [24, 93]. Нарушение регуляции BCL-2 может развиваться по причине хромосомной транслокации и амплификации гена, также ведущих к запуску сигнального пути ядерного фактора В [21].

Онкоген BCL-6 расположен на 3q27 хромосоме. Белок bcl-6 функционирует как транскрипционный ингибитор и участвует в нескольких клеточных процессах, таких как активация, дифференцировка, клеточный апоптоз. В нормальных В-клетках, bcl-6 является ключевым регулятором реакций в герминальном центре. Онкоген BCL-6 подавляет активность семейства белков p-53, с-тус и bcl-2 [18, 51].

Прямые и опосредованные взаимосвязи между генами MYC, BCL-6 и BCL-2 схематично представлены на рисунке 2.

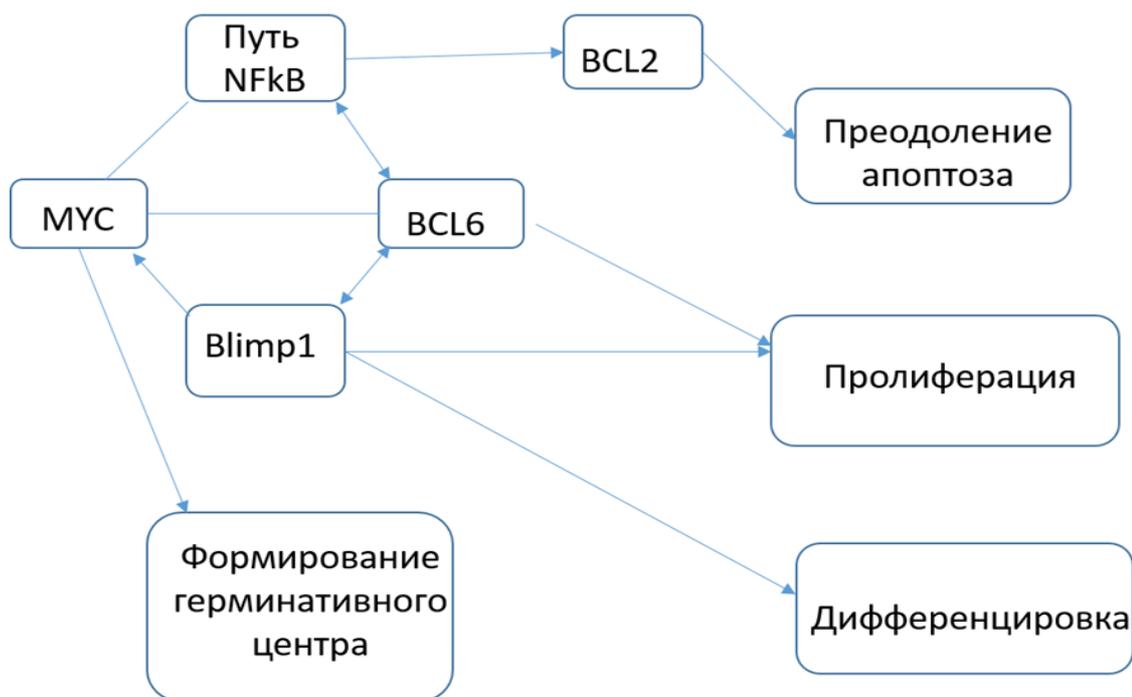


Рисунок 2 – Схема прямых и опосредованных взаимосвязей между генами MYC, BCL6 и BCL2, и основными процессами развития В-лимфоцита.

### **1.7 Дифференциальная диагностика диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности NOS, В-клеточной лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах MYC, BCL2 и/или BCL6**

Первым этапом в дифференциальной диагностике агрессивных В-клеточных лимфом является разделение за счет патоморфологических особенностей на бластоидный тип, лимфому Беркитта или ДВККЛ (рисунок 3). Следующий шаг – ИГХ-исследование, далее цитогенетическое исследование или FISH с целью выявления перестроек в гене MYC, BCL-2, и BCL-6. Если обнаруживаются реанжировки MYC с BCL-2 и/ или BCL6, то формулировка диагноза следующая: В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с перестройками MYC, BCL-2 и/ или BCL-6, то есть ДН или ТН лимфома.

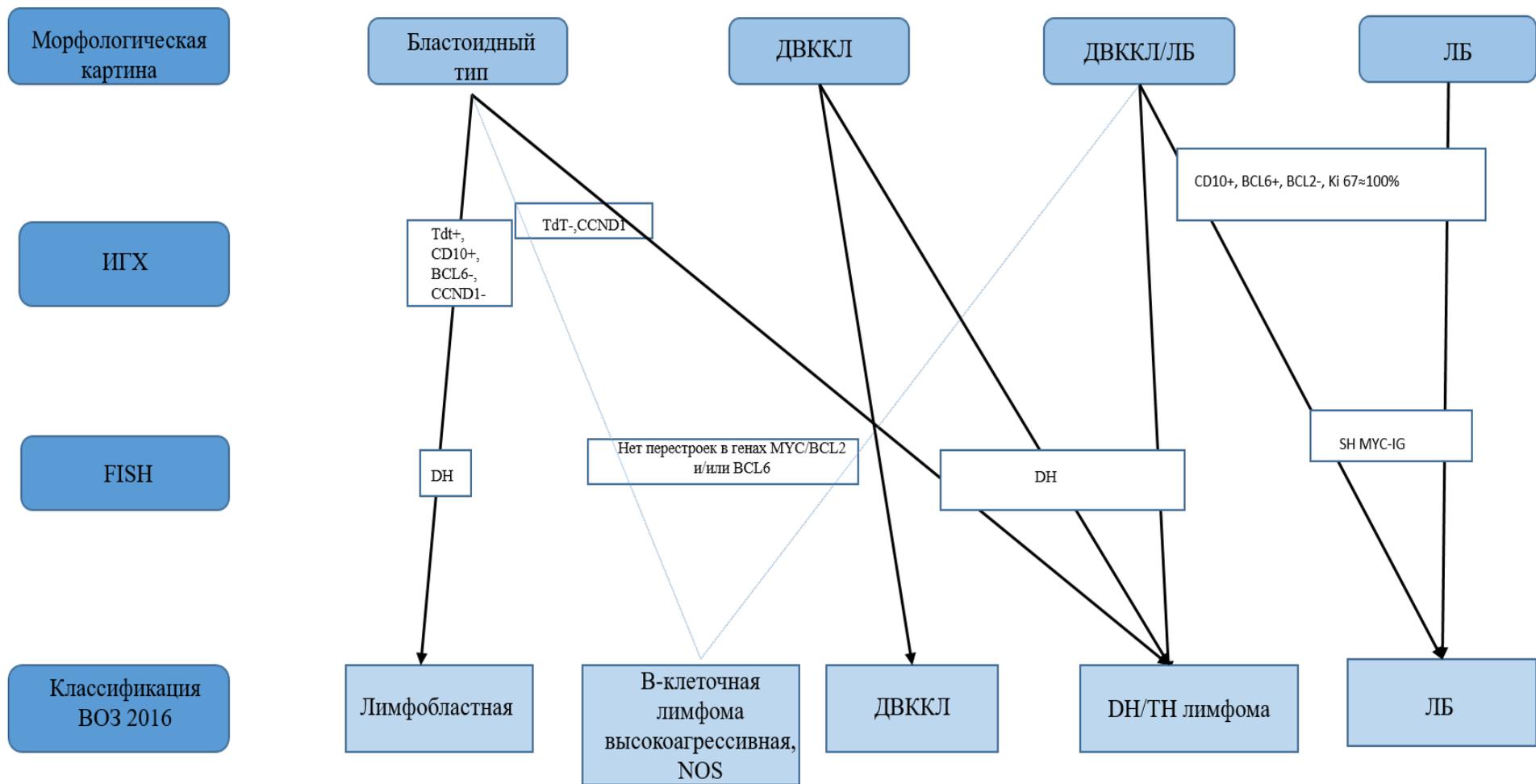


Рисунок 3 – Диагностический алгоритм, рекомендованный в новой классификации ВОЗ 2017 года для дифференциальной диагностики В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности.

Если данные генетические аномалии отсутствуют, диагноз ставится по морфологическим и ИГХ особенностям и звучит как В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности NOS [127].

В США диагностика ДН лимфом посредством FISH является стандартом. Однако в России на сегодняшний день не выполняется исследование FISH в каждодневной практике из-за высокой трудоемкости и стоимости данной методики, что диктует необходимость разработки алгоритма диагностики ДН и ТН лимфом в условиях отсутствия возможности рутинного анализа FISH.

Влияние конкретных типов перестроек MYC/BCL-2 или MYC/BCL-6 у ДН лимфом на прогноз заболевания изучен не до конца. В одном из когортных исследований не наблюдалось значимых различий в ОВ пациентов с перестройкой MYC/BCL-2 и MYC/BCL-6, хотя в 59% случаев пациенты с перестройкой MYC/BCL-6 также имели перестройку BCL-2 (ТН) [63]. В то же время Aukema и соавт. обнаружили значительно худшие показатели выживаемости у пациентов с MYC/BCL-6 (случаи с ТН были исключены) [22]. Landsburg и соавт. подтвердили данную находку: в их исследовании у пациентов с MYC/BCL-6 транслокацией медиана ОВ была 14,5 мес. в сравнении с 34,8 мес. у пациентов с MYC/BCL-2. Тем не менее данные по-прежнему остаются противоречивыми [97] и вопрос о влиянии на прогноз типа перестройки у ДН остается открытым.

Таким образом, с точки зрения молекулярно-генетических особенностей, наибольшую значимость для дальнейшего изучения точной постановки диагноза и определения прогноза заболевания имеют перестройки в генах MYC/BCL-2, MYC/BCL-6, BCL2/BCL-6. При этом не до конца изученным остается влияние конкретных типов перестроек на течение заболевания [39].

## **1.8 Клинические особенности диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы**

Лимфома ДВККЛ преобладает у пациентов после 70 лет, хотя также может встречаться и у молодых больных, и крайне редко у детей. Мужчины болеют чаще, чем женщины. Пациенты с ДВККЛ, как правило, манифестируют с симптомами, ассоциированными с лимфаденопатией, быстро растущей опухолевой массой, вовлечением определенного органа. Лимфома ДВККЛ может поражать практически любой орган, причем экстранодальное поражение встречается в 40% случаев. Самыми частыми локализациями при экстранодальном поражении являются кожа, легкие, желудочно-кишечный тракт, реже встречающиеся локализации – кости, яички, слюнные железы, щитовидная железа, печень, почки и надпочечники [3, 4, 6, 7, 9].

Симптомы интоксикации или В-симптомы (подъем температуры тела выше 38° С; потеря в весе более 10% от массы тела в течение 6 месяцев; профузные ночные поты) наблюдаются в 30% случаев. Гиперурикемия, обусловленная спонтанным синдромом лизиса опухоли наблюдается у высокоагрессивных лимфом, в том числе ДВККЛ. Примерно 60% ДВККЛ диагностируются на III-IV стадии заболевания. Повышенный уровень ЛДГ, обусловленный большими размерами опухолевой массы, поражением печени и иммуноопосредованной гемолитической анемией, наблюдается у 50% пациентов с ДВККЛ. Концентрация beta-2-микроглобулина в крови также часто повышена.

Тромбоцитопения, анемия или лейкопения связаны, как правило, с инфильтрацией костного мозга, наблюдаемой, по данным разных источников, в 10-30% случаев [48]. Вовлечение костного мозга может быть двух видов: конкордантное и дискордантное. Только конкордантное поражение костного мозга, по результатам различных исследований, было выделено как неблагоприятный фактор риска прогрессирования заболевания [36, 43, 62, 96].

Для определения прогноза заболевания используется международный прогностический индекс (МПИ) (таблица 3), включающий в себя:

- возраст старше 60 лет;
- повышенный уровень ЛДГ;
- III-IV стадия заболевания согласно классификации Ann Arbor (1971) с пересмотром Costwolds (1989) (Приложение 3);
- общесоматический статус 2-4 (по шкале ECOG);
- вовлечение более одного экстранодального очага.

Группы риска, сформированные на основании суммы факторов риска, коррелируют с показателями пятилетней выживаемости у пациентов с ДВККЛ [41, 119].

Таблица 3 – Распределение пациентов с ДВККЛ на группы риска в зависимости от значения МПИ

МПИ (сумма факторов риска)	Группа риска	Полный ответ	5 – БРВ	5 – ОВ
0-1	Низкий	87%	70%	73%
2	Низкий промежуточный	67%	50%	51%
3	Высокий промежуточный	55%	49%	43%
4-5	Высокий	44%	40%	26%
Примечание – БРВ – безрецидивная выживаемость; ОВ – общая выживаемость.				

Для стратификации рисков для пациентов старше 60 лет разработан МПИ, скорректированный по возрасту (aaPI), в который входят:

- стадия III-IV;
- повышение ЛДГ;
- ECOG  $\geq 2$ .

При отсутствии факторов риска пациент относится к группе низкого риска, при наличии одного фактора – низкого/промежуточного риска, двух факторов – высокого/промежуточного риска, всех трех факторов – высокого риска.

Международный прогностический индекс был разработан в 1993 году до начала применения моноклонального антитела ритуксимаб, значительно улучшившего результаты лечения пациентов с ДВККЛ. Тем не менее, МПИ по-прежнему широко используется в клинической практике.

National Cancer Center Network (NCCN) расширила МПИ (таблица 4). Данная модель позволяет более четко стратифицировать пациентов, получающих химиоиммунотерапию в группы риска [15].

Таблица 4 – МПИ, предложенный National Cancer Center Network

Название фактора риска	Количество баллов
<b>Возраст, лет</b>	
>40-60	1
>60-75	2
>75	3
<b>Уровень ЛДГ</b>	
>1-3	
>3	
Стадия по Ann Arbor III-IV	1
Экстранодальное поражение (костный мозг, центральная нервная система, легкие, печень, желудочно-кишечный тракт)	1
Общесоматический статус по шкале ECOG $\geq$ 2	1
Примечание – ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group; ЛДГ – лактатдегидрогеназа.	

В МПИ, по версии NCCN, такие показатели, как возраст, уровень ЛДГ в сыворотке крови и экстранодальное поражение (костный мозг, легкие, головной мозг, печень, желудочно-кишечный тракт) были специфицированы более детально.

Максимальное количество факторов риска у данной модели – восемь, а групп риска – четыре: низкого (0-1 фактор), низкого промежуточного (2-3 фактора), высокого промежуточного (4-5 факторов) и высокого риска ( $\geq 6$  факторов).

### **1.9 Особенности Double-hit и Double-expressor лимфом и их оптимальное лечение**

Согласно данным из разных источников, ДН лимфомы диагностируются крайне редко [115]. В общей когорте больных с транслокациями в генах MYC/BCL-2/ BCL-6 65% имеют перестройки MYC и BCL-2, 14% – в MYC и BCL-6, а 21% пациентов – во всех трех генах (ТН лимфомы) [64]. Примечательно, что до 20% пациентов с ДН и ТН лимфомами не демонстрируют гиперэкспрессию белков c-myc и bcl-2, что может говорить о лучшем прогнозе заболевания в сравнении с теми, у кого данная экспрессия присутствует [105]. Хотя у большинства ДН и ТН лимфом наблюдается коэкспрессия соответствующих белков, не всегда наличие экспрессии ассоциировано с вышеупомянутыми перестройками. Необходимо учитывать, что положительной экспрессией белков считаются значения  $\geq 40\%$  для c-myc и  $>50\%$  для bcl-2. В этом случае, при отсутствии перестроек, данный подтип лимфомы будет называться «Double-Expressor» лимфома (DE лимфома). Важно заметить, что DE лимфома не выделена как отдельный подтип в новой классификации ВОЗ 2017 года, однако ряд исследований продемонстрировали неблагоприятное течение ДВККЛ с коэкспрессией c-myc и bcl-2 [66, 84, 107]. Среди ДН лимфом 80-90% имеют GCB-подтип [97], в то время как у DE лимфом non-GCB подтип определяется в 63%, GCB подтип – в 37% случаев. В дополнение, в каждой группе non-GCB и GCB наличие коэкспрессии c-myc и bcl-2 является независимым неблагоприятным прогностическим фактором, указывающим на более низкие показатели выживаемости без прогрессирования (ВБП) и ОВ больных ДВККЛ.

Лимфомы ДН отличаются более агрессивным течением в сравнении с ДВККЛ NOS. В исследовании Tomita и соавт. среди 27 пациентов с ДН лимфомой, у 92% наблюдалось повышение ЛДГ, 93% имели экстранодальное поражение и у 87% был высокий МПИ [34]. В ретроспективном анализе клиники MD Anderson [45] 84% пациентов с ДН лимфомой имели распространённую стадию заболевания (III/IV), уровень ЛДГ был повышен в 69% случаев. В одном из самых крупных ретроспективных анализов, инициированном Petrich и соавт., [63] были проанализированы данные 311 пациентов. Результаты были схожими с предыдущими исследованиями: 81% пациентов имели распространённую стадию заболевания, 76% - высокий уровень ЛДГ.

Лимфомы ДВККЛ с коэкспрессией экспрессией c-myc и bcl-2, или DE лимфомы, также являются отдельным клиническим фенотипом [87]. Ретроспективный анализ Green и соавт. продемонстрировал плохой общий соматический статус у пациентов с DE лимфомой, распространённую стадию заболевания на момент постановки диагноза, высокий индекс пролиферативной активности Ki-67, средний или высокий индекс МПИ, множественное экстранодальное поражение и худший ответ на лечение стандартной химиотерапией по схеме «R-СНОР» [61]. В сравнении с ДН, DE лимфомы чаще встречаются в клинической практике. В исследовании Johnson и соавт. у 18% проанализированных пациентов была выявлена гиперэкспрессия c-myc и bcl-2, а у Ни и соавт. 34% больных [59] имели эту особенность. Согласно литературным данным, от 20 до 30% пациентов с ДВККЛ имеют подтип DE лимфомы [37].

Разработка оптимальной терапии первой линии ДН и DE лимфом является сложной задачей в связи с отсутствием проспективных клинических исследований. К тому же, из-за низкой частоты встречаемости данного подтипа количество публикаций крайне ограничено, что делает практически невозможным разработку единых стандартных протоколов лечения. Несколько больших ретроспективных исследований показали худший ответ на лечение пациентов с ДН и DE лимфомами при применении стандартного лечения схемой «R-СНОР», в связи с чем были изучены другие подходы с интенсификацией режима терапии [59, 63, 68].

В анализе Petrich и соавт. среди 311 пациентов с ДН лимфомами, получивших лечение как стандартным режимом химиотерапии по схеме «R-СНОР», так и более интенсивным режимом «R-ЕРОСН» (доза-адаптированный режим с применением ритуксимаба, этопозиды, преднизолона, винкристина, циклофосфамида и доксорубицина), были выявлены значительно худшие показатели БРВ в группе «R-СНОР» (7,8 против 21,6 месяцев;  $p=0,001$ ) в сравнении с группой, получивших интенсивный режим, хотя не было разницы в ОВ ( $p=0,564$ ). Похожие результаты были получены в ретроспективном анализе клиники MD Anderson: DA-R-ЕРОСН продемонстрировал значительное улучшение БРВ ( $p=0,004$ ) и ОВ ( $p=0,057$ ) в сравнении с стандартным «R-СНОР» [45]. В мета-анализе 11 исследований «R-ЕРОСН» показал достоверное снижение риска прогрессирования в сравнении с «R-СНОР» (снижение относительного риска на 34%,  $p=0,032$ ), хотя вновь не было выявлено влияния на показатели ОВ [49].

На основании полученных данных, более интенсивный индукционный подход с «R-ЕРОСН» стал терапией выбора, а в некоторых центрах стандартом лечения у пациентов с высокоагрессивной ДВККЛ. В настоящее время в мире проходят несколько проспективных клинических исследований у пациентов как с ДН, так и с DE лимфомами с использованием «R-ЕРОСН» в сочетании с ингибитором bcl-2 венетоклакс (NCT03036904) и также «R-ЕРОСН» с иммуномодулирующим агентом леналидомид (NCT02213913).

Как уже было упомянуто выше, коэкспрессия экспрессия c-myc и bcl-2 имеет негативное влияние на клиническое течение ДВККЛ. В исследовании Green и соавт. были продемонстрированы худшие показатели выживаемости у пациентов с DE лимфомами, получивших лечение схемой «R-СНОР» в сравнении с пациентами без экспрессии c-myc и bcl-2: 3-летняя ВБП составила 39% против 75% соответственно ( $p<0,001$ ) и трехлетняя ОВ – 43% против 86% соответственно ( $p<0,001$ ) [61]. Несмотря на неудовлетворительные результаты лечения стандартной химиотерапией «R-СНОР», данные по использованию других схем химиотерапии крайне ограничены и противоречивы, поэтому «R-СНОР», как и «R-ЕРОСН», остаются схемами выбора при лечении агрессивных ДВККЛ. Несколько

проспективных исследований в будущем могут прояснить эту ситуацию (NCT03036904 и NCT02213913). Также нет единого мнения по поводу необходимости проведения ВДХТ с АутоТКМ в качестве консолидации для пациентов, достигших полного клинического ответа после применения первой линии химиотерапии, так как результаты остаются противоречивыми [63, 89, 90].

## Глава 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа была выполнена в научном отделе инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации (на базе отделения гематологии и химиотерапии с палатой реанимации и интенсивной терапии) и в научной лаборатории морфологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Диссертационное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. В квалификационное исследование были включены сведения о 215 пациентах с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. У пациентов с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз согласно классификации ВОЗ 2008 года, диагноз был реклассифицирован согласно новым требованиям классификации ВОЗ 2017 года.

#### 2.1 Характеристика больных

В исследование были включены сведения о 215 пациентах с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Средний возраст составил  $51,29 \pm 14,55$  лет. Более половины пациентов (53%) находились в старшей возрастной группе 50-69 лет. Количество мужчин несколько превалировало над количеством женщин (54,9% против 45,1% соответственно). В-симптомы были отмечены у 74 пациентов (35,2%). В исследуемой выборке преобладали пациенты с IV стадией заболевания – 108 (50,5%). Экстранодальное вовлечение было зарегистрировано у 50 пациентов (23,6%). Первично-резистентное течение

заболевания наблюдалось у 35 пациентов (17,5%). Основные клинические характеристики пациентов с ДВККЛ представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Клиническая характеристика пациентов с ДВККЛ

Клиническая характеристика		Результат, %
Пол n=215	женщины	45,1%
	мужчины	54,9%
Возрастные группы n=214	18-29 лет	9,8%
	30-39 лет	13,1%
	40-49 лет	14,5%
	50-59 лет	31,3%
	60-69 лет	22,9%
	70-79 лет	7,5%
Наличие В-симптомов n=210	нет	64,8%
	да	35,2%
Стадия заболевания на момент постановки диагноза n=214	I стадия	15,9%
	II стадия	22,0%
	III стадия	11,7%
	IV стадия	50,5%
Первично-рефрактерное течение n=200	нет	82,5%
	да	17,5%
Экстранодальное вовлечение n=212	нет	76,4%
	да	23,6%
«Upfront-ВДХТ»+аутоТКМ n=201	нет	88,1%
	да	11,9%

Лечение по схеме химиотерапии «R-CHOP» получили 138 пациентов (71,1%). Схема «R-EPOCH» была проведена 20 пациентам (10,3%). В 5 случаях (2,5%) первой линии терапии была схема «Hyper-CVAD/MtX». Семь пациентов (3,7%) получали схему лечения без ритуксимаба. Виды схем химиотерапии, которые применялись у пациентов с ДВККЛ, представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Виды химиотерапии, используемые у пациентов (n=194)

Схема режима химиотерапии	Результат, %
«R-CHOP» (n=138)	71,1%
«R-EPOCH» (n=20)	10,3%
«R-Hyper-CVAD/MtX» (n=5)	2,5%
«CHOP» (n=7)	3,7%
«Ауто-ТКМ+ВДХТ» (n=24)	12,3%
Итого	100%
Примечание – n – количество пациентов.	

## 2.2 Обследование больных

Перед началом лечения пациентам проводилось полное обследование согласно действующими рекомендациями по лечению и диагностике ДВККЛ [7]. Во всех случаях обязательным являлось гистологическое и ИГХ исследование патологического очага, полученного путем эксцизионной биопсии или иного хирургического вмешательства.

### 2.2.1 Клиническое обследование больных

Клиническое обследование включало в себя: физикальный осмотр, сбор анамнеза, оценка клинического течения заболевания (в т.ч. наличие или отсутствие В симптомов). Среди лабораторных исследований обязательными были:

- клинический анализ крови с микроскопией мазка;
- биохимический анализ крови (АЛТ, АСТ, общий билирубин, ЛДГ, общий белок, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, креатинин, мочевины, мочевая кислота);

- коагулограмма;
- общий анализ мочи;
- определение группы крови и резус фактор;
- RW, HIV, ВГВ, ВГС;
- люмбальная пункция.

Методы инструментальной диагностики включали в себя:

- компьютерную томографию (КТ) органов шеи, грудной клетки, брюшной полости и малого таза;
- трепан-биопсию и аспирационную биопсию костного мозга с последующим цитологическим и гистологическим исследованием;
- электрокардиограмму;
- эхокардиограмму;
- фиброгастродуоденоскопию.

В ряде случаев также выполнялись остеосцинтиграфия, магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ).

Соматический статус определялся согласно шкале ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, Zubrod, WHO):

1. Пациент активен так же, как и до заболевания; нет ограничений в физических нагрузках.
2. Тяжелая физическая активность ограничена, легкая или сидячая работа выполняется без дополнительного напряжения.
3. Пациент обслуживает себя самостоятельно, но другие виды физической активности выполняет с трудом, проводя в постели менее 50% дня.
4. Пациент затрудняется обслуживать себя самостоятельно, нуждается в помощи, проводит в постели более 50% дня.
5. Не способен к самообслуживанию, прикован к инвалидному креслу или к постели.

## **2.2.2 Стадирование пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой**

Стадирование ДВККЛ осуществлялось по системе Ann Arbor (таблица 7), разработанной в Лугано в 1974 году для лимфомы Ходжкина и модифицированное в 1988 году. Данная система стадирования сфокусирована на количестве локализаций, пораженных опухолью (нодальные и экстранодальные) [7].

Таблица 7 – Стадия заболевания. Классификация Ann Arbor (1971) с пересмотром Costwolds (1989).

Стадия I	Одна лимфатическая зона или один экстралимфатический орган вовлечены в патологический процесс. Одна лимфатическая зона может включать в себя один или анатомическую группу лимфоузлов
Стадия II	Две и более лимфатические зоны по одну сторону диафрагмы вовлечены в патологический процесс или экстранодальным поражение нелимфоидного органа (ПЕ)
Стадия III	С обеих сторон диафрагмы наблюдается поражение лимфатических зон, с возможным вовлечением селезенки (ПИС) и/или экстранодальным поражением
Стадия IV	Диффузное или диссеминированное вовлечение внелимфатических органов, таких как печень, легкие, костный мозг
Для всех стадий	
A	• Отсутствие В-симптомов
B	Наличие одного или более таких симптомов, как: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Лихорадка выше 38° С не менее трех дней подряд</li> <li>• Ночные профузные поты</li> <li>• Потеря массы тела более 10% от массы тела за последние 6 месяцев</li> </ul>
E	• Локализованное экстранодальное поражение (при ППЕ стадиях)
S	• Поражение селезенки
X	Массивное опухолевое поражение – более 10 см в диаметре или медиастинально-торакальный индекс 7 более 1/3

### ***2.2.3 Морфологическое, иммуногистохимическое и молекулярно-генетическое исследования***

В диссертационное исследование были включены данные о 215 пациентах с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДВККЛ), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Пациентам с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз согласно классификации ВОЗ (2008), была выполнена согласно новым требованиям классификации ВОЗ 2017 года.

Морфологическое, ИГХ и молекулярно-генетическое исследования гистологических препаратов были произведены в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Морфологический вариант опухоли оценивался при окраске гематоксилином и эозином. Во время ИГХ анализа была оценена экспрессия ряда маркеров и уровень пролиферативной активности Ki-67 (%) (характеристика антител, применяемых в исследовании, таблица 8). Большинству пациентов были выполнены окраски в рамках Hans-алгоритма, который включает в себя маркеры CD10, tum1, bcl6, с использованием общепринятых критериев их оценки (> 30%, > 70%, > 30% соответственно).

Таблица 8 – Характеристика антител, использованных в исследовании

№	Анти-тело	Клон	Производи-тель	Наименование	Время инкубации	Титр	Система визуализации	Обработ-ка
1	bcl-2	124	ДАКО	Антитела моноклональные мышинные к человеческому BCL2 Онкопротеин, клон 124	30 мин	1:75	EnVision Flex	TRS 9,0
2	bcl-6	PG-B6p	ДАКО	Антитела моноклональные мышинные к человеческому BCL6 Протеин, клон PG-B6p	40 мин	1:50	UltraOptiView DAB	CCI/72
3	mum-1	Mum1p	ДАКО	Антитела моноклональные мышинные к человеческому BCL6 Протеин, клон PG-B6p	30 мин	1:300	EnVision Flex	TRS 9,0
4	CD3	MRQ-39	CMQ	Кроличьи поликлональные антитела к CD 3 – CD 3 Rabbit Polyclonal Antibody – фл., конц. (мл) 0,1	30 мин	1:500	EnVision Flex	TRS 9,0
5	CD5	SP19	CMQ	Кроличьи моноклональные антитела к CD 5 – CD 5 Rabbit Monoclonal Antibody – фл., конц. (мл) 0,1	30 мин	1:50	EnVision Flex	TRS 9,0
6	CD10	NCL-L-CD10-27-	Leica	Моноклональные мышинные антитела к CD 10, 1 мл, NCL-L-CD10-270	30 мин	1:75	EnVision Flex	TRS 9,0
7	CD19	EP169	CMQ	Антитела к CD 19 - Rabbit Monoclonal; EP169; 1 мл, концентрат	30 мин	1:50	EnVision Flex	TRS 9,0

Продолжение таблицы 8

№	Анти-тело	Клон	Производи-тель	Наименование	Время инкубации	Титр	Система визуализации	Обработ-ка
8	CD20	L26	DAKO	Антитела моноклональные мышинные к человеческому CD20су, клон L26	30 мин	1:200	EnVision Flex	TRS 6,0
9	CD30	Ver-H1	DAKO	Антитела моноклональные мышинные к человеческому CD 30, клон Ver-H2	30 мин	1:40	EnVision Flex	TRS 9,0
10	CD79a	JCB117	DAKO	Антитела моноклональные мышинные к человеческому CD 79P, клон JCB117	30 мин	1:200	EnVision Flex	TRS 9,0 (можно TRS 6,0)
11	Ki-67	MIB-1	DAKO	Антитела моноклональные мышинные к человеческому Ki-67 Антиген, клон MIB-1	30 мин	RTU	EnVision Flex	TRS 9,0
12	p53	клон DO7	DAKO	Антитела моноклональные мышинные к человеческому p53 Протеин, клон DO-7	30 мин	1:100	EnVision Flex	TRS 6,0
13	Pax-5	SP34	CMQ	Кроличьи моноклональные антитела к PAX-5 - PAX-5 Rabbit Monoclonal Antibody – фл., конц. (мл) 0,1	30 мин	1:100	EnVision Flex	TRS 9,0
14	Циклин D1	SP4	DBS	Антитела кроличьи моноклональные к циклину D1, Rabbit anti Cyclin D1	30 мин	1:100	Novolink Real	TRS 9,0

Окраска препаратов ИГХ методом проводилась согласно стандартной операционной процедуре ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России К-1.2.1. Процедура ИГХ окраски осуществлялась на автоматизированном приборе – иммуногистостейнере BenchMark ULTRA Ventana с использованием коммерческих реактивов и стандартных протоколов производителя.

### **Протокол процесса ИГХ метода окраски**

1. Стекла с монтированными на них срезами ткани помещали в термостат (60° С) на 30 минут.
2. Переносили немедленно в свежий ксилол на 5 минут.
3. Повторяли процедуру в п. 2 с новой порцией ксилола.
4. Помещали в изопропиловый спирт (абсолют) на 5 мин.
5. Повторяли процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).
6. Повторяли процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).
7. Повторяли процедуру в п. 4 с новой порцией изопропилового спирта (абсолют).
8. Промывали в дистиллированной воде 3-5 мин.
9. Помещали стекла в 3% раствор пероксида водорода на 5 мин.
10. Промывали в дистиллированной воде 3-5 мин.
11. Переносили стекла в водяную баню на 30 мин в зависимости от протокола к антителу использовали соответствующий буфер для демаскировки и температурный режим: а) Dako Cytomation Target Retrieval Solution (pH 6, ×10) при 98-99° С, б) TRIS-EDTA Retrieval Buffer (pH 9, ×10) при 96-97° С.
12. Промывали дистиллированной водой 5 мин.
13. Переносили в промывочный TBS-буфер (pH 7.6, ×20) на 5-15 мин.
14. Наносили 100-300 мкл раствора антитела с соответствующим титром (см. таблицу 5) в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.

15. Повторяли процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.
16. Повторяли процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.
17. Наносили вторичное антитело, связанное с активационным реагентом, EnVision FLEX HRP, инкубировали при комнатной температуре 30 мин.
18. Повторяли процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.
19. Повторяли процедуру в п. 13 с новой порцией промывочного TBS-буфера.
20. Проводили визуализацию диаминобензидином (DAB) при комнатной температуре 200-600 мкл 5-10 мин.
21. Промывали в дистиллированной воде 3-5 мин.
22. Проводили докраску ядер клеток Гематоксилином Майера.
23. Дистиллированная вода 2 мин.
24. Промывочный TBS-буфер (pH 7.6, ×20) 2 мин.
25. Дистиллированная вода 2 мин.
26. Изопропиловый спирт 2 мин.
27. Изопропиловый спирт 2 мин.
28. Изопропиловый спирт 2 мин.
29. Изопропиловый спирт 2 мин.
30. Ксилол 2 мин.
31. Ксилол 2 мин.

#### ***Детализованный протокол депарафинизации***

1. Помещали стекла в термостат (60° C) на 30 минут.
2. Переносили немедленно в свежий ксилол на 5 минут.
3. Повторяли процедуру в п. 2 с новой порцией ксилола.
4. Помещали в 96% этиловый спирт на 2 мин.
5. Помещали стекла в раствор 85% этилового спирта на 2 минуты.
6. Помещали стекла в раствор 70% этилового спирта на 2 минуты.
7. Промывали в дистиллированной воде.
8. Повторяли процедуру в п. 7 с новой порцией дистиллированной воды.
9. Не давая стеклам высохнуть, сразу перемещали стекла в буфер для демаскировки и перейти к протоколу демаскировки.

***Детализованный протокол демаскировки***

1. Заполняли контейнер достаточным количеством раствора для демаскировки так, чтобы раствор покрывал стекла, перенесли в термостат и установили температуру равную 95-99° С.
2. Помещали стекла в кассетах в предварительно нагретый раствор для демаскировки (SSC), накрыли контейнер крышкой и инкубировали стекла в течение 15 минут после того, как вода достигнет необходимой температуры.
3. Извлекали контейнер из бани и охладили содержимое при закрытой крышке в течение 20 минут при комнатной температуре.
4. Промывали в дистиллированной воде.
5. Повторяли процедуру в п. 4 с новой порцией дистиллированной воды.
6. Не давая стеклам высохнуть, переходили к предварительной ферментативной обработке реагентом Пепсин: наносили 3-5 капель реагента и инкубировать 5-15 мин при 37° С.
7. Промывали стекла в буферном растворе или раствором  $1 \times \text{PBS} + 1\% \text{ ПФА} + 50 \text{ mM MgCl}_2$ , 5 мин.
8. Повторяли промывку дистиллированной водой, 1 мин.
9. Помещали в 70% этиловый спирт на 1 мин.
10. Помещали стекла в раствор 85% этилового спирта на 1 мин.
11. Помещали стекла в раствор 96% этилового спирта на 1 мин.
12. Сушили стекла при комнатной температуре.

***Детализованный протокол обработки антителом***

1. Наносили 10 мкл ДНК-зонда в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.
2. Немедленно покрывали место нанесения покровным стеклом размером 22 мм × 22 мм. Избегать образования воздушных пузырьков под покровным стеклом.
3. Вдоль краев покровного стекла наносили полимерный клей.

4. Помещали стекла в гибридайзер с программой нагрева: для процесса денатурации  $75^{\circ}\text{C}$  в течение 5 мин, для процесса гибридизации –  $37^{\circ}\text{C}$ , 20 часов.

#### ***Детализованный протокол пост-гибридизации и закрепления***

1. Удаляли полимерного клея и погружали стекла в промывочный буферный раствор ( $2\times\text{SSC}$ ) до удаления покровных стекол при  $37^{\circ}\text{C}$ , 1-3 мин. Буферный раствор должен быть прогрет до погружения в него стекол.
2. Заполняли контейнер достаточным количеством промывочного цитратного буферного раствора так, чтобы раствор покрывал стекла, перенести в термостат и установить температуру равную  $69^{\circ}\text{C}$  и поместить стекла в кассетах в предварительно нагретый промывочный цитратный буферный раствор, накрывали контейнер крышкой и инкубировать стекла в течение 10 минут.
3. Помещали стекла в кассетах в предварительно нагретый промывочный цитратный буферный раствор, накрывали контейнер крышкой и инкубировать стекла в течение 5 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .
4. Повторяли процедуру п. 2 с новой порцией подогретого до  $37^{\circ}\text{C}$  буферного раствора.
5. Помещали в 70% этиловый спирт на 1 мин.
6. Помещали стекла в раствор 85% этилового спирта на 1 мин.
7. Помещали стекла в раствор 96% этилового спирта на 1 мин.
8. Высушивали стекла при комнатной температуре в темноте.
9. Наносили 10 мкл раствора флуоресцентного красителя (DAPI) в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.
10. Немедленно покрывали место нанесения покровным стеклом размером 22 мм х 22 мм, избегая образования воздушных пузырьков под покровным стеклом.
11. Вдоль краев покровного стекла наносили полимерный клей.

### ***Оценка уровня экспрессии белков в опухолевой ткани***

Оценка экспрессии белков c-тус и bcl-2 осуществлялась с учетом опубликованных рекомендаций для маркеров. Применялись те же пороговые значения: c-тус>40% и bcl-2>50%. Пороговыми значениями для p-53 считались >75%, bcl-6 и CD10>30% [28, 72, 118, 127].

Клоны антител, использованные в настоящей работе, были идентичны.

## **2.3 Схемы лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой**

В подавляющем большинстве случаев в первой линии полихимиотерапии пациенты получали «СНОР»-подобные схемы с ритуксимабом («R-СНОР», «R-ЕРОСН»). В ряде случаев пациентам из группы высокого риска после курсов «R-СНОР» и «R-ЕРОСН» выполнялась ВДХТ в первой линии терапии с последующей аутоТКМ.

### **Схемы химиотерапии**

#### **«R-СНОР»**

- Ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> День 0 или День 1
- Преднизолон 100 мг внутрь, День 1-5
- Доксорубин 50 мг/м<sup>2</sup> в/в кап., День 1
- Винкристин 1,4 мг/м<sup>2</sup> в/в День 1 (суммарно не более 2 мг)
- Циклофосфамид 750 мг/м<sup>2</sup> в/в кап., День 1

Курс проводится 1 раз в 21 день, очередное начало курса на 22 день.

#### **«R-ЕРОСН»**

- Ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> в/в, день 0 или День 1
- Преднизолон 60 мг/м<sup>2</sup> 2 раза в день внутрь, дни 1-5 25

- Этопозид  $50 \text{ мг/м}^2$  /сут. в/в, дни 1-4
- Доксорубин  $10 \text{ мг/м}^2$  /сут. в/в, дни 1-4
- Винкристин  $0,4 \text{ мг/м}^2$  /сут. в/в, дни 1-4
- Циклофосфан  $750 \text{ мг/м}^2$  в/в, день 5

Далее в зависимости от уровня нейтрофилов, дозы препаратов этопозид, доксорубин, циклофосфан либо повышаются на 25% (при отсутствии снижения уровня нейтрофилов ниже  $0,5 \times 10^9$  /л, тромбоцитов ниже  $25 \times 10^9$  /л), либо остаются прежними (при одном или двух измерениях уровень нейтрофилов был менее  $0,5 \times 10^9$  /л, тромбоцитов выше  $25 \times 10^9$  /л), либо снижаются на 25% (при 3 и более измерениях уровень нейтрофилов менее  $0,5 \times 10^9$ , тромбоциты ниже  $25 \times 10^9$  /л).

### **Схемы для лечения рецидивов лимфом:**

#### **«ДНАР»**

- Цисплатин  $100 \text{ мг/м}^2$  в/в кап. 24-часовая инфузия, день 1
- Цитарабин  $2 \text{ г/м}^2$  в/в кап. 2 раза в день, день 2
- Дексаметазон  $40 \text{ мг}$  в/в, дни 1-4

#### **«ВЕАМ»**

- Мелфалан  $140 \text{ мг/м}^2$  День 1
- Кармустин  $300 \text{ мг/м}^2$  день 1
- Цитарабин  $800-1600 \text{ мг/м}^2$  в/в кап. День 1-4
- Этопозид  $400-800 \text{ мг/м}^2$  День 1-4

## **2.4 Критерии оценки противоопухолевого ответа**

Критерии оценки противоопухолевого ответа осуществлялись согласно российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний, дополненным в 2017 г.

### **Полная ремиссия**

2. Полное исчезновение всех проявлений заболевания: клинических симптомов, рентгенологических признаков болезни. Размеры лимфатических узлов.
3. Размеры лимфатических узлов менее 1,5 см по наибольшему диаметру, при условии того, что до начала лечения были более 1,5 см; и менее 1,0 см по наибольшему диаметру, при условии размеров до начала лечения 1,5-1,1 см.
4. Если до начала лечения печень и селезенка были увеличены, после лечения не пальпируются и рентгенологически не определяются признаки их поражения.
5. Костный мозг не поражен.
6. Достигнутый эффект лечения должен длиться не менее 2 недель

### **Неуверенная полная ремиссия**

1. Согласно инструментальным методам обследования выявляются остаточные явления опухоли, в случае сокращения опухоли  $>75\%$  от исходных размеров и отсутствие роста данных очагов в течение более 3 месяцев. По остальным критериям – достижение полной ремиссии.

### **Частичная ремиссия**

1. Уменьшение не менее чем на 50% суммы диаметров всех измеряемых очагов лимфомы.
2. Нет признаков новых очагов поражения или увеличения ранее выявленных.  
В случае исходного поражения костного мозга необходимо уточнить характеристику опухолевых клеток.

### **Лучевая терапия**

После окончания лекарственного лечения, при наличии показаний согласно российским клиническим рекомендациям по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний 2014 г. и 2017 г., пациентам проводилась лучевая терапия на резидуальную опухоль.

## 2.5 Статистический анализ

Для статистического анализа применялась программа IBMS PSS Statistics версии 17.0 с расширенным модулем для анализа выживаемости. Управление базой данных на преаналитическом этапе осуществлялось с помощью Microsoft Office Access.

Для подготовки описательного материала использовались базовые методы дескриптивной статистики.

Анализ переменных в финальной базе данных происходил с использованием методов параметрической и непараметрической статистики. Выбор статистических критериев осуществлялся с учетом типа переменных (количественные, ранговые либо номинативные) и распределения количественных переменных. Тип распределения количественных переменных определяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова и визуальной оценки гистограммы частот.

С целью поиска межгрупповых различий для нормально распределенных переменных применяли методы параметрической статистики (т-тест Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ).

Анализ межгрупповых различий для ненормально распределенных величин осуществлялся с помощью непараметрических критериев типа Манна–Уитни.

Для анализа номинативных переменных при достаточном количестве данных в базе применялся критерий хи-квадрат. В случае недостаточного объема выборки применялся тест Фишера.

Также для статистического анализа при наличии зависимой номинативной переменной использовали метод бинарной логистической регрессии с вычислением отношения шансов (ОШ) и 95% доверительных интервалов.

Различия между группами считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Поиск связи между двумя количественными величинами осуществлялся с помощью корреляции Пирсона (для нормально распределенных переменных) и ранговой корреляции Спирмена (в случае ненормального распределения) с вычислением коэффициента корреляции.

Анализ выживаемости выполнялся с помощью стандартных методик событийного анализа. С учетом того, что срок наблюдения был различным для всех пациентов, применялся стандартный для подобных исследований подход к цензурированию. Наблюдения считаются цензурированными в случае, когда зависимая переменная (ОВ или БРВ) является моментом наступления события (смерти либо рецидива), в то время как длительность исследования ограничена. Для исследования выживаемости применяли правое однократное цензурирование. Согласно общепринятой в биомедицинских исследованиях терминологии, цензурированными считали пациентов, у которых на протяжении наблюдения не произошло терминальное событие. Цензурирование осуществлялось по дате последнего контакта с пациентом. Пациенты, с которыми контакт был потерян, также цензурировались датой последнего контакта и в тексте обозначались как «потерянные для последующего наблюдения».

Графическое представление результатов анализа выживаемости Каплана–Майер с построением кривых выживаемости и вычислением медиан выживаемости. Анализ различий между группами происходил с применением тестов лог-ранк, Бреслоу, Тарона-Вэра. В случаях, когда медиана выживаемости в группах была достигнута, описание результатов проводилось с использованием медиан выживаемости. В случаях, когда медиана выживаемости в группах не была достигнута, для описания применялся 75% квартиль.

Сравнение рисков наступления событий в группах осуществлялось с помощью регрессионной модели Кокса с независимыми от времени ковариатами. Для каждой переменной было вычислено отношение рисков и 95% доверительных интервалов в унивариантном анализе. Для мультивариантного анализа отбирались взаимно независимые, не скоррелированные между собой переменные, которые оказали наиболее значимое влияние на зависимую переменную в унивариантном анализе. Для включения переменных в регрессионную модель применяли метод пошагового включения. Выбор наиболее качественной мультивариантной модели, максимально характеризующей выборку, осуществлялся на основании коэффициента псевдо-R<sup>2</sup> Нагелькерка.

### Глава 3

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1 Клиническая характеристика пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года)

Всего в исследование было включено 215 пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Средний возраст составил  $51,29 \pm 14,55$  лет. В исследуемой группе количество мужчин несколько преобладало над количеством женщин (54,9% против 45,1% соответственно). У пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года) наблюдалась следующая клиническая характеристика: В-симптомы наблюдались у 74 пациентов (35,2%), преобладали пациенты с IV стадией заболевания – 108 (50,5%), у 50 пациентов (23,6%) - экстранодальное вовлечение, а первично-резистентное течение заболевания наблюдалось у 35 пациентов (17,5%). Основные клинические характеристики пациентов с ДВККЛ были представлены в таблице 9.

Лечение по схеме химиотерапии «R-СНОР» получили 138 пациентов (71,1%). Схема «R-ЕРОСН» была проведена 20 пациентам (10,3%). В 5 случаях (2,5%) первой линии терапии была схема «Нурег-СVAD/MtX». Семь пациентов (3,7%) получали схему лечения без ритуксимаба (таблица 10).

В ряде случаев пациентам из группы высокого риска после курсов «R-СНОР» и «R-ЕРОСН» выполнялась ВДХТ в первой линии терапии с последующей аутоТКМ (n=24) (12,3%), характеристика данной подгруппы пациентов представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика пациентов (n=24) с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года), которым была выполнена ВДХТ с аутоТКМ

Клинические характеристики		Результат, %
Пол	женщины	41,7%
	мужчины	58,3%
Стадия заболевания на момент постановки диагноза	I стадия	12,5%
	II стадия	4,2%
	III стадия	,0%
	IV стадия	83,3%
МПИ	Низкий + низкий промежуточный	33,3%
	Высокий + высокий промежуточный	66,7%
Наличие В-симптомов	нет	66,7%
	да	33,3%
Экстранодальное вовлечение	нет	87,5%
	да	12,5%
ВДХТ + АутоТКМ в 1 линии терапии	нет	,0%
	да	100,0%
Первично-рефрактерное течение	нет	91,7%
	да	8,3%
ДВККЛ NOS GCB против non-GCB	non-GCB подтип	28,6%
	GCB-подтип	71,4%
ДВККЛ NOS с коэкспрессией c-myc и bcl-2	нет	50,0%
	да	50,0%
Ki-67 0-89 против 90-100	0-89	28,6%
	90-100	71,4%
Примечание – n – количество пациентов.		

### 3.2 Иммуногистохимическая и молекулярно-генетическая характеристика диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (новая классификация ВОЗ 2017 года)

В диссертационное исследование были включены сведения о 215 пациентах с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (ДВККЛ), проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. У пациентов с ДВККЛ, которым ранее установили диагноз согласно классификации ВОЗ (2008), диагноз был реклассифицирован согласно новым требованиям ВОЗ (2017).

Анализ ИГХ был выполнен 123 пациентам. Пациентам определялись как стандартные диагностические ИГХ маркеры (CD20, CD5, CD19, CD79а, PAX5) в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года, так и потенциально прогностические маркеры, входящие в Hans-алгоритм (CD10, bcl-6, tum-1), а также c-myc и bcl-2, CD30, p53.

В подавляющем большинстве случаев (96,7%) наблюдалась экспрессия CD20 (рисунки 4, 5).

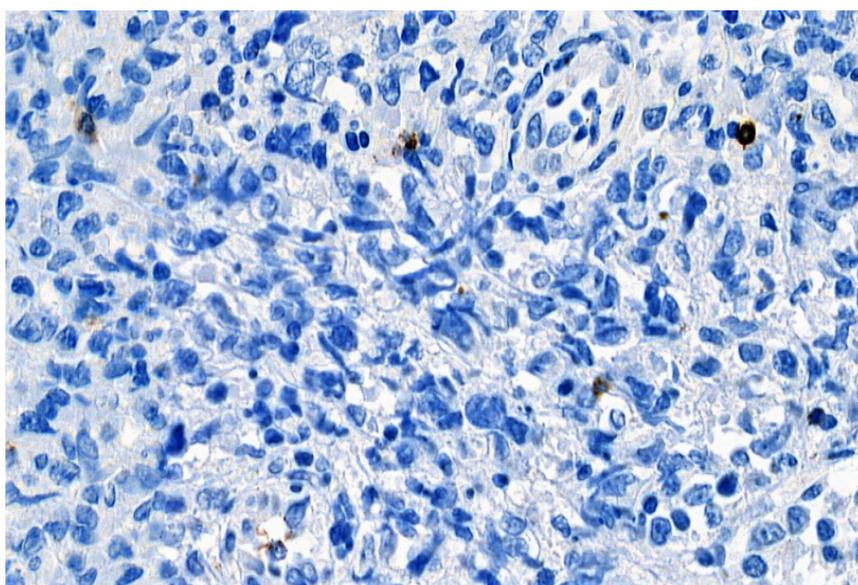


Рисунок 4 – ДВККЛ без экспрессии CD20, увеличение  $\times 45$ .

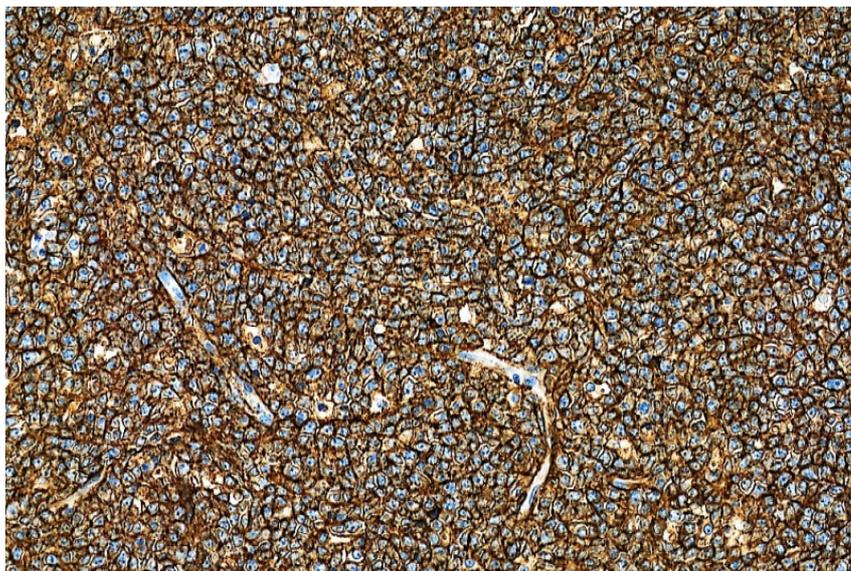


Рисунок 5 – ДВККЛ с экспрессией CD20, увеличение  $\times 20$ .

После выполнения Hans-алгоритма, non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 44 случаях (62,9%). Высокая пролиферативная активность с уровнем Ki-67  $> 89\%$  была обнаружена у 35 пациентов (48,6%). Экспрессия маркера CD10 была у 19/61 пациентов (31,1%), экспрессия bcl-2 – у 73/108 пациентов (67,6%). Большинство пациентов имели экспрессию bcl-6 – в 78 из 118 случаев (66,1%), и экспрессию ttm-1 – 19/60 (31,7%). Экспрессия c-тус была обнаружена у 21/74 пациентов (28,4%). У 21 из 71 пациентов (29,6%) наблюдалась коэкспрессия c-тус и bcl-2 (DE лимфома), 14/39 – имели одновременную экспрессию c-тус, bcl-2, bcl-6. Положительная реакция с суcln D1 наблюдалась у 4/24 пациентов (16,7%), CD5 – у 19/55 (34,5%), CD30 – у 24/66 пациентов (36,4%) (таблица 10).

Таблица 10 – Результаты ИГХ анализа ДВККЛ у пациентов, включенных в исследование

ИГХ маркеры	Результат, %
Экспрессия CD20 n=61	96,3%
Экспрессия CD10 n=61	31,1%
Экспрессия bcl-2 n=108	67,6%

## Продолжение таблицы 10

ИГХ маркеры	Результат, %
Экспрессия bcl-6 n=118	66,1%
Экспрессия tum-1 n=60	31,7%
Экспрессия c-тус n=74	28,4%
Уровень Ki-67% более 90% n=79	55,7%
Коэкспрессия c-тус и bcl-2 n=71	29,6%
Тройная экспрессия c-тус, bcl-2 и bcl-6 n=39	35,9%
Экспрессия Cyclin D1 n=24	16,7%
Экспрессия CD5 n=55	34,5%
Экспрессия CD30 n=66	34,5%
Примечание – n – количество пациентов.	

Данные о наличии транслокаций в генах BCL-2, BCL-6 и MYC у пациентов с ДВККЛ представлены в таблице 11.

Таблица 11 – FISH-характеристика ДВККЛ пациентов, включенных в исследование

Параметр	n=48	Результат, %
Транслокация в гене BCL-2	2	4,1%
Транслокация в гене BCL-6	6	12,5%
Транслокация в гене MYC	2	4,1%
Всего моно-транслокаций	10	20,8%
Double-hit лимфомы	0	0%
Примечание – n – количество пациентов.		

При анализе распределения уровня экспрессии различных ИГХ маркеров (методом Холмогорова-Смирнова и при помощи визуальной оценки гистограмм) выявлено, что во всех случаях распределение является ненормальным, в связи с чем для дальнейшего анализа будут применяться методы непараметрической статистики. Выборку в данном случае лучше характеризуют медианы и квартили, однако среднее и стандартное отклонения также было рассчитаны.

### 3.3 Оценка выживаемости без прогрессирования у пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года)

Всего в анализ ВВП было включено 187 пациентов с ДВККЛ. Медиана времени наблюдения за пациентами составила 29 месяцев. Медиана ВВП в исследуемой выборке не была достигнута, 75% квартиль составил  $32,0 \pm 11,3$  месяцев. За время наблюдения среди 187 пациентов было зарегистрировано 49 случаев рецидива заболевания (в случае достижения ремиссии) либо прогрессирования (в случае первично-рефрактерного течения). Графически данная информация представлена на рисунке 6.

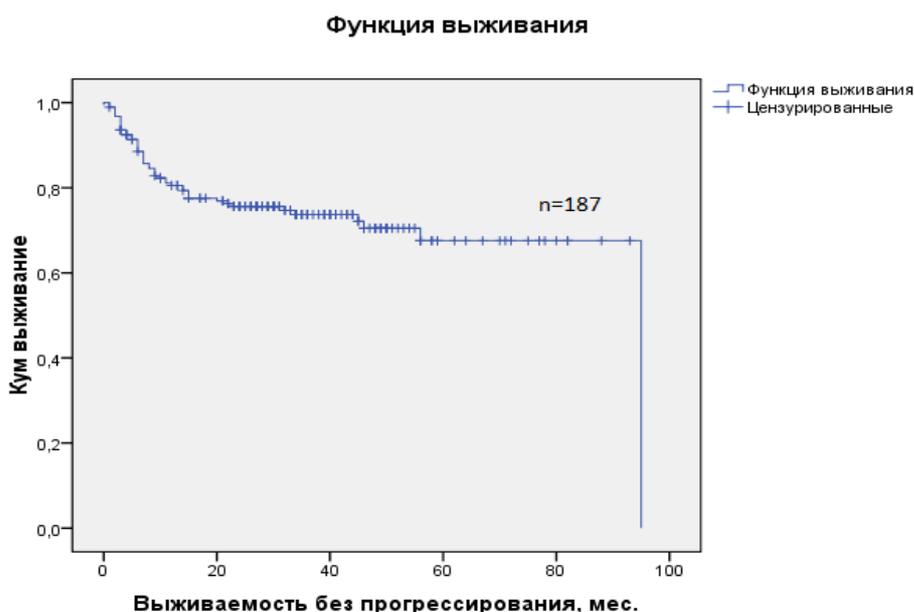


Рисунок 6 – График выживаемости без прогрессирования пациентов с ДВККЛ.

### 3.4 Унивариантный анализ выживаемости без прогрессирования пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года)

При сравнении ВБП у мужчин и женщин медиана выживаемости не была достигнута в обеих группах. 75% квартиль у женщин составил  $46,0 \pm 15,6$  месяцев против  $15,0 \pm 9,7$  месяцев в группе мужчин (рисунок 7). Статистически значимых различий получено не было: при сравнении лог-ранк тестом  $p\text{-value}=0,233$ , тестом Бреслоу  $=0,114$ .  $OR=1,422$ , 95% ДИ  $[0,792-2,511]$ ,  $p=0,112$ .

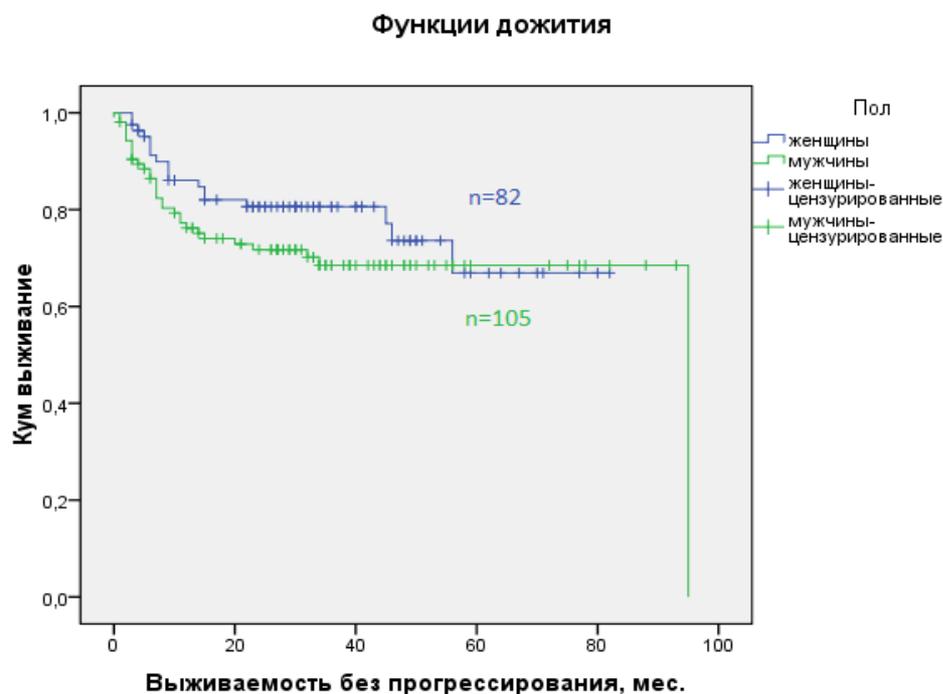


Рисунок 7 – График ВБП в зависимости от пола пациентов с ДВККЛ.

Медиана выживаемости в обеих возрастных группах (18-49 против 50-89 лет) не была достигнута. В группе пациентов 50-89 лет 75% квартиль составил  $20,0 \pm 10,8$  месяцев, в группе 18-49 лет – достигнут не был. В группе более молодых пациентов ВБП была значимо выше в сравнении с пациентами старше 50 лет,  $OR=1,889$ , 95% ДИ  $[1,002-2,776]$ ,  $p=0,050$  (рисунок 8).

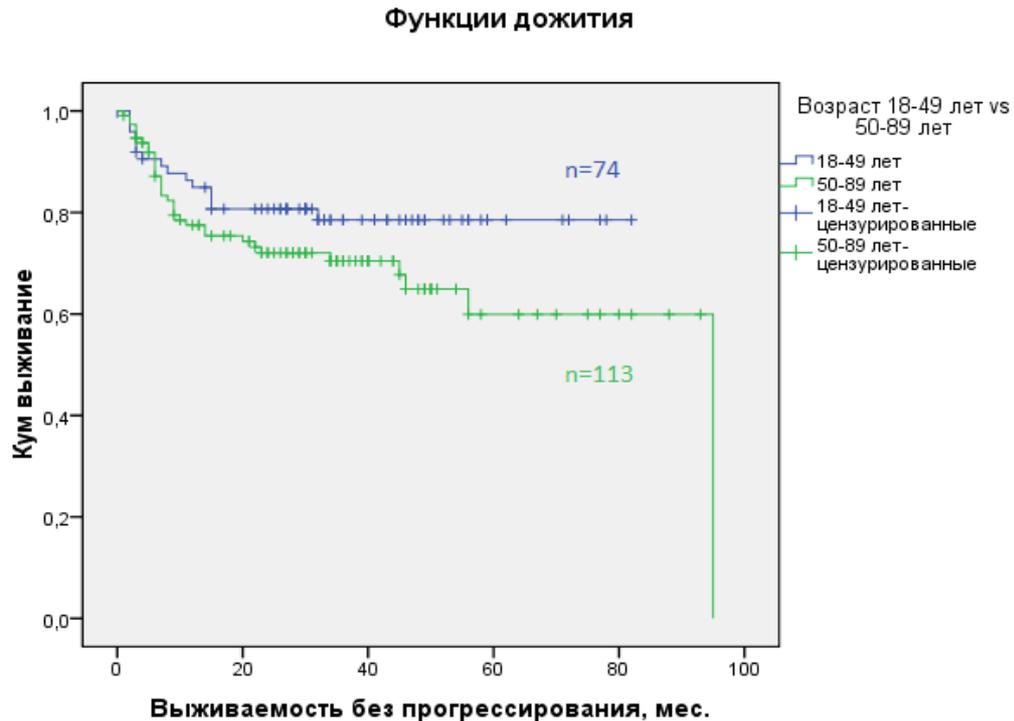


Рисунок 8 – График ВБП в зависимости от возраста пациентов с ДВККЛ.

Размеры групп с известными значениями показателя МПИ были недостаточны для полноценного анализа выживаемости. Для более наглядного представления данных пациенты с известными значениями показателя МПИ подразделялись на 2 группы риска: группа «низкий + низкий промежуточный риск» (значение МПИ 0-2 балла) и группа «высокий + высокий промежуточный риск» (значение МПИ 3-5 баллов). На рисунке 9 представлены кривые ВБП пациентов в зависимости от принадлежности к одной из двух групп риска.

При сравнении МПИ в двух группах медианы выживаемости не были достигнуты. В группе «низкий + низкий промежуточный риск» 75% квартиль составил  $46,0 \pm 8,2$  месяцев против  $45,0 \pm 9,1$  месяцев в группе «высокий + высокий промежуточный риск». При сравнении выживаемости статистически значимых различий в группах получено не было ( $OR=1,074$  [95% ДИ 0,459-2,514]  $p=0,869$ ).

При сравнении выживаемости пациентов в зависимости от наличия В-симптомов медиана выживаемости не достигнута для обоих случаев. В группе наличия В-симптомов 75% квартиль составил  $12 \pm 3,7$  месяцев против  $56 \pm 5,2$  месяцев в группе отсутствия В-симптомов (рисунок 10),  $p$ -value при сравнении

тестом Бреслоу = 0,034, Тарона-Вэра=0,043. При сравнении рисков рецидива в группах ОР=1,712, 95% ДИ [1,053-3,025], p=0,034.

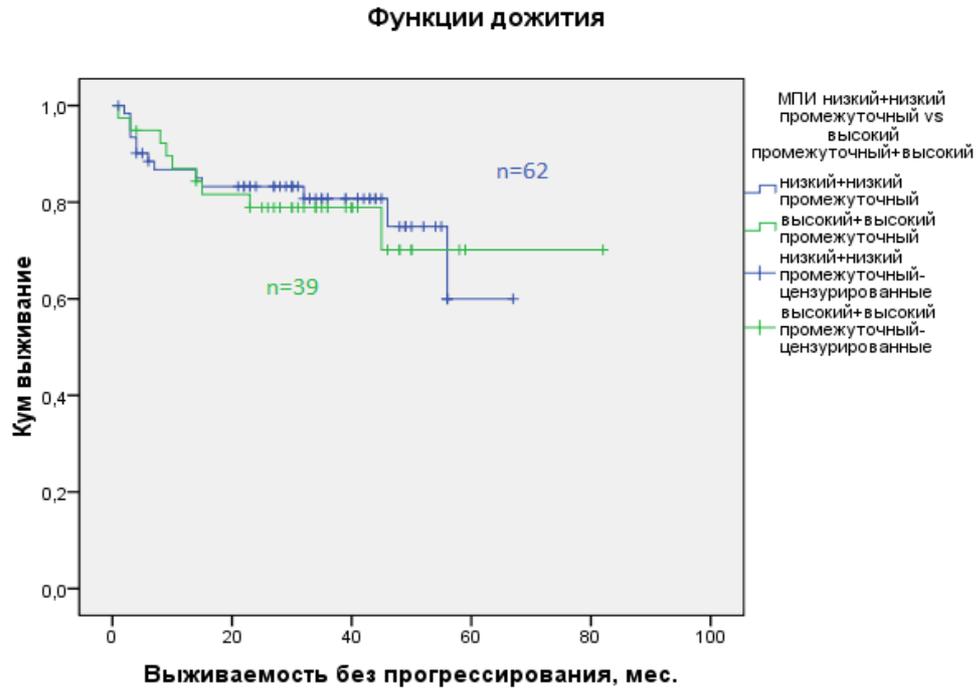


Рисунок 9 – График ВВП пациентов с ДВККЛ в зависимости от группы риска (на основании значений МПИ).

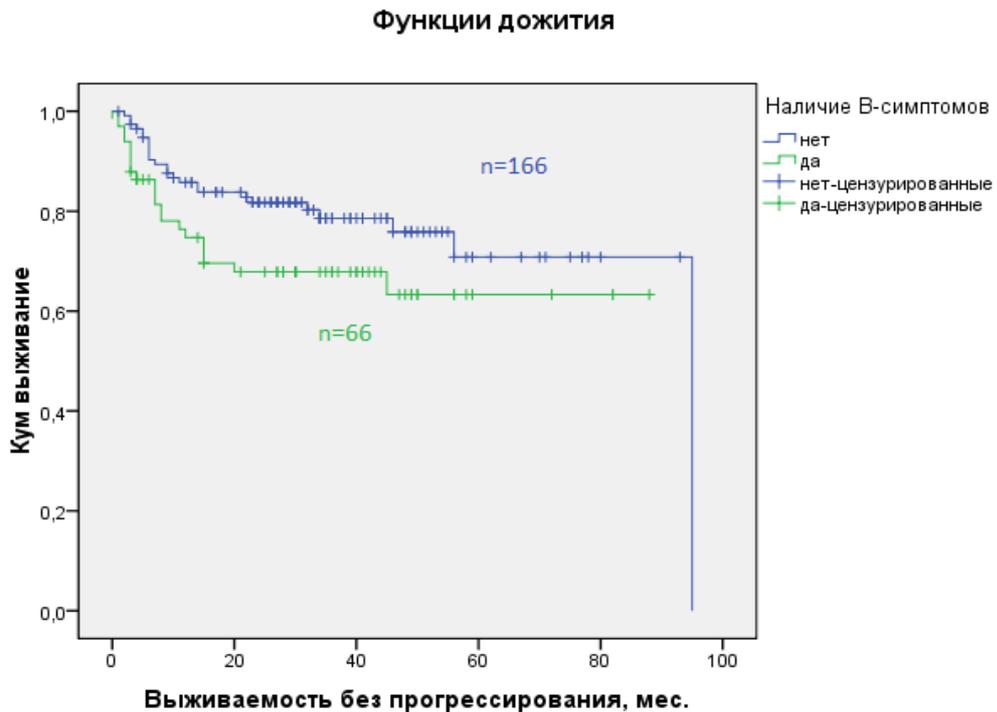


Рисунок 10 – График ВВП в зависимости от В-симптомов у пациентов с ДВККЛ.

Размеры групп при подгрупповом анализе выживаемости для каждой стадии заболевания оказались малыми, поэтому данные о пациентах были объединены в две группы – I-II и III-IV стадий (рисунок 11).

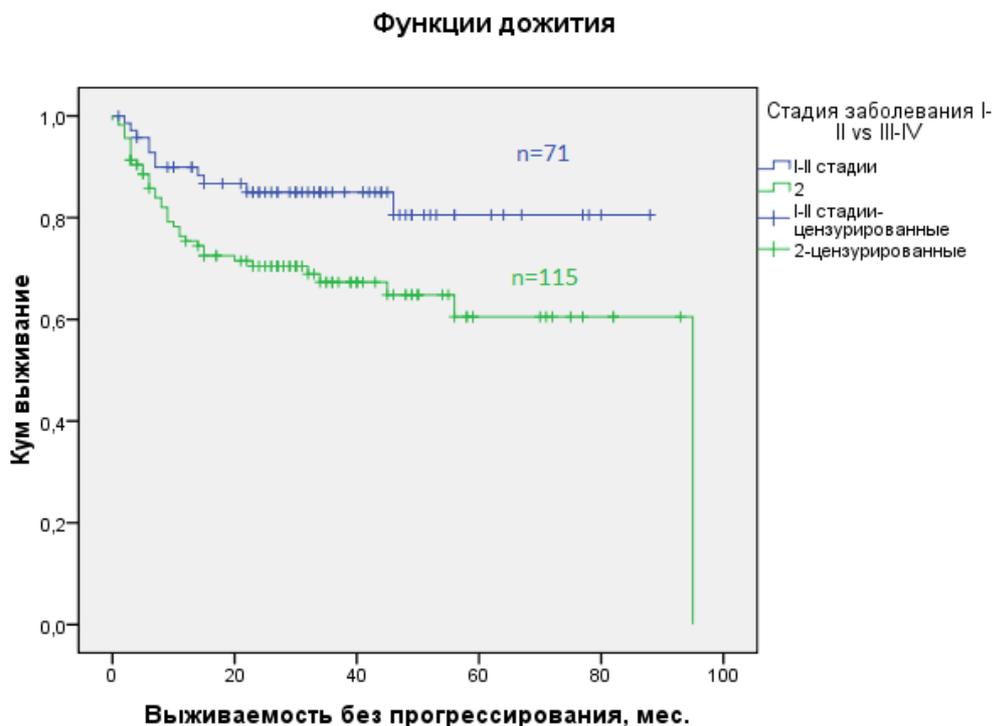


Рисунок 11 – График ВБП пациентов с ДВККЛ в зависимости от стадии.

При сравнении выживаемости в группах I-II и III-IV стадий медиана ВБП не была достигнута в обеих группах. В группе III-IV стадий 75% квартиль составил  $14 \pm 7,7$  месяцев, в группе I-II стадий – не достигнут ( $p=0,016$ ). При сравнении рисков рецидива в группах  $OR=2,241$ , 95% ДИ [1,140-4,403],  $p=0,016$ .

При унивариантном анализе выживаемости в зависимости от экстранодального вовлечения медианы ВБП в обоих случаях достигнуты не были. В группе отсутствия экстранодального вовлечения 75% квартиль составил  $32,0 \pm 11,7$  месяцев, в группе наличия – 75% квартиль достигнут не был (рисунок 12). Значимых межгрупповых различий получено не было,  $OR=0,850$ , 95% ДИ [0,410-1,761],  $p=0,661$ .

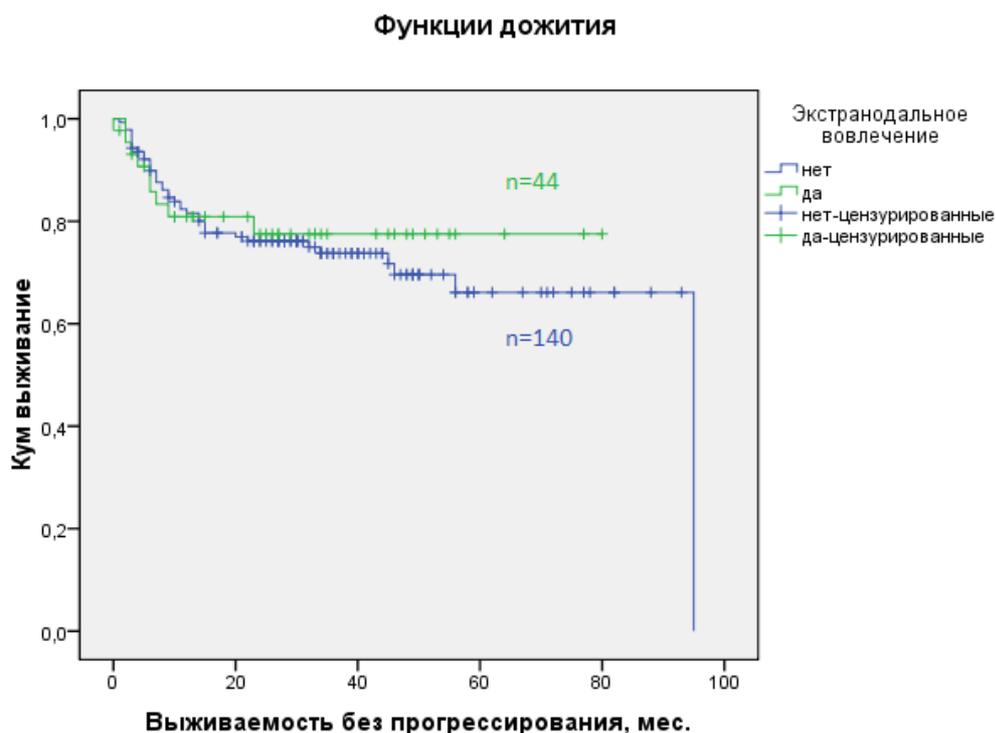


Рисунок 12 – График ВБП в зависимости от  
экстранодального вовлечения среди пациентов с ДВККЛ.

При проведении унивариантного анализа ВБП в зависимости от проведения ВДХТ с АутоТКМ в 1 линии в обоих случаях медиана выживаемости не была достигнута. В группе пациентов, которым не выполнялась ВДХТ в первой линии с последующей АутоТКМ, 75% квартиль выживаемости составил  $22,0 \pm 12,1$  месяцев, а в группе пациентов, которые получали данное лечение, 75% квартиль достигнут не был (при сравнении лог-ранк тестом  $p=0,188$ , при сравнении тестом Бреслоу  $p=0,079$ ) (рисунок 13). При сравнении рисков в группах  $OR=0,466$ , 95% ДИ [0,145-1,504],  $p=0,202$ .

Медиана ВБП в группе первично-рефрактерного течения ДВККЛ составила 5,0 месяцев (95% ДИ 0,00-11,2), в группе отсутствия первично-рефрактерного течения медиана и 75% квартиль не были достигнуты ( $p<0,001$ ):  $OR=36,678$ , 95% ДИ [17,594-76,463],  $p<0,001$  (рисунок 14).

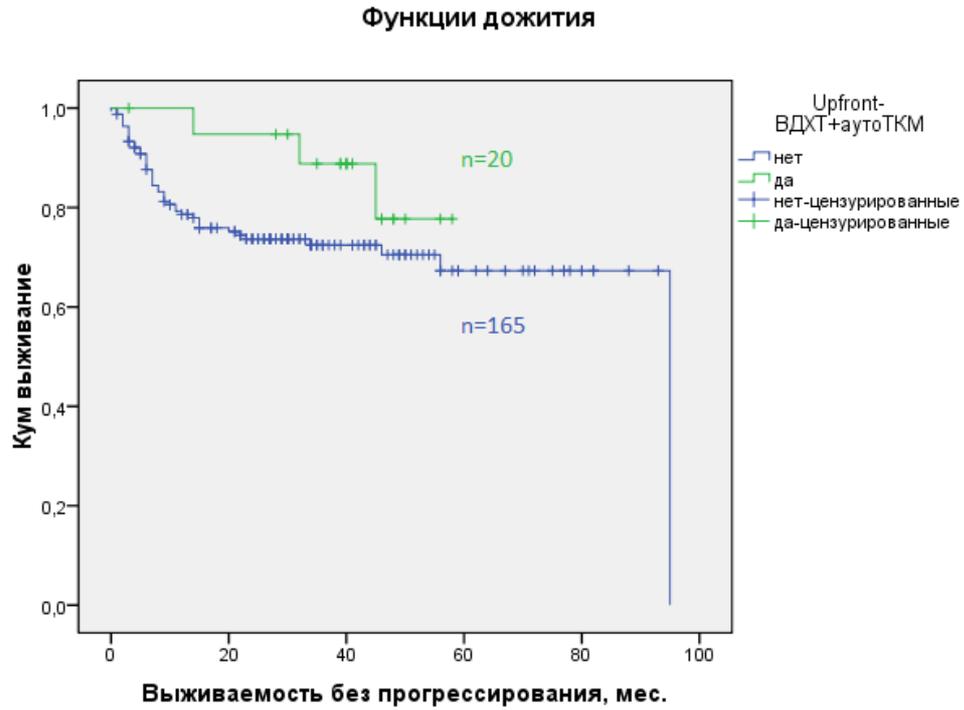


Рисунок 13 – ВБП в зависимости проведения аутоТКМ в 1 линии терапии пациентам с ДВККЛ ВДХТ.

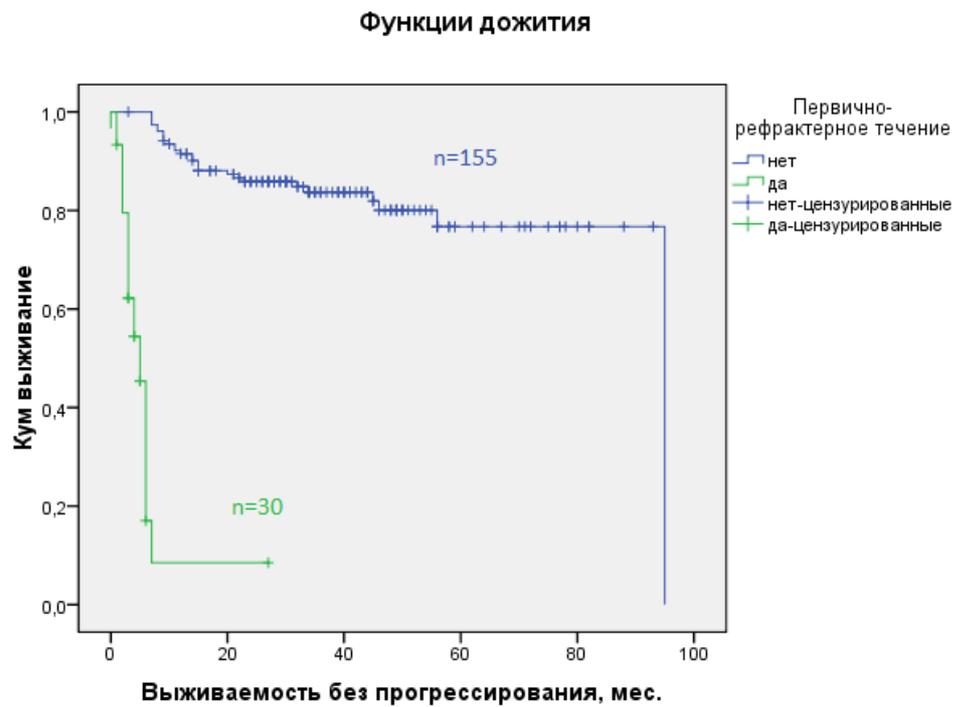


Рисунок 14 – ВБП в зависимости от наличия первично-рефрактерного течения у пациентов с ДВККЛ.

Медиана выживаемости в группе пациентов с non-GCB ДВККЛ составила 46,0 месяцев (95% ДИ 30,1-59,3), тогда как в группе с GCB ДВККЛ медиана и 75% квартиль не были достигнуты ( $p=0,171$ ), ОР=0,505, 95% ДИ [0,183-1,393],  $p=0,107$  (рисунок 15).

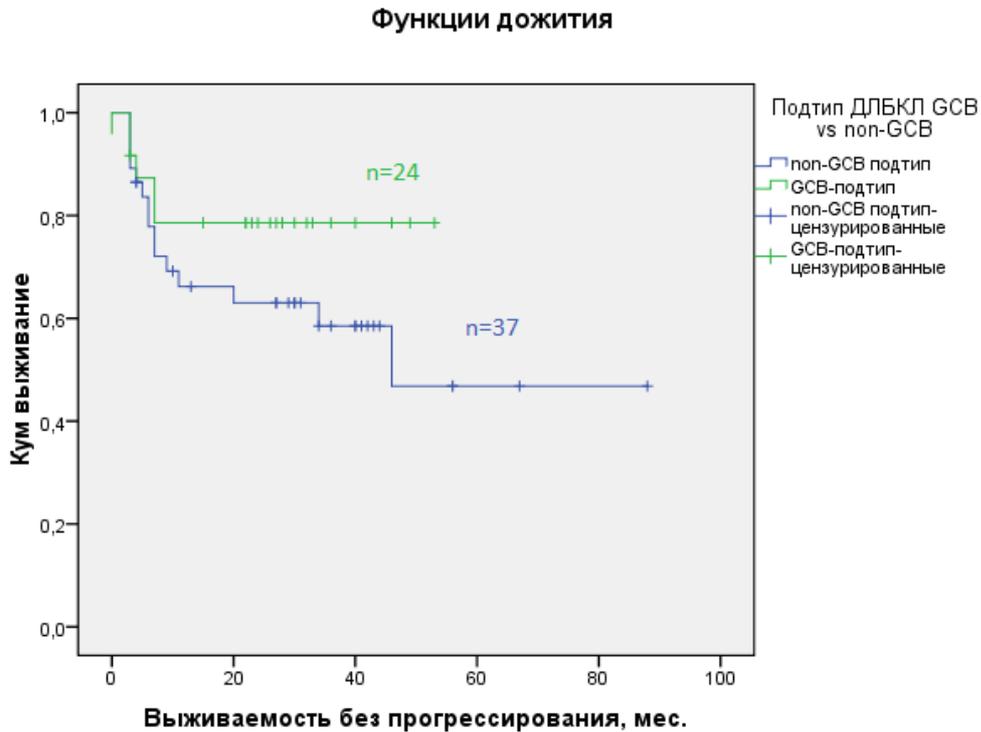


Рисунок 15 – ВБП в зависимости от подтипа ДВККЛ.

При сравнении ВБП в группах пациентов в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии CD10 (рисунки 16, 17) медиана выживаемости не была достигнута в обеих группах. 75% квартиль в группе без экспрессии CD 10 составил  $6,0 \pm 1,3$  месяца, в группе наличия экспрессии 75% квартиль достигнут не был ( $p=0,122$ ) (рисунок 18). При сопоставлении рисков рецидива в подгруппах обнаружены статистически значимые различия в ВБП между группами – пациенты с экспрессией CD10 имели меньший риск рецидива в сравнении с пациентами с отрицательной экспрессией, ОР=0,397, 95% ДИ [0,115-0,983],  $p=0,049$ .

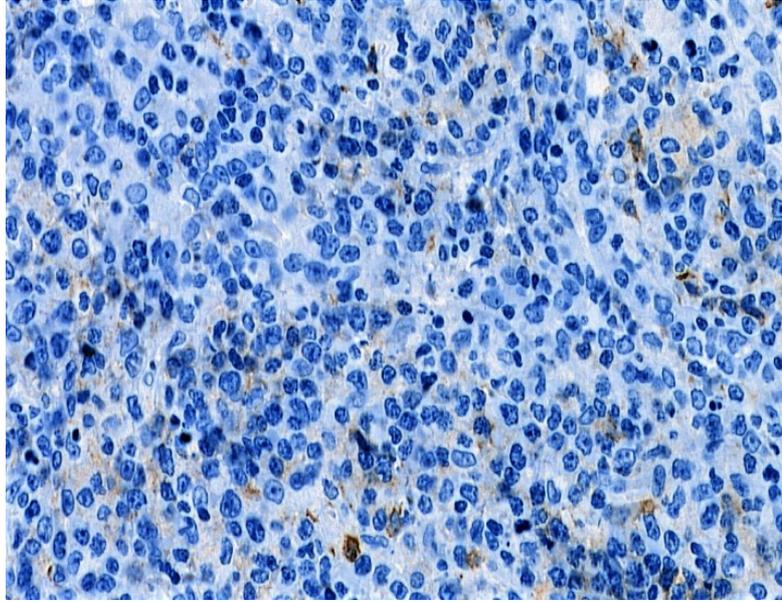


Рисунок 16 – ДВККЛ без экспрессии CD 10. Увеличение  $\times 40$ .

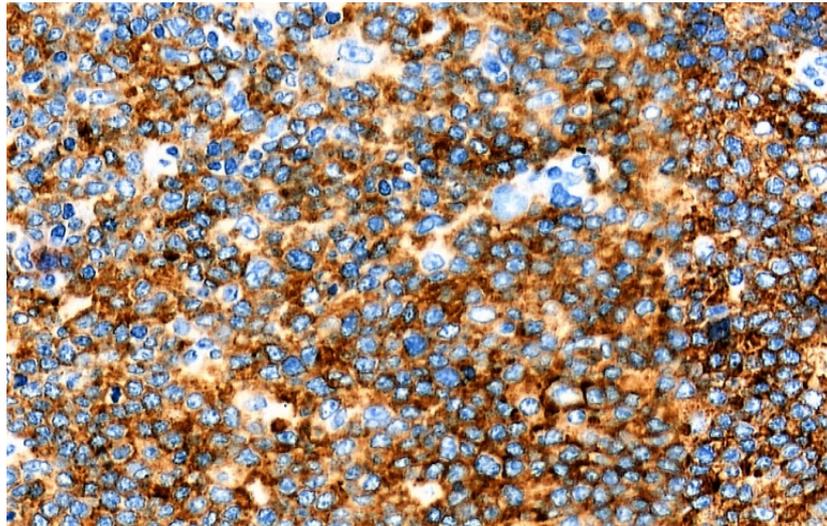


Рисунок 17 – ДВККЛ с экспрессией CD 10. Увеличение  $\times 40$ .

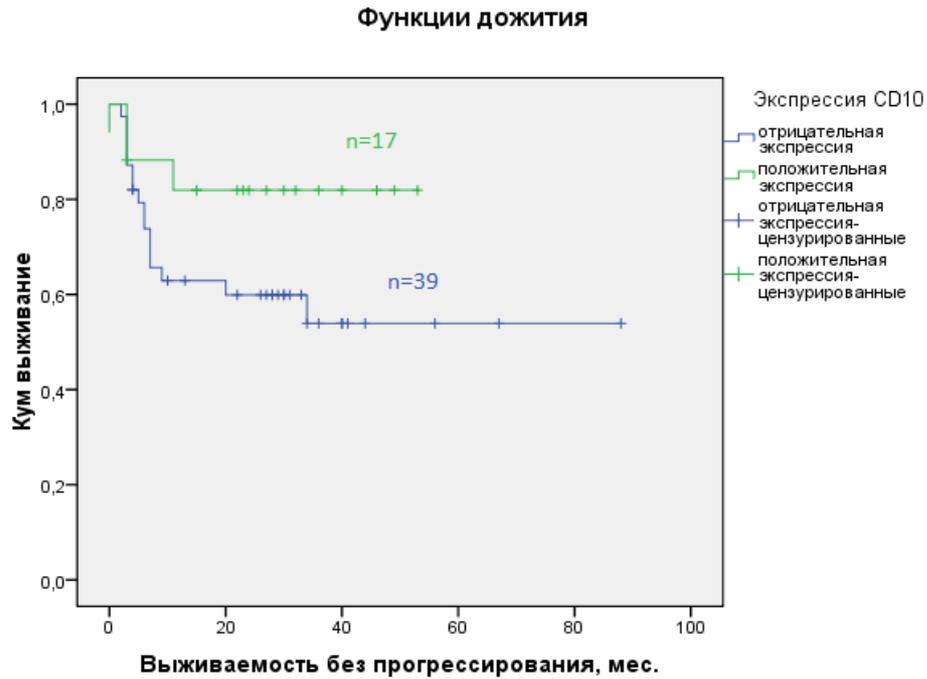


Рисунок 18 – ВБП в зависимости от экспрессии CD10  
у пациентов с ДВККЛ.

Унивариантный анализ ВБП в зависимости от экспрессии *tum-1* (рисунки 19, 20) показал, что медиана выживаемости не была достигнута в обоих случаях. 75% квартиль в группе без экспрессии *tum-1* составил  $9,0 \pm 7,9$  месяцев против  $6,0 \pm 2,6$  месяцев в группе с экспрессией ( $p=0,411$ ) (рисунок 21). При сравнении рисков в группах наличия и отсутствия экспрессии  $OR=1,467$ , 95% ДИ [0,576-3,739],  $p=0,422$ .

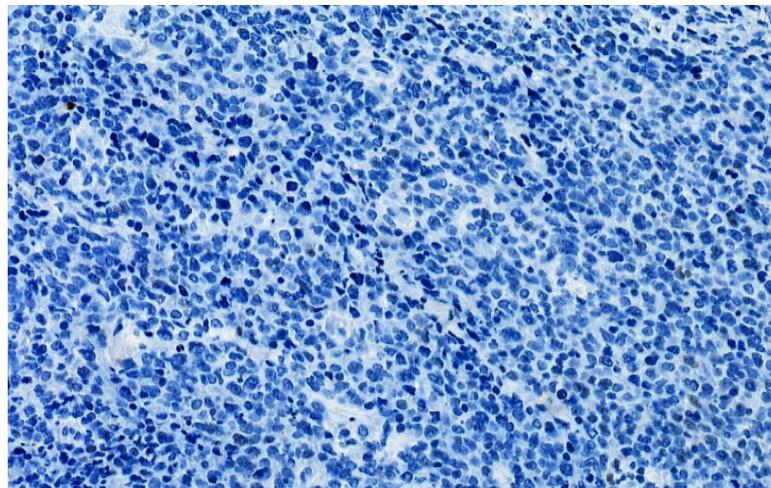


Рисунок 19 – ДВККЛ без экспрессии *tum-1*. Увеличение  $\times 25$ .

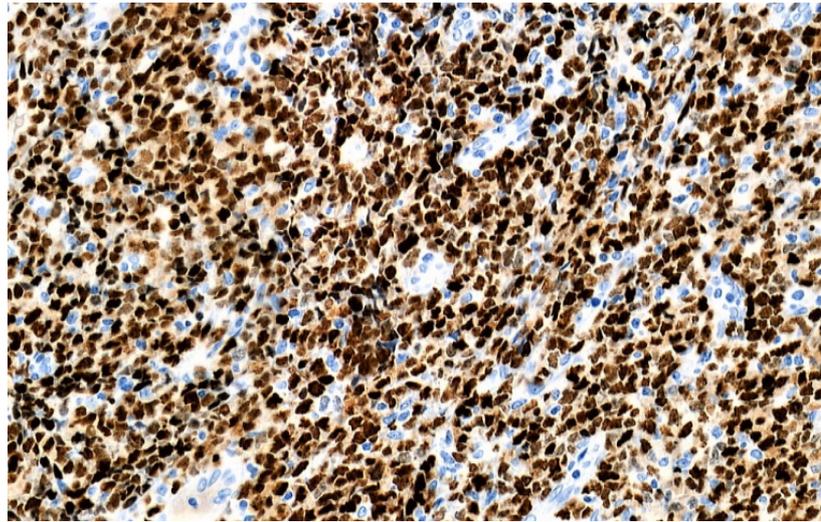


Рисунок 20 – ДВККЛ с экспрессией *mum-1*. Увеличение  $\times 25$ .

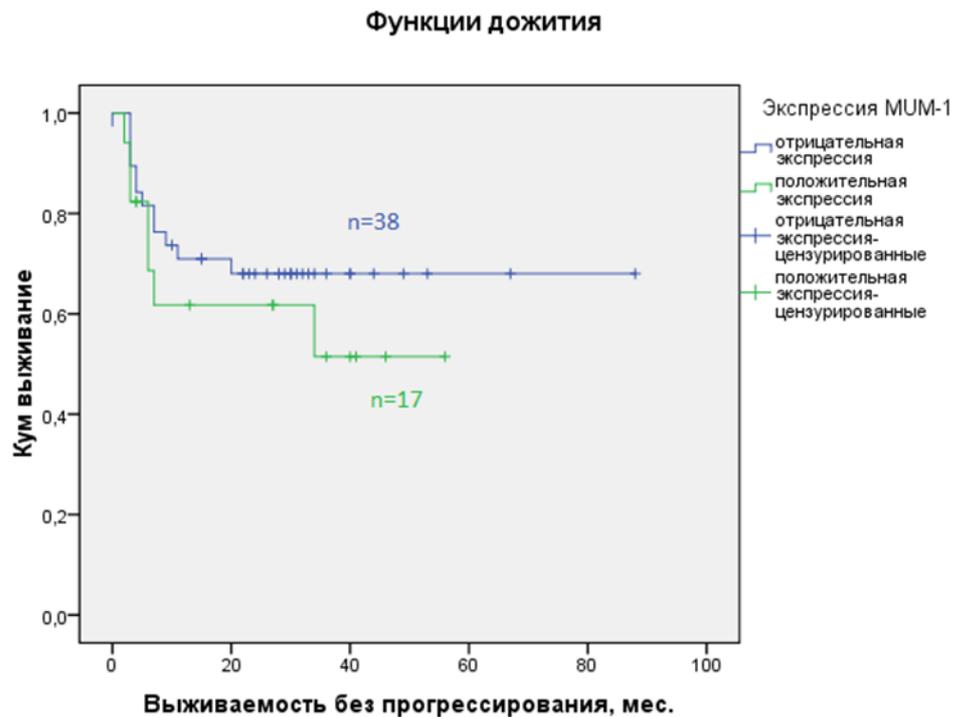


Рисунок 21 – График ВБП в зависимости от экспрессии *mum-1* у пациентов с ДВККЛ.

При сравнении ВБП в зависимости от экспрессии *bcl-6* (рисунки 22, 23) медиана выживаемости не была достигнута в обоих случаях. В группе без экспрессии 75% квартиль составил  $7,0 \pm 2,5$  месяцев против  $34,0 \pm 13,3$  месяцев в

группе с экспрессией ( $p=0,20$ ) (рисунок 24). При анализе рисков рецидива в группах  $OR=0,627$ , 95% ДИ  $[0,304-1,295]$ ,  $p=0,207$ .

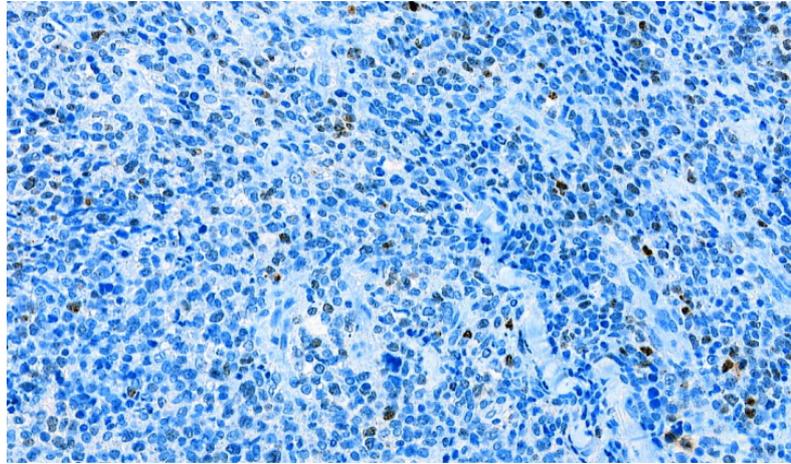


Рисунок 22 – ДВККЛ без экспрессии bcl-6. Увеличение  $\times 20$ .

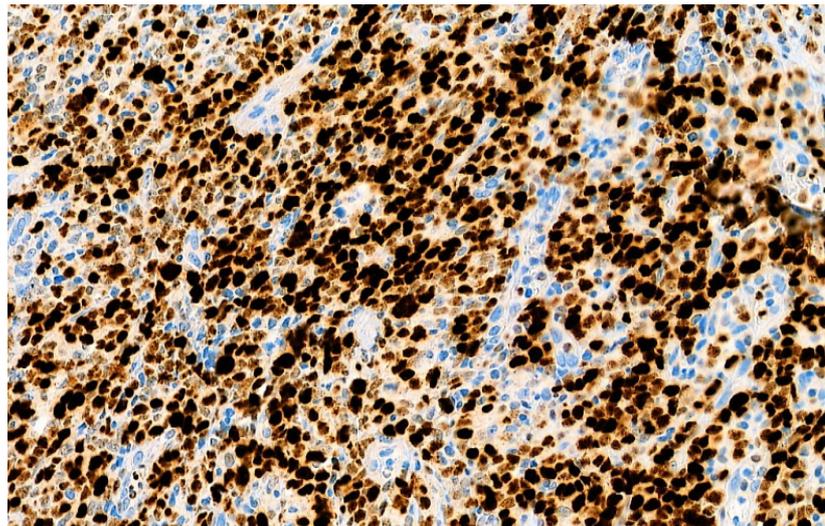


Рисунок 23 – ДВККЛ с экспрессией bcl-6. Увеличение  $\times 20$ .

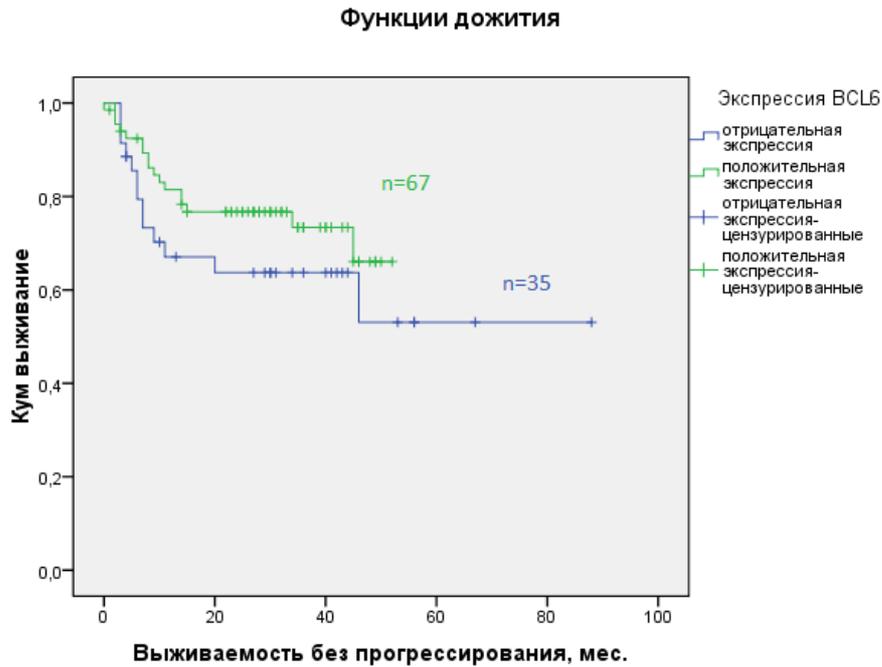


Рисунок 24 – График ВВП в зависимости от экспрессии bcl-6 у пациентов с ДВККЛ.

При анализе ВВП в зависимости от экспрессии bcl-2 (рисунки 25, 26) медиана выживаемости не была достигнута в обоих случаях. В группе без экспрессии bcl-2 75% квартиль составил  $14,0 \pm 5,1$  месяцев против  $11,0 \pm 4,2$  месяцев в группе с ее наличием ( $p=0,394$ ) (рисунок 27). При сравнительном анализе рисков рецидива в группах  $OR=1,422$  95% ДИ [0,627-3,224],  $p=0,400$ .

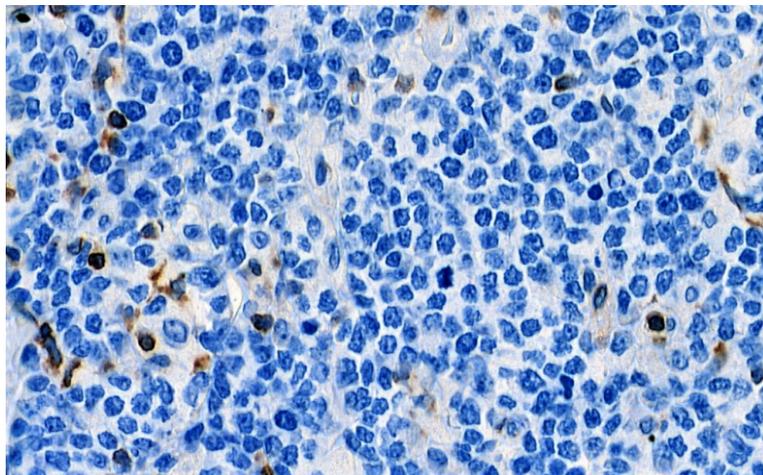


Рисунок 25 – ДВККЛ без экспрессий bcl-2. Увеличение  $\times 45$ .

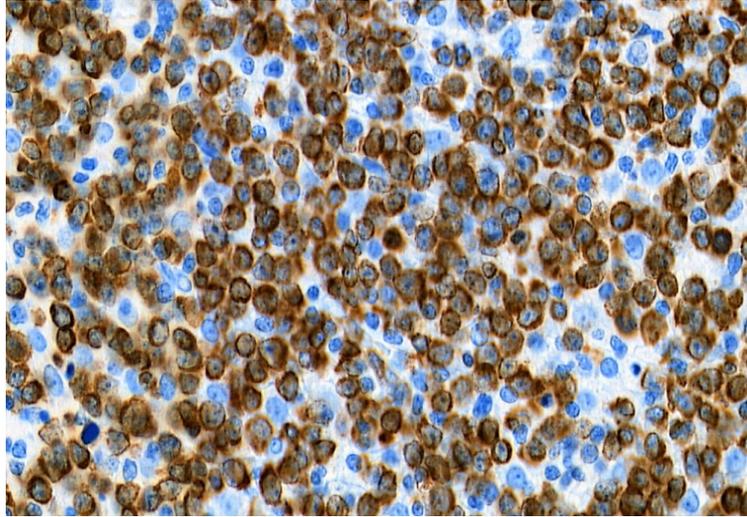


Рисунок 26 – ДВККЛ с экспрессией bcl-2. Увеличение  $\times 40$ .

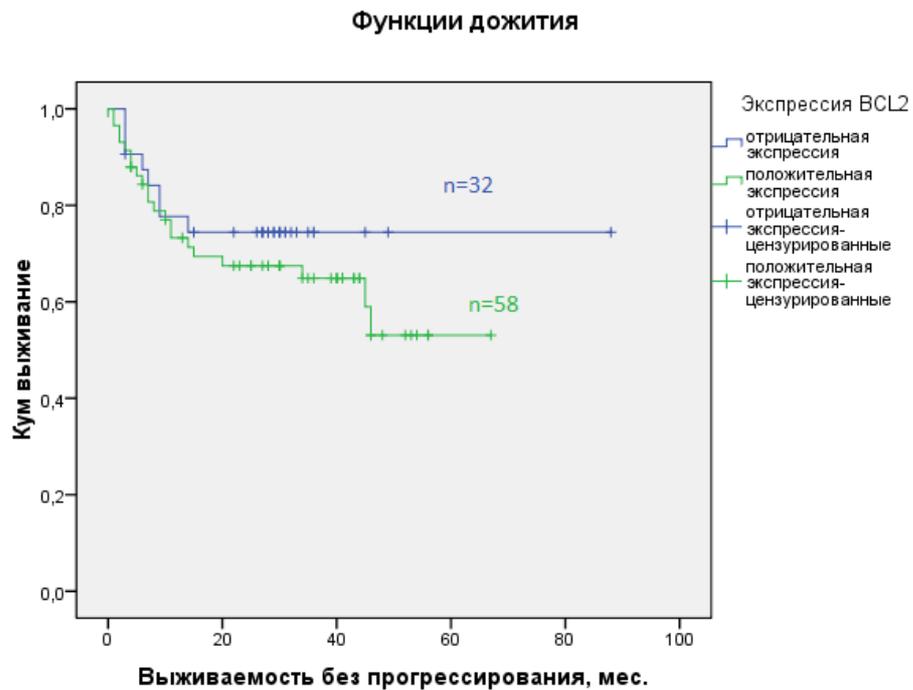


Рисунок 27 – График ВБП в зависимости от экспрессии bcl-2 у пациентов с ДВККЛ.

При анализе ВБП пациентов в зависимости от экспрессии c-myc (рисунок 28) медиана выживаемости не была достигнута в обеих группах. В группе с отсутствием экспрессии c-myc 75% квартиль составил  $7,0 \pm 2,9$  месяцев, в группе с

наличием экспрессии 75% квантиль достигнут не был ( $p=0,484$ ). При сравнении рисков  $OR=0,678$  [0,225-2,048],  $p=0,491$  (рисунок 29).

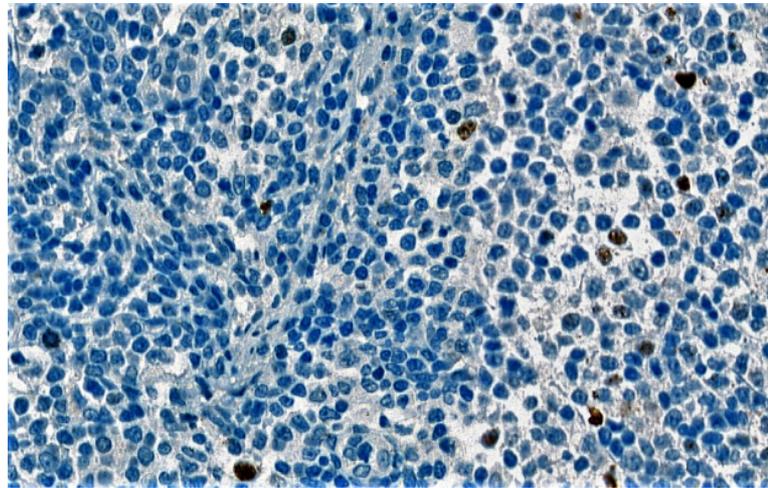


Рисунок 28 – ДВККЛ без экспрессии с-туса. Увеличение  $\times 40$ .

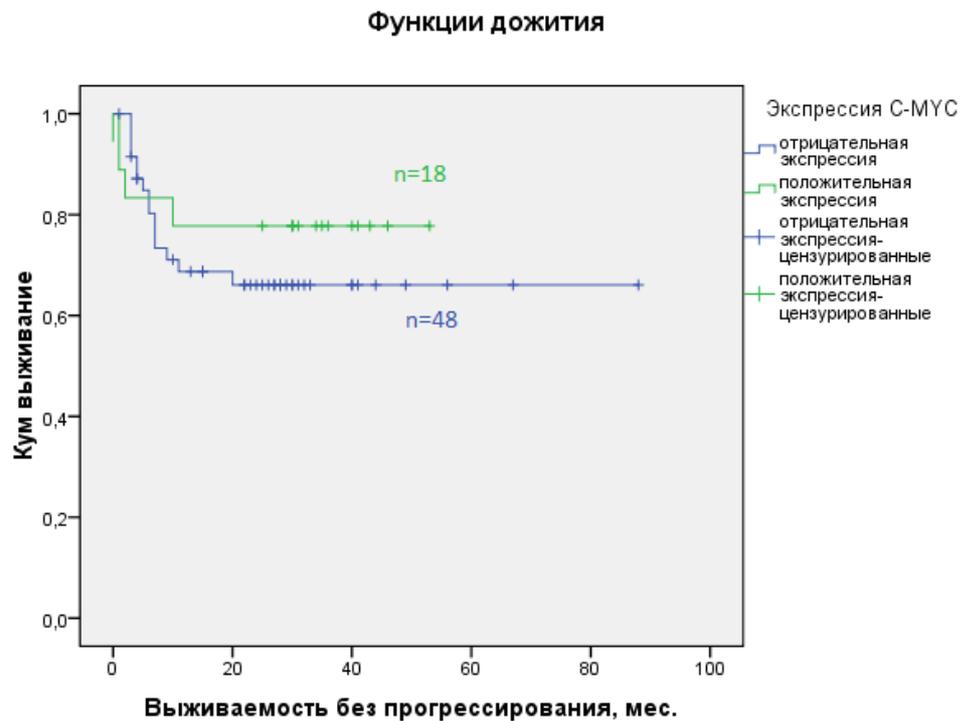


Рисунок 29 – График ВБП в зависимости от экспрессии с-туса у пациентов с ДВККЛ.

При анализе выживаемости пациентов в группах в зависимости от коэкспрессии белков с-туса, bcl-2 медиана ВБП не была достигнута. В группе

пациентов с отсутствием коэкспрессии 75% квартиль составил  $7,0 \pm 2,5$  месяцев, в группе с наличием двойной экспрессией 75% квартиль достигнут не был. Статистически значимых различий между группами обнаружено не было ( $p=0,605$ ). При сопоставлении рисков рецидива в группах  $OR=0,750$ , 95% ДИ  $[0,249-2,262]$ ,  $p=0,610$  (рисунок 30).

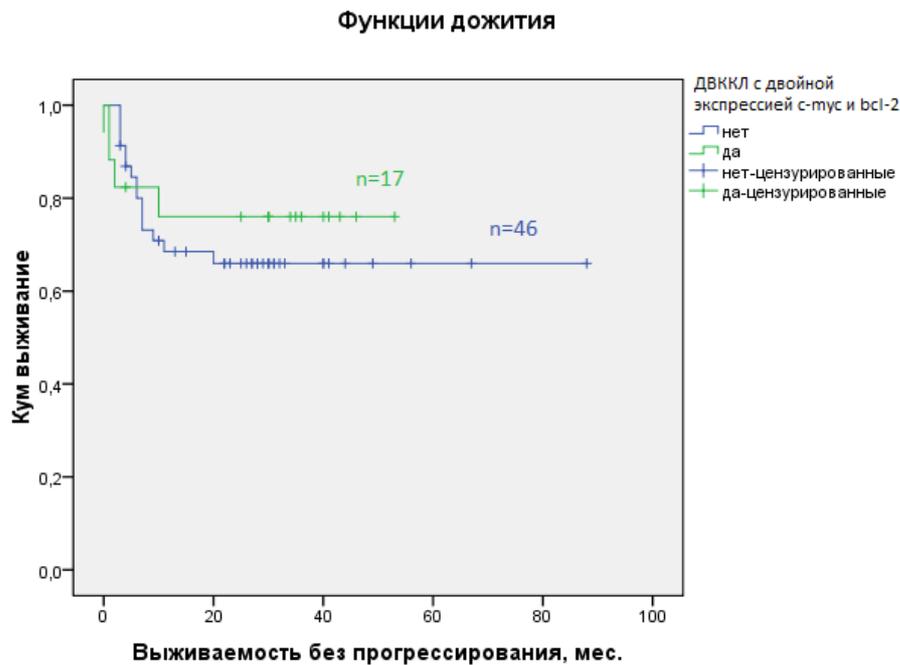


Рисунок 30 – График ВВП в зависимости от двойной экспрессии с-тус и bcl-2 у пациентов с ДВККЛ.

При анализе ВВП пациентов в группах в зависимости от наличия тройной экспрессии белков с-тус, bcl-2 и bcl-6 медиана выживаемости также не была достигнута. В группе с экспрессией с-тус, bcl-2, bcl-6 75% квартиль составил  $10,0 \pm 6,7$  месяцев, в группе пациентов без экспрессии вышеупомянутых маркеров 75% квартиль достигнут не был ( $p=0,202$ ). При анализе риска рецидива в группах  $OR=2,552$ , 95% ДИ  $[0,571-11,412]$ ,  $p=0,220$  (рисунок 31).

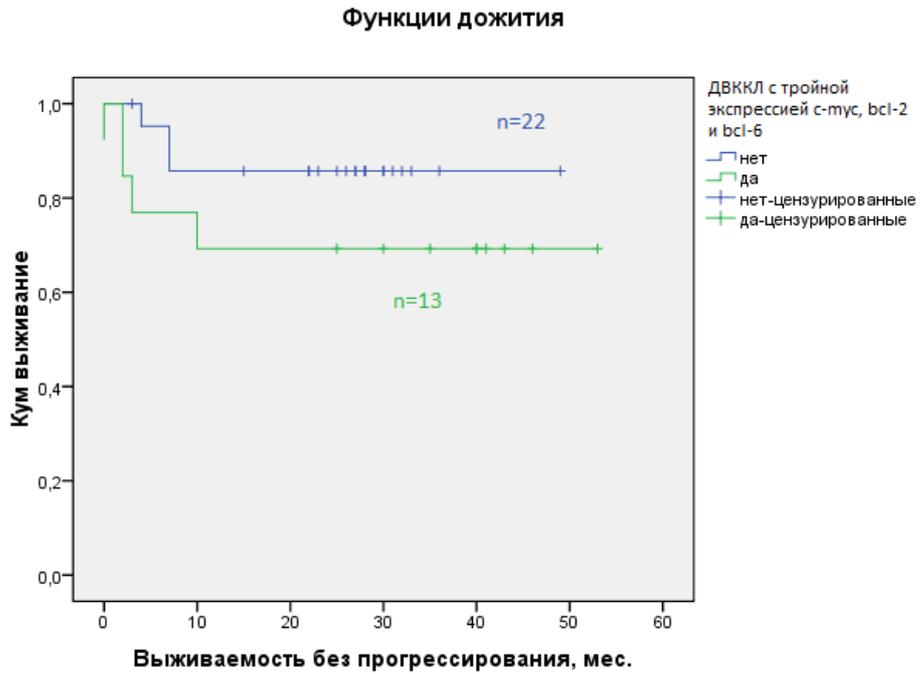


Рисунок 31 – График ВБП в зависимости от тройной экспрессии c-тус, bcl-2, bcl-6 у пациентов с ДВККЛ.

При сравнении ВБП в зависимости от экспрессии CD5 (рисунки 32, 33) медиана ВБП не была достигнута в обеих группах. В группе без экспрессии CD5 75% квартиль составил  $46,0 \pm 30,2$  месяцев против  $11,0 \pm 3,9$  месяцев в группе с экспрессией CD5 ( $p=0,189$ ); при сравнении рисков рецидива в группах  $OR=1,978$ , 95% ДИ [0,692-5,649],  $p=0,203$  (рисунок 34).

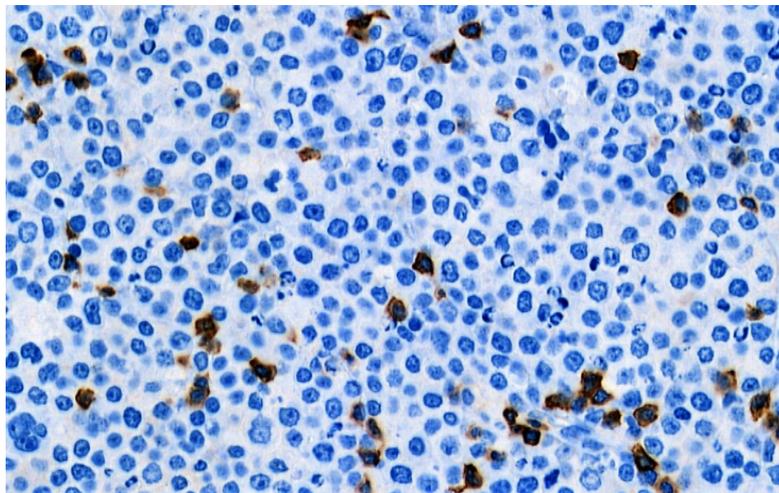


Рисунок 32 – ДВККЛ без экспрессии CD5. Увеличение  $\times 40$ .

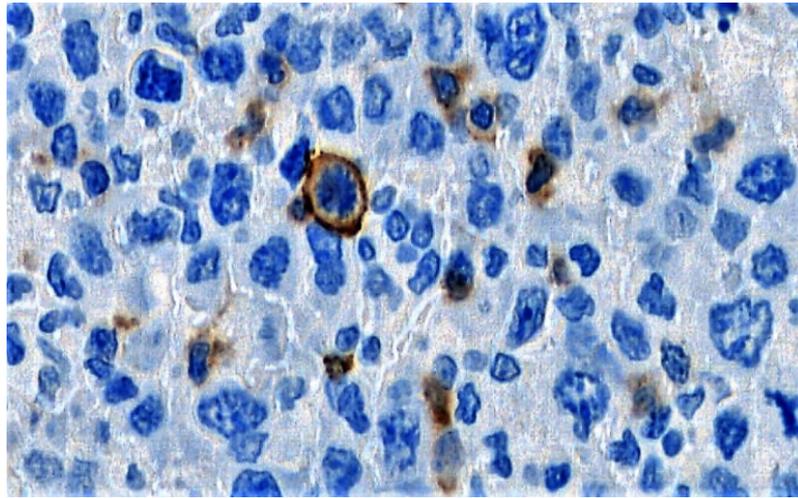


Рисунок 33 – ДВККЛ с экспрессией CD5. Увеличение  $\times 50$ .

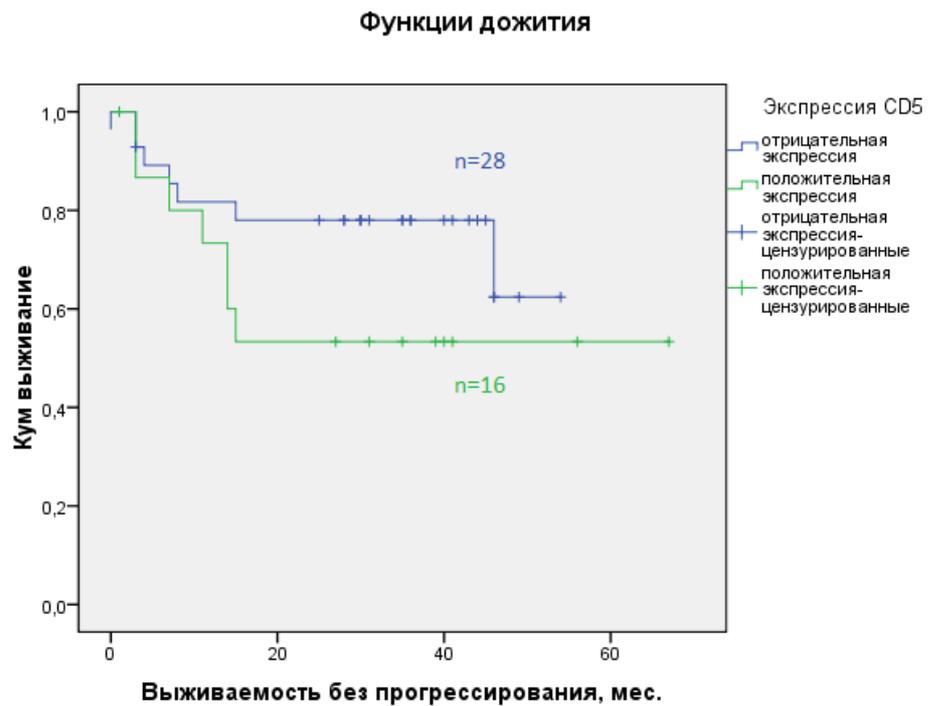


Рисунок 34 – График ВВП в зависимости от экспрессии CD5 у пациентов с ДВККЛ.

При унивариантном анализе ВВП в группах в зависимости от экспрессии CD30 (рисунки 35, 36) медиана выживаемости не была достигнута. В группе без экспрессии CD30 75% квартиль составил  $15,0 \pm 12,2$  месяцев против  $32 \pm 23,4$  месяца

в группе с экспрессией ( $p=0,798$ ), при сравнении рисков в группах  $OR=1,113$ , 95% ДИ  $[0,430-2,983]$ ,  $p=0,801$ (рисунок 37).

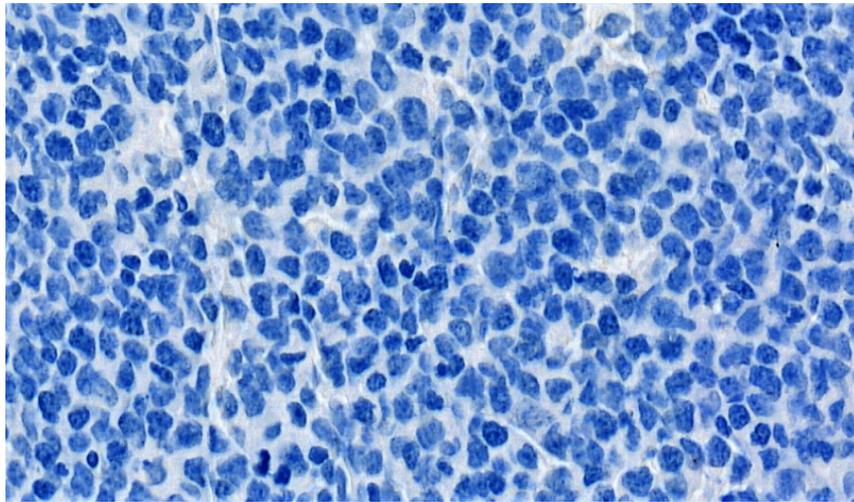


Рисунок 35 – ДВККЛ без экспрессии CD30. Увеличение  $\times 50$ .

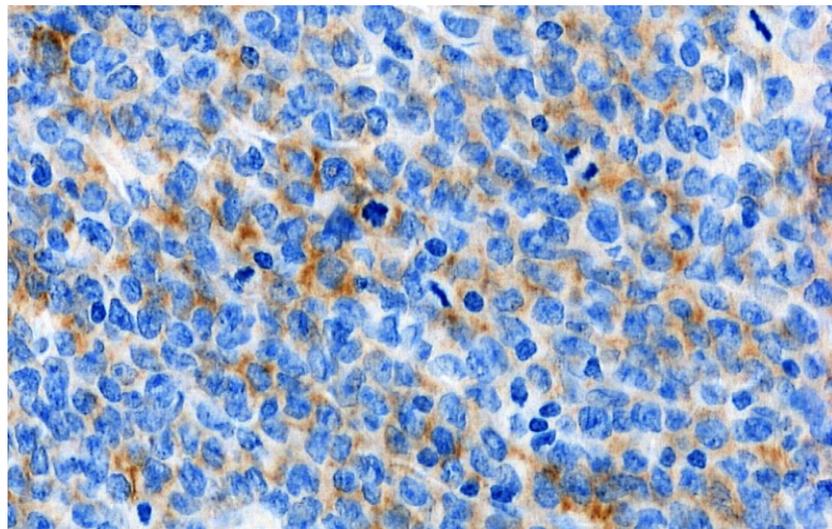


Рисунок 36 – ДВККЛ с экспрессией CD30. Увеличение  $\times 50$ .

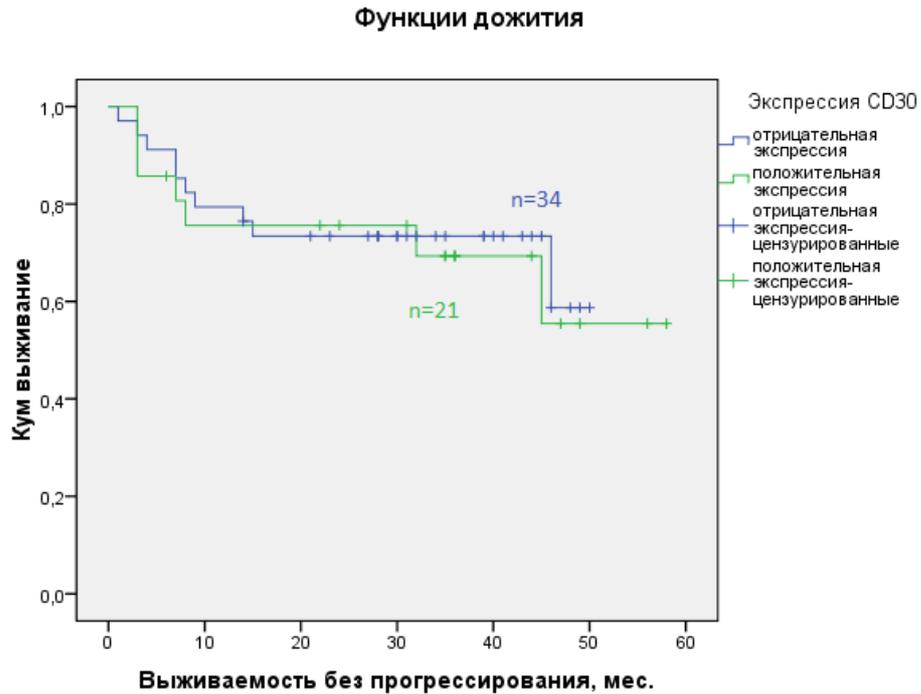


Рисунок 37 – График ВБП в зависимости от экспрессии CD30 у пациентов с ДВККЛ.

При оценке ВБП в зависимости от уровня экспрессии Ki-67 (0-89% против 90-100%) (рисунок 38) пациенты с более высоким уровнем Ki-67 имели несколько менее благоприятный прогноз (OR=1,483, 95% ДИ [0,453-4,862], p=0,215), но статистически значимых различий обнаружено не было.

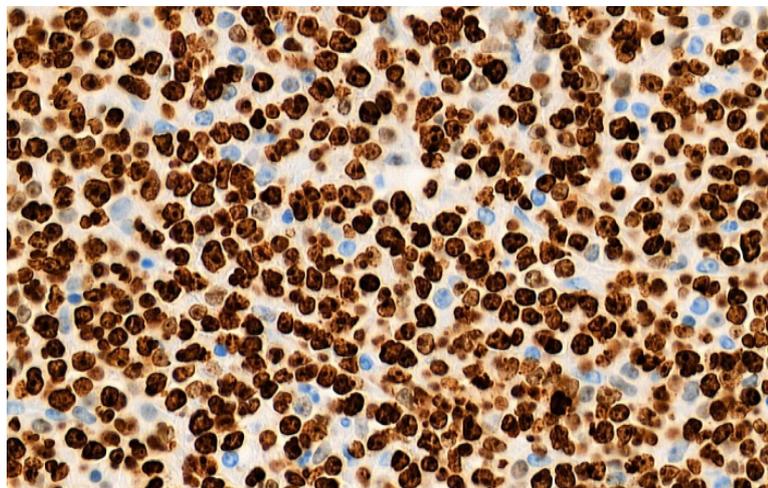


Рисунок 38 – ДВККЛ, в которой значение Ki-67 более 90%. Увеличение  $\times 40$ .

Медиана выживаемости не были достигнуты в обеих группах: 75% квартиль ВБП в группе со значениями Ki-67 в диапазоне 90-100% составил 15 месяцев (рисунок 39). Пороговое значение Ki-67 = 90% для разделения пациентов на группы выбрано по результатам ROC-анализа для работы с зависимыми от времени предикторами.

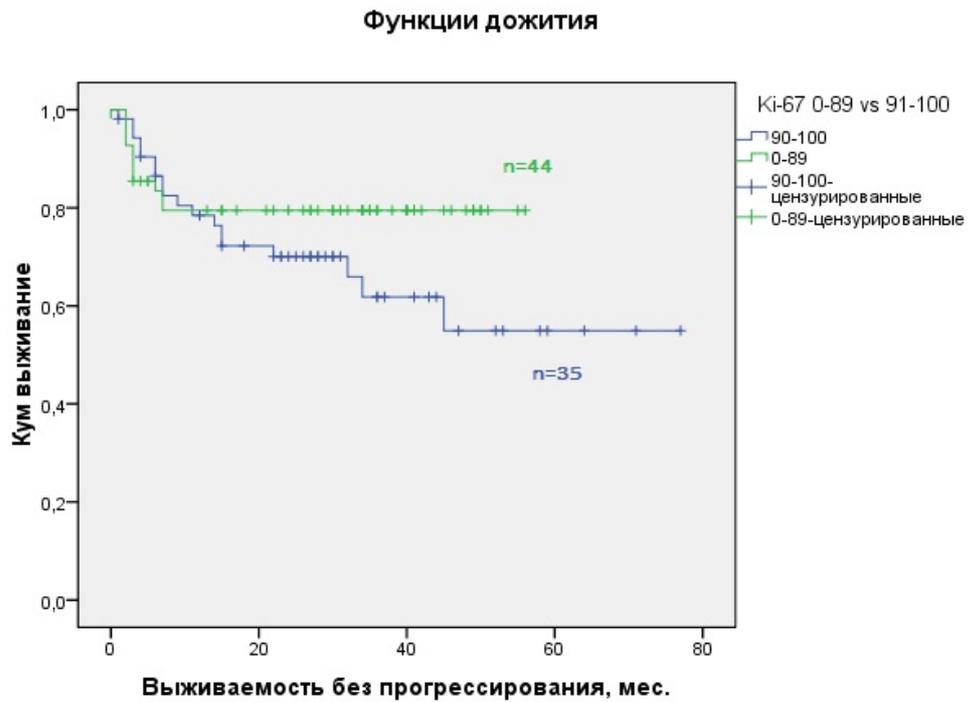


Рисунок 39 – График ВБП в зависимости от уровня экспрессии Ki-67 у пациентов с ДВККЛ.

Возможно, недостаточная выраженность некоторых тенденций отчасти связана с тем, что по отношению к различным пациентам, включенным в выборку, изначально практиковались различные терапевтические подходы в зависимости от степени агрессивности заболевания, и пациенты с более агрессивными лимфомами получали интенсивные схемы лечения – «R-ЕРОСН» либо ВДХТ с АутоТКМ в 1 линии терапии. Для назначения того или иного лечения учитывалась принадлежность к GCB/non-GCB подтипам, коэкспрессия с-тус и bcl-2, уровень Ki-67, степень распространенности заболевания. Этот факт мог несколько нивелировать потенциальные межгрупповые различия.

Таким образом, при унивариантном анализе на ВБП у пациентов с ДВККЛ достоверно влияли наличие у пациента В-симптомов, (ОР=1,712, 95% ДИ [1,053-3,025],  $p=0,034$ ), распространенная стадия заболевания (ОР=2,241, 95% ДИ 2,241 [1,140-4,403],  $p=0,016$ ), первично-резистентное течение заболевания (ОР=36,678, 95% ДИ [17,594-76,463],  $p<0,001$ ).

### 3.5 Мультивариантный анализ выживаемости без прогрессирования пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года)

В мультивариантный анализ были включены взаимно нескоррелированные переменные. Включение переменных осуществлялось прямым пошаговым методом. Выбор наиболее адекватной модели базировался на показателях коэффициентов Кокс-Шнель и Нагелькерке. Получившаяся прогностическая мультивариантная модель обладает достаточным качеством (таблица 12).

Таблица 12 – Результаты унивариантного и мультивариантного анализа факторов, влияющих на выживаемость без прогрессирования у пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой (новая классификация ВОЗ 2017 года)

Параметр	Унивариантный анализ		Мультивариантный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p-value	ОР (95% ДИ)	p-value
Пол				
Женщины	1,000	0,112*	–	–
Мужчины	1,422 [0,792-2,511]			
Возраст				
18-49 лет	1,000	0,050*	–	–
50-89 лет	1,889 [1,002-2,776]			
МПИ				
Низкий+низкий	1,000	0,869	–	–
промежуточный				
Высокий	1,075 [0,459-2,514]			
промежуточный+высокий				

## Продолжение таблицы 12

Параметр	Унивариантный анализ		Мультивариантный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p-value	ОР (95% ДИ)	p-value
В-симптомы				
Нет	1,000	0,034*	1,000	0,003
Да	1,712 [1,053-3,025]		1,927 [1,387-2,564]	
Стадия заболевания				
I-II	1,000	0,016*	1,000	<0,001
III-IV	2,241 [1,140-4,403]		4,315 [1,911-5,389]	
Экстранодальное вовлечения				
Да		0,661	–	–
Нет	1,000 0,850 [0,410-1,761]			
Поражение селезенки				
Да	1,000	0,866	–	–
Нет	1,105 [0,343-3,561]			
ВДХТ + аутоТКМ в 1 линии				
Нет	1,000	0,202	–	–
Да	0,466 [0,145-1,504]			
Первично-резистентное течение				
Нет	1,000	<0,001*	1,000	<0,001
Да	36,678 [17,594-76,463]		28,123 [22,494-32,736]	
Подтип ДВККЛ				
Non-GCB	1,000	0,107*	–	–
GCB	0,505 [0,183-1,393]			
Экспрессия CD10				
Есть	1,000	0,049*	1,000	0,015
Нет	0,397 [0,115-0,983]		0,411 [0,101-0,914]	
Экспрессия tum-1				
Нет	1,000	0,422	–	–
Есть	1,467 [0,576-3,739]			
Экспрессия bcl-6				
Нет	1,000	0,207	–	–
Есть	0,627 [0,304-1,295]			

## Продолжение таблицы 12

Параметр	Унивариантный анализ		Мультивариантный анализ	
	ОР (95% ДИ)	p-value	ОР (95% ДИ)	p-value
Экспрессия bcl-2				
Нет	1,000	0,400	–	–
Есть	1,422 [0,627-3,224]			
Экспрессия c-тус				
Нет	1,000	–	–	–
Есть	0,678 [0,225-2,048]			
Коэкспрессия c-тус, bcl-2				
Есть	1,000	0,610	–	–
Нет	0,605 [0,249-2,262]			
Тройная экспрессия				
Нет	1,000	0,220	–	–
Есть	2,552 [0,571-11,412]			
Экспрессия CD5				
Нет	1,000	0,203	–	–
Есть	1,978 [0,692-5,649]			
Экспрессия CD30				
Нет	1,000	0,801	–	–
Есть	1,113 [0,430-2,983]			
Уровень экспрессии Ki-67				
0-89%	1,000		–	–
90-100%	1,483 [0,453-4,862]	0,215		
Примечание – * – переменные, которые были включены в мультивариантный анализ.				

При мультивариантном анализе независимыми предикторами, негативно влияющими на выживаемость, оказались первично-резистентное течение заболевания (ОР=28,123, 95% ДИ [22,494-32,736],  $p<0,001$ ), III-IV стадия заболевания (ОР=4,315, 95% ДИ [1,911-5,389],  $p<0,001$ ), наличие у пациента В-симптомов (ОР=1,927, 95% ДИ [1,387-2,564],  $p=0,003$ ) и отсутствие экспрессии CD10. Тогда как экспрессия маркера CD10 являлась независимым предиктором благоприятного прогноза (ОР=0,397, 95% ДИ [0,115-0,983],  $p=0,015$ ) (рисунок 40).

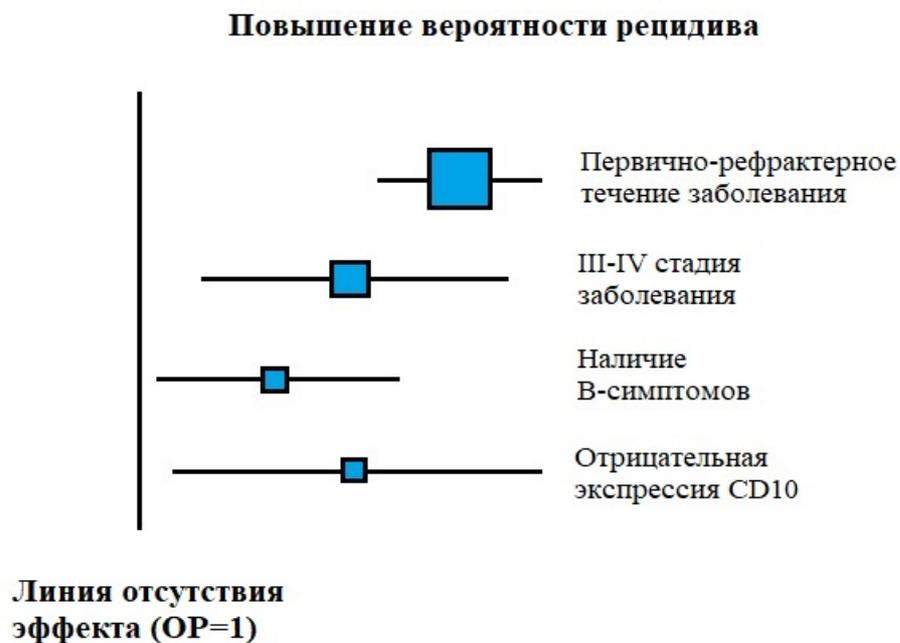


Рисунок 40 – Факторы, значимо влияющие на ВВП при мультивариантном анализе у пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года).

### 3.6 Сравнительная характеристика пациентов в зависимости от коэкспрессии белков c-myc и bcl-2 (новая классификация ВОЗ 2017 года)

Коэкспрессия c-myc и bcl-2 значимо чаще встречалась в группе более молодых пациентов (18-49 лет) в сравнении с пациентами, которым было 50 лет и более (57,1% против 42,9%,  $p=0,048$ ) (рисунок 41). Также была обнаружена тенденция к наличию взаимосвязи между МПИ и наличием коэкспрессии c-myc и bcl-2 – такие пациенты чаще имели высокий показатель МПИ ( $p=0,060$ ) (рисунок 42).

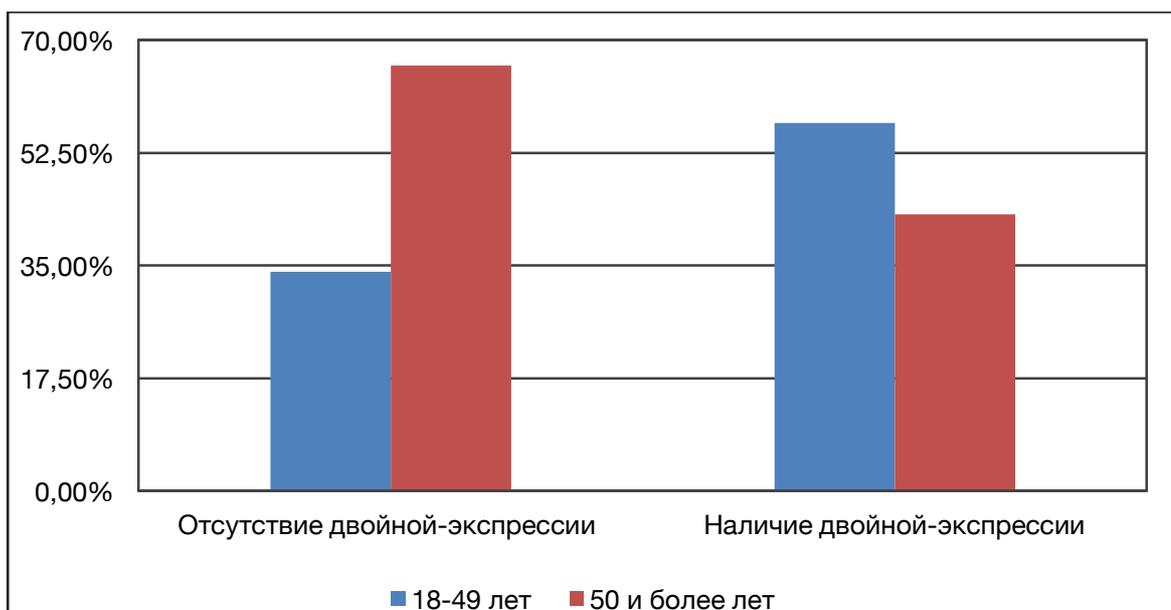


Рисунок 41 – Взаимосвязь возраста и коэкспрессии c-myc и bcl-2.

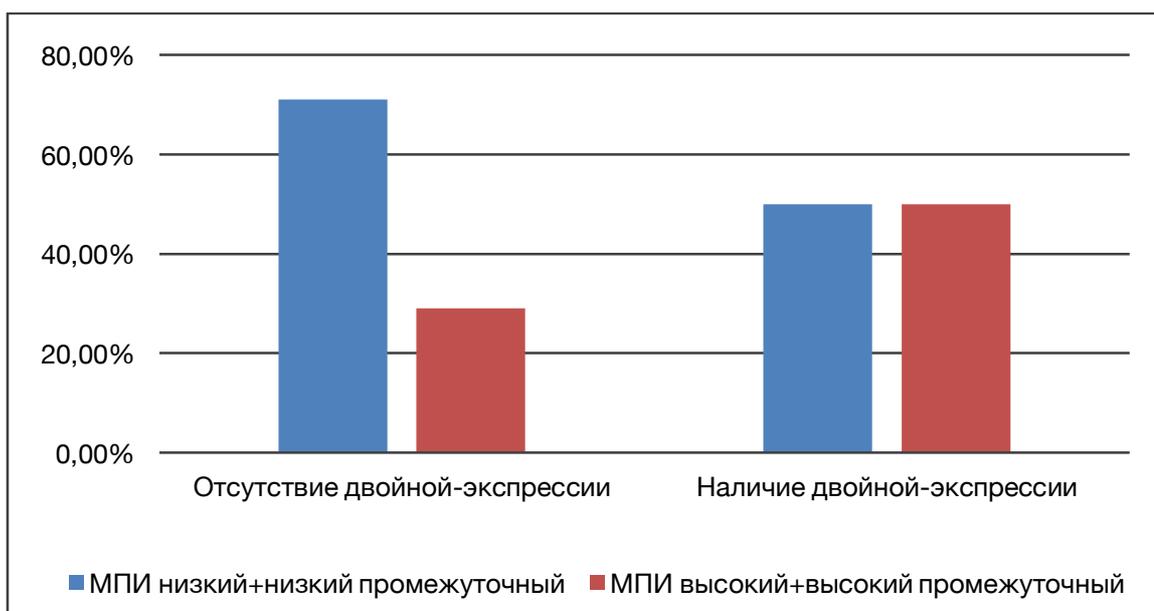


Рисунок 42 – Взаимосвязь МПИ и коэкспрессии c-myc и bcl-2.

Не было обнаружено взаимосвязи между в зависимости от коэкспрессии c-myc и bcl-2 и стадией заболевания ( $p=0,534$ ), экстранодальным вовлечением ( $p=0,661$ ), первично-рефрактерным течением заболевания ( $p=0,897$ ), GCB или non-GCB подтипом лимфомы ( $p=0,965$ ) и уровнем Ki-67 (0,701). В таблице 13 представлены характеристики пациентов с учетом коэкспрессии c-myc и bcl-2.

Таблица 13 – Характеристика пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года) с учетом коэкспрессии c-тус и bcl-2 (n=71)

Клинические характеристики		Коэкспрессия c-тус и bcl-2	
		нет n=50	да n=21
		% по столбцу	
Пол	женщины	52,0%	38,1%
	мужчины	48,0%	61,9%
Возрастные группы	18-29 лет	8,0%	23,8%
	30-39 лет	8,0%	23,8%
	40-49 лет	18,0%	9,5%
	50-59 лет	50,0%	23,8%
	60-69 лет	12,0%	19,0%
	70-79 лет	4,0%	,0%
	80-89 лет	,0%	,0%
МПИ низкий+низкий промежуточный против высокий промежуточный+высокий	Низкий + низкий промежуточный	71,0%	50,0%
	высокий+высокий промежуточный	29,0%	50,0%
Стадия заболевания	I стадия	16,0%	14,3%
	II стадия	26,0%	14,3%
	III стадия	16,0%	9,5%
	IV стадия	42,0%	61,9%
Экстранодальное вовлечение	нет	74,0%	61,9%
	да	26,0%	38,1%
Первично-рефрактерное течение	нет	76,6%	80,0%
	да	23,4%	20,0%
Примечание – n – количество пациентов.			

В целом следует отметить, что большему числу пациентов с коэкспрессией c-тус и bcl-2 чаще выполнялась ранняя интенсификация лечения в сравнении с пациентами без коэкспрессии, так как на момент назначения терапии уже имелись

литературные данные о том, что данная подгруппа может обладать неблагоприятным прогнозом. Так, ВДХТ с АутоТКМ чаще выполняли пациентам с коэкспрессией c-тус и bcl-2 (25,0% против 10,6%), аналогичная тенденция наблюдается для применения схемы «R-ЕРОСН» (40,0% против 14,3%), «Hyper-CVAD/MtX» (15% против 2%). Важно отметить, что данные расчеты были получены на небольших выборках и потому к интерпретации результатов следует относиться с осторожностью.

Таким образом, недостаточная выраженность некоторых тенденций при анализе ВБП связана с тем, что по отношению к различным пациентам, включенным в исследование, практиковался несколько различный подход в зависимости от уровня агрессивности заболевания – пациенты с более агрессивными формами ДВККЛ получали более интенсивные схемы лечения – «R-ЕРОСН» либо ВДХТ с АутоТКМ в 1 линии терапии – это подтверждается данными в таблице 14. Эта разница в подходах могла оказаться причиной отсутствия статистически значимых различий ВБП в группах наличия и отсутствия коэкспрессии.

Таблица 14 – Сравнительная характеристика схем лечения в группах наличия и отсутствия экспрессии c-тус и bcl-2 (n=71)

Схемы лечения		Коэкспрессия c-тус и bcl-2	
		нет	да
		результат, %	
«Upfront-ВДХТ»+аутоТКМ	нет	89,4%	75,0%
	да	10,6%	25,0%
Полихимиотерапия первой линии	«R-СНОР»	70,4%	25,0%
	«R-ЕРОСН»	14,3%	40,0%
	«R-СНОР»+ТКМ	12,3%	20,0%
	«Hyper-CVAD/MtX»	2,0%	15,0%
Примечание – n – количество пациентов.			

### 3.7 Сравнительная характеристика пациентов с наличием транслокаций в генах C-MYC, BCL-2 или BCL-6

Среди пациентов с наличием транслокаций в генах MYC (рисунок 43), BCL-6 (рисунок 44) либо BCL-2 (рисунок 45) определялось равное количество мужчин и женщин (50% против 50%). Наибольшее количество пациентов с транслокациями находились в возрастной группе 50-59 лет. Средний возраст данной подгруппы пациентов составил 51,2 года. Наиболее часто при наличии транслокаций определялся низкий либо низкий промежуточный МПИ (n=4, 80%) и более распространенные стадии заболевания (III-IV ст. 60,0% против I-II ст. 40,0%), однако были случаи и на I стадии опухолевого процесса (n=2, 20%). Экстранодальное вовлечение определялось в трех случаях (30,0%).

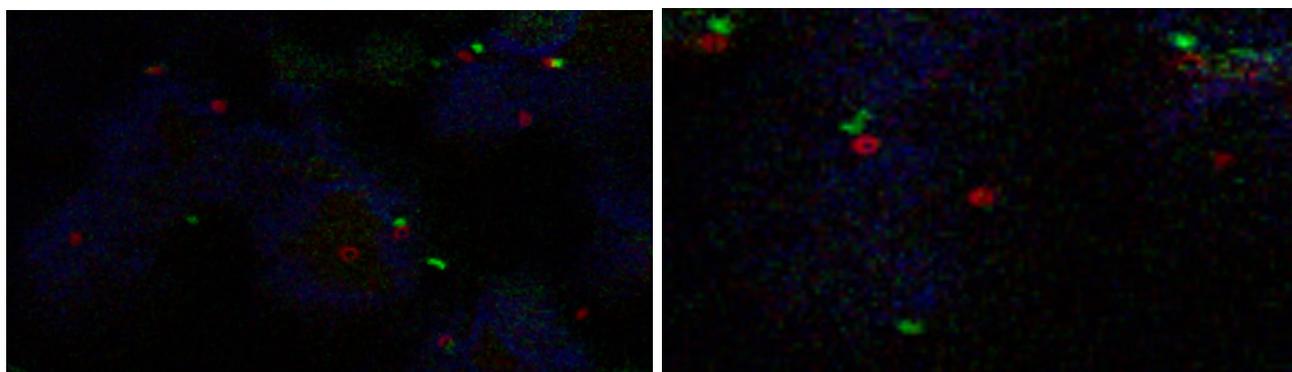


Рисунок 43 – Транслокация MYC, FISH.

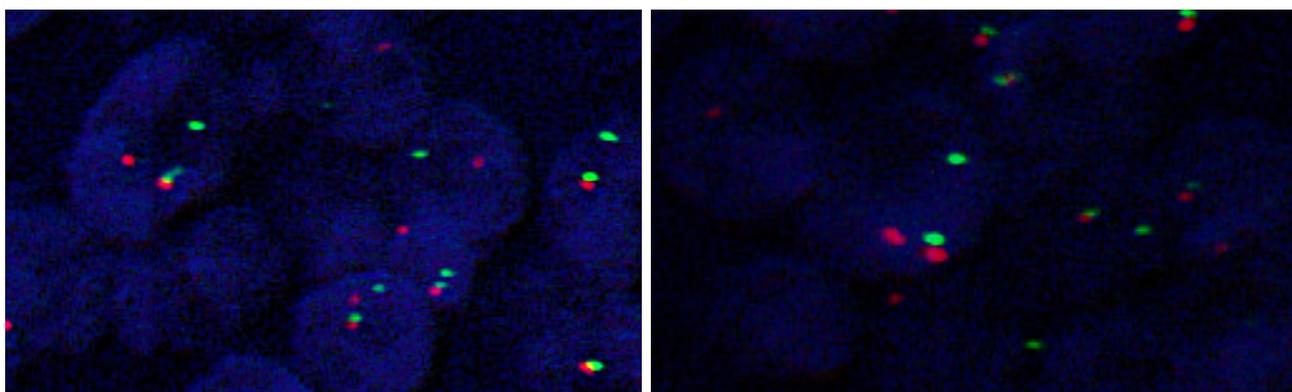


Рисунок 44 – Транслокация BCL-6, FISH.

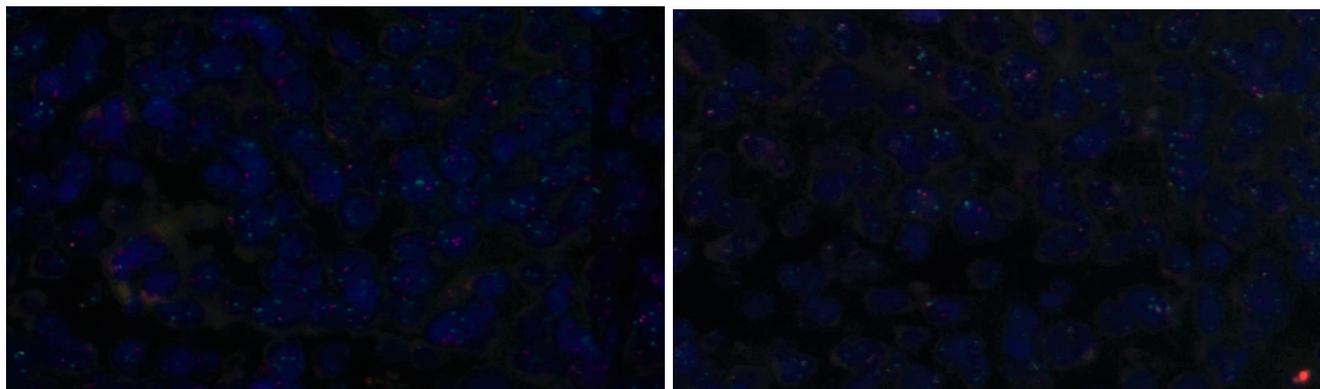


Рисунок 45 – Транслокация BCL-2, FISH.

У части пациентов с транслокациями было зарегистрировано первично-рефрактерное течение заболевания ( $n=4$ , 40%), что достаточно сильно отличается от распределения пациентов с отсутствием подобных поломок (8 (21,6%) с наличием первично-рефрактерного лечения против 29 (78,4%) с отсутствием первично-рефрактерного течения) (рисунок 46).

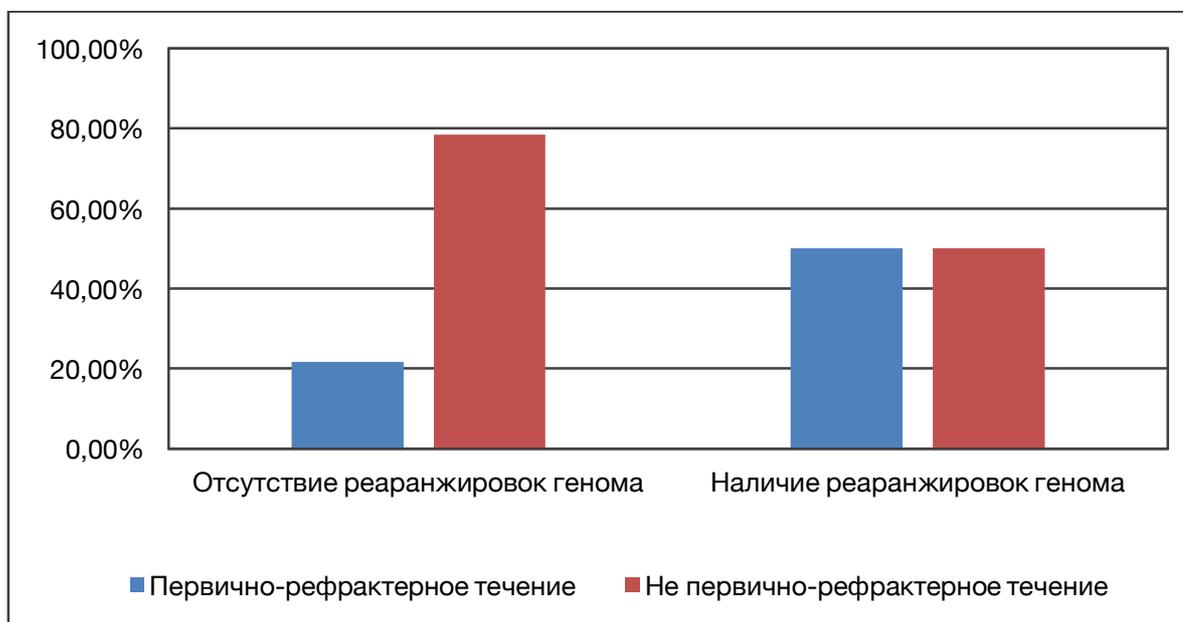


Рисунок 46 – Взаимосвязь первично-рефрактерного течения и наличия транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6.

Аналогичное распределение произошло в подтипах лимфом: у 5 (50%) пациентов с транслокациями зарегистрирован GCB-подтип лимфомы, у 5 (50%) – non-GCB, в то время как в группе пациентов без реаранжировок генома non-GCB лимфомы преобладали (n=29 (72,5%)). Половина лимфом у пациентов с транслокациями также характеризовались высокими показателями пролиферативной активности: у половины пациентов (n=5) уровень Ki-67 превышал 90%. В таблице 15 представлена сравнительная характеристика пациентов с наличием и отсутствием транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6.

Таблица 15 – Сравнительная характеристика пациентов с наличием и отсутствием транслокаций в генах MYC, BCL-2, BCL-6

Характеристика пациентов		Отсутствие транслокаций	Наличие транслокаций
		результат, %	
Пол	женщины	40,0%	50,0%
	мужчины	60,0%	50,0%
Возраст 18-49 лет против 50-89 лет	18-49 лет	32,5%	40,0%
	50-89 лет	67,5%	60,0%
Возрастные группы	18-29 лет	10,0%	10,0%
	30-39 лет	7,5%	20,0%
	40-49 лет	15,0%	10,0%
	50-59 лет	50,0%	40,0%
	60-69 лет	12,5%	20,0%
	70-79 лет	5,0%	,0%
МПИ низкий+низкий промежуточный против высокий промежуточный+высокий	низкий+низкий промежуточный	68,0%	80,0%
	высокий+высокий промежуточный	32,0%	20,0%
Стадия заболевания	I стадия	15,0%	20,0%
	II стадия	25,0%	20,0%

	III стадия	20,0%	20,0%
	IV стадия	40,0%	40,0%

Продолжение таблицы 15

Характеристика пациентов		Отсутствие транслокаций	Наличие транслокаций
		результат, %	
Экстранодальное вовлечение	нет	85,0%	70,0%
	да	15,0%	30,0%
Первично-рефрактерное течение	нет	78,4%	60,0%
	да	21,6%	40,0%
Подтип ДВККЛ GCB против non-GCB	non-GCB подтип	72,5%	50,0%
	GCB-подтип	27,5%	50,0%
Ki-67 0-89 против 90-100	0-89	39,3%	50,0%
	90-100	60,7%	50,0%
Примечание – n – количество пациентов.			

Был проведен корреляционный анализ количественных переменных для поиска потенциальных взаимосвязей (таблица 16). Была обнаружена значимая корреляция средней силы связи между уровнем экспрессии с-тус и Ki-67, коэффициент корреляции=0,568,  $p=0,01$  (рисунок 47). Однако, с учетом количества проведенных попарных сравнений, данная находка может оказаться случайной.

Таблица 16 – Корреляционная матрица для количественных переменных

Переменные	Оценка коэффициента корреляции	Возраст, лет	Уровень экспрессии tum-1, %	Уровень экспрессии С-МУС, %	Уровень экспрессии CD5, %	Уровень экспрессии BCL2, %	Уровень экспрессии CD 30, %	Уровень экспрессии P53, %	Уровень Ki-67
Возраст, лет	Коэфф. корреляции	1,000	,078	-,159	-,057	,205	-,305*	-,115	,069

	Знч. (2-сторон)	.	,596	,286	,706	,166	,037	,442	,446
	N	214	48	47	47	47	47	47	123

Продолжение таблицы 16

Переменные	Оценка коэффициента корреляции	Возраст, лет	Уровень экспрессии tum-1, %	Уровень экспрессии C-МYC, %	Уровень экспрессии CD 5, %	Уровень экспрессии BCL2, %	Уровень экспрессии CD 30, %	Уровень экспрессии P53, %	Уровень Ki-67
Уровень экспрессии tum-1, %	Коэфф. корреляции	,078	1,000	,356*	,166	,380**	,180	-,128	,250
	Знч. (2-сторон)	,596	.	,014	,264	,008	,227	,392	,142
	N	48	48	47	47	47	47	47	36
Уровень экспрессии C-МYC, %	Коэфф. корреляции	-,159	,356*	1,000	,108	,166	,079	,353*	,568**
	Знч. (2-сторон)	,286	,014	.	,472	,266	,597	,015	,005
	N	47	47	47	47	47	47	47	35
Уровень экспрессии CD 5, %	Коэфф. корреляции	-,057	,166	,108	1,000	,153	-,187	-,124	,114
	Знач. (2-сторон)	,706	,264	,472	.	,306	,208	,407	,515
	N	47	47	47	47	47	47	47	35
Уровень экспрессии BCL2, %	Коэфф. корреляции	,205	,380**	,166	,153	1,000	-,073	-,192	,033
	Знч. (2-сторон)	,166	,008	,266	,306	.	,624	,195	,849
	N	47	47	47	47	47	47	47	35
Уровень экспрессии CD 30, %	Коэфф. корреляции	-,305*	,180	,079	-,187	-,073	1,000	,045	,002
	Знач. (2-сторон)	,037	,227	,597	,208	,624	.	,762	,990
	N	47	47	47	47	47	47	47	35
	Коэфф. корреляции	-,115	-,128	,353*	-,124	-,192	,045	1,000	-,047

Уровень экспрессии P53, %	Знач. (2-сторон)	,442	,392	,015	,407	,195	,762	.	,790
	N	47	47	47	47	47	47	47	35

Продолжение таблицы 16

Переменные	Оценка коэффициента корреляции	Возраст, лет	Уровень экспрессии tum-1, %	Уровень экспрессии С-МУС, %	Уровень экспрессии CD 5, %	Уровень экспрессии BCL2, %	Уровень экспрессии CD 30, %	Уровень экспрессии P53, %	Уровень Ki-67
Уровень Ki-67	Коэфф. корреляции	,069	,250	,568**	,114	,033	,002	-,047	1,000
	Знач. (2-сторон)	,446	,142	,005	,515	,849	,990	,790	.
	N	123	36	35	35	35	35	35	123

Примечание – \* – корреляция значима на уровне 0,05 (2-сторонняя); \*\* – корреляция значима на уровне 0,01 (2-сторонняя); знч. – значение; коэфф. – коэффициент.

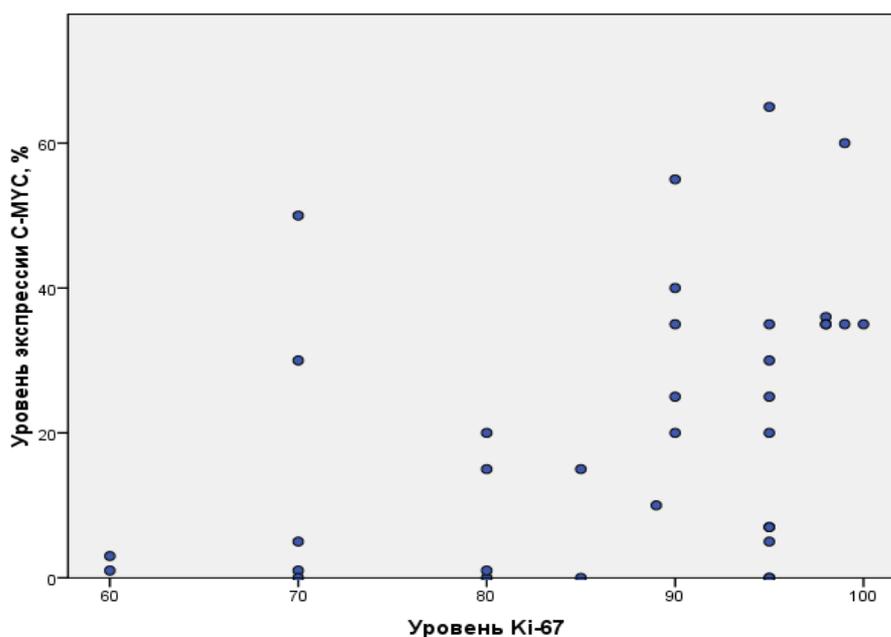


Рисунок 47 – Взаимосвязь между уровнем экспрессии с-тус и уровнем Ki-67.

Среди пациентов с ДВККЛ мутантный тип экспрессии p53 был обнаружен у 8/47 (17%) пациентов. Был проведен сравнительный анализ клинических и патоморфологических параметров в группах пациентов с мутантным и диким типом экспрессии p53 (рисунки 48, 49). Выявлено, что имеется тенденция к более распространенным стадиям в группе с мутантным типом экспрессии p53 в сравнении с диким типом экспрессии (87,5% против 56,4% соответственно,  $p=0,095$ ) (рисунок 50).

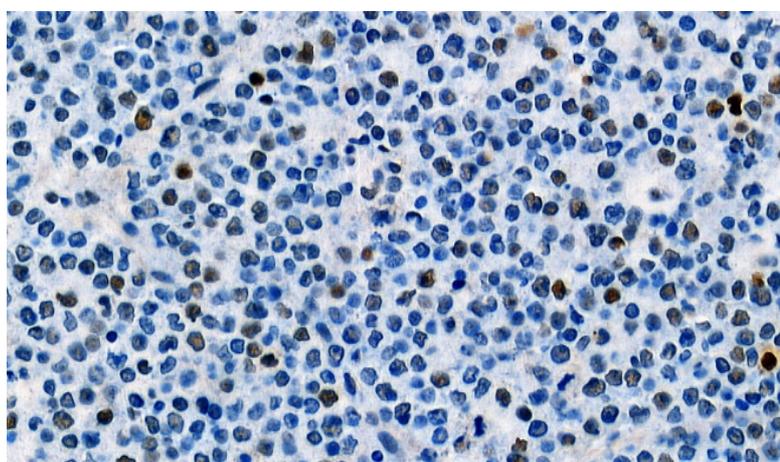


Рисунок 48 – Дикий тип экспрессии p53. Увеличение  $\times 40$ .

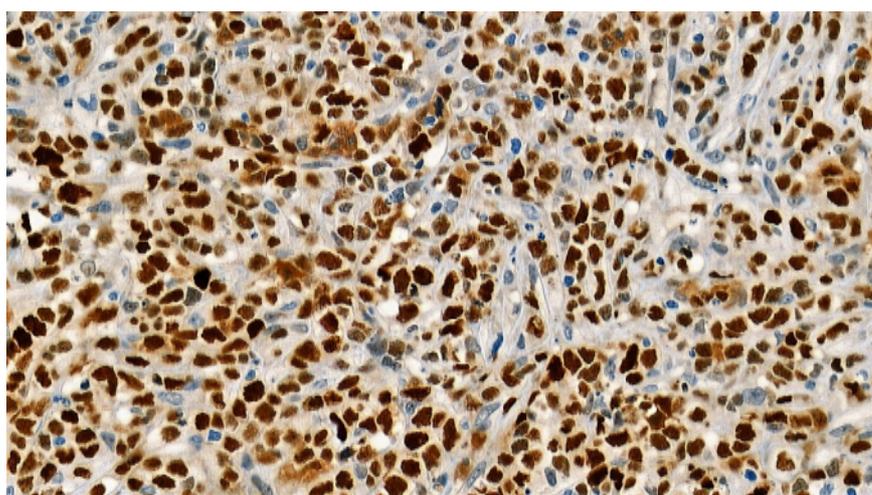


Рисунок 49 – Мутантный тип экспрессии p53. Увеличение  $\times 40$ .

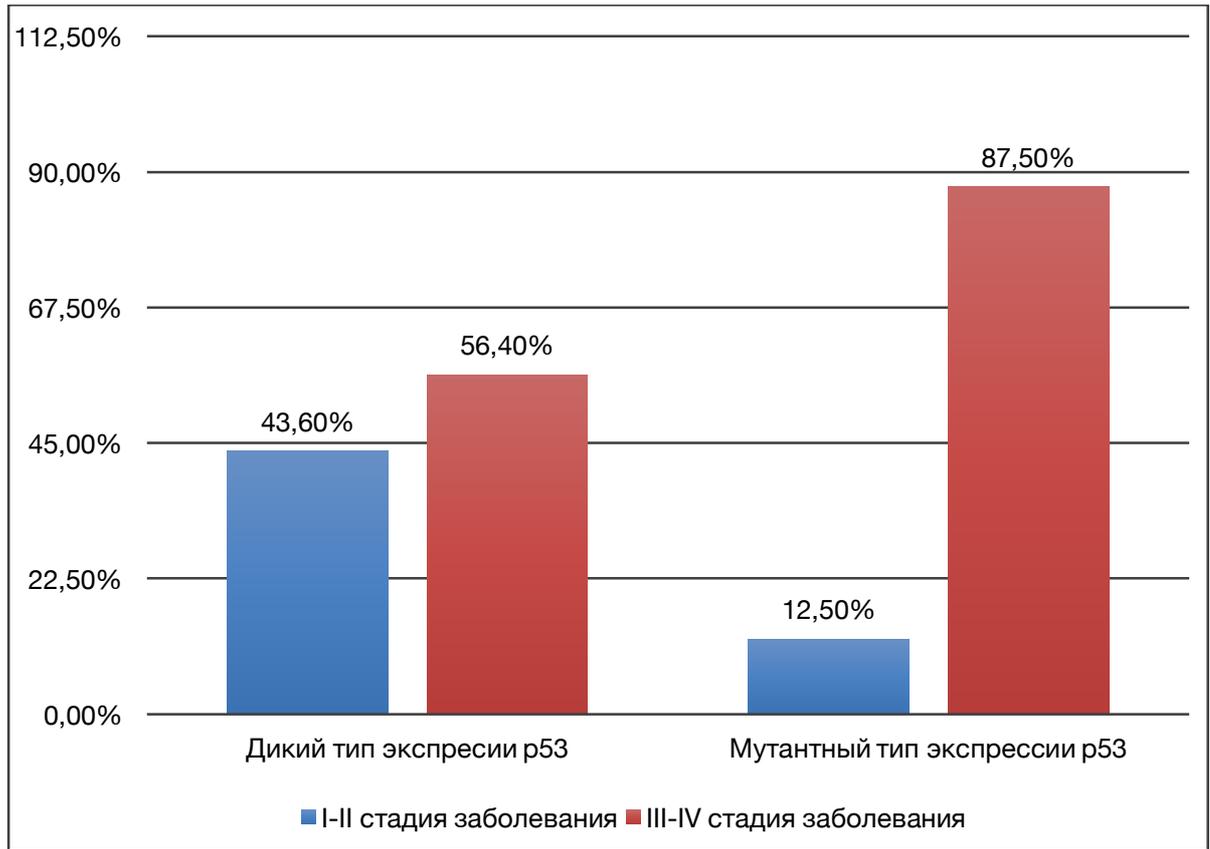


Рисунок 50 – Распределение стадий ДВККЛ в группах в зависимости от типа экспрессии p53.

## Глава 4

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диффузная В клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – потенциально излечимое заболевание, однако несмотря на то что большинство пациентов с ДВККЛ достигают полной ремиссии, при применении химиоиммунотерапии с моноклональным антителом ритуксимаб, у 50% больных развивается рецидив и у 30% – летальный исход [108]. Среди всех НХЛ ДВККЛ является самым частым подтипом [41] и в зависимости от разных географических зон, встречаемость варьирует от 30 до 40%. С учетом клинического течения, молекулярно-генетических и ИГХ особенностей, становится очевидным, что ДВККЛ гетерогенна и имеет различный ответ на терапию и прогноз. Это диктует необходимость комплексной оценки различных параметров при постановке диагноза для определения не только прогноза, но и тактики лечения, в том числе с применением таргетной терапии, или возможности включения пациента в клинические исследования.

Были проанализированы клинические особенности ДВККЛ, такие как В-симптомы, первично-резистентное течение, и факторы, входящие в международный прогностический индекс (МПИ). С 1993 года для определения прогноза заболевания широко используется МПИ, в который входят такие факторы как возраст >60 лет, экстранодальное поражение, повышенный уровень ЛДГ, III-IV стадия заболевания, общесоматический статус 2-4 по шкале ECOG [119]. Важно заметить, что МПИ не учитывает различные биологические особенности опухоли, и поэтому недостаточно достоверно отражает прогноз заболевания. В проведенном исследовании распространённая стадия заболевания (III-IV стадия), входящая в МПИ, явилась независимым фактором риска рецидива заболевания (OR=2,241, 95% ДИ [1,140-4,403], p=0,016). При этом пациенты с распространённой стадией характеризовались более низкими показателями выживаемости в сравнении с пациентами с I-II стадией (75% квартиль ВБП для III-IV стадий составил 14±7,7

месяцев, а для I-II стадий – не достигнут ( $p=0,016$ ). Анализ выживаемости пациентов с учетом всех факторов МПИ не показал статистически значимых различий ( $OR=1,074$  [95% ДИ 0,459-2,514]  $p=0,869$ ). Таким образом, комплексная оценка клинических особенностей ДВККЛ совместно с молекулярными характеристиками может дать наиболее полное представление о прогнозе заболевания. Наличие В-симптомов ассоциировано с худшими показателями БРВ и является независимым от МПИ фактором риска рецидива, что было подтверждено результатами исследований [59]. Медиана ВВП в группе наличия В-симптомов составила  $12\pm 3,7$  мес. против  $56\pm 5,2$  мес. в группе отсутствия В-симптомов.,  $p = 0,034$ ; ( $OR=1,712$ , 95% ДИ [1,053-3,025]).

Было подтверждено, что рефрактерное течение заболевания является независимым фактором риска рецидива у больных ДВККЛ [88]. Медиана ВВП в группе первично-рефрактерного течения у больных ДВККЛ составила 5,0 мес. (95% ДИ 0,00-11,2), в группе отсутствия первично-рефрактерного течения медиана не была достигнута ( $p<0,001$ ).

Не вызывает сомнений, что при определении прогноза заболевания важно учитывать не только клинические особенности заболевания. Так, в новой классификации лимфопролиферативных заболеваний ВОЗ, вышедшей в 2017 году, подчеркивается необходимость проведения ИГХ анализа и молекулярно-генетических исследований для полноценной диагностики опухоли.

В частности, в новой классификации ВОЗ 2017 года ДВККЛ без дополнительного уточнения (NOS) была разделена на различные молекулярные подтипы в зависимости от происхождения опухолевой клетки и результатов исследования профиля экспрессии генов:

- лимфома с фенотипом клеток герминального центра (GCB);
- лимфома с фенотипом активированных В-клеток (ABC).

Многие современные исследования продемонстрировали худшие показатели ВВП и ОВ у пациентов с ABC-подтипом ДВККЛ [117]. В рутинной клинической практике определение профиля экспрессии генов недоступно, поэтому в новой классификации ВОЗ 2017 года рекомендовано разделять ДВККЛ на подтипы на

основании данных ИГХ анализа. Суррогатной моделью определения происхождения клетки является ИГХ Hans-алгоритм, который включает в себя белки CD10, bcl-6, tum-1. Hans-алгоритм позволяет разделить ДВККЛ на GCB и non-GCB подтипы (включающий в себя «неклассифицируемые» случаи и ABC-подтипы ДВККЛ). В мировых исследованиях non-GCB подтип ДВККЛ продемонстрировал худшие показатели выживаемости в сравнении с GCB-подтипом ДВККЛ [44]. Согласно имеющимся данным, в 79% случаев результаты ИГХ Hans-алгоритма сопоставимы с анализом профиля экспрессии генов [114].

Медиана ВБП в группе с non-GCB подтипом ДВККЛ составила 46,0 месяцев (95% ДИ 30,1-59,3), в группе с GCB подтипом ДВККЛ медиана не была достигнута ( $p=0,171$ ),  $OR=0,505$ , 95% ДИ [0,183-1,393], что продемонстрировало лучшие показатели выживаемости у пациентов с GCB-подтипом ДВККЛ. Определение подтипа ДВККЛ и разделение на ABC и GCB подтипы должно стать стандартом диагностики. Результаты Hans-алгоритма не всегда сопоставимы с анализом профиля экспрессии генов, однако, разделение на GCB и non-GCB подтипы крайне важно для индивидуализации лечения [12].

Лимфома ДВККЛ NOS с коэкспрессией c-тус и bcl-2, или DE лимфома не была выделена как отдельная нозологическая единица в новой классификации ВОЗ 2017 года. В исследовании было оценено влияние моноэкспрессии белков c-тус и bcl-2, так и влияние коэкспрессии на прогноз заболевания.

Белок c-тус отвечает за метаболизм, синтез белков, дифференцировку клеток. Транслокация хромосом, амплификация гена MYC, мутация в данном гене, повторяющиеся перестройки могут являться причинами высокой экспрессии белка c-тус [82, 85]. При анализе ВБП в зависимости от экспрессии c-тус 75% квартиль в группе без экспрессии c-тус составил  $7,0 \pm 2,9$  месяцев, в группе с экспрессией 75% квартиль достигнут не был ( $p=0,484$ ;  $OR=0,678$  [0,225-2,048],  $p=0,491$ ).

Ген BCL-2 кодирует белок, поддерживающий жизнеспособность клеток посредством ингибирования апоптоза. В нормальных лимфоцитах оксидативный стресс, нестабильность генома и другие патологические процессы индуцируют экспрессию белков семейства BHL-2, функцией которых является ингибирование bcl-

2 и, соответственно, инициация апоптоза [17]. Анализ ВВП в зависимости от экспрессии bcl-2 составил 75% квартиль в группе без экспрессии bcl-2 составил  $14,0 \pm 5,1$  месяцев против  $11,0 \pm 4,2$  месяцев в группе с наличием экспрессии ( $p=0,394$ ,  $OR=1,422$  95% ДИ [0,627-3,224],  $p=0,400$ .)

Известно, что в случае малигнизации клеточного клона, коэкспрессия c-myc и bcl-2 является причиной прогрессирования лимфомы и резистентности к химиотерапии [24]. Наличие коэкспрессии белков c-myc и bcl-2 описано как неблагоприятный фактор прогноза у больных ДВККЛ [67, 105]. Данная особенность не всегда ассоциирована с наличием транслокации одноименных генов. Это определяет лучший прогноз по сравнению с подгруппой Double-hit (DH) и Triple-hit (TH) лимфом, но ухудшает прогноз в сравнении с ДВККЛ NOS без экспрессии. Больные с DE лимфомой, получившие химиотерапию «R-CHOP», имели неполный ответ на лечение, более низкие показатели БРВ и 5-летней ОВ в сравнении с больными из группы ДВККЛ NOS без экспрессии [80]. В проведенном исследовании при анализе ВВП в зависимости от коэкспрессии c-myc и bcl-2 в обеих группах медиана ВВП не была достигнута, и 75% квартиль в группе пациентов без коэкспрессии составил  $7,0 \pm 2,5$  месяцев, а в группе с коэкспрессией c-myc и bcl-2 75% квартиль достигнут не был. Статистически значимых различий между группами мы не обнаружили ( $p=0,605$ ). Коэкспрессия c-myc и bcl-2 с пороговыми значениями для c-myc и bcl-2  $>40\%$  и  $>50\%$ , соответственно, была ассоциирована с более высокими показателями МПИ у пациентов с ДВККЛ. Следует отметить, что большинство пациентов с коэкспрессией c-myc и bcl-2 подвергалось ранней интенсификации лечения в сравнении с таковыми без коэкспрессии. Так как на момент назначения терапии уже имелись литературные данные о том, что коэкспрессией c-myc и bcl-2 является фактором неблагоприятного прогноза. Высокодозная химиотерапия с АутоТКМ чаще выполняли пациентам с коэкспрессией c-myc и bcl-2 (25,0% против 10,6%). Аналогичная тенденция наблюдается для применения схемы «R-EPOCH» (25,0% против 14,3%), «Hyper-CVAD/MtX» (15% против 2%).

Таким образом, ожидаемые различия в выживаемости исследуемых групп были нивелированы ранней интенсификацией лечения («R-ЕРОСН» и/или ВДХТ с АутоТКМ в 1 линии терапии) у больных с более агрессивными формами ДВККЛ. В настоящее время ранняя интенсификация лечения пациентов с DE лимфомой в начале активно внедряется в ведущих онкологических центрах Европы и США, так как результаты лечения стандартным протоколом «R-СНОР» остаются неудовлетворительными [59].

В новой классификации ВОЗ 2017 года выделена группа В-клеточных лимфом высокой степени злокачественности, в которую вошли: лимфома с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6, или ДН и ТН лимфомы, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности. Данная подгруппа лимфом встречается крайне редко и составляет менее 3% всех ДВККЛ.

Согласно имеющимся литературным данным, клиническими особенностями ДН и ТН лимфом являются: высокая частота выявления болезни в III-IV стадиях, тяжелое общее состояние больных (ECOG 2-4) в период манифестации болезни, поражение костного мозга, повышение уровня ЛДГ [45]. Учитывая отличное от ДВККЛ NOS течение заболевания, клинические и биологические характеристики ДН и ТН лимфомы должны быть выделены в отдельную нозологию с помощью анализа FISH.

Рутинное проведение анализа FISH всем пациентам с ДВККЛ – достаточно трудоемкий и дорогостоящий процесс, в связи с чем в настоящей работе был предложен оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH посредством поэтапного выполнения ИГХ анализа (рисунок 51).

Первым этапом в данном алгоритме является морфологическая оценка опухоли, далее определение ИГХ маркеров для подтверждения диагноза в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года, затем разделение ДВККЛ на подтипы GCB и non-GCB посредством Hans-алгоритма. Следующий шаг – определение экспрессии c-myc и bcl-2, при подтверждении ее наличия – анализ FISH на транслокацию в гене

MYC. При положительном тесте необходимо оценить наличие или отсутствие транслокаций у потенциальных партнеров- BCL-2, BCL-6. Предложенный алгоритм в условиях невозможности выполнения FISH всем пациентам с ДВККЛ поможет выделить прогностически неблагоприятную группу больных, которым потенциально необходим более агрессивный подход в терапии.

В проведенном исследовании двойные транслокации обнаружены не были, тогда как частота «монокит» лимфом составила 20,8%. Это подтверждает низкую встречаемость лимфом с перестройками в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6 в общей популяции больных ДВККЛ.

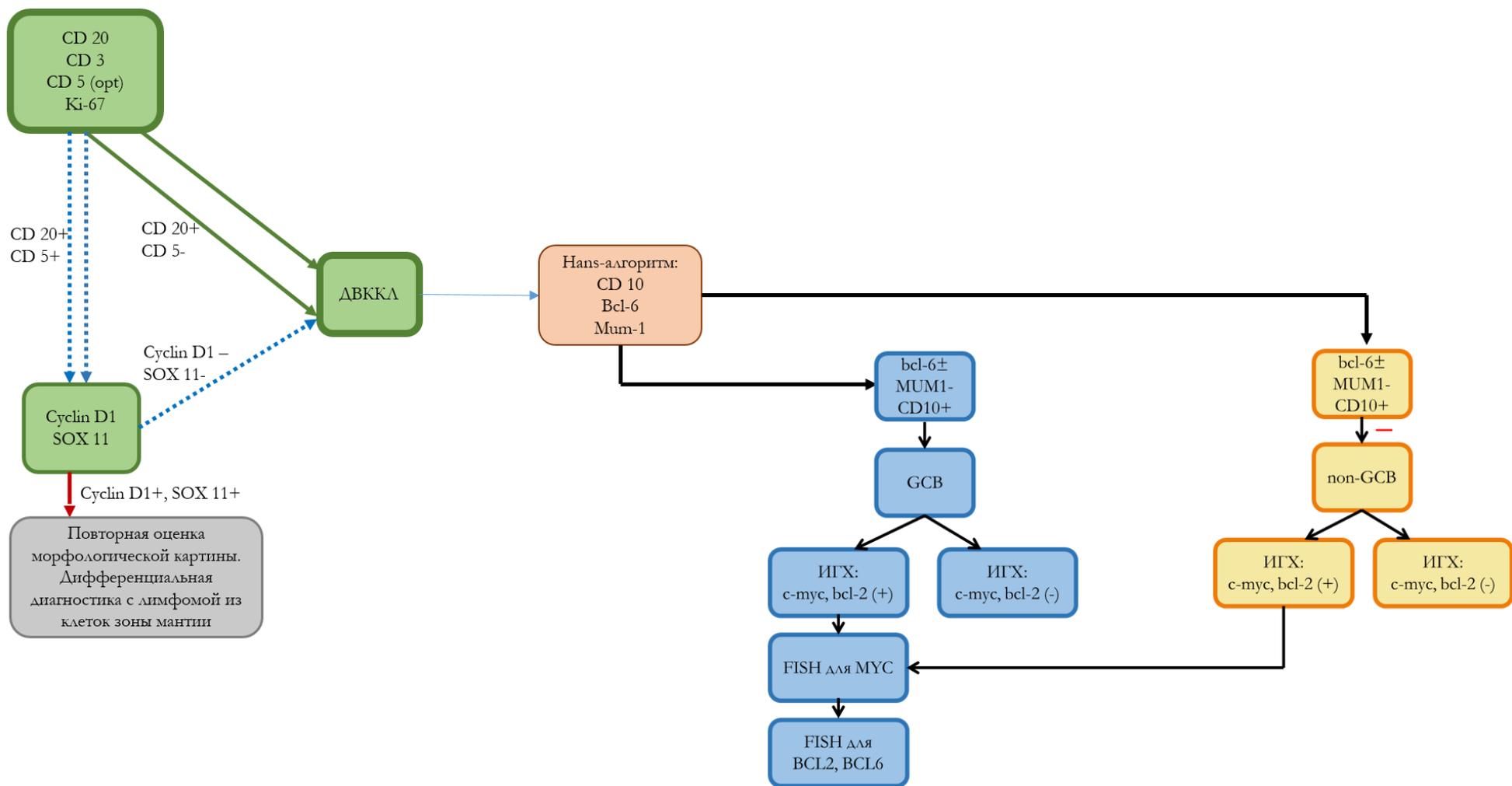


Рисунок 51 – Оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

Также было проанализировано влияние других ИГХ маркеров на прогноз заболевания, таких как CD10, tum-1, CD30, CD5, bcl-6, p53. Не продемонстрировали свое влияние на прогноз заболевания tum-1 и bcl-6, которые, в то время как экспрессия CD10 была ассоциирована со значимо более благоприятным прогнозом у пациентов: 75% квартиль в группе без экспрессии CD10 составил  $6,0 \pm 1,3$  месяца, в группе наличия экспрессии 75% квартиль достигнут не был ( $p=0,122$ ). При сопоставлении рисков рецидива в подгруппах обнаружены статистически значимые различия в ВБП – пациенты с экспрессией CD10 имели меньший риск рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии,  $OR=0,397$ , 95% ДИ [0,115-0,983].

Экспрессия CD30 наблюдается в 10-20% случаев ДВККЛ [26]. Имеющиеся данные о влиянии экспрессии CD30 на прогноз заболевания в настоящее время являются противоречивыми. В исследовании Ну и соавт., пациенты с экспрессией CD 30 имели более высокий показатель 5-летней ОВ, чем пациенты в группе с без экспрессии (79% против 59%;  $p=0,01$ ) [59]. В анализе Collie и соавт. были получены противоположные результаты [27]. В проведенном исследовании 75% квартиль в группе без экспрессии CD30 составил  $15,0 \pm 12,2$  месяцев, а в группе с наличием экспрессии –  $32 \pm 23,4$  месяца ( $p=0,798$ ,  $OR=1,113$ , 95% ДИ [0,430-2,983],  $p=0,801$ ). В новой классификации ВОЗ 2017 года ИГХ маркер CD30 не включен в перечень обязательных к определению маркеров при первичной постановке диагноза ДВККЛ, тем не менее таргетный препарат брентуксимаб ведотин, конъюгат моноклонального антитела и противоопухолевого агента, уже продемонстрировал свою эффективность при применении у пациентов с ДВККЛ с экспрессией CD30 [94, 123].

Лимфомы CD5+ ДВККЛ составляют уникальную подгруппу ДВККЛ, в связи с чем в новой классификации ВОЗ 2017 года было рекомендовано рутинное определение CD5 во всех случаях впервые диагностированной ДВККЛ. Согласно имеющимся данным, экспрессия CD5 ассоциирована с худшим клиническим течением – распространенными стадиями заболевания, повышенным уровнем ЛДГ и высокими показателями МПИ [50, 104].

В представленном анализе медиана ВБП была значительно выше в группе без экспрессии CD5: 75% квартиль составил  $46,0 \pm 30,2$  месяцев против  $11,0 \pm 3,9$  месяцев в группе с экспрессией CD5 ( $p=0,189$ )  $OR=1,978$ , 95% ДИ [0,692-5,649],  $p=0,203$ ), однако, статистически значимых различий обнаружено не было, что, возможно связано с недостаточной выборкой.

Опухоли ДВККЛ отличаются вариабельностью по уровню экспрессии Ki-67. Уровень его экспрессии в опухолевых клетках при ДВККЛ колеблется от 20% до 100% [126]. Маркер Ki-67 используется повсеместно с целью оценки активности клеточной пролиферации при В-клеточных лимфомах [14, 37, 102]. В исследовании при оценке ВБП в зависимости от уровня экспрессии Ki-67 (0-89% против 90-100%) пациенты с более высоким уровнем Ki-67 имели менее благоприятный прогноз ( $OR=1,483$ , 95% ДИ [0,453-4,862],  $p=0,215$ ), но статистически значимых различий обнаружено не было. Медиана ВБП не была достигнута в обеих группах; 75% квартиль ВБП в группе Ki-67 90-100% составил 15 месяцев. Полученные результаты демонстрируют, что оценка уровня Ki-67% для определения прогноза заболевания у больных ДВККЛ недостаточна, необходим также учет не только клинических данных, но и биологических особенностей.

Таким образом, среди оцениваемых ИГХ маркеров наибольшую прогностическую значимость имела экспрессия CD10, которая коррелировала с меньшим риском рецидива заболевания.

Возможно, достоверных различий в выживаемости пациентов при анализе некоторых ИГХ маркеров не было обнаружено в связи с малой выборкой пациентов, а также с применением более интенсивного подхода в терапии первой линии. Для назначения того или иного типа лечения («R-CHOP», «R-EPOCH» ±ВДХТ с АутоТКМ в 1 линии) учитывалась принадлежность к GCB/non-GCB подтипам, наличие/отсутствие экспрессии c-myc и bcl-2, CD5 и уровень Ki-67, степень распространенности заболевания. Этот факт мог несколько нивелировать потенциальные межгрупповые различия.

Во всем мире по-прежнему стандартом лечения пациентов с ДВККЛ остается терапия «R-СНОР», и при необходимости - лучевая терапия [2, 10]. Примерно 60-70% пациентов, получивших данное лечение, могут полностью вылечиться от заболевания или уйти в длительную ремиссию. Тем не менее, у 30-40% пациентов при применении «R-СНОР» развивается рецидив или рефрактерное течение заболевания. Терапевтические подходы, применяемые в этих случаях, не позволяют достичь удовлетворительных результатов. ВДХТ и АутоТКМ применяются, как правило, у молодых пациентов с хорошим соматическим статусом. Часть этих пациентов могут быть полностью излечены, у части больных развивается рецидив. Прогноз для пациентов, которым не была выполнена ВДХТ с АутоТКМ или развился рецидив после ее проведения, крайне неблагоприятный. Все вышеупомянутое обуславливает необходимость разработки оптимального подхода в лечении пациентов ДВККЛ в первой линии с учетом как клинических проявлений заболевания (возраст пациента, общесоматический статус, наличие или отсутствие В-симптомов, первично-резистентное течение, уровень МПИ), так и агрессивных биологических свойств опухоли (коэкспрессия с-тус и bcl-2, non-GCB подтип, наличие транслокаций в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6). Это может быть достигнуто с помощью ранней интенсификации лечения с применением «R-ЕРОСН», ВДХТ с АутоТКМ в первой линии, добавление новых таргетных агентов к стандартной схеме химиотерапии. Данный подход подлежит дальнейшему углубленному анализу в рамках многоцентровых рандомизированных исследований.

В настоящее время из-за отсутствия проспективных клинических исследований оптимальная терапия агрессивных подтипов ДВККЛ остается изученной не до конца. Имеются лишь данные больших ретроспективных исследований ДН и DE лимфом, в которых сравнивали стандартный «R-СНОР» с более интенсивной 5-дневной схемой «R-ЕРОСН» [63]: значительно худшие показатели БРВ наблюдались в группе «R-СНОР» (7,8 против 21,6 месяцев;  $p=0,001$ ) в сравнении с группой пациентов, получивших интенсивный режим, хотя не было получено разницы в ОБ ( $p=0,564$ ). Нет единого мнения по поводу

необходимости проведения ВДХТ с АутоТКМ в качестве консолидации для пациентов, у которых достигнут полный клинический ответ после применения первой линии химиотерапии, так как результаты остаются противоречивыми, и необходимо более детальное изучение этого вопроса [63, 89, 90].

В настоящее время в клинической практике по-прежнему используется МПИ, но уже стало очевидно, что учет только клинических и лабораторных характеристик на момент постановки диагноза не отражает полную картину заболевания. В связи с этим новая классификация лимфопролиферативных заболеваний, вышедшая в 2017 году, впервые учла не только ИГХ характеристики, но и молекулярно-генетические подтипы ДВККЛ: и разделила ДВККЛ NOS на GCB и ABC подтипы. Учитывая отсутствие возможности рутинного анализа профиля экспрессии генов в клинической практике, суррогатной моделью определения происхождения клетки может выступать Hans-алгоритм, результаты которого в большинстве случаев коррелируют с профилем экспрессии генов.

Наличие экспрессии белков c-myc и bcl-2 может являться маркером агрессивного течения ДВКЛЛ, но это не всегда коррелирует с наличием транслокаций в генах MYC, BCL-2 и/или BCL-6. В настоящей работе был предложен оптимизированный алгоритм диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017, в том числе на предмет наличия перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

В то же время влияние экспрессии белков p53, CD30 и других маркеров остается не до конца изученным и требует анализа в большей выборке пациентов. Разделение диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы на биологические подтипы с учетом ИГХ и молекулярно-генетических особенностей необходимо не только для определения прогноза заболевания, полной постановки диагноза, но и разработки индивидуального подхода в лечении с целью улучшения показателей выживаемости.

## ВЫВОДЫ

1. Среди включенных в исследование пациентов с ДВККЛ (новая классификация ВОЗ 2017 года) преобладали пациенты с IV стадией (50,5%), экстранодальное вовлечение было зарегистрировано у 23,6%, первично-резистентное течение - у 17,5%, В-симптомы – у 35,2% пациентов.
2. Экспрессия CD20 была зарегистрирована в 96,7% случаев, экспрессия Ki-67 > 89% - у 48,6% пациентов. Согласно новым требованиям ВОЗ 2017 экспрессия CD10 была выявлена в 31,1% случаев, bcl-2 – в 67,6%, c-тус – в 28,4%, bcl-6 – 66,1%. В 29,6% случаев наблюдалась коэкспрессия c-тус и bcl-2. Non-GCB подтип ДВККЛ был установлен в 63% случаев, GCB подтип – в 37% случаев.
3. Лимфомы высокой степени злокачественности с перестройками в генах С-МУС, BCL2 и/или BCL6 (Double и Triple-hit лимфомы) не были обнаружены, ДВККЛ с перестройками в одном из генов: С-МУС или BCL2 или BCL6 встречались в 20,8% случаев.
4. ВВП была ниже в группе пациентов: с наличием В-симптомов (медиана 12 мес. против 56 мес. в группе больных без В-симптомов,  $p=0,034$ ); у пациентов с III-IV стадиями заболевания (медиана 14 мес. против медиана не достигнута для пациентов с I-II стадиями,  $p=0,016$ ); с первично-рефрактерным течением ДВККЛ (медиана 5,0 мес. против медиана не была достигнута при отсутствии первично-рефрактерного течения,  $p<0,001$ ).
5. Пациенты с ДВККЛ и экспрессией CD10 (GCB-подтип) имели меньший риск развития рецидива в сравнении с пациентами без экспрессии CD10 ( $p=0,049$ ).
6. Достоверных отличий в показатели ВВП в группах с коэкспрессией и без коэкспрессии и c-тус и bcl-2 у пациентов с ДВККЛ NOS не выявлено (медиана не достигнута против  $7,0\pm 2,5$  месяцев,  $p=0,605$ , OR=0,750, 95% ДИ [0,249-2,262]), что может быть связано с проведением ранней интенсификации лечения в первой группе.

7. Оптимизированный в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года алгоритм позволяет диагностировать диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому с учетом перестроек в генах MYC, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для улучшения диагностики и лечения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) обязательным является оценка иммуногистохимических маркеров, входящих в Hans-алгоритм с целью разделения на GCB и non-GCB подтипы в рамках новой классификации ВОЗ 2017 года.
2. Для оценки прогноза заболевания у пациентов с ДВККЛ согласно требованиям классификации ВОЗ 2017 года необходима оценка иммуногистохимических маркеров, таких как с-тус и bcl-2. При наличии экспрессии белков с-тус и bcl-2 выполняется молекулярно-генетическое исследование опухоли на наличие транслокаций в генах С-МУС/BCL-2/BCL6 с использованием предложенного алгоритма диагностики. Это позволяет диагностировать прогностически неблагоприятный подтип лимфомы – В-клеточную лимфому высокой степени злокачественности с перестройками в генах С-МУС, BCL2 и/или BCL-6 (впервые выделенный в новой классификации ВОЗ 2017 года).
3. Первым этапом в оптимизированном алгоритме диагностики ДВККЛ с учетом новой классификации ВОЗ 2017 года, в том числе на предмет наличия перестроек в генах МУС, BCL-2, BCL-6 при отсутствии возможности рутинного использования метода FISH, является морфологическая оценка опухоли, анализ ИГХ маркеров (CD20, CD3, CD5 (опционально), К-67) для подтверждения или исключения диагноза ДВККЛ, затем разделение на подтипы GCB и non-GCB с использованием Hans-алгоритма. Следующий шаг – определение экспрессии с-тус и bcl-2, при подтверждении ее наличия – анализ FISH на транслокацию в гене МУС. При положительном тесте необходимо оценить наличие или отсутствие транслокации в генах BCL-2, BCL-6. Предложенный алгоритм в условиях невозможности выполнения FISH всем пациентам с ДВККЛ поможет выделить прогностически неблагоприятную группу больных, которым потенциально необходим более агрессивный подход в терапии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АПК	– антиген-презентирующая клетка
АутоТКМ	– аутологичная трансплантация костного мозга
БРВ	– безрецидивная выживаемость
ВБП	– выживаемость без прогрессирования
ВДХТ	– высокодозная химиотерапия
ВОЗ	– Всемирная Организация Здравоохранения
ДВККЛ	– диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома
ДВККЛ NOS	– диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома Not otherwise specified (без дополнительного уточнения)
ИГХ анализ	– иммуногистохимический анализ Ig – иммуноглобулин
ЛДГ	– лактатдегидрогеназа
МПИ	– Международный Прогностический Индекс
НХЛ	– Неходжкинская лимфома
ОВ	– общая выживаемость
ЦНС	– центральная нервная система
ABC	– activated B-cell – из клеток с фенотипом активированных В-клеток
BCL-2	– B-cell lymphoma 2 – белок В-клеточной лимфомы 2
BCL-6	– B-cell lymphoma 6 – белок В-клеточной лимфомы 6
DE	– double expressor – двойная экспрессия, коэкспрессия
DH	– double-hit – лимфома с двойной транслокацией
ECOG	– Eastern Cooperative Oncology Group – Восточная группа по оценке общесоматического статуса онкологического пациента
FISH	– Fluorescence in situ Hybridization – флуоресцентная гибридизация in situ
GCB	– Germinal B-cell like – лимфома с фенотипом клеток герминального центра
Ig	– immunoglobulin (иммуноглобулин)

MYC	– myelocytomatosis viral oncogene homolog – клеточный гомолог вирусного онкогена
NF-κB	– nuclear factor kappa-light-chain-enhancer – ядерный фактор «каппа-би»
PD-L1	– programmed cell death ligand – лиганд программированной клеточной гибели
SH	– single-hit – лимфома с единственной транслокацией
TH	– triple-hit – лимфома с тремя транслокациями

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Артемьева, А.С. В-клеточные лимфомы средостения из крупных клеток / А.С. Артемьева, Т.Ю. Семиглазова, Г.А. Франк // *Вопр. онкологии.* – 2015. – Т. 61, № 2. – С. 280-288.
2. Виноградова, Ю.Н. Лучевая терапия в комбинированном лечении неходжкинских лимфом / Ю.Н. Виноградова, Н.В. Ильин // *Злокачественные опухоли.* – 2015. – № 4, спецвып. 2. – С. 44-48.
3. Диффузная В-крупноклеточная лимфома с первичной локализацией в яичке. Клиническая онкогематология / Г.С. Тумян [и др.] // *Фундам. исследования и клин. практика.* – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 206-210.
4. Диффузная В-крупноклеточная лимфома с первичным вовлечением лимфоузлов средостения: диагностика и лечение / Я.К. Мангасарова [и др.] // *Терапевт. арх.* – 2010. – № 7. – С. 61-65.
5. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность) / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. – 250 с.
6. Первичная диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома центральной нервной системы: современные представления о патогенезе, диагностике и принципах лечения / С.В. Волошин [и др.] // *Вестн. гематологии.* – 2011. – № 3. – С. 22-34.
7. Поддубная, И.В. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний [Электронный ресурс] / И.В. Поддубная, В.Г. Савченко. – 2018. – Режим доступа: <https://rusoncohem.ru/klinrec/klin-rekomendatsii-limfoproliferativnykh-zabolevaniy/>.
8. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / под ред. С.В. Петрова, Т.Н. Райхлина. – 4-е изд., доп. и перераб. – Казань, 2012. – С. 312-338.

9. Сотникова, О.П. Первичные неходжкинские лимфомы яичка / О.П. Сотникова, Е.Н. Сорокин, И.В. Поддубная // Онкоурология. – 2012. – № 1. – С. 88-94.
10. Фармакотерапия опухолей. Посвящается памяти Михаила Лазаревича Гершановича / А.Н. Стуков [и др.]; под ред. А.Н. Стукова, М.А. Бланка, Т.Ю. Семиглазовой, А.М. Беляева. – СПб.: Изд-во АНО «Вопросы онкологии», 2017. – 513 с.
11. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer / V.N. Ngo [et al.] // Nature. – 2006. – Vol. 441, № 7089. – P. 106-110.
12. A multi-institutional outcomes analysis of patients with relapsed or refractory DLBCL treated with ibrutinib / A.M. Winter [et al.] // Blood. – 2017. – Vol. 130. – P. 1676-1679.
13. A Multiprotein Supercomplex Controlling Oncogenic Signaling in Lymphoma / J.D. Phelan [et al.] // Nature. – 2018. – Vol. 560, № 7718. – P. 387-391.
14. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment / E.C. Obermann [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2009. – Vol. 62. – P. 754-756.
15. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era / Z. Zhou [et al.] // Blood. – 2014. – Vol. 12. – P. 837-842.
16. Anaplastic variant of diffuse large B-cell lymphoma displays intricate genetic alterations and distinct biological features / M. Li [et al.] // Am. J. Surg. Pathol. – 2017. – Vol. 41. – P. 1322-1332.
17. Anderson, M.A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies / M.A. Anderson, D. Huang, A. Roberts // Semin. Hematol. – 2014. – Vol. 51. – P. 219-227.
18. Basso, K. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells / K. Basso, R. Dalla-Favera // Immunol. Rev. – 2012. – Vol. 247. – P. 172-183.

19. B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases / A.M. Perry [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 162. – P. 40-49.
20. B-cell lymphomas with concurrent IGHBCCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma / M. Snuderl [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2010. – Vol. 34. – P. 327-340.
21. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma / J.M. Schuetz [et al.] // *Leukemia.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1383-1390.
22. Biological characterization of adult MYC-translocation–positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma / S.M. Aukema [et al.] // *Haematologica.* – 2014. – Vol. 99. – P. 726-735.
23. Brentuximab vedotin demonstrates objective responses in a phase 2 study of relapsed/refractory DLBCL with variable CD 30 expression / E.D. Jacobsen [et al.] // *Blood.* – 2015. – Vol. 125. – P. 1394-1402.
24. Cabanillas, F. Advances in Diagnosis and Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma / F. Cabanillas, B. Shah // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* – 2017. – Vol. 17, № 12. – P. 783-796.
25. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018 / J. Ferlay [et al.] // *Eur. J. Cancer.* – 2018. – Vol. 103. – P. 356-387.
26. CD 30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia / G.W. Slack [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol. 167, № 5. – P. 608-617.
27. CD 30 Immunohistochemical Expression In Diffuse Large B-Cell Lymphoma Is Associated With Decreased Overall Survival and The Non-Germinal Center Molecular Subtype / A.M. Collie [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 122, № 21. – Abstract 4318.
28. Cell-of-Origin Assignment in Diffuse Large B-cell Lymphoma Determined By Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Has Prognostic

- Significance Independent of IPI and MYC/BCL2 Immunohistochemistry / D.W. Scott [et al.] // 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition. Abstract book. – 2014. – Vol. 124, № 21. – P. 1624.
29. Cell-of-origin subtype classification of diffuse large B-cell lymphoma using the lymphx2Cx assay retains relevance in the context of BCL2 and MYC expression status / S.L. Kendrick [et al.] // 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition. Abstract book. – 2014. – Vol. 124, № 21. – P. 1667.
  30. Clinical and biological significance of de novo CD 5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries / Z.Y. Xu-Monette [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 5615-5633.
  31. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP / Z.Y. Xu-Monette [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2015. – Vol. 28. – P. 1555-1573.
  32. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma / E. Haralambieva [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2005. – Vol. 29. – P. 1086-1094.
  33. Clinical impact of the cell-of-origin classification and the MYC/BCL2 dual expresser status in diffuse large B-cell lymphoma treated within prospective clinical trials of the German high-grade non-Hodgkin's lymphoma study group / A.M. Staiger [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 22. – P. 2515-2526.
  34. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations / N. Tomita [et al.] // *Haematologia*. – 2009. – Vol. 94. – P. 935-943.
  35. Cohen, J.B. Novel therapies for relapsed/refractory aggressive lymphomas / J.B. Cohen // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. – 2018. – Vol. 2018, № 1. – P. 75-82.
  36. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy / Z. Yao [et al.] // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 32, № 2. – P. 353-363.

37. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone / N.A. Johnson [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 3452-3459.
38. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray / C.P. Hans [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, № 1. – P. 275-282.
39. Davies, A. Double-hit lymphoma: So what? / A. Davies // *Hematol. Oncol.* – 2019. – Vol. 37, Suppl. 1. – P. 19-23.
40. De novo CD 5+ diffuse large B-cell lymphoma: adverse outcomes with and without stem cell transplantation in a large, multicenter, rituximab treated cohort / L. Alinari [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2016. – Vol. 91. – P. 395-399.
41. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines / H. Tilly [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2015. – Vol. 26, suppl. 5. – P. v116-v125.
42. Diffuse large B-cell lymphomas of immunoblastic type are a major reservoir for MYC-IGH translocations / H. Horn [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2015. – Vol. 39. – P. 61-66.
43. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma / J. Brudno [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol. 127. – P. 965-970.
44. Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or PCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review / M. Schmidt-Hansen [et al.] // *Leuk Lymphoma.* – 2017. – Vol. 58. – P. 2403-2418.
45. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience / Y. Oki [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol. 166. – P. 891-901.
46. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies / Z.Y. Xu-Monette [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119. – P. 3668-3683.
47. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma / J. Kiyasu [et al.] // *Blood.* – 2015. – Vol. 126. – P. 2193-2201.

48. Freedman, A.S. Clinical presentation and diagnosis of non-Hodgkin lymphoma [Electronic resource] / A.S. Freedman, J.W. Friedberg. – Mode of access: <https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-diagnosis-of-non-hodgkin-lymphoma>.
49. Front-line, dose-escalated immunochemotherapy is associated with a significant progression-free survival advantage in patients with double-hit lymphomas: a systematic review and meta-analysis / C. Howlett [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2015. – Vol. 170. – P. 504-514.
50. Gene expression profiling of diffuse large B-Cell lymphomas supervised by CD 5 expression / K. Miyazaki [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 102, № 2. – P. 188-194.
51. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma / A. Reddy [et al.] // *Cell.* – 2017. – Vol. 171, № 2. – P. 481-494.
52. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas / K. Georgiou [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol. 127. – P. 3026-3034.
53. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma / J. Zhang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110. – P. 1398-1403.
54. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma / R. Schmitz [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – Vol. 378, № 15. – P. 1396-1407.
55. Hematology. Basic Principles and Practice / R. Hoffman [et al.]. – 7<sup>th</sup> ed. – Philadelphia, Elsevier, 2018. – 2408 p.
56. High-grade B-cell Lymphoma With MYC Rearrangement and Without BCL2 and BCL6 Rearrangements Is Associated With High P53 Expression and a Poor Prognosis / S. Li [et al.] // *Am. J. Surg. Pathol.* – 2016. – Vol. 40, № 2. – P. 253-261.
57. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy / Z.M. Li [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2012. – Vol. 88. – P. 510-517.

58. High Ki-67 expression in involved bone marrow predicts worse clinical outcome in diffuse large B cell lymphoma patients treated with R-CHOP therapy / M.K. Song [et al.] // *Int. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 101, № 2. – P. 140-147.
59. Hu, S. CD 30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study / S. Hu [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, № 14. – P. 2715-2724.
60. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL / G. Ott [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116. – P. 4916-4925.
61. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone / T.M. Green [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 3460-3467.
62. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP / L.H. Sehn [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 1452-1457.
63. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis / A.M. Petrich [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 124. – P. 2354-2361.
64. Impact of oncogene rearrangement patterns on outcomes in patients with double-hit non-Hodgkin lymphoma / D.J. Landsburg [et al.] // *Cancer.* – 2016. – Vol. 122. – P. 559-564.
65. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets / K. Karube [et al.] // *Leukemia.* – 2018. – Vol. 32, № 3. – P. 675-684.
66. Karube, K. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas / K. Karube, E. Campo // *Semin Hematol.* – 2015. – Vol. 52. – P. 97-106.
67. Kawashima, I. Double Expressor Lymphoma Is Associated with Poor Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation / I. Kawashima, Y. Inamoto,

- A.M. Maeshima // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2018. – Vol. 24, № 2. – P. 294-300.
68. Khelfa, Y. Double-Hit Large B Cell Lymphoma / Y. Khelfa, Y. Lebowicz, M.O. Jamil // *Curr. Oncol. Rep.* – 2017. – Vol. 19, № 11. – P. 74.
69. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis / X. He [et al.] // *BMC Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – P. 153.
70. Li, S. Diffuse large B-cell lymphoma / S. Li, K.H. Young, L.J. Medeiros // *Pathology.* – 2018. – Vol. 50, № 1. – P. 74-87.
71. Liu, Y. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment / Y. Liu, S.K. Barta // *Am. J. Hematol.* – 2019. – Vol. 94. – P. 604-616.
72. Low rather than high Ki-67 protein expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma / S. Hasselblom [et al.] // *Leuk Lymphoma.* – 2008. – Vol. 49, № 8. – P. 1501-1509.
73. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival / N.A. Johnson [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 2273-2279.
74. Matthew, J.R. Pierce & Amitkumar Mehta Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD 30 in lymphoma / J.R. Matthew // *Exp. Rev. Hematology.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 29-37.
75. Mehta-Shah, N. Anas Younes Novel Targeted Therapies in Diffuse Large B-Cell Lymphoma / N. Mehta-Shah, A. Younes Novel // *Semin Hematol.* – 2015. – Vol. 52, № 2. – P. 126-137.
76. Melchers, F. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire / F. Melchers // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 578-584.
77. Merli, M. New uses for brentuximab vedotin and novel antibody drug conjugates in lymphoma / M. Merli, A. Ferrario, M. Maffioli // *Expert. Rev. Hematol.* – 2016. – Vol. 9, № 8. – P. 767-780.

78. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes / B. Chapuy [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 5. – P. 679-669.
79. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing / R.D. Morin [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 122. – P. 1256-1265.
80. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program / S. Hu [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 20. – P. 4021-4031.
81. MYC/BCL6 double-hit lymphoma (OHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis / S. Li [et al.] // *Histopathology*. – 2016. – Vol. 6S. – P. 1090-1098.
82. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications / T. Sewastianik [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2014. – Vol. 1846. – P. 457-467.
83. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study / C. Copie-Bergman [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 126. – P. 2466-2474.
84. MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma / T.X. Lu [et al.] // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6. – P. 18374-18388.
85. Nguyen, L. The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects / L. Nguyen, P. Papenhausen, H. Shao // *Genes (Basel)*. – 2017. – Vol. 8. – P. E116.
86. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma / V.N. Ngo [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 470, № 7332. – P. 115-119.

87. Outcomes after Allogeneic Stem Cell Transplantation in Patients with Double-Hit and Double-Expressor Lymphoma / A.F. Herrera [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2018. – Vol. 24. – P. 514-520.
88. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study / M. Crump [et al.] // *Blood.* – 2017. – Vol. 130, № 16. – P. 1800-1808.
89. Outcomes of DA-EPOCH-R induction plus autologous transplant consolidation for double hit lymphoma / A.I. Chen [et al.] // *Leuk Lymphoma.* – 2018. – Vol. 59. – P. 1884-1889.
90. Outcomes of patients with double-hit lymphoma who achieve first complete remission / D.J. Landsburg [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 2260-2267.
91. Pasqualucci, L. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma / L. Pasqualucci, R. Dalla-Favera // *Blood.* – 2018. – Vol. 131, № 21. – P. 2307-2319.
92. Pena, C. Double or triple expressor lymphomas: prognostic impact of immunohistochemistry in patients with diffuse large B-cell lymphoma / C. Pena, P. Villegas, M.E. Cabrera // *Hematol. Transfus Cell. Ther.* – 2019. – Epub ahead of print.
93. Peroja, P. Mutation of TP53, translocation analysis and immunohistochemical expression of MYC, BCL-2 and BCL-6 in patients with DLBCL treated with R-CHOP / P. Peroja, M. Pedersen, T. Mantere // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 14814.
94. Pierce, J.M. Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD 30 in lymphoma / J.M. Pierce, A. Mehta // *Expert. Rev. Hematol.* – 2017. – Vol. 10, № 1. – P. 29-37.
95. Prognostic impact of CD 5 expression in diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab-EPOCH / B. Thakral [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2017. – Vol. 98. – P. 415-421.
96. Prognostic impact of concordant and discordant bone marrow involvement and cell-of-orig in Korean patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP / M.J. Park [et al.] // *J. Clin. Pathol.* – 2015. – Vol. 68, № 9. – P. 733-738.

97. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma / Q. Ye [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – P. 2401-2441.
98. Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients / R.E. Culpin [et al.] // *Histopathology*. – 2013. – Vol. 63, № 6. – P. 788-801.
99. p53 dysregulation in B-cell malignancies: More than a single gene in the pathway to hell / B. Tessoulin [et al.] // *Blood Rev.* – 2017. – Vol. 31, № 4. – P. 251-259.
100. P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma / X.J. Wang [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2017. – Vol. 30. – P. 194-203.
101. p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study / Y. Xie [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2014. – Vol. 141. – P. 593-604.
102. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP / A. Tzankov [et al.] // *Mod. Pathol.* – 2014. – Vol. 27. – P. 958-971.
103. Recent advances in aggressive large B-cell lymphomas: a comprehensive review / P. Korkolopoulou [et al.] // *Adv. Anat. Pathol.* – 2016. – Vol. 23. – P. 202-243.
104. Recent advances in de novo CD 5+ diffuse large B cell lymphoma / P. Jain [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2013. – Vol. 88, № 9. – P. 798-802.
105. Relapsed or refractory double-expressor and double-hit lymphomas have inferior progression-free survival after autologous stem-cell transplantation / A.F. Herrera [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 24-31.
106. Reproducible, quantitative, and flexible molecular subtyping of clinical DLBCL samples using the NanoString nCounter system / M.H. Veldman-Jones [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 21. – P. 2367-2378.

107. Riedell, P.A. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment / P.A. Riedell, S.M. Smith // *Cancer*. – 2018. – Vol. 124, № 24. – P. 4622-4632.
108. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles / D. Cunningham [et al.] // *Lancet*. – 2013. – Vol. 381, № 9880. – P. 1817-1826.
109. Rutherford, S.C. DLBCL Cell of Origin: What Role Should It Play in Care Today? / S.C. Rutherford, J.P. Leonard // *Oncology (Williston Park)*. – 2018. – Vol. 32, № 9. – P. 445-449.
110. Sarkozy, C. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas / C. Sarkozy, A. Traverse-Glehen, B. Coiffier // *Lancet Oncol.* – 2015. – Vol. 16. – P. e555-567.
111. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2019 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2019. – Vol. 69, № 1. – P. 7-34.
112. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2020 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer J. Clin.* – 2020. – Vol. 70, № 1. – P. 7-30.
113. Sole rearrangement but not amplification of MYC is associated with a poor prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma and B cell lymphoma unclassifiable / D.J. Landsburg [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2016. – Vol. 175, № 4. – P. 631-640.
114. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker / A. Batlle-Lopez [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, № 14. – P. 18036-18049.
115. Swerdlow, S.H. Diagnosis of ‘double hit’ diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC / S.H. Swerdlow // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. – 2014. – Vol. 2014. – P. 90-99.

116. Teng, G. Immunoglobulin somatic hypermutation / G. Teng, F.N. Papavasiliou // *Annu. Rev. Genet.* – 2007. – Vol. 41. – P. 107-120.
117. The Activated B-Cell Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma As Determined By Whole Genome Expression Profiling on Paraffin Embedded Tissue Is Independently Associated With Reduced Overall and Progression Free Survival in the Rituximab Era: Results From the UK NCRI R-CHOP 14 v 21 Phase III Trial / M. Gleeson [et al.] // 58<sup>th</sup> American Society of Haematology Annual Meeting and Exposition Blood. – San Diego, CA, 2016. – P. 1746.
118. The impact of concurrent MYC BCL2 Protein Expression on the risk of Secondary Central Nervous System Relapse in Diffuse Large B-cell Lymphoma (DLBCL) / K.L. Savage [et al.] // 56<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition. Abstract book. – 2014. – Vol. 124, № 21. – P. 495.
119. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: a predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma / M.A. Shipp [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329, № 14. – P. 987-994.
120. The prognosis of MYC translocation positive diffuse large B-cell lymphoma depends on the second hit / A. Clipson [et al.] // *J. Pathol. Clin. Res.* – 2015. – Vol. 1. – P. 125-133.
121. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement / J. Campbell [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2006. – Vol. 76. – P. 473-480.
122. The role of anti-PD-1 and anti-PD-L1 agents in the treatment of diffuse large B-cell lymphoma: The future is now / L.M. Juárez-Salcedo [et al.] // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2017. – Vol. 113. – P. 52-62.
123. Therapeutic Use of Brentuximab Vedotin in CD 30+ Hematologic Malignancies / A. Fabbri [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2017. – Vol. 17, № 7. – P. 886-895.

124. TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations / N. Gebauer [et al.] // *Leuk Lymphoma*. – 2015. – Vol. 56. – P. 179-185.
125. Watkins, M.P. CD 19-targeted immunotherapies for treatment of patients with non-Hodgkin B-cell lymphomas / M.P. Watkins, N.L. Bartlett // *Expert Opin Investig Drugs*. – 2018. – Vol. 27, № 7. – P. 601-611.
126. WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow [et al.]. – Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008. – P. 233-234.
127. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow [et al.]. – Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017. – P. 291-342.
128. Yasodha, N. The Biology of the Germinal Center / N. Yasodha // *ASH Education Book*. – 2007. – Vol. 1. – P. 210-215.
129. Zhang, J. Cancer Immunotherapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma / J. Zhang, L.J. Medeiros, K.H. Young // *Front. Oncol*. – 2018. – Vol. 8. – P. 351.