

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТЕРАПИИ
И ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Карпова Виктория Сергеевна

**КЛИНИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ С ПОРАЖЕНИЕМ
ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

3.1.28. Гематология и переливание крови

1.5.7. Генетика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Поспелова Татьяна Ивановна

доктор медицинских наук

Воропаева Елена Николаевна

Новосибирск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.	17
1.1 Современные представления о гематоэнцефалическом барьере.	17
1.1.1 Отделы и строение гематоэнцефалического барьера.	17
1.1.2 Функции гематоэнцефалического барьера.	21
1.1.3 Механизмы изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера и относительная иммунная привилегированность центральной нервной системы.	22
1.1.4 Механизмы метастазирования опухолевых клеток через гематоэнцефалический барьер.	25
1.2 Характеристика первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы.	29
1.2.1 Общие сведения.	29
1.2.2 Клиническая картина и диагностика первичной лимфомы центральной нервной системы.	31
1.2.3 Прогноз и подходы к терапии заболевания.	32
1.3 Вторичное поражение центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	34
1.3.1 Общие сведения.	34
1.3.2 Клиника и диагностика вторичного поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	35
1.3.3 Терапия пациентов с поражением центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	39
1.3.4 Подходы к профилактике вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.	42
1.3.5 Прогностические модели и факторы риска рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы. ...	46

1.4. Изучение диффузной В-крупноклеточной лимфомы методами секвенирования нового поколения.	53
1.4.1 Общие сведения о секвенировании нового поколения.	53
1.4.2 Мутационный профиль нодальных вариантов диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	56
1.4.3 Мутационный профиль первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы.	60
1.4.4 Мутационная нагрузка в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы.	62
1.5 Резюме.	64
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	67
2.1. Дизайн исследования.	67
2.2. Характеристика больных CBioPortal for Cancer Genomics database.	67
2.3. Клиническая характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования, имеющих поражение центральной нервной системы.	70
2.4 Методы клинического, лабораторного и инструментального обследования в группе больных с поражением центральной нервной системы.	73
2.5 Характеристика больных системной диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы.	79
2.6 Специальные методы исследования.	81
2.6.1 Высокопроизводительное секвенирование образцов.	81
2.6.2 Подтверждение выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей.	85
2.6.3 Скрининговая методика обнаружения рекуррентной мутации <i>MYD88</i> p.L265P.	87
2.7 Статистическая обработка материала.	89
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	91
3.1. Сравнение первичной лимфомы центральной нервной системы и	

диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы.	91
3.2. Сравнение диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы и системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы без вовлечения центральной нервной системы.	100
3.3. Сравнительный анализ первичной лимфомы центральной нервной системы и системной диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы.	102
3.4. Анализ эффективности терапии в выборке пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы.	103
3.5 Мутационный статус пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой базы данных CBioPortal for Cancer Genomics database.	105
3.6 Прогностическое значение мутаций <i>MYD88</i> , <i>PIM1</i> , <i>CD79B</i> , <i>INO80</i> , <i>SMARCA4</i> и <i>ARID1A</i>	112
3.7 Собственные результаты высокопроизводительного секвенирования образцов опухоли больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с рецидивами в центральной нервной системы.	113
3.8 Анализ функциональной значимости выявленных в группе исследований мутаций.	130
ОБСУЖДЕНИЕ.	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	175
ВЫВОДЫ.	184
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	186
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	187
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	192
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	223

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Диффузная В-крупноклеточная неходжкинская лимфома (ДВККЛ) является наиболее распространенной формой неходжкинских лимфом, на её долю приходится около 49 % случаев лимфоидных неоплазий В-клеточного происхождения во всем мире [208]. Улучшение подходов к терапии системной опухоли, достигнутых в последние годы, обеспечивает более высокую выживаемость и «дожитие» пациента до рецидива в центральную нервную систему (ЦНС). В эпоху применения ритуксимаба рецидив в ЦНС развивается у 4–5 % пациентов с лимфомой (по распространенности соответствует критериям орфанного заболевания), что является крайне неблагоприятным событием в течении заболевания. И если ранее частыми являлись менингеальные варианты, то большинство рецидивов лимфомы в ЦНС в эпоху ритуксимаба вовлекают паренхиму головного мозга [232].

В России в настоящее время отсутствует целостная характеристика клинико-лабораторных данных пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением ЦНС, имеются отдельные статьи, затрагивающие вопросы неврологической симптоматики, психических нарушений у пациентов с лимфомами ЦНС, описание клинических случаев [2; 17].

Современная профилактика вовлечения ЦНС при ДВККЛ является крайне токсичной и представлена двумя основными подходами: внутривенным введением метотрексата в высоких дозах или интратекальными введениями препаратов, эффективность которых не подтверждается в ряде системных мета-анализов [230].

Особое значение имеет прогнозирование риска рецидива ДВККЛ в ЦНС. В настоящее время отбор пациентов для проведения профилактики вовлечения ЦНС при лимфомах остается сложным. Международный прогностический индекс ЦНС (МПИ-ЦНС) позволяет определить группу более высокого риска рецидива в ЦНС при агрессивных лимфомах [64]. Однако частота рецидива в ней составляет

10–12 %, вместе с тем, до половины случаев рецидивов ДВККЛ в ЦНС происходит среди пациентов из групп низкого/среднего риска [97]. Считается, что разработка молекулярно-генетических маркеров и их интеграция в клинические модели риска поражения ЦНС при ДВККЛ может повысить эффективность последних [126].

Немаловажное значение имеет как поиск новых более действенных способов профилактики рецидивов лимфомы в ЦНС, так и оптимизация терапии ДВККЛ на этапах системного течения опухолевого процесса и при вовлечении нервной ткани, что затруднено в силу исключения пациентов с рецидивами в ЦНС из большинства клинических исследований. Кроме того, отсутствуют модели на животных, которые качественно воспроизводили бы поражение ЦНС при лимфоме [97].

Самым большим препятствием для успешного прогнозирования, профилактики и лечения рецидивов в ЦНС является недостаточное понимание генетических основ фенотипической гетерогенности ДВККЛ, которая в настоящее время расценивается не как отдельное заболевание, а совокупность заболеваний, каждое из которых обладает определенными молекулярными и биологическими особенностями [148].

Поскольку ДВККЛ может иметь в своей основе активацию различных онкогенных путей, разумно предположить, что и закономерности опухолевой прогрессии у пациентов могут отличаться, а новые методы лечения, разработанные для ингибирования этих специфических онкогенных путей, будут успешными только в определенных подгруппах пациентов с ДВККЛ и малоэффективными в общей массе больных.

Повышенный риск вовлечения ЦНС наблюдается у пациентов с «double-hit» и «triple-hit» ДВККЛ (с перестройками *MYC* и *BCL2* и/или *BCL6*), а также с вовлечением костного мозга, яичек или молочной железы, что подчеркивает необходимость выяснения молекулярно-биологических черт опухоли, связанных с повышенным потенциалом проникновения опухолевых В-лимфоцитов в ткани [63; 118; 119; 173; 183; 236].

Высочайшую информативность в изучении ДВККЛ показали различные подходы молекулярного профилирования: геномного, транскриптомного, протеомного и др. Так данные, полученные с применением высокопроизводительного секвенирования опухолевой ткани больных системной ДВККЛ и первичной лимфомой ЦНС на уровне целых экзотов и геномов, привели к появлению новых направлений исследований в онкогематологии [32; 138; 210; 221], тогда как случаи лимфомы с рецидивами в ЦНС остаются практически не изученными.

Понимание биологических свойств ДВККЛ с рецидивами в ЦНС крайне затруднено в силу невысокой частоты события и редкости выполнения биопсии из очага в головном мозге по причине выраженной тяжести состояния больных. Поражение центральной нервной системы при лимфоме развивается в первые 6–9 месяцев с момента диагностики опухоли, иногда на фоне проводимого лечения. Случаются также изолированные рецидивы ДВККЛ в ЦНС, что может свидетельствовать о ранней миграции лимфомных клеток за гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и существовании нераспознанного очага уже на момент постановки диагноза [113; 232]. Именно по этим причинам актуальным представляется изучение мутационного статуса лимфомы с рецидивами в ЦНС на основании анализа первичного биоматериала – биоптатов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, полученных на этапах диагностики. Этот биоматериал вполне может позволить идентифицировать молекулярно-генетические маркеры опухолевых клеток, которые должны насторожить в отношении высокого риска вовлечения в опухолевый процесс ЦНС.

В этой связи сложно переоценить важность изучения мутационного ландшафта случаев ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, в том числе с привлечением доступных международных баз данных, для идентификации панели генов, таргетное секвенирование которых позволяло бы получать прогностическую информацию, способствовать выбору оптимальной терапии больных и быть основой для разработки новых подходов к профилактике вовлечения нервной системы при лимфоме.

Степень разработанности темы диссертации

Данные по России о клинико-лабораторной характеристике пациентов с ДВККЛ с вовлечением ЦНС фрагментарны и не позволяют оценить общую картину. Они представлены единичными публикациями, большинство из которых представляют собой описание клинических случаев [1; 2; 17]. Исследований, в которых бы проводилась многосторонняя оценка пациентов данной группы, включая факторы прогноза, практически нет.

Опубликованные в последние годы работы свидетельствуют о том, что прогностическое значение МПИ-ЦНС, применяемого большинством исследователей с целью отбора пациентов для профилактического лечения рецидивов ДВККЛ в ЦНС, не всегда воспроизводится [97; 126], поэтому необходима его дальнейшая валидация на различных выборках. С целью повышения чувствительности и специфичности данной клинической модели прогноза требуется ее доработка и/или дополнение молекулярно-генетическими маркерами.

В настоящее время в публикациях базы данных PubMed содержатся сведения о результатах таргетного, полногеномного или полноэкзомного секвенирования около 2 000 образцов системной ДВККЛ и более 150 образцов первичной ДВККЛ ЦНС, а также данные о мутационном профиле нескольких клеточных линий лимфомы [131]. Тогда как сведения о мутационном статусе ДВККЛ с рецидивами в ЦНС представлены единичными публикациями, описывающими небольшие группы больных или отдельные клинические случаи [97].

В подавляющем большинстве работ, описанных в литературе, подчеркивается необходимость поиска эффективных методов профилактики поражения ЦНС при ДВККЛ. Нерешенной задачей является также индивидуализированный выбор терапии ДВККЛ как в момент клинической манифестации рецидива с вовлечением нервной системы, так и в момент санации ЦНС на досимптомных этапах [114].

Данные задачи могут быть успешно решены только при углублении понимания биологии опухоли [52]. Вместе с тем, представления о молекулярных

механизмах развития рецидивов ДВККЛ с вовлечением ЦНС в настоящее время носят крайне ограниченный характер [56].

Анализ информации о клинических и молекулярно-генетических характеристиках лимфомы с вовлечением нервной ткани, представленной в международных базах данных, ранее не проводился.

Все вышеперечисленное определяет недостаточную разработанность выбранной темы, делая её областью интереса современной медицинской науки, онкологии, гематологии и медицинской генетики и актуальной научной задачей.

Цель исследования

На основании изучения особенностей клинического течения, данных лабораторно-инструментальных методов исследования и анализа мутационного профиля дать сравнительную характеристику первичного и вторичного поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме и выявить факторы риска вторичного вовлечения центральной нервной системы при данной опухоли.

Задачи исследования

1. Дать сравнительную клиническую характеристику диффузной В-крупноклеточной лимфомы с первичным и вторичным поражением центральной нервной системы.

2. Провести поиск клинических и лабораторных факторов риска вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

3. Выявить особенности мутационного профиля диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным поражением центральной нервной системы по сведениям из доступных баз данных и в ходе собственного исследования с применением методов высокопроизводительного секвенирования нового поколения (NGS).

4. Определить гены, мутации в которых ассоциированы с высоким

риском вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

Научная новизна

Впервые получены сравнительные данные по частоте встречаемости и клинико-лабораторной характеристике пациентов с В-крупноклеточной лимфомой, имеющих первичное поражение и вторичное вовлечение в опухолевый процесс центральной нервной системы.

На отечественной группе больных проведена оценка особенностей клинического течения, данных лабораторных и инструментальных методов исследования системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы без поражения и с поражением центральной нервной системы, первичной лимфомы центральной нервной системы (вариант диффузной В-крупноклеточной лимфомы).

Впервые на российской выборке больных выполнено изучение мутационного профиля диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным поражением центральной нервной системы с применением высокопроизводительного секвенирования нового поколения. Полученные результаты сопоставлены с зарубежными данными из C-Bioportal for cancer genomics. Это позволило обобщить данные и получить принципиально новую информацию о биологии опухоли, выявить новые молекулярно-генетические механизмы патогенеза и прогрессии лимфомы с поражением центральной нервной системы, связанные с мутациями в генах NF- κ B сигнального пути (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*), нарушениями в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *SMARCA4*), с мутациями в генах JAK-STAT сигнального пути (*PIM1* и *STAT3*), а также с мутациями в главном онкосупрессорном гене *TP53*, приводящими к активации этих путей.

По итогам работы были идентифицированы клинические, лабораторно-инструментальные и молекулярно-генетические характеристики, выявление которых свидетельствует о высоком риске вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме.

Результаты работы могут способствовать решению принципиально новых задач по разработке целенаправленной терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы как на этапе определения высокого риска вовлечения центральной нервной системы, так и на этапе уже развившегося поражения центральной нервной системы.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании анализа клинической характеристики ДВККЛ с поражением ЦНС на территории Сибирского мегаполиса возможно перспективное планирование и прогнозирование числа пациентов, нуждающихся в высокотехнологичном, дорогостоящем лечении, что позволит правильно спланировать бюджет и обеспечить регион необходимыми медикаментами и специализированными медицинскими кадрами.

Проведенное исследование молекулярно-генетического профиля ДВККЛ с поражением ЦНС с привлечением международной базы данных CBioportal for cancer genomics database расширяет информацию по молекулярной биологии опухоли и открывает новые направления развития междисциплинарных исследований в онкогематологии.

По результатам научно-исследовательской работы создан банк ДНК опухолевой ткани, полученной от пациентов с ДВККЛ с поражением ЦНС, который может быть использован для дальнейших исследований.

Определены гены, молекулярно-генетическое тестирование которых поможет выделить пациентов с ДВККЛ, имеющих высокий риск вторичного вовлечения в опухолевый процесс ЦНС.

Запатентована скрининговая методика выявления рекуррентной мутации *MYD88* p.L265R на стандартном оборудовании в широкой клинической практике (Патент РФ № 2756909 от 06.10.2021, Евразийский патент № 043879 от 30.06.2023). Предлагаемый способ выявления мутации пригоден при использовании ДНК из любого биоматериала, включая архивные FFPE-образцы, которые характеризуются высокой степенью фрагментации.

Полученные данные о мутационном профиле ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС могут повлиять на терапевтические решения, служить основой персонализации лечения и обеспечить усовершенствование схем ведения больных.

Диссертационное исследование выполнено при поддержке Гранта Президента России молодым ученым в 2019–2020 гг. на тему: «Исследование мутационного профиля диффузной В-крупноклеточной лимфомы методом высокопроизводительного секвенирования для разработки молекулярных основ принятия решения о выборе программы терапии и профилактики поражения центральной нервной системы».

Методология и методы диссертационного исследования

Исследовательская деятельность была направлена на получение сравнительных данных о клинической характеристике пациентов с ДВККЛ с первичным и вторичным поражением, а также без поражения ЦНС и поиск молекулярно-генетических черт лимфомы на момент диагностики системной ДВККЛ, свидетельствующих о высоком риске вторичного вовлечения ЦНС при опухоли.

Работа имеет дизайн ретроспективного исследования (2011–2022 гг.). Объект исследования – больные ДВККЛ трех групп: с первичной лимфомой ЦНС, с системной ДВККЛ без поражения ЦНС и с вторичным вовлечением ЦНС. Предмет исследования: клинические характеристики, данные лабораторно-инструментальных методов исследования, мутационный профиль лимфомы.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с принципами доказательной медицины с применением общенаучных (количественное и качественное описание), общелогических (анализ и синтез), а также статистических методов, соответствующих поставленным цели и задачам.

В работе использованы современные специальные методы исследования: анализ специализированных баз данных, фенол-хлороформная экстракция ДНК,

полноэкзомное секвенирование методом парно-концевых прочтений на аппарате Illumina HiSeq 1500, биоинформационная обработка и прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру.

Положения, выносимые на защиту

1. Для диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы характерны мультифокальный характер и отсутствие типичной локализаций поражений в паренхиме головного мозга, вовлечение в опухолевый процесс спинного мозга и черепно-мозговых нервов, частое поражение оболочек мозга, наряду с меньшим объемом опухолевых очагов.

2. В случаях диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы в дебюте заболевания опухолевый процесс характеризуется большим пролиферативным потенциалом и способностью к диссеминации по нелимфоидным органам по сравнению с диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы.

3. Молекулярно-генетический профиль системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным поражением центральной нервной системы характеризуется мутациями, запускающими неоангиогенез, способствующими избеганию опухоли иммунного надзора и выживанию опухолевых клеток.

Степень достоверности

Достоверность результатов диссертации обеспечена обоснованностью исходных теоретических позиций, соответствием дизайна исследования критериям доказательной медицины и основана на применении в ходе исследования комплекса современных методов клинического, биохимического и молекулярно-генетического исследования, а также общепринятых статистических методов, соответствующих цели и задачам работы. Исследование выполнено на

репрезентативном объеме клинических наблюдений – крупнейшей отечественной выборке больных ДВККЛ с вовлечением ЦНС (82 пациента) и без такового (202 больных), а также с привлечением международной базы данных. Методики обследования, использованные в работе, были стандартизованы для всех участников. Использовались апробированные лабораторно-инструментальные методы, сертифицированные наборы реагентов и приборы, современные компьютерные программы для анализа и обработки полученных данных. Научные данные корректно обработаны с применением современных методов статистического анализа и детально проанализированы. Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными (протокол № 7 от 23.03.2023).

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены и обсуждены на 9-й Всероссийской конференции «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2022), на Объединенном 6-м конгрессе гематологов и III конгрессе трансфузиологов России (Москва, 2022), на 9-м Съезде Российского общества медицинских генетиков (Москва, 2021), на 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2021), на Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии, онкогематологии и клеточной терапии» (Киров, 2021), на Всероссийском гематологическом форуме с международным участием «Фундаментальные и прикладные исследования в гематологии» (Новосибирск, 2021), на European Society of Human Genetics Conference (Берлин, 2020), на 11th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Новосибирск, 2020).

Апробация работы состоялась на заседании проблемной комиссии «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», «Актуальные проблемы профилактики, диагностики и лечения внутренних болезней» ФГБОУ ВО

«Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2023).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Клинико-морфологические, молекулярно-биологические и эпигенетические основы диагностики и лечения заболеваний внутренних органов и коморбидных состояний в терапевтической клинике, номер государственной регистрации 121061700029-5.

Внедрение результатов исследования

По результатам работы получен 1 патент на изобретение РФ № 2756909 С1 от 06.10.2021 «Способ выявления мутации p.L265P в гене *MYD88*» авторов Воропаевой Е. Н., Поспеловой Т. И., Максимова В. Н. и др.; Евразийский патент на изобретение № 043879 от 30.06.2023.

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии ФПК и ППФ Новосибирского государственного медицинского университета и практику лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 1 патент РФ на изобретение и 4 статьи в научных журналах и изданиях, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 1 статья в журнале категории К1 и 3 статьи в журналах категории К2, входящих в список изданий, распределённых по категориям К1, К2, К3, в том числе 2 статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и систем цитирования Scopus и Chemical Abstracts.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 228 страницах машинописного текста и состоит из введения, трех глав, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 243 источниками, из которых 215 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 24 таблиц и 24 рисунков.

Личный вклад автора

Автор диссертационного исследования участвовал в разработке дизайна исследования, внес личный вклад в формулировку цели и задач исследования, самостоятельно проводил выполнение всех этапов работы: анализ данных литературы, сбор биологического материала и клинических данных, статистическую обработку данных, обобщение, интерпретацию научных результатов, обсуждение результатов исследования и формирование выводов. В соавторстве написал и опубликовал все печатные работы в журналах, включенных в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Современные представления о гематоэнцефалическом барьере

1.1.1 Отделы и строение гематоэнцефалического барьера

Гематоэнцефалический барьер представляет собой физиологическую структуру, отграничивающую нервную ткань от кровеносной системы организма [115], которая включает в себя специализированные сосудистые барьеры центральной нервной системы: гематоретинальный, гемато-нервный, гематолабиринтный и гемато-спинномозговой барьер [21]. Другие клеточные образования, такие как эпителиальные клетки сосудистого сплетения гематоликворного барьера и танициты, расположенные вдоль границ желудочков и околожелудочковых органов, также могут считаться отделами гематоэнцефалического барьера, поскольку они предотвращают нерегулируемое попадание компонентов крови в спинномозговую жидкость и интерстициальную жидкость головного мозга. Кроме того, эти образования обладают другими важными функциями, такими как регулирование транспорта циркулирующих в системном кровотоке веществ в мозг, удаление потенциально вредных веществ из мозга, выделение молекул, передающих сигналы клеткам в паренхиме мозга, и реагирование на стимулы, возникающие как в мозге, так и приходящие из крови [83].

При этом гематоэнцефалический барьер отсутствует в шести анатомических образованиях центральной нервной системы, большинство из которых являются нейроэндокринными структурами и участвуют в процессах нейрогуморальной регуляции: ромбовидная ямка, шишковидное тело, нейрогипофиз, прикрепленная пластинка, субкортикальный и субкомиссуральный органы [6; 21].

Анатомически гематоэнцефалический барьер состоит из эндотелиальных клеток, астроцитов, перицитов, нейронов, макрофагов микроглии, а также

внеклеточного матрикса и гликокаликса. Все они входят в состав нейроваскулярной единицы (Рисунок 1) [6].

Эндотелиальные клетки выполняют барьерную, транспортную, обменную функции, а также индуцируют дифференцировку астроцитов и поддерживают функции перицитов [83]. Наиболее апикальными структурами в эндотелиальных клетках являются плотные контакты. Их основными трансмембранными компонентами являются клаудины, окклюдин и молекулы адгезии. Ниже плотных контактов расположены присоединяющие контакты, образованные трансмембранными белками – кадгеринами и нектинами [6].

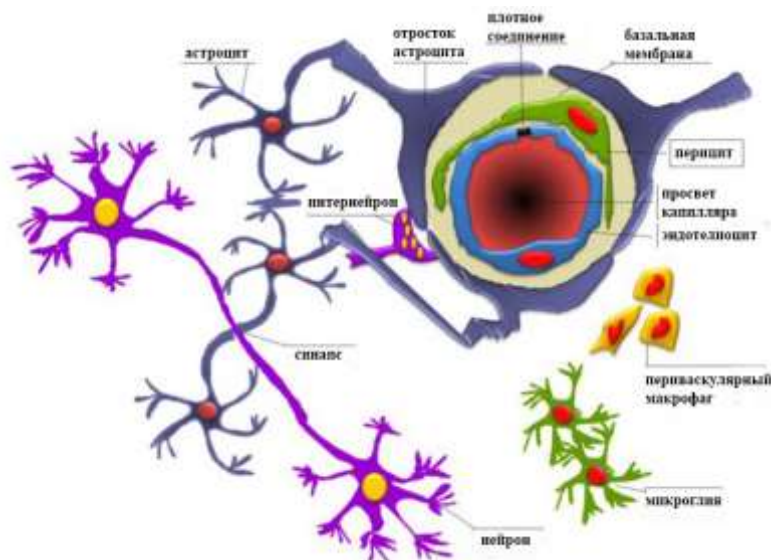


Рисунок 1 – Строение гематоэнцефалического барьера, нейроваскулярная единица [21; 84]

Просветную поверхность эндотелиальных клеток выстилает гликокаликс. Он предотвращает прямое воздействие компонентов плазмы на эндотелиальную просветную мембрану, а также выполняет функции механосенсора и передачи сигналов в эндотелий [83].

Астроциты – наиболее распространенный тип клеток головного мозга. Они регулируют ряд физиологических процессов в ЦНС, таких как нейромедиация, синаптическая пластичность, функциональная гиперемия и конвективный поток

интерстициальной жидкости мозга. Отростки астроцитов окружают мозговые капилляры, артериолы и вены. В капиллярах астроцитарные отростки расположены на стороне базальной мембраны, которая окружает эндотелиальные клетки и перициты. Астроциты являются иммунологически активными клетками и представляют собой тип клеток в ЦНС, экспрессирующих основной комплекс гистосовместимости II класса [10].

Перициты образуют второй клеточный слой в капиллярах и посткапиллярах [209]. Они очень тесно прикреплены к эндотелиальным клеткам и имеют общую с ними базальную мембрану. Благодаря своей близости к эндотелиальным клеткам, перициты являются мощными модуляторами функций ГЭБ и вносят свой вклад в иммунный ответ в нервной ткани, вызывая повышенную проницаемость ГЭБ путем физической диссоциации или секреции факторов (цитокинов, хемокинов), изменяющих эндотелиальную диффузию, облегчая транспорт иммунных клеток в мозг, вызывая распространение нейровоспаления путем стимуляции как резидентных, так и рекрутированных из кровотока иммунных клеток [83].

Базальная мембрана микрососудов состоит из ламининов, коллагена IV, фибронектина, гликозаминогликанов и гликопротеинов. Она функционирует как каркас, прикрепление эндотелия на который опосредуется интегринами и, наряду с другими компонентами нейроваскулярной единицы, способствует непроницаемости микроциркуляторного русла ЦНС [145].

Нейроны также оказывают существенное влияние на функционирование ГЭБ. В частности, они индуцируют экспрессию ГЭБ-ассоциированных белков в эндотелиальных клетках, регулируют их проницаемость, а также ширину просвета сосудов мозга [83].

Микроглия головного мозга происходит из клеток желточного мешка, мигрирующих в ЦНС во время эмбрионального развития. В мозге взрослого человека клетки микроглии тесно связаны с сосудистой сетью и продуцируют провоспалительные медиаторы (цитокины, хемокины, оксид азота, простагландины, матриксные протеазы и активные формы кислорода) [162]. Важной защитной функцией микроглии является ее способность быстро

мигрировать в места повреждения головного мозга и изменять свою морфологию с образованием специализированной фагоцитарной сети, препятствующей диффузии вредных веществ в мозговую паренхиму. Микроглия также способствует разрешению воспаления в головном мозге после травмы [58].

Гематоликворный барьер имеет свои особенности. Эпендима – это оболочка в центральной нервной системе, которая располагается на границе раздела между паренхимой мозга и полостями желудочков, а также в перивентрикулярных органах головного мозга, практически не имеющих гематоэнцефалического барьера. Эпендима представлена эпендимоцитами – реснитчатыми клетками [25].

Согласно современным представлениям, эпендимальные клетки оказывают трофическую и метаболическую поддержку клеток микроокружения мозга, принимают участие в выработке и секреции цереброспинальной жидкости, стероидогенезе, избирательном проникновении воды в клетки или выведению ее из клеток, контроле уровня натрия во внеклеточной жидкости и обеспечивают формирование самого эпендимального (гематоликворного) барьера [25].

Барьерная роль эпендимоцитов обеспечивается наличием разных типов межклеточных контактов и анкерных белков. В области апикальной поверхности эпендимоциты соединяются между собой посредством адгезивных контактов, в средней части между клетками присутствуют щелевые контакты. Такие же контакты имеются между эпендимоцитами и астроцитами. Кроме этого, в отдельных областях центральной нервной системы эпендимоциты соединяются посредством плотных контактов [25].

В желудочках мозга эпендимальные клетки совместно с микрососудами формируют сосудистое сплетение, продуцирующее ликвор. У людей образуется около 500–600 мл ликвора в день. Он обеспечивает питательную и гомеостатическую среду для мозга и циркулирует через желудочковые, субарахноидальные и параваскулярные пространства, а также через паренхиму головного мозга [21]. Ликвор полностью обменивается в человеческом мозге примерно трижды за сутки [83].

Сосудистое сплетение является иммунноактивной тканью. Оно представляет собой площадку для обмена лейкоцитов и иммунного надзора. Его клетки активируют экспрессию провоспалительных цитокинов, молекул клеточной адгезии и главного комплекса гистосовместимости [6].

Большую роль в поддержании гомеостаза мозга играют специализированные клетки эпендимы – танициты, которые морфологически отличаются от кубовидных эпендимальных клеток, выстилающих желудочки, тем, что у них нет ресничек [27]. Помимо барьерной функции, танициты участвуют в регуляции гипоталамических путей и нейроиммунной коммуникации [25].

1.1.2 Функции гематоэнцефалического барьера

Главная функция ГЭБ – барьерная. Она заключается в предотвращении попадания в ткань мозга веществ, переносимых кровью. В ее основе лежат следующие механизмы:

- плотные контакты, которые предотвращают парацеллюлярную диффузию растворенных веществ через мозг;
- специализированный липидный состав эндотелия сосудов мозга, который ингибирует опосредованный микровезикулами жидкофазный трансцитоз;
- активное прохождение веществ в направлении мозг-кровь или ликвор-кровь за счет экспрессии клетками ГЭБ белков-транспортёров эффлюкса, а именно белков семейства ABC-транспортёров (atp-binding cassette – ABC), что ограничивает поглощение мозгом эндогенных макромолекул и ксенобиотиков [21; 83].

Помимо барьерной функции ГЭБ имеет специализированные функции, которые отвечают за гомеостаз ЦНС, питание и связь между тканью мозга и телом (Рисунок 2). Так, небольшие липофильные молекулы могут пересекать ГЭБ путем пассивной трансмембранной диффузии. В целях же обеспечения мозга субстратами для выработки энергии, синтеза белков и нуклеиновых кислот,

поддержания pH и электролитов транспорт малых полярных молекул (глюкозы, аминокислот, нуклеозидов, ионов, простагландинов и других) через клеточные мембраны ГЭБ осуществляется растворимыми белками-носителями. Пептиды и крупные белки переносятся через ГЭБ путем рецептор-опосредованного трансцитоза и эндоцитоза, которые не только энергозависимы и насыщаемы, но и зависят от везикулярного транспорта [98].

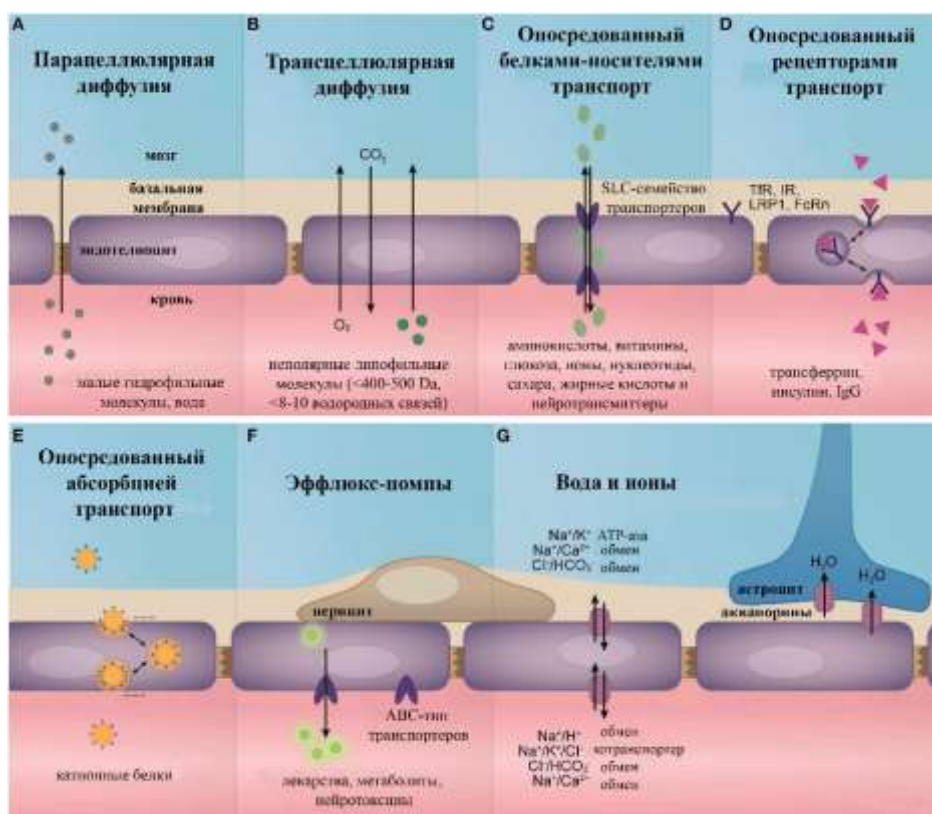


Рисунок 2 – Механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер [47]

1.1.3 Механизмы изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера и относительная иммунная привилегированность центральной нервной системы

Проницаемость гематоэнцефалического барьера меняется с течением жизни человека: она очень высока в первые недели жизни ребенка и крайне мала

в старости [6]. При этом ГЭБ не статичен, он взаимодействует с микросредой ЦНС и реагирует на ее потребности, а его проницаемость может контролироваться внутри- и межклеточной передачей сигналов между эндотелиальными клетками и окружающими астроцитами и нейронами.

Повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера, строго говоря, считается патологическим состоянием. Под нарушением ГЭБ понимают потерю нормальной барьерной функции в результате утраты плотных контактов, явления макропиноцитоза, образования фенестр или канюль/везикуло-трубчатых структур, что позволяет протекать в ЦНС таким веществам, как сывороточные белки. Однако данный термин часто используется гораздо более свободно для описания изменений ГЭБ, позволяющих проникать в мозговую паренхиму и лейкоцитам [140].

Существует несколько взаимосвязанных друг с другом механизмов, нарушающих барьерную функцию ГЭБ [83].

1) Механическое нарушение целостности ГЭБ, что приводит к повреждению эндотелия и кровоизлиянию в ткань мозга и может быть связано не только с черепно-мозговой травмой, но и с внутричерепным кровоизлиянием и реперфузионной травмой после ишемии мозга.

2) Воспаление, которое является ключевым биологическим процессом в ответ на травмы и инфекции, также приводит к изменению барьерных и интерфейсных функций ГЭБ. Например, при нейровоспалении или системном воспалительном процессе повреждение плотных контактов эндотелиоцитов может происходить под воздействием медиатора воспаления интерлейкина-1 бета (IL-1b). Данный интерлейкин приводит к снижению экспрессии, нарушению локализации или посттрансляционной модификации белков плотных контактов.

Другие воспалительные медиаторы – брадикинин, гистамин, серотонин, арахидоновая кислота – повышают парацеллюлярную проницаемость ГЭБ. Также во время системного воспаления происходит деградация гликокаликса и базальной пластинки, что приводит к увеличению проницаемости эндотелия и повышению адгезии лейкоцитов к стенке сосудов в ЦНС [83].

3) Проникновение лейкоцитов в параваскулярное пространство мозга.

Считается, что лейкоциты в здоровой паренхиме головного мозга отсутствуют или встречаются в крайне небольших количествах. Содержание их в ликворе здорового человека может достигать до 5 000/мл, и около 80 % клеток являются CD4⁺ Т-клетками памяти. Т-клетки в сосудистом сплетении и менингеальных компартментах вносят свой вклад в иммунную защиту мозга, опосредуют реакции на повреждение мозговой ткани, а также регулируют физиологические функции ЦНС [21; 87].

Если ранее центральная нервная система (ЦНС) рассматривалась как абсолютно иммунопривилегированная область, в настоящее время считается, что иммунная привилегированность ЦНС относительна [21; 83].

Обмен иммунными клетками между кровью и мозгом в норме является строго регулируемым процессом. Экстравазация их в ЦНС может проходить через посткапиллярные вены в субарахноидальное пространство, через гематоликворный барьер в сосудистом сплетении в ликвор и через гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга. Процесс пересекания ими сосудистой стенки может происходить транс- или парацеллюлярно и включает в себя ряд стадий, которые были хорошо охарактеризованы в исследованиях сосудов, не относящихся к ЦНС. Они включают в себя этапы адгезии, перекатывания, захвата, проползания и диапедеза [21, 38].

Сосудистая система ЦНС, будучи структурно и функционально отличной от других органов, отличается в своем контроле миграции лимфоцитов. Начальные стадии захвата и перекатывания опосредуются взаимодействием молекул адгезии – селектинов на поверхности эндотелиальных клеток с гликопротеидами (интегринами) на поверхности активированных лимфоцитов. Так, молекула адгезии сосудистого эндотелия (ICAM-1) экспрессируется в большом количестве в сосудах и поэтому считается, что она может играть важную роль в рекрутировании клеток из кровообращения [102].

В результате взаимодействия между хемокинами, секретируемыми эндотелием, и соответствующими хемокиновыми рецепторами, экспрессируемыми

на лимфоцитах, происходят конформационные изменения интегринов, способствуя, тем самым, их прочной адгезии к эндотелиальным клеткам. Далее, лимфоциты ползут вдоль эндотелиального барьера против кровотока, что также опосредовано селектинами. Активация внутриклеточной части молекулы адгезии стимулирует перестройку цитоскелета эндотелиоцита, что облегчает диапедез через него клеток в периваскулярное пространство [21; 102].

Также лимфоцит может мигрировать в направлении кровь-мозг непосредственно в местах плотных контактов, «ослабленных» под действием провоспалительных факторов [38].

Экспрессируемые эндотелиальными клетками селектины удерживаются во внутриклеточных везикулах, называемых телами Вибеля. Последние реагируют на медиаторы воспаления, обеспечивая быструю регуляцию экспрессии селектинов на просветной мембране. Поскольку эндотелиоциты являются основными клетками ЦНС, экспрессирующими рецептор IL-1R1 (рецептор 1-го типа к IL-1), IL-1b является важным медиатором, обеспечивающим транспорт лейкоцитов через ГЭБ как при нейровоспалении, так и при общевоспалительных реакциях организма [143].

1.1.4 Механизмы метастазирования опухолевых клеток через гематоэнцефалический барьер

Недавние исследования показывают, что для образования метастазов в ЦНС опухолевые клетки должны достичь сосудистой системы мозга, прикрепиться к эндотелиальным клеткам микрососудов, экстравазироваться в паренхиму, а далее пролиферировать в мозговой ткани и индуцировать ангиогенез [86].

Гематоэнцефалический барьер, как было описано выше, представляет собой самый плотный эндотелиальный барьер в организме и создает препятствие для движения не только растворенных веществ, но и клеток. За счет этих же свойств он может играть двоякую роль в формировании метастазов. С одной стороны, ГЭБ образует препятствие, защищающее центральную нервную систему от

проникновения опухолевых клеток, а с другой – активно участвует в защите метастатических клеток после проникновения их в нервную ткань [199].

Обсуждаются механизмы того, каким образом еще ГЭБ может играть вспомогательную роль в формировании метастазов при некоторых типах злокачественных новообразований, а именно: церебральные эндотелиальные клетки могут не только обеспечить идеальную среду для выживания опухолевых клеток в непосредственной близости от них, но и активно способствовать проникновению метастатических клеток в ЦНС. После пересечения ГЭБ метастатические элементы защищены от иммунного надзора организма, а клеточные компоненты самой нервной ткани могут выделять вещества, благоприятные для роста метастазов [11].

Хотя этапы миграции метастатических клеток имеют сходство с проникновением нормальных лимфоцитов в ЦНС, существенные их отличия обусловлены различными физиологическими, молекулярными и механическими характеристиками здоровых иммунных и метастатических элементов (Рисунок 3) [21; 199].

Установлено, что адгезия опухолевых клеток происходит на уровне капилляров и посткапиллярных венул. При этом им требуется значительно больше времени для экстравазации в ЦНС. Задержанные в сосудистой сети головного мозга клетки сначала принимают вытянутую форму, а затем округляются и растягивают стенки сосудов. Сам диапедез через отверстия в эндотелии, вероятно, протекает быстро, но достижение метастатическими элементами экстралюминального положения занимает несколько дней [199]. Хотя экстравазация отдельных клеток является доминирующим механизмом формирования метастазов в головном мозге, в некоторых случаях может происходить внутрисосудистая пролиферация опухолевых клеток, что приводит к полной обструкции сосуда и нарушению ГЭБ [199].

Вклад эндотелиальных клеток в процессы распространения опухолевых клеток по организму, по-видимому, также органоспецифичен. В то время как в легких и печени эндотелиоциты «наползают» на поверхность метастатических

клеток, в головном мозге наблюдается их ретракция. Высказано предположение, что после прохождения опухолевых клеток в ЦНС ГЭБ восстанавливается и препятствует доставке лекарств и иммунных клеток к опухоли [199].

Растворимая форма молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 (sVCAM-1) участвует в задержке опухолевых клеток и последующей их экстравазации через эндотелий головного мозга. Более высокий уровень ее экспрессии может увеличивать возможность взаимодействия опухолевых клеток с эндотелием и проникновения их в ЦНС [91].

Далее решающую роль в процессах метастазирования играют цитокины и хемокины. Они модулируют взаимодействие между белками плотных контактов, являющимися первым барьером, который клетки должны преодолеть для попадания в ЦНС. Известно также, что комплексы хемокин-лиганд CXCR4/CXCL12 и CXCR5/CXCL13 играют важную роль в тропизме к ЦНС клеток диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомы [45]. Цитокин хемокин-лиганд 2 (CCL2) может продуцироваться нейронами, астроцитами, микроглией, а также клетками сосудистого сплетения. У пациентов с вторичным поражением ЦНС лимфомой отмечается значительно более высокий уровень CCL2 в ликворе, чем в сыворотке крови.

Протеолитические ферменты, вырабатываемые участвующими в воспалительных процессах клетками и способные разрушать практически все макромолекулы, находящиеся в межклеточном матриксе, называемые матриксными металлопротеиназами, а также сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) также нарушают целостность плотных контактов. А матриксная металлопротеиназа-9 (ММР-9) еще и имеет решающее значение для расщепления базальной мембраны [83].

Согласно проведенным исследованиям, ММР-9, CCL-2, sVCAM-1 играют важную роль в метастатическом каскаде опухолей. Повышенные уровни их коррелируют с метастазированием лейкозов и лимфом в ЦНС. Возможно, они могут быть тесно связаны с усилением тропизма опухолевых клеток к ЦНС [45].

В некоторых исследованиях было показано, что пациенты без поражения ЦНС имели довольно низкие уровни ММП-9, CCL-2, sVCAM-1 в ликворе, а не в сыворотке крови, что указывает на более высокую специфичность биомаркеров ликвора по сравнению с сывороточными биомаркерами в прогнозировании метастазирования лимфомы в ЦНС [21]. Дальнейшее изучение этих биомаркеров может оказаться полезным при прогнозировании метастатического поражения ЦНС при лимфомах [45].

После попадания в ЦНС рост и распространение злокачественных клеток полностью зависит от установления адекватного кровоснабжения. Активность ангиогенеза определяется балансом между проангиогенными и антиангиогенными молекулами на локальном тканевом уровне. Он может происходить как за счет истинного прорастания, которое происходит путем разветвления новых капилляров из уже существующих сосудов, так и являться результатом расширения, расщепления и слияния ранее существовавших сосудов, вызванных пролиферацией эндотелиальных клеток в стенке кровеносного сосуда. Фактор роста сосудов VEGF играет ключевую роль в физиологическом и патологическом неоангиогенезе. Он стимулирует не только пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, но и индуцирует экспрессию металлопротеиназ этими клетками [85].

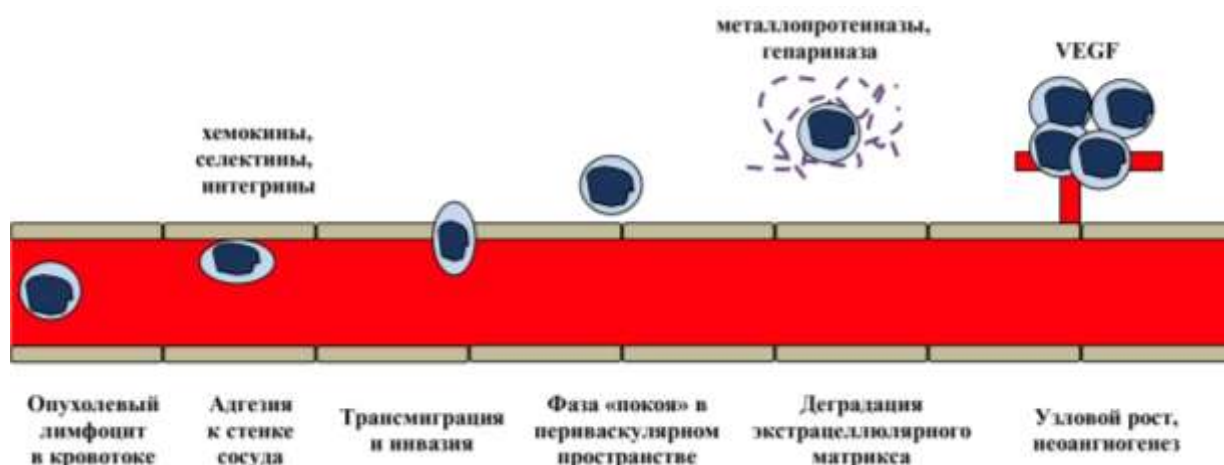


Рисунок 3 – Этапы метастазирования лимфомных клеток через гематоэнцефалический барьер [21]

1.2 Характеристика первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы

1.2.1 Общие сведения

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) является преобладающим типом неходжкинских лимфом (до 30–40 % всех случаев заболевания) и представляет собой биологически гетерогенное заболевание, в котором выделяют различные клинические варианты [29; 165].

Согласно современной классификации Всемирной организации здравоохранения 2018 года, выделяют тринадцать нозологических форм данной опухоли:

- ДВККЛ, неутонченная;
- ДВККЛ, богатая Т-клетками и/или гистиоцитами;
- первичная кожная ДВККЛ, leg type;
- первичная ДВККЛ ЦНС;
- фибрин-ассоциированная ДВККЛ;
- ДВККЛ, ассоциированная с хроническим воспалением;

- ДВККЛ, ВЭБ-позитивная, неуточненная;
- плазмобластная лимфома;
- ДВККЛ, ALK-позитивная;
- внутрисосудистая В-клеточная крупноклеточная лимфома;
- первичная медиастинальная (тимическая) В-клеточная крупноклеточная лимфома;
- ДВККЛ, герпес вирус-позитивная, неуточненная;
- В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности с реаранжировками *MYC* и *BCL-2* и/или *BCL-6* [19].

Первичная ДВККЛ ЦНС составляет более 90 % первичных лимфом ЦНС (ПЛЦНС). Она является самостоятельной высокоагрессивной формой лимфом. Опухоль поражает исключительно центральную нервную систему, включая головной мозг, глаза, спинной мозг и ликвор [107].

По типу вовлечения отделов нервной системы ПЛЦНС может быть классифицирована на лептоменингеальные, паренхиматозные, глазные или комбинированные поражения [21; 74; 88].

Первичная лимфома ЦНС – редкое опухолевое заболевание, составляющее 4 % внутричерепных новообразований и 4–6 % экстранодалных лимфом. Начиная с 70-х годов 20 века, наблюдается общий рост заболеваемости ПЛЦНС из-за роста доли лиц пожилого населения, улучшения нейровизуализации, а также в связи с эпидемией ВИЧ-инфекции в начале 90-х годов двадцатого века [68].

Гистологически ПЛЦНС представляет собой опухоль с высокой пролиферативной активностью, клетки которой диффузно инфильтрируют паренхиму головного мозга с периваскулярным характером роста. Подавляющее большинство (> 80 %) случаев ПЛЦНС варианта ДВККЛ представлены подтипом из активированных В-клеток [74].

1.2.2 Клиническая картина и диагностика первичной лимфомы центральной нервной системы

Диагноз ПЛЦНС требует высокой степени настороженности, поскольку клиническая картина варьирует в зависимости от локализации опухоли.

Около 70 % пациентов имеют фокальные неврологические дефициты, приводящие к быстрому проведению нейровизуализации. Тогда как у остальных пациентов в клинической картине имеются общемозговая симптоматика или нейрокогнитивные изменения, что приводит к поздней диагностике заболевания. Судороги наблюдаются нечасто (14 %), а лептоменингеальная диссеминация обычно протекает бессимптомно. При поражении спинного мозга обычно выявляются дискретные интрамедуллярные очаги, поражающие главным образом грудной отдел, клиническая картина зависит от локализации процесса [107].

Поражение глаз при ПЛЦНС выявляется у 20–25 %, клинически протекает бессимптомно, либо напоминает течение увеита [74].

Международная группа по изучению ПЛЦНС рекомендует в качестве стандартной диагностики проведение следующих методов обследования: МРТ головного мозга с контрастным усилением, МРТ позвоночника с контрастным усилением (при наличии спинальных симптомов), офтальмологическое исследование и исследование спинномозговой жидкости. Первичная лимфома ЦНС выявляется как солитарное, так и мультифокальное поражение вещества головного мозга, часто расположенное перивентрикулярно, с вовлечением белого вещества мозга, мозолистого тела или базальных ганглиев. Для выявления поражения вне ЦНС, исключения системного заболевания следует провести КТ или ПЭТ-сканирование тела с фтордезоксиглюкозой (ФДГ), а также биопсию костного мозга [68].

Окончательный диагноз требует патологоанатомического подтверждения. «Золотой» стандарт диагностики заболевания – это стереотаксическая биопсия головного мозга. При поражении глаз выполняется витрэктомия. Ликвор и

стекловидное тело могут быть использованы для цитологического исследования, иммунофенотипирования и молекулярно-генетического анализа [182].

1.2.3 Прогноз и подходы к терапии заболевания

Для оценки прогноза ПЛЦНС используют шкалу International Extranodal Lymphoma Study Group (IELSG), которая включает оценку соматического статуса по шкале ECOG, возраст, концентрацию белка в спинномозговой жидкости, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке и наличие вовлечения глубоких структур мозга. Двухлетняя выживаемость коррелирует с наличием 0-1, 2-3, или 4-5 неблагоприятных факторов риска и составляет 80 %, 48 % или 15 % соответственно [240].

За последние годы отмечается улучшение 5-летней выживаемости у пациентов ПЛЦНС в возрасте моложе 70 лет, выживаемость пациентов старше 70 лет практически не изменилась, это связано отчасти с тем, что по крайней мере 20 % пациентов не получают терапию.

Регрессия опухоли достигается примерно у 85 % всех пациентов независимо от типа лечения, но рецидивы часты и почти всегда ограничиваются ЦНС [68].

В настоящее время, нет достаточных доказательств, чтобы поддержать рекомендацию агрессивного хирургического подхода при ПЛЦНС. Из-за диффузного инфильтрирующего роста ПЛЦНС, хирургическое вмешательство обычно ограничено стереотаксической биопсией, и никакого улучшения выживаемости не приносит [88].

Исторически для впервые диагностированной ПЛЦНС использовалось тотальное облучение головного мозга, как и при всех злокачественных опухолях головного мозга. В процессе изучения воздействия радиации на опухоль, была установлена необходимая и достаточная доза – 45 Грей. Частота ответа на лучевую терапию составляет около 90 %, но медиана общей выживаемости ограничена 12–18 месяцами, как правило, из-за рецидива [68]. В настоящее время

лучевая терапия используется в основном в качестве терапии спасения или с паллиативной целью.

До настоящего времени нет единого золотого стандарта в отношении оптимальной терапии ПЛЦНС первой линии. Несмотря на то, что оптимизированные режимы полихимиотерапии улучшили выживаемость для большинства пациентов с ПЦНС, лечение этого заболевания по-прежнему представляет серьезную проблему для нейроонкологического сообщества.

Наибольшую распространенность приобрело использование высоких доз метотрексата (дозировка $> 3 \text{ г/м}^2$ каждые 2–3 недели) в сочетании с алкилирующим агентом и ритуксимабом. В настоящее время используются следующие схемы: ритуксимаб/HD-TX/винкристин/прокарбазин (R-MVP), ритуксимаб/HD-MTX/темозоломид (R-MT), ритуксимаб/HD-MTX/тиотепа/цитарабин (MATRIx) и ритуксимаб/HD-MTX/BCNU/тенипозид/преднизолон (R-MBTP).

Показатели 2-летней общей выживаемости в этих исследованиях были схожими и варьировали: 57 % (R-MT), 50–79 % (R-MVP), 61 % (MATRIx). Рандомизированных исследований, сравнивающих эти режимы, не существует [68].

Роль интратекальной (ИТ) терапии остается неопределенной. Обоснованием включения ИТ-терапии является достижение более длительного воздействия лекарств при цитотоксических концентрациях в ликворе. Интратекальная терапия входила в состав начальных схем полихимиотерапии, и включала такие агенты, как метотрексат, цитарабин, тиотепа и ритуксимаб. Однако повышенная токсичность (лейкоэнцефалопатия или миелопатия) и нежелательные явления, связанные с применением ИТ-терапии (инфекции) уменьшили использование данного подхода.

Также изучается применение консолидирующей высокодозной, миелоаблативной химиотерапии с последующей аутотрансплантацией стволовых кроветворных клеток у молодых пациентов, но общепризнанные рекомендации по выбору наилучшей консолидирующей терапии отсутствуют [240].

1.3 Вторичное поражение центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

1.3.1 Общие сведения

До трети ДВККЛ могут возникать в экстранодальных участках, чаще всего желудочно-кишечном тракте, коже и мягких тканях, костях или мочеполовом тракте, а также центральной нервной системе (ЦНС) [167].

Вторичное поражение ЦНС при системных вариантах ДВККЛ регистрируется до 5 % случаев и может возникать на различных этапах прогрессии опухоли [53]. Оно редко обнаруживается в дебюте системного заболевания, может манифестировать в течение нескольких месяцев после верификации диагноза, но чаще выявляется в момент рецидива заболевания, и всегда характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом для жизни пациента [134; 171]. Так медиана общей выживаемости пациентов, имеющих рецидив ДВККЛ с поражением ЦНС, насчитывает всего несколько месяцев [64].

При этом вовлечение ЦНС обычно возникает в течение первого года после диагностики системной опухоли [106]. Частота его варьирует от менее чем 1 % у молодых пациентов с низким риском заболевания до 35 % у пациентов с наличием факторов риска [64].

Таким образом, вторичное вовлечение ЦНС при системной ДВККЛ по сроку возникновения и характеру вовлечения нервной ткани можно разделить на три варианта:

- системная лимфома с поражением ЦНС в дебюте заболевания;
- присоединение поражения ЦНС в момент системного рецидива или прогрессировании опухоли;
- изолированный рецидив лимфомы в ЦНС (отсутствие поражения других органов и систем) [54; 63].

Согласно литературным данным, на момент обнаружения очагов опухоли в ЦНС в рецидиве заболевания примерно половина пациентов имеют

прогрессирующую системную лимфому [19]. У больных же с изолированным рецидивом опухоли в ЦНС системное заболевание часто развивается позже в течение нескольких месяцев. Таким образом, системные проявления лимфомы обычно сопровождают обнаружение паренхиматозного или лептоменингеального поражения нервной ткани [113].

1.3.2 Клиника и диагностика вторичного поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Как правило, вторичное поражение ЦНС при лимфоме развивается в первые 6-9 месяцев с момента диагностики опухоли, что может свидетельствовать о существовании нераспознанного очага уже на момент постановки диагноза. При этом ранняя диагностика поражения ЦНС при лимфоме имеет решающее значение для правильного лечения как у иммунокомпетентных больных, так и у лиц с ослабленным иммунитетом.

По данным статистики на лептоменингеальную лимфому приходится две трети случаев вторичных лимфом ЦНС, остальная часть представлена паренхиматозным поражением [212]. При этом вовлечение мозговых оболочек может быть результатом прямого распространения опухоли с соседних костных очагов, гематогенной диссеминации или распространения по сосудисто-нервным пучкам [106].

У пациентов наблюдаются различные симптомы, которые зависят от анатомического расположения опухоли. При лептоменингеальном поражении часто наблюдается сочетание радикулопатии, черепной невропатии, изменения психического статуса. Головная боль присутствует у 30–40 % пациентов с лептоменингеальным поражением, что может быть связано с повышением внутричерепного давления из-за метастатической обструкции потока/абсорбции ликвора. Паренхиматозные поражения могут вызывать очаговый неврологический дефицит и судороги. Также лимфома может проявляться симптомами компрессии [106].

Появление неврологической симптоматики у пациента с ДВККЛ должны побуждать к проведению дополнительного обследования: нейровизуализации, люмбальной пункции [106].

В течение многих лет цитологическое исследование спинномозговой жидкости (ликвора) является золотым стандартом диагностики лептоменингеального поражения ЦНС при ДВККЛ. При этом ложноотрицательные результаты цитологии ликвора по данным разных авторов составляют от 20 до 60 %, что может быть связано с небольшим объемом исследуемого материала, невозможностью обработать образец немедленно или забрать ликвор вблизи анатомического расположения очага поражения, малым количеством опухолевых клеток и наличием большого числа реактивных лимфоцитов в пробе [106]. С целью повышения чувствительности данного вида исследования в настоящее время рекомендовано проведение как минимум двух больших объемных (более 10 мл) люмбальных пункций [235].

Кроме цитологического исследования ликвора в настоящее время используется проточная цитометрия. Многие исследования продемонстрировали ее ценность для выявления поражений ЦНС при ДВККЛ [106].

В исследованиях показана большая чувствительность проточной цитометрии по сравнению с цитологическим исследованием [64]. Полученные в настоящее время данные дают достаточные доказательства в поддержку необходимости обязательного использования проточной цитометрии в диагностике поражения ЦНС при ДВККЛ. При этом необходимо соблюдение следующих условий: стандартизированные процедуры забора проб, немедленная фиксация образца, использование валидированных комбинаций антител (не менее восьми) для одновременной идентификации всех клеточных подмножеств (нормальных/реактивных, а также опухолевых В-клеток), присутствующих в образце спинномозговой жидкости [106].

Биохимическое исследование ликвора у пациентов с лимфомами ЦНС выявляет повышение общего уровня белка и ЛДГ, наличие плеоцитоза и

снижения уровня глюкозы в ликворе [106]. Однако эти параметры неспецифичны и поэтому не подходят для рутинной диагностики заболевания [106].

Уровни растворимых маркеров sCD21, sCD22, sCD24, sCD38, sCD44, sCD72 и тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов в спинномозговой жидкости также имеют ограниченную диагностическую ценность, но могут быть использованы в отдельных случаях, когда цитология ликвора и проточная цитометрия не являются информативными [106].

Повышенные уровни в ликворе sCD19, антитромбина III (sATIII), sCD27, b2-микроглобулина, IL-6, IL-10, CXCL13, неоптерина, остеопонтина и нескольких микроРНК (miRNA19b, miRNA21 и miRNA92a) обсуждаются в качестве потенциально полезных биомаркеров лимфом ЦНС, особенно в случаях первичной лимфомы ЦНС. Однако потенциальная ценность этих маркеров была изучена лишь в нескольких исследованиях, где использовались различные конечные точки, и были включены единичные случаи ДВККЛ с вторичным поражением ЦНС [106].

Из доступных в настоящее время методов нейровизуализации наиболее информативным является магнитно-резонансная томография (МРТ), включая МРТ с контрастным усилением. По данным испанской исследовательской группы ее чувствительность составляет 71 % против 36 % для компьютерной томографии (КТ) [106]. Таким образом, оценка вторичного поражения ЦНС у пациентов обычно должна включать МРТ, за исключением тех немногих случаев, когда процедура противопоказана и рекомендуется проведение КТ.

О лептоменингеальном поражении по данным МРТ с контрастированием свидетельствует накопление парамагнетика мозговыми оболочками, субэпендимальными структурами, твердой мозговой оболочкой и черепно-мозговыми нервами, а также явления сообщающейся гидроцефалии [77; 105; 119; 120].

Люмбальная пункция индуцирует усиленное накопление парамагнетика в черепном или спинномозговом пространстве, которое может быть ложно интерпретировано как лептоменингеальное поражение. По этой причине перед

нейровизуализацией люмбальной пункции следует избегать [77]. Также на результаты МРТ влияет предшествующее использование глюкокортикостероидов [106].

Паренхиматозное поражение ЦНС при лимфоме может проявляться единичным или множественными очагами, иметь перивентрикулярное и/или поверхностное расположение [74]. На основе данных нейровизуализации невозможно дифференцировать вторичные поражения ЦНС при ДВККЛ и первичную лимфому ЦНС [225]. Хотя, имеются данные, что вторичное поражение мозга при ДВККЛ, в основном, проявляется множественными супратенториально расположенными очагами, тогда как для первичной лимфомы ЦНС характерны одиночные очаги [113].

ПЭТ-КТ также рассматривается в качестве потенциальной диагностической процедуры при лимфомах с поражением ЦНС [60]. Однако данных об использовании ПЭТ-КТ в настоящее время мало и необходимо проведение дополнительных клинических исследований, чтобы определить ее точное место в диагностике вторичных лимфом ЦНС [225].

Как и для всех первичных опухолей головного мозга и метастазов в мозг, МРТ-визуализация необходима для планирования хирургических лечебно-диагностических процедур, таких как стереотаксическая биопсия и удаление опухоли.

Гистопатологическое и иммуногистохимическое исследования образцов стереотаксической биопсии считается стандартной процедурой для диагностики первичной лимфомы ЦНС, но не является рутинной практикой у пациентов с подозрением на рецидив ДВККЛ с поражением нервной ткани по целому ряду причин [110]. Стереотаксическая биопсия является инвазивной процедурой, которая имеет относительно ограниченную чувствительность (20–65 %), диагностическая ценность которой ниже у пациентов, получающих кортикостероиды. Более того, этот подход не может быть использован у части больных из-за особенностей расположения очагов поражения [113].

1.3.3 Терапия пациентов с поражением центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Стандартом лечения больных ДВККЛ низкой и низкой/промежуточной групп риска является 6 циклов иммунохимиотерапии по схеме R-CHOP-21 [I, A]. Такой подход, по данным крупных рандомизированных исследований, позволяет более 80 % больных пережить пятилетний рубеж. Однако внедрение ритуксимаба не решило проблемы лечения когорты больных с поражением опухолью нервной ткани [19].

Ритуксимаб представляет собой химерное моноклональное антитело IgG1 к антигену CD20 на В-клетках. При системном применении он плохо проникает через гематоэнцефалический барьер. Экспериментальные данные на животных и людях показывают, что его концентрация в ликворе составляет всего 0,1–1,7 % от концентрации, обнаруживаемой в сыворотке крови [55].

Вместе с тем, опубликованные отчеты о случаях заболевания продемонстрировали цитологический ответ и симптоматическое улучшение у пациентов с поражением ЦНС лимфомой от интратекального введения ритуксимаба в дозах от 10 до 40 мг [202]. В настоящее время интратекальное введение ритуксимаба (10–25 мг) показало обнадеживающие результаты в терапии вторичных лимфом ЦНС, особенно в сочетании с интратекальным введением метотрексата [106], однако такой метод лечения не входит в Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению диффузной В-крупноклеточной лимфомы взрослых [19].

Не только ритуксимаб, но и другие препараты стандартного курса химиотерапии CHOP плохо проникают через гематоэнцефалический барьер, что отчасти объясняет случаи изолированных рецидивов ДВККЛ в ЦНС при отсутствии системного заболевания [113].

По этим причинам поражение ЦНС при ДВККЛ представляет собой чрезвычайно сложную ситуацию, при которой многие переменные определяют как выбор, так и исход лечения. Современные методы терапии вторичного поражения

ЦНС при ДВККЛ основаны на системном применении мультилекарственных схем, включающих проникающие через ГЭБ агенты; на применении ритуксимаба для улучшения контроля системной лимфомы; на интратекальном введении препаратов, а также на интенсификации лечения с помощью трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток (АСКТ) [110].

Полезность лучевой терапии головного мозга для лечения лимфом ЦНС ограничена ее нейротоксичностью, особенно у пожилых пациентов. Несколько лет назад тотальное облучение головного мозга использовалось в сочетании с химиотерапией при первичных лимфомах ЦНС, но его истинное влияние на результат лечения остается спорным. Поэтому в настоящее время облучение всего мозга, как правило, используется как терапия спасения у больных ДВККЛ с вовлечением ЦНС, имеющих резистентность к метотрексату. При вторичном поражении лимфомой ЦНС лучевая терапия может рассматриваться как адъювантное лечение у пациентов с большим объемом поражения или с блокадой оттока ликвора [106].

Системные химиотерапевтические агенты, которые пересекают ГЭБ, такие как метотрексат, распределяются по всему организму, что избавляет от необходимости их интратекального введения. Однако следует учитывать высокую токсичность этих веществ для костного мозга и других органов.

Метотрексат при внутривенном применении в дозировке 3 г/м^2 и более достигает туморицидной концентрации в паренхиме головного мозга и ликворе, что достаточно для лечения лимфом с поражением ЦНС. Однако нет единого мнения относительно оптимального количества введений высокодозного метотрексата. Считается, что их может потребоваться не менее четырех. Такие факторы, как пожилой возраст, отягощенный соматический статус и нарушение функции почек или печени должны рассматриваться как противопоказания для подобного лечения [106].

Исследования пациентов с первичной лимфомой ЦНС показали хорошую безрецидивную выживаемость у пациентов, получавших высокодозный метотрексат в сочетании с высокодозным цитарабином в качестве индукционной

терапии с последующей лучевой терапией в качестве консолидации. Другие препараты, которые пересекают ГЭБ, такие как прокарбазин или ифосфамид, были использованы в комбинации с высокодозным метотрексатом и также показали обнадеживающие результаты [106].

Иммунохимиотерапия, включающая высокодозный метотрексат, внутривенный ритуксимаб и пероральный темозоломид, также эффективна в терапии лимфом ЦНС [110].

Еще одним перспективным, а возможно и лучшим из существующих вариантов терапии больных рецидивирующими лимфомами с вовлечением ЦНС, является высокодозная химиотерапия с последующей трансплантацией аутологичных стволовых клеток (АСКТ). В целом в случаях, чувствительных к метотрексату, рекомендуется введение высокодозного метотрексата для достижения максимальной циторедукции, а затем – режим кондиционирования на основе тиотепы или кармустина и АСКТ [110].

В недавно проведенном итальянском исследовании использование высокодозного метотрексата и цитарабина, а затем курса R-HDS (ритуксимаб/циклофосфамид/цитарабин/этопозид), с последующей АСКТ привело к достижению частичной ремиссии у 63 % и достижению 5-летней общей выживаемости у 68 % пациентов. Другие опубликованные схемы терапии включают различные комбинации препаратов, таких как циклофосфамид, кармустин, этопозид, бусульфан и тиотепу, с ритуксимабом или без него [106].

Препараты метотрексат, цитарабин и тиотепа могут вводиться интратекально, достигая спинного и головного мозга через спинномозговую жидкость. Однако эти агенты быстро выводятся из ликвора, что приводит к необходимости повторного их введения два или три раза неделю [106].

Липосомальный цитарабин обеспечивает устойчивую концентрацию в ликворе в течение 14 дней, что позволяет использовать более благоприятный график введений. С точки зрения безопасности препарат следует назначать одновременно с терапией дексаметазоном, поддерживая адекватный интервал

между введением липосомального цитарабина и другими потенциальными нейротоксическими цитостатическими препаратами [106].

Некоторые авторы выражают надежды, что новые молекулы, которые пересекают ГЭБ, такие как ниволумаб, ибрутиниб или леналидомид, могут улучшить исход для данной когорты пациентов [65; 191; 200].

Наконец, пациенты с резистентной к метотрексату лимфомой с поражением ЦНС или имеющие ранние рецидивы заболевания после схем высокодозной консолидации в качестве «терапии спасения» могут быть включены в клинические испытания или рассматриваться для паллиативного лечения в зависимости от клинической ситуации [106].

1.3.4 Подходы к профилактике вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Как отмечалось выше, добавление ритуксимаба к курсу химиотерапии не профилактирует возникновение рецидива ДВККЛ в ЦНС [64]. Предполагают, что ритуксимаб способен уменьшить вероятность рецидива в ЦНС у пациентов с лимфомой за счет более эффективного лечения системных проявлений опухоли, но не воздействия на злокачественные клетки, защищенные гематоэнцефалическим барьером [232].

В исследовании RICOVER-60, сравнивающем эффективность применения схемы лечения CHOP-14 и R-CHOP-14, наблюдалось лишь незначительное снижение частоты рецидивов в ЦНС у пациентов, получавших внутривенный ритуксимаб, по сравнению с теми, кто получал только CHOP-14 [167; 232].

Однако мета-анализ 7 проспективных исследований, обобщающий данные по 4 859 пациентам, целью которого было оценить влияние ритуксимаба на частоту и характер рецидивов в ЦНС, а также решить вопрос о том, играет ли ритуксимаб роль в профилактике данного грозного осложнения, показал отсутствие различий в частоте изолированных рецидивов в ЦНС при использовании CHOP (циклофосфан/доксорубин/винкристин/преднизолон) или R-CHOP

(ритуксимаб/циклофосфан/доксорубицин/винкристин/преднизолон) / R-СНОЕР (ритуксимаб/циклофосфан/доксорубицин/винкристин/этопозид/преднизолон) [113].

Данные о пользе профилактики поражения ЦНС у пациентов с ДВККЛ отчасти противоречивы. Вместе с тем, результаты большинства исследований показали статистически значимое снижение частоты рецидивов ЦНС у пациентов, получавших профилактику, по сравнению с теми, кому она не проводилась [124]. Так, Ferreri et al ретроспективно оценили 200 пациентов в рамках адаптированного к риску подхода к профилактике ЦНС у пациентов с ДВККЛ. Пациенты получали профилактику рецидива лимфомы с поражением ЦНС с использованием внутривенного введения высоких доз метотрексата с химиотерапией или без нее. Авторами не было зарегистрировано ни одного рецидива с поражением ЦНС у пациентов, получавших высокие дозы метотрексата в качестве профилактики вовлечения ЦНС [197]. Участники другой исследовательской группы d'études des Lymphomes de l'Adulte (GELA) также пришли к выводу, что снижение частоты рецидивов с поражением ЦНС и улучшение общей выживаемости оправдывают использование более интенсивной химиотерапии и профилактики рецидива с поражением ЦНС [113].

Наиболее эффективные комбинации препаратов для профилактики поражения ЦНС при ДВККЛ и количество их введений в настоящее время обсуждаются и четко не определены. Так, например, в ряде стран используется тройная интратекальная терапия (метотрексат, цитарабин и гидрокортизон), хотя нет никаких доказательств того, что тройная интратекальная терапия улучшает выживаемость без прогрессирования у пациентов с паренхиматозным поражением ЦНС в сравнении с использованием интратекального метотрексата в монорежиме. Важно также отметить, что эта терапия не лишена также клинического риска и токсичности, особенно для пожилых и ослабленных пациентов [106].

Что касается сроков, то в настоящее время представляется целесообразным проводить профилактику поражения ЦНС при агрессивных лимфомах, включая

ДВККЛ, как можно раньше, поскольку большинство рецидивов происходит в первые месяцы–год после постановки диагноза [113].

Национальная сеть по борьбе с раком NCCN (National Comprehensive Cancer Network) США рекомендует проводить профилактику пациентам с высоким риском рецидива в ЦНС после проведения курса полихимиотерапии путем введения 4-8 доз интратекального метотрексата и/или цитарабина или системного метотрексата в дозе от 3 до 3,5 г/м² [190].

Потенциальные преимущества интратекальной профилактики ЦНС должны быть сопоставлены с ее рисками и недостатками. В целом она хорошо переносится и может быть использована в тех случаях, когда пациенты не могут перенести системную терапию метотрексатом. Но возможны и серьезные побочные эффекты, такие как химический арахноидит, головная боль и подтекание спинномозговой жидкости [204].

При этом интратекальная профилактика в настоящее время все чаще заменяется внутривенной [30; 128; 144; 161; 197], поскольку она менее эффективно предотвращает паренхиматозные рецидивы. Фармакокинетические исследования интратекально вводимых метотрексата и цитарабина демонстрируют плохое распределение данных препаратов в паренхиме головного мозга [113].

При внутривенном применении метотрексата важно учитывать дозу и продолжительность инфузии препарата, поскольку низкие дозы 1 г/м² или длительные инфузии больших доз (8 г/м² в течение 24 часов) обычно не приводят к достижению цитотоксических концентраций вещества в ликворе. Клинические исследования показали оптимальной дозу в 3,0–3,5 г/м², вводимую в течение 2-3 часов [113; 198].

Одним из подходов является внутривенное введение высокодозного метотрексата на 15-й день чередующихся 21-дневных циклов R-CHOP. Однако высокая токсичность такого подхода может привести к отсрочке проведения R-CHOP, а в некоторых случаях – даже к прекращению его применения. Пациенты, получающие эту схему лечения, должны иметь исходно хороший

соматический статус и тщательно контролироваться на предмет потенциальной токсичности. Побочные эффекты метотрексата включают в себя мукозит, миелосупрессию, нейротоксичность и нефротоксичность. Ощелачивание мочи перед введением метотрексата и последующее введение лейковорина считаются стандартными подходами к минимизации его токсических эффектов [106; 128].

Используется также следующая схема профилактики: исходно выполняется лечебно-диагностическая люмбальная пункция с интратекальным введением метотрексата; далее оценивается возможность применения у данного пациента высокодозного метотрексата с учетом функции почек, сопутствующих заболеваний и соматического статуса. Пациенты получают сначала 6 циклов стандартной химиотерапии, такой как R-CHOP или R-CHOPR, а затем 2 цикла высоких доз метотрексата. Авторы, предлагающие такой подход утверждают, что данная схема лечения сводит к минимуму прерывание или задержку основного курса химиотерапии из-за индуцированных метотрексатом цитопений [137].

Системное применение высоких доз цитарабина исследовалось на небольшой группе пациентов и не показало четкой эффективности в профилактике поражений ЦНС при ДВККЛ [106].

Также изучалась эффективность терапии R-CHOP с ибрутинибом с целью профилактики рецидивов с поражением лимфомой ЦНС. Такая схема показала хорошие результаты у пациентов моложе 60 лет, но имела повышенную токсичность, вынуждающую прерывать лечение, и более плохие исходы у пожилых больных, т. е. популяции с самым высоким риском рецидива ДВККЛ в ЦНС. Таким образом, добавление ибрутиниба не улучшало безрецидивную выживаемость в общей популяции пациентов [192].

Комбинация леналидомид плюс R-CHOP, напротив, показала обнадеживающие результаты, поскольку ленолидами не только проникает через ГЭБ, но и хорошо переносится, проявляя терапевтическую активность при агрессивных рецидивирующих/рефрактерных лимфомах [192].

Альтернативными подходами являются интратекальное введение липосомального цитарабина и ритуксимаба, а также включение в терапию

больных ДВККЛ ингибиторов программирующего клеточную смерть белка-1 (PD-1), таких как ниволумаб. Однако данные об их применении с целью профилактики рецидива лимфомы с поражением ЦНС ограничены [65; 106].

Таким образом, в силу высокой токсичности и инвазивности профилактика вовлечения ЦНС при ДВККЛ остается нерешенной клинической задачей. Она не может быть предложена каждому пациенту с лимфомой из-за присущих ей рисков [124]. В настоящее время все еще существует необходимость в разработке точных оценок риска рецидива в ЦНС у пациентов с ДВККЛ, чтобы проводить потенциально токсичное лечение только у пациентов с высоким риском этого фатального осложнения [88].

1.3.5 Прогностические модели и факторы риска рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы

Определить, какие пациенты относятся к группе высокого риска, является непростой задачей, для решения которой предлагаются различные модели.

Одну из них Hollender и соавторы предложили в 2002 году. Она была разработана на основании многомерного анализа результатов ретроспективного исследования историй болезней 1 220 пациентов и включала в себя следующие факторы риска: наличие более одного экстранодального участка поражения, уровень альбумина менее 3,5 мг/дл, возраст старше 60 лет, повышенный уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и поражение забрюшинных лимфатических узлов. Исследователи рекомендуют стратифицировать пациентов как низкий риск (от 0 до 3 факторов риска) или высокий риск (от 4 до 5 факторов риска) при оценке кандидатов на профилактику ЦНС [113]. По данным их исследования, пациенты, отнесенные к группе высокого риска, составили 12 % когорты, а частота рецидива – 4,3 %. При этом в группе пациентов, у которых впоследствии развился рецидив ЦНС, 54 % имели высокий риск, согласно предложенной модели. Кроме того, в группе больных с высоким риском частота рецидивов ЦНС составляла 25 % по сравнению с частотой рецидивов 6 % у пациентов с низким

риском [113]. Важно отметить, что проанализированные авторами случаи ДВККЛ не получали терапию ритуксимабом [113].

В настоящее время эксперты Национальной сети по борьбе с раком NCCN рекомендуют использовать Международный прогностический индекс ЦНС (МПИ-ЦНС). Эта прогностическая модель была предложена в 2013 году и основана на данных 2 164 пациентов немецкой исследовательской группы [161]. В нее входят следующие факторы риска, связанные с повышенным риском развития рецидива лимфомы в ЦНС у пациентов с ДВККЛ, получающих терапию по протоколу R-CHOP:

- возраст старше 60 лет;
- уровень ЛДГ выше нормы;
- общесоматический статус ECOG > 1;
- III или IV стадия заболевания;
- 2 и более экстранодальных очагов поражения;
- поражение почек или надпочечников.

Эти факторы риска могут быть использованы для отнесения пациентов к одной из трех групп риска [64; 161]:

- низкий риск (0 или 1 фактор риска), с частотой рецидива ДВККЛ с поражением ЦНС 0,6 % за 2 года;
- промежуточный риск (2 или 3 фактора риска), с частотой рецидива ДВККЛ с поражением ЦНС 3,4 % за 2 года;
- высокий риск (от 4 до 6 факторов риска), с частотой рецидива ДВККЛ с поражением ЦНС 10,2 % за 2 года.

К факторам риска могут быть также отнесены следующие варианты заболевания: лимфома яичек, первичная ДВККЛ молочных желез и ВИЧ-ассоциированная лимфома [161].

Известно также, что риск рецидива с поражением ЦНС у пациентов с ДВККЛ может достигать 50 % в случае наличия у них double-hit и triple-hit варианта опухоли (т. е. хромосомные транслокации с вовлечением генов *MYC*, *BCL2* и/или *BCL6*, которые встречается в 5–10 % случаев лимфомы) [142]. Так,

было показано, что пациенты с двойной экспрессией *MYC* и *BCL2*, имели повышенный риск рецидива с поражением ЦНС по сравнению с теми, у которых не было двойной экспрессии генов (9,7 % против 2,2 % в течение 2 лет, $p = 0,001$) [119].

В ряде работ было показано, что с повышенным риском рецидива в ЦНС может быть связан молекулярный подтип ДВККЛ из активированных В-клеток [119].

Значение молекулярного подтипа лимфомы для риска развития рецидива с вовлечением ЦНС был оценен с помощью профилирования экспрессии генов образцов ранее не леченной CD20-положительной ДВККЛ пациентов, включенных в исследование GOYA [38]. В рамках данной работы двойная экспрессия *MYC* и *BCL2* не была связана с повышенным риском рецидива с поражением ЦНС, в отличие от подтипа из активированных В-лимфоцитов и не классифицируемого подтипа опухоли. Так 2-летняя частота рецидивов в ЦНС составила 15,2 % в группе наивысшего риска, определяемой как наличие высокого балла МПИ-ЦНС в сочетании с неблагоприятными молекулярными подтипами заболевания [38].

Kanemasa и соавторы на основании ретроспективного анализа данных 413 пациентов с ДВККЛ предложили делить больных на группы низкого (от 0 до 2 факторов) или высокого (от 3 до 4 факторов) риска вовлечения ЦНС на основе четырех характеристик: наличия экстранодальных поражений, низкого уровня сывороточного альбумина, поражения забрюшинных лимфатических узлов и III или IV стадии заболевания [55]. При применении данного подхода авторами была показана более высокая 5-летняя частота рецидивов ДВККЛ в ЦНС (26,4 %) в группе высокого риска, а также более низкая (3 %) частота данного события в группе низкого риска, чем при применении других моделей. Однако отмечается, что разработанный Kanemasa и соавторами подход не был независимо валидирован [55].

Cheah и соавторы провели многоцентровый ретроспективный анализ 217 пациентов с ДВККЛ с высоким риском рецидива лимфомы с поражением ЦНС. Высокий риск определялся ими как два или более из следующих факторов:

множественное экстранодальное поражение; повышенный уровень ЛДГ в сыворотке крови; наличие В-симптомов; наличие поражения костного мозга, молочных желез, яичек, почек или надпочечников [30].

В таблице 1 обобщены ключевые особенности существующих прогностических моделей рецидива ЦНС и наборы данных, из которых видно, что подход, предложенный Schmitz и соавторами, рекомендованный руководящими принципами Национальной сети по борьбе с раком NCCN, имеет самые убедительные доказательства [64].

При оценке индивидуального риска рецидива в ЦНС у пациентов с ДВККЛ необходимо учитывать и дополнительные клинические факторы риска, которые не учитывают прогностические модели (Таблица 2). К ним могут быть отнесены, например, варианты опухоли с вовлечением молочной железы, костного мозга, яичек, матки, а также поражением более двух экстранодальных участков [236].

Так в качестве показаний к проведению профилактики вовлечения ЦНС рядом авторов рекомендуется рассматривать ее как опцию терапии для большинства пациентов с double-hit и triple-hit лимфомой, лиц высокого риска по шкале МПИ-ЦНС, больных группы промежуточного риска с ABC-подтипом и двойной экспрессией *MYC* и *BCL2*, а также тех пациентов, кто имеет высокий риск экстранодального поражения, включая первичное поражение яичек, молочных желез и орбиты [126].

В целом приведенные выше данные свидетельствуют, что современные подходы, используемые для прогнозирования рецидива ДВККЛ с поражением ЦНС, нуждаются в уточнении. До настоящего времени четко не определена популяция пациентов высокого риска, которые получают достаточную пользу от профилактики рецидива с поражением ЦНС, оправдывающую дополнительную токсичность терапии. Только использование валидированных прогностических моделей вместе с новыми индивидуальными клиническими и биологическими факторами риска может позволить клиницистам достичь этой цели.

Таблица 1 – Прогностические модели рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы

Авторы	Выборка, тип исследования	Факторы риска	Стратификация на группы риска (число факторов риска)	Частота рецидива в ЦНС (95 % CI)	Ссылка
Hollender и др.	1 200 пациентов с агрессивными НХЛ (за исключением лимфомы Беркитта и лимфобластной лимфомы), многоцентровое	- более 1 экстранодального поражения, - повышенный уровень ЛДГ, - возраст более 60 лет, - альбумин менее 3,5 мг/дл, - поражение забрюшинных лимфоузлов	низкий риск (0-3); высокий риск (4-5)	5-летний риск: группа низкого риска – 5,6 %; группа высокого риска – 18,3 %	[113]
Schmitz и др.	1 735 пациентов с ДБККЛ, многоцентровое	- более 1 экстранодального поражения, - повышенный уровень ЛДГ, - возраст более 60 лет, - статус по ECOG более 1, - III или IV стадия заболевания, - поражение почек или надпочечников	низкий риск (0-3); промежуточный риск (2-3); высокий риск (4-6)	2-летний риск: группа низкого риска – 0,8 %; группа промежуточного риска – 2,9 %; группа высокого риска – 10,0 %	[64]

Продолжение таблицы 1

Авторы	Выборка, тип исследования	Факторы риска	Стратификация на группы риска (число факторов риска)	Частота рецидива в ЦНС (95 % CI)	Ссылка
Kanemasa и др.	413 пациентов с ДБККЛ, одноцентровое	- более 1 экстранодального поражения, - альбумин менее 3,5 мг/дл, - III или IV стадия заболевания, - поражение забрюшинных лимфоузлов	низкий риск (0-2); высокий риск (3-4)	5-летний риск: группа низкого риска – 3 %; группа высокого риска – 26,4 %	[55]
Cheah и др.	217 пациентов с ДБККЛ, многоцентровое	- множественные экстранодальные поражения; - повышенный уровень ЛДГ; - наличие В-симптомов, - поражение костного мозга, молочных желез, яичек, почек или надпочечников	низкий риск (0-2); высокий риск (3 и более)	группа низкого риска – 2,3 % группа высокого риска – 18,4 %	[30]

Таблица 2 – Дополнительные факторы прогноза, ассоциированные с развитием рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы

Авторы	Выборка	Фактор риска	Частота рецидива в ЦНС у пациентов с фактором риска (%)	Ссылка
Zussa и др.	373 пациента с ДВККЛ	Вовлечение яичек	15 % 5-летний риск: 19 %	[173]
Aviles и др.	96 пациентов с экстранодальной ДВККЛ с поражением молочной железы	Вовлечение молочной железы	11 %	[183]
Sehn и др.	795 пациентов с ДВККЛ	Вовлечение костного мозга	13 %	[118]
Oki и др.	129 пациентов с Double-hit ДВККЛ	Double-hit лимфома	9 %	[236]
Savage и др.	428 пациентов с ДВККЛ, из них 127 (30 %) с Double-hit лимфомой	Double-hit лимфома	8,7 % 2-летний риск: 9,7 %	[119]
El-Galaly и др.	678 женщин с ДВККЛ	С вовлечением матки	41 %	[236]
El-Galaly и др.	1 532 пациента с ДВККЛ	Более 2 экстранодальных очагов поражения	15 %	[225]

1.4 Изучение диффузной В-крупноклеточной лимфомы методами секвенирования нового поколения

1.4.1 Общие сведения о секвенировании нового поколения

Секвенирование нового поколения (next generation sequencing – NGS) – группа методов определения нуклеотидной последовательности для описания её первичной структуры, технология которых позволяет одновременно «прочитать» множество ДНК или РНК мишеней. Большинство технологий высокопроизводительного секвенирования включают в себя следующие этапы: подготовку библиотек, секвенирование и биоинформационный анализ получаемых данных [142].

На этапе подготовки библиотек ДНК подвергается фрагментации (до длины от нескольких десятков до нескольких сотен пар нуклеотидов (п. н.), а к концам получаемых коротких фрагментов пришиваются универсальные адаптеры (олигонуклеотиды с известной последовательностью), позволяющие далее проводить одновременную амплификацию всей библиотеки. При этом метод самой амплификации отличается для различных коммерческих платформ [142].

Далее осуществляется одновременное многократное прочтение (секвенирование) полученного множества коротких фрагментов. Оно производится путем синтеза новых фрагментов ДНК на одноцепочечных ДНК-библиотеках, выполняющих роль матрицы. После включения в цепь каждого нуклеотида в порядке, соответствующем матричной последовательности, прибор детектирует сигнал, который записывается в цифровом виде. Аналогично амплификации существующие в настоящее время платформы для NGS используют различные механизмы регистрации встроенных в новую цепь нуклеотидов [142].

На следующем этапе специально разработанным программным обеспечением проводится биоинформатическая обработка полученного массива данных и сравнение прочтенных фрагментов с референсными

последовательностями генов. Это делает возможным выявление всех известных типов изменений в геноме (в том числе однонуклеотидных замен, малых вставок и делеций, нарушения копийности генов, генных транслокаций и других) всего за несколько часов или суток [3].

Наибольшее число проведенных и опубликованных в настоящее время исследований были основаны на применении платформы Illumina, характеристиками которой являются не только высокая производительность, но и оптимальное соотношение производительности прибора к цене исследования. При этом наиболее востребованным является секвенирование парных прочтений, которое позволяет одновременно секвенировать прямую и обратную цепь фрагмента, что увеличивает точность прочтения и выравнивания фрагментов на референсный геном. Реализуемая при этом технология основана на амплификации библиотек с формированием кластеров на проточной ячейке. Каждая ячейка содержит 8 дорожек. К поверхности дорожек прикреплены («пришиты») одноцепочечные комплементарные адаптеру олигонуклеотиды. Благодаря этому они не только иммобилизируют исследуемую ДНК, но и служат праймерами для мостиковой амплификации [35].

Варианты применения NGS условно можно разделить на следующие группы [3]:

- 1) полногеномное секвенирование, в ходе которого происходит прочтение всей последовательности ДНК;
- 2) полноэкзомное секвенирование или секвенирование «клинического экзома» – исследование всех кодирующих последовательность белков или только клинически значимых генов соответственно;
- 3) таргетное секвенирование – определение последовательности ограниченного числа интересующих генов;
- 4) секвенирование транскриптома или РНК-секвенирование.

Секвенирование экзонов и таргетных панелей уже заняло прочное место в онкологии. В том числе появление секвенирования нового поколения (NGS) открыло новые возможности в диагностике, прогнозировании и лечении

опухолевых заболеваний крови. Например, с помощью NGS можно оперировать совершенно новыми молекулярно-генетическими классификациями опухолей, основанными на изменениях нуклеотидной последовательности и транскрипционных уровней; обнаруживать причинные редкие мутации и мониторировать аллельную нагрузку; исследовать взаимодействия между различными внутриклеточными процессами и путями, ведущими к опухолевой трансформации; анализировать эпигенетические факторы, мутационную нагрузку опухоли, а также обнаруживать индивидуальные мишени для лечения новообразования [180].

В отличие от других опухолевых образований, таких как карцинома легких, меланомы, гинекологические опухоли и опухоли желудочно-кишечного тракта, рутинное применение высокопроизводительного секвенирования еще не получило широкого распространения в гематологии даже за рубежом, особенно у пациентов с лимфомами. Данный метод в лучшем случае считается дополнительной опцией в сложных дифференциально-диагностических случаях, а также используется по просьбе лечащего врача или пациента [141]. При всех своих плюсах NGS еще не используется в рутинной клинической практике онкогематолога по нескольким причинам, прежде всего из-за высокой стоимости исследования, отсутствия консенсусных панелей целевых генов, одобренных для рутинной диагностики ДВККЛ.

В целом анализ NGS генерирует большой объем данных, которые для использования клиницистами должны быть объединены в единый клинический отчет. Для его получения требуется разработка программного обеспечения, позволяющего четко визуализировать основные результаты секвенирования образца каждого пациента, включая персональные идентификаторы, показатели качества пробы, а также аннотированные и стратифицированные по важности варианты [80].

Так, биоинформатика стала важнейшим компонентом лабораторий, желающих проводить клинический анализ секвенирования нового поколения. Крайне важна разработка строго стандартизованных конвейеров

биоинформатического анализа выявленных вариантов, которые обладали бы гибкостью, позволяющей вносить изменения в соответствии с рассматриваемым клиническим случаем [9; 163].

1.4.2 Мутационный профиль нодальных вариантов диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Применение подходов секвенирования нового поколения (NGS) значительно расширило понимание генетического ландшафта ДВККЛ. Получаемые с их помощью данные свидетельствуют о том, что клетки лимфомы проходят несколько раундов клональной экспансии. В целом генные мутации в ткани опухоли можно разделить на мутации «водители» и мутации «пассажиры». Драйверные мутации, как правило, возникают раньше в патогенезе ДВККЛ и нарушают ключевые клеточные процессы, участвующие в лимфогенезе. Напротив, мутации «пассажиры» не играют важной роли в патогенезе и могут быть случайными событиями. При этом каждый отдельный случай ДВККЛ со временем подвергается клональному отбору субклонов, которые дают наибольшее преимущество в выживании [138].

В настоящее время в публикациях базы данных PubMed содержатся сведения о результатах таргетного, полногеномного или полноэкзомного секвенирования методами NGS около 2 000 образцов системной ДВККЛ и более 150 образцов первичной ДВККЛ ЦНС, а также данные о мутационном профиле нескольких клеточных линий данного варианта лимфомы [131].

Мутации, обнаруживаемые при ДВККЛ, участвуют во многих клеточных процессах и сигнальных путях, включая модификацию гистонов (метилирование и ацетилирование), рост клеток, пролиферацию, метаболизм, дифференцировку, апоптоз, выживание, миграцию, реакцию на повреждение ДНК, сигнализацию В-клеточных рецепторов, сигнализацию Толл-подобных рецепторов, ангиогенез и регуляцию иммунного ответа [151].

При этом три основных клеточных подтипа ДВККЛ имеют различные репертуары генетических aberrаций [34; 146]. Так, для ДВККЛ была предложена «Лимфопанель», основанная на выявлении мутаций в 34 генах [163] (Таблица 3). Согласно полученным с ее помощью данным, GCB-подтип в целом по профилю драйверных мутаций напоминает профиль фолликулярной лимфомы и чаще имеет мутации в генах, связанных с метилированием или ацетилизацией гистонов (*EZH2*, *EP300*, *CREBBP*, *KMT2D*), хомингом В-клеток (*GNA13*, *GNAI2*, *SIPR2*), а также с сигнальными путями PI3K и JAK-STAT [81; 203]. Напротив, генетические аномалии, приводящие к активации сигнальных путей В-клеточных и Toll-подобных рецепторов, а далее пути NF- κ B, чаще встречаются в ABC-подтипе. К ним относятся мутации в генах *MYD88*, *CD79A/B*, *CARD11*, *MALT1*, *BCL10* и *TNFAIP3* [59; 93; 121; 125; 151; 154; 170]. Мутации в генах иммунологического надзора (*CD58*, В2-микροглобулина, *TNFRSF14* и *CIITA*), путях NOTCH, *CDNK2A* и *TP53* были зарегистрированы при обоих типах лимфомы примерно с равной частотой [121; 153].

Мутации *STAT6* (72,2 %), *SOCS1* (55,5 %) и *TNFAIP3* (61,1 %) наиболее часты в образцах PMBL-подтипа, что подчеркивает сходство между данным вариантом ДВККЛ и классической лимфомой Ходжкина. Мутационный профиль PMBL-подтипа лимфомы также обогащён aberrациями в генах иммунного ответа *CD58*, В2-микροглобулина и *CIITA*, а также *GNA13* и *XPO1* [9].

Однако разделение ДВККЛ на три основных клеточных подтипа лишь незначительно повлияло на терапевтические подходы при лимфоме, а вариации в исходе заболевания, также как ответ пациентов на лечение, все еще характеризуется гетерогенностью даже в пределах, казалось бы, хорошо определенных подмножеств данной опухоли.

Таблица 3 – Частоты мутаций при различных подтипах диффузной В-крупноклеточной лимфомы для генов «Лимфопанели» из исследования LYSA Study [141]

Ген	Частота мутаций			
	Нодальные варианты ДВККЛ			
	ABC-подтип	GCB-подтип	PMBL-подтип	другие
<i>STAT6</i>	0 %	14 %	72 %	6 %
<i>XPO1</i>	1 %	1 %	39 %	3 %
<i>SOCS1</i>	6 %	16 %	56 %	12 %
<i>BCL2</i>	1 %	24 %	0 %	3 %
<i>CIITA</i>	12 %	10 %	56 %	9 %
<i>TNFAIP3</i>	15 %	11 %	61 %	15 %
<i>CD79B</i>	25 %	2 %	0 %	3 %
<i>PIM1</i>	33 %	8 %	0 %	6 %
<i>GNA13</i>	9 %	12 %	50 %	12 %
<i>CD58</i>	6 %	10 %	39 %	6 %
<i>CREBBP</i>	6 %	31 %	11 %	24 %
<i>B2M</i>	9 %	18 %	50 %	24 %
<i>EZH2</i>	0 %	18 %	6 %	9 %
<i>TNFRSF14</i>	2 %	17 %	0 %	24 %
<i>MFHAS1</i>	1 %	10 %	28 %	9 %
<i>MYD88</i>	28 %	10 %	0 %	15 %
<i>ITPKB</i>	9 %	16 %	39 %	9 %
<i>PRDM1</i>	16 %	6 %	0 %	3 %
<i>NOTCH2</i>	2 %	10 %	0 %	15 %
<i>IRF4</i>	14 %	5 %	11 %	0 %
<i>MEF2B</i>	12 %	23 %	11 %	6 %
<i>BRAF</i>	0 %	0 %	0 %	3 %
<i>FOXO1</i>	4 %	12 %	6 %	3 %
<i>KMT2D</i>	41 %	46 %	17 %	42 %
<i>CARD11</i>	14 %	7 %	0 %	9 %
<i>NOTCH1</i>	7 %	1 %	6 %	6 %
<i>CD79A</i>	0 %	2 %	0 %	0 %

Продолжение таблицы 3

Ген	Частота мутаций			
	Нодальные варианты ДВККЛ			
	ABC-подтип	GCB-подтип	PMBL-подтип	другие
<i>NP53</i>	19 %	16 %	11 %	6 %
<i>CDKN2B</i>	0 %	1 %	0 %	3 %
<i>ID3</i>	5 %	2 %	6 %	9 %
<i>MYC</i>	5 %	10 %	6 %	3 %
<i>CDKN2A</i>	2 %	1 %	0 %	0 %
<i>TCF3</i>	1 %	2 %	0 %	0 %
<i>EP300</i>	15 %	14 %	17 %	18 %

Это требует более глубокого знания молекулярной гетерогенности, характерной для данного варианта неходжкинских злокачественных лимфом [108].

Среди недавних публикаций следует упомянуть результаты еще нескольких исследований ДВККЛ с применением методов NGS, поскольку именно они обеспечивают большую молекулярную однородность при разделении ДВККЛ на группы, улучшают понимание биологии данной опухоли и обладают наилучшей в настоящее время прогностической информативностью.

Так, на основе мутационных профилей и спектра хромосомных перестроек Schmitz et al. [94; 203] выделили уже четыре генетических подтипа лимфомы. Группа «MCD», характеризующаяся сочетанными мутациями генов *MYD88* и *CD79B*, и группа «N1» (мутации *NOTCH1*) чаще встречалась среди ABC-подтипа ДВККЛ. Группа «BN2» (мутации *NOTCH2* и слияния *BCL6*), наблюдалась одинаково часто при ABC- и GCB-подтипах. Тогда как группа «EZB» (мутации *EZH2* и транслокации с участием гена *BCL2*) чаще всего встречалась при GCB-подтипе опухоли. Группы «BN2» и «EZB» были связаны с лучшим ответом на R-CHOP и благоприятным исходом, в отличие от подгрупп «MCD» и «N1».

Добавив изменения числа соматических копий среди ранее существовавших биомаркеров, Charu et al. [147] определили пять вариантов ДВККЛ, включая кластер «C1» (сочетанные мутации *BCL6* и *NOTCH2*) и кластер «C5» (избыточная

экспрессия генов *BCL2* и *MALT1*, а также мутации *CD79B* и *MYD88*), которые чаще всего наблюдались среди ABC-подтипа ДВККЛ; кластер «С2» (с биаллельной инактивацией *TP53*, потерей *CDKN2A* и геномной нестабильностью) как независимая от неопухолевого аналога группа; кластер «С3» (транслокация *BCL2*, изменения *PTEN*, а также эпигенетических медиаторов, таких как *KMT2D*, *CREBBP* и *EZH2*) и кластер «С4» (изменения в *BCR/PI3K*, *JAK/STAT* и *BRAF*-путях) наблюдались в подмножестве GCB-подтипа. Кластеры «С1» и «С4», в отличие от «С2», «С3» и «С5», были связаны с неблагоприятным исходом заболевания. Следует отметить, что «С1», «С3» и «С5» перекрывались с группами «BN2», «EZB» и «MCD» в исследовании Schmitz et al.

1.4.3 Мутационный профиль первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы

Несмотря на значительный прогресс в понимании молекулярно-генетических характеристик нодальной ДВККЛ, большинство существующих молекулярных данных по первичной ДВККЛ ЦНС до последнего времени были получены путем локус-специфических подходов, имеющих меньшую чувствительность (Таблица 4) и нацеленных на поиск точечных мутаций в отдельных генах-кандидатах, таких как *MYD88*. Редкость заболевания и ограниченная доступность для биопсии пораженной мозговой ткани препятствуют активному изучению мутационного ландшафта данной опухоли, а понимание его особенностей остается весьма ограниченным.

Совершенствование методов секвенирования привело к некоторому улучшению понимания биологии и первичной ДВККЛ ЦНС, молекулярно-генетический профиль которой имеет свои особенности.

Наибольшее число мутаций при первичной ДВККЛ ЦНС приходится на гены BCR/NF-kB сигнального каскада (*MYD88*, *CARD11*, *CD79B* и *TBL1XR1*), что отражает превалирование среди случаев заболевания молекулярного

ABC-подтипа лимфомы. Например, мутация *MYD88* p.L265P является наиболее распространенной (до 60 % случаев) при первичной ДВККЛ ЦНС [62]. Часто выявляются также повреждения в генах *PIM1* (до трети случаев), *BTG2*, *PRDM1* и *KIT*, гене транскрипционного фактора *ETV6* и регуляторах клеточного цикла *CDKN2A/B* [49; 57; 92; 95; 150; 172; 185; 194; 210; 218].

Таблица 4 – Наиболее частые мутации при первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы по данным литературы

Частота мутаций в генах						N образцов	Метод*	Ссылка
<i>MYD88</i>	<i>CD79b</i>	<i>PIM1</i>	<i>BTG2</i>	<i>TBL1XR1</i>	<i>CARD11</i>			
68 %	32 %	НД	НД	НД	НД	54	S	[90]
85 %	37 %	100 %	93 %	32 %	НД	41	W	[96]
76 %	83 %	НД	НД	23 %	18 %	71	T, S, P	[193]
94 %	61 %	НД	НД	НД	НД	18	S	[186]
38 %	НД	3 %	НД	14 %	НД	29	S, T	[194]
38 %	30 %	НД	НД	22 %	НД	37	W, S, P	[150]
33 %	44 %	44 %	22 %	НД	НД	22	W, S	[224]
75 %	20 %	НД	НД	НД	НД	20	PCR, S	[109]
79 %	40 %	30 %	30 %	НД	30 %	19	W	[95]
86 %	64 %	71 %	НД	36 %	29 %	21	W	[211]
36 %	НД	НД	НД	НД	НД	14	S	[156]
61 %	НД	НД	НД	НД	НД	41	S	[158]
100 %	НД	НД	НД	НД	НД	14	ddPCR, T	[61]
33 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	6,7 %	0 %	15	T	[57]
Примечание: * – методы исследования: T – таргетное секвенирование нового поколения, S – секвенирование по Сенгеру, W – полноэкзомное секвенирование, P – пиросеквенирование, PCR – ПЦР, ddPCR – цифровая ПЦР.								

В 2016 году были опубликованы результаты высокопроизводительного секвенирования таргетной панели из 48 имеющих отношение к канцерогенезу генов 19 образцов первичной ДВККЛ ЦНС, которое показало, что суммарно более 80 % патогенных мутаций были сосредоточены в восьми генах (*CTNNB1*,

PIK3CA, *PTEN*, *ATM*, *KRAS*, *PTPN11*, *TP53* и *JAK3*). При этом у всех 19 пациентов были выявлены мутации в гене *TP53*, а абerrации в *TP53* и *ATM* коррелировали с более высоким общим числом мутаций в других анализируемых генах. Таким образом, было продемонстрировано, что первичная ДВККЛ ЦНС имеет определенные сходства в спектре генных мутаций с другими солидными опухолями головного мозга, в отличие от других видов агрессивных лимфом [61].

1.4.4 Мутационная нагрузка в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Известно, что нарушения в процессах репликации и репарации повреждений ДНК, а также воздействие канцерогенов могут увеличить скорость мутационного процесса в клетках. Повышенная частота возникновения мутаций является характерной чертой злокачественных новообразований. Применение методов секвенирования нового поколения позволило оценить еще одну важную характеристику опухоли – мутационную нагрузку. Под мутационной нагрузкой опухоли понимают общее количество мутаций, присутствующих в образце [234]. Среднюю мутационную нагрузку опухоли определяют как число соматических мутаций с заменой нуклеотидов и делеций/вставок на мегабазу (Мб) исследованной последовательности. По степени выраженности она может быть разделена на три группы: низкую (1–5 мутаций/Мб), среднюю (6–19 мутаций/Мб) и высокую (≥ 20 мутаций/Мб).

Мутационная нагрузка в настоящее время плохо охарактеризована при опухолевых заболеваниях крови [131]. По данным TCGA мутационная нагрузка при неспецифицированной ДВККЛ была низкой и составила 3,3 мутаций/Мб. Однако в рамках данного проекта была собрана информация лишь о 58 образцах опухоли [36]. Результаты других более мощных исследований привели к необходимости пересмотреть данную точку зрения. Так, анализ в исследовании, включающем 432 образца ДВККЛ, показал, что средний уровень мутационной

нагрузки составил 9,2 мутаций/Мб, более 20 мутаций/Мб имели 19 % исследованных образцов опухоли [37].

В работе Chalmers et al. 2017 года было выполнено сравнение мутационной нагрузки в 100 тысячах образцов 100 типов злокачественных новообразований, выявленной методом секвенирования экзома. Авторы также показали, что ДВККЛ относится к числу опухолей со средней мутационной нагрузкой [37]. В общем рейтинге злокачественных новообразований ДВККЛ занимала пятое место после базальноклеточной карциномы, сквамозоклеточной карциномы, крупноклеточного рака легкого и меланомы. Среднее число мутаций составляло 10 мутаций/Мб, а максимальное – более 250 мутаций/Мб, 18 % образцов имели высокий уровень мутационной нагрузки (более 20 мутаций/Мб).

В недавнем исследовании Severson et al. было показано, что первичная ДВККЛ ЦНС имеет несколько более высокую интенсивность мутационного процесса. Треть (30 %) случаев из выборки, включающей 24 образца, относились к опухолям с высокой мутационной нагрузкой [180]. В другой работе (15 образцов первичной ДВККЛ ЦНС) 26,7 % опухолей имели высокий, 13,3 % – средний и 60 % – низкий уровень мутационной нагрузки [147].

Средний и высокий уровень мутационной нагрузки в опухоли, с одной стороны свидетельствует о значительном уровне генетической нестабильности трансформированных клеток, с другой – говорит о большей вероятности возникновения неоантигенов, которые служат мишенями активированных иммунных клеток [90]. В настоящее время растет число клинических и экспериментальных доказательств того, что мутационная нагрузка опухоли может быть использована в качестве прогностического биомаркера чувствительности злокачественного новообразования к ингибиторам контрольных иммунных точек (иКТИ), таким как ингибитор лиганда белка, контролирующего клеточную смерть, 1 (анти-PDL1) [172].

1.5 Резюме

В настоящее время установлено, что ГЭБ является высокоактивной структурой. С одной стороны, он защищает ткань мозга от химических, физических и иных воздействий, а с другой – уникально приспособлен для передачи сигналов между ЦНС и другими частями организма. Клетки ГЭБ реагируют на сигналы, поступающие из ЦНС или компартментов крови, которые могут стимулировать изменения в их барьерных, транспортных и секреторных функциях.

Более того, установлено, что иммунная привилегированность ЦНС не абсолютна. В норме экстравазация лимфоцитов через ГЭБ имеет решающее значение для иммунного надзора в нервной ткани, хотя и жестко регулируется.

Повреждение ГЭБ является одним из центральных звеньев в патогенезе многих заболеваний нервной системы, а неспецифическая проницаемость ГЭБ может существенно возрастать при различной соматической патологии. В целом иммунологическая дисфункция и воспаление являются основными факторами в нарушении целостности ГЭБ.

Механизмы метастазирования злокачественных новообразований в ЦНС остаются малоизученными, хотя уже сейчас понятно, что для их осуществления необходимы взаимодействия между циркулирующими опухолевыми клетками и компонентами гематоэнцефалического барьера. При этом некоторые цитокины могут действовать как аттрактанты для метастазирующих клеток, а процесс развития метастаза включает в себя несколько этапов от экстравазации до локальной пролиферации и активации неоангиогенеза.

Кроме того, обращает на себя внимание следующий факт: некоторые виды злокачественных новообразований чаще других дают метастазы в мозг [75]. При этом считается, что большинство клеток первичной опухоли способны к метастазированию, диссеминация их происходит очень рано, а в основе данного феномена могут лежать специфические геномные изменения злокачественных клеток [89].

Вторичное поражение ЦНС является редким, но прогностически крайне неблагоприятным событием в течении системной ДВККЛ. Добавление ритуксимаба к стандартной химиотерапии заболевания, к сожалению, не снизило частоту рецидивов данной опухоли с поражением нервной ткани. Медиана интервала от постановки диагноза лимфомы до вовлечения ЦНС также практически не изменилась и составляет от 6,5 до 7,0 месяцев.

Очевидно, что существует неудовлетворенная потребность в диагностических инструментах, новых подходах к стратификации на группы риска и методах профилактики поражения ЦНС у пациентов с ДВККЛ [21].

Уже на этапах постановки диагноза лимфомы требуется проведение тщательного сбора анамнеза и неврологического обследования, нейровизуализации, включая магнитно-резонансную томографию головного мозга и позвоночника. Однако большое значение имеет разработка более совершенных диагностических методов для выявления наличия вовлечения в опухолевый процесс ЦНС при постановке диагноза ДВККЛ, поскольку эти пациенты нуждаются в особом терапевтическом подходе. Так, например, добавление проточной цитометрии к обычной цитологии ликвора повышает чувствительность выявления поражения ЦНС лишь до 50 % [64]. А оценка моноклональности по перестройкам гена тяжелой цепи иммуноглобулина (*IgH*) является дополнительным диагностическим инструментом, который может оказаться полезным в ряде сложных диагностических случаев [113].

Доказано, что проведение профилактики рецидива с поражением ЦНС снижает частоту данного события и должно рассматриваться в группах высокого риска. Учитывая самые последние данные, системная профилактика с применением высоких доз метотрексата, вероятно, является наиболее эффективным подходом, но связана с дополнительными токсическими эффектами и не может быть использована у некоторых групп пациентов. Такая стратегия может быть наиболее подходящей для пациентов высокого риска с сохранным соматическим статусом, получающих терапию по протоколу R-CHOP [128]. Однако оптимальная системная профилактика, которая хорошо вписывалась бы в более интенсивные схемы химиотерапии, такие как EPOCH

(этопозид/преднизолон/винкристин/циклофосфан/доксорубин) и hyper-CVAD (блок А: циклофосфамид/винкристин/доксорубин/дексаметазон, блок В: метотрексат/цитарабин) еще не найдена [200; 202].

Современные прогностические модели помогают клиницистам в отборе пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой, которые подвергаются наибольшему риску рецидива заболевания в ЦНС, хотя идеальный отбор этих пациентов все еще остается сложной задачей. В настоящее время для прогнозирования риска рецидива ДВККЛ в ЦНС National Comprehensive Cancer Network рекомендовано использовать модель МПИ-ЦНС [161].

Дополнительные индивидуальные клинические и биологические факторы риска, используемые, наряду с валидированными прогностическими моделями, могут способствовать отбору пациентов с наибольшим риском вовлечения ЦНС.

Исследования с применением методов секвенирования нового поколения свидетельствуют о том, что подтипы ДВККЛ, выделенные на основании клинических, гистопатологических и иммуногистохимических критериев гетерогенны. А недоучет генетических аберраций в опухолевых клетках в клинической практике может приводить к недостаточной эффективности терапии и неблагоприятным исходам у пациентов с лимфомой.

Очевидно, что в каждом конкретном случае заболевания требуется детальная характеристика изменений в геноме опухолевых клеток. Вместе с тем, для того чтобы технология NGS была осуществима в повседневной клинической практике, должны быть разработаны консенсусные панели целевых генов, позволяющих проводить быстрый скрининг мутационных профилей пациентов, фокусируясь на выборе генов, имеющих отношение к заболеванию. Это позволило бы ограничить объем генерируемых данных, стоимость секвенирования и время выполнения работ.

Следует отметить, что если генетический профиль системной и первичной ДВККЛ ЦНС охарактеризован, то данные по высокопроизводительному секвенированию образцов ДВККЛ со вторичным поражением ЦНС в доступных литературных источниках не представлены, что свидетельствует о необходимости изучения данного вопроса.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования

Работа носит характер ретроспективного исследования. Дизайн исследования представлен на рисунке 4.

Критерии включения:

- 1) наличие информированного согласия на участие в исследовании;
- 2) мужчины и женщины от 18 до 80 лет (включительно);
- 3) диагноз ПЛЦНС с морфологией ДВККЛ или ДВККЛ с вовлечением ЦНС, установленный по действующим на момент диагностики критериям ВОЗ.

Критерии исключения:

- 1) отсутствие информированного согласия;
- 2) возраст до 18 лет.

Исследование проведено в соответствии с этическими принципами проведения научных медицинских исследований с участием человека, изложенными в Хельсинкской Декларации всемирной медицинской ассоциации и с соблюдением этических норм и правил, предусмотренных Бюллетенем Высшей аттестационной комиссии Министерства образования России № 3 от 2002г. «О порядке проведения биомедицинских исследований у человека». Проведение исследования одобрено комитетом по этике ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 150 от 16.02.2023). Все пациенты давали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

2.2 Характеристика больных CBioPortal for Cancer Genomics database

Были проанализированы данные специализированной базы CBioPortal for Cancer Genomics database, которая содержит сведения по молекулярно-генетическим профилям и клиническим характеристикам более 1 200 пациентов с ДВККЛ [14; 214]. Среди них выделены случаи с поражением

ЦНС в рецидиве заболевания (n = 48), а также случаи лимфомы без вовлечения ЦНС (n = 355).

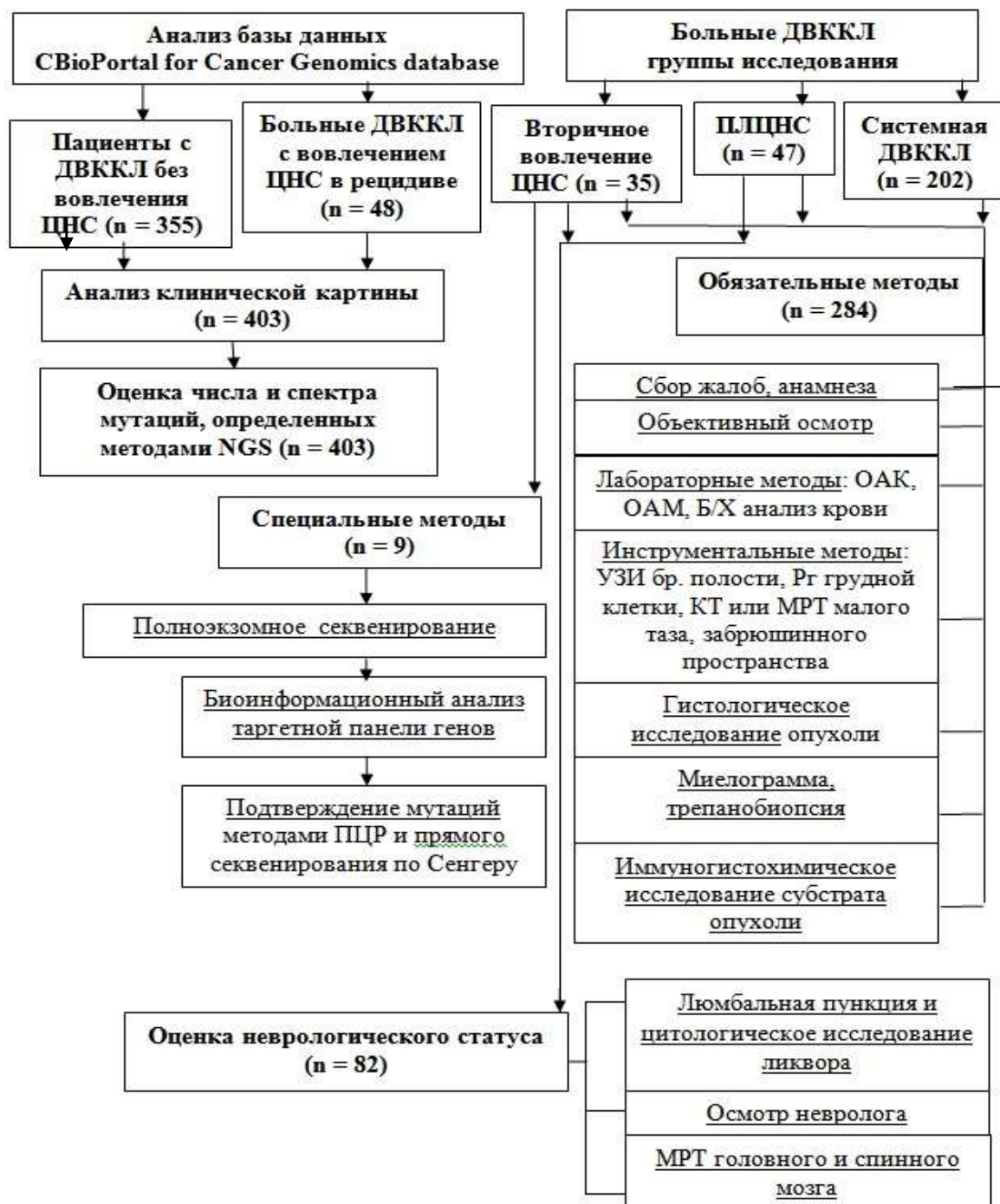


Рисунок 4 – Дизайн исследования

Сравнительная клиническая характеристика двух групп основана на имеющихся в базе данных и приведена в таблице 5, из которой следует, что обе группы имели сходный половозрастной состав. Соотношение мужчин и женщин

составляло 6:4 в обеих группах, а доля пациентов 70 лет и старше с вовлечением ЦНС в рецидиве и без такового составила 62,5 % и 53,5 %, соответственно ($p = 0,241$).

Больные из группы пациентов с рецидивом ДВККЛ в ЦНС имели более выраженную тяжесть течения опухолевого процесса, а именно большую частоту регистрации таких факторов риска Международного прогностического индекса IPI, как симптомы опухолевой интоксикации (58,2 % против 34,1 %, $p = 0,002$), III-IV стадий заболевания (85,4 % против 55,8 %, $p < 0,001$), экстранодальных поражений (41,7 % против 16,6 %, $p < 0,001$), отягощенного общесоматического статуса ECOG (2 и более баллов) (45,8 % против 26,8 %, $p = 0,007$) и повышения уровня ЛДГ (70,8 % против 53,8 %, $p = 0,026$).

В целом пациенты с вовлечением ЦНС в рецидиве опухоли в 1,5 раза чаще относились в группу высокого и промежуточного высокого риска IPI (58,4 % против 38,6 %, $p < 0,001$) и в 2,1 раза чаще имели поражение опухолью яичек (25,9 % против 12,1 %, $p = 0,093$).

Несмотря на то, что первичный ответ на лечение в обеих анализируемых по CBioPortal for Cancer Genomics database группах был достаточно высоким – частота полного и частичного ответа составила более 90 %, общая выживаемость пациентов в группе с рецидивом в ЦНС составила всего 14,6 % против 71,5 % в группе без вовлечения нервной ткани ($p < 0,001$).

Таблица 5 – Клиническая характеристика пациентов из базы данных CBioPortal for Cancer Genomics database

Показатель	Частота, Абс. (%)		p
	Рецидив в ЦНС (n = 48)	Без вовлечения ЦНС (n = 355)	
Характеристика пациентов			
Мужчины	29 (60,4)	202 (56,9)	0,644
Женщины	19 (39,6)	153 (43,1)	
Возраст ≥ 70 лет	30 (62,5)	190 (53,5)	0,241

Продолжение таблицы 5

Показатель	Частота, Абс. (%)		p
	Рецидив в ЦНС (n = 48)	Без вовлечения ЦНС (n = 355)	
Характеристика пациентов			
Стадия заболевания по Ann Arbor III-IV	41 (85,4)	198 (55,8)	< 0,001
ECOG score 2 и более	22 (45,8)	95 (26,8)	0,007
Экстранодальные поражения 2 и более	20 (41,7)	59 (16,6)	< 0,001
Повышение уровня ЛДГ	34 (70,8)	191 (53,8)	0,026
Симптомы опухолевой интоксикации	28 (58,3)	121 (34,1)	0,002
Поражение яичек	7/27 (25,9)	17/141 (12,1)	0,093
Количество баллов по МПИ			
≤ 2	10 (20,8)	179 (50,4)	< 0,001
≥ 3	28 (58,4)	137 (38,6)	
Н/Д	10 (20,8)	39 (11,0)	—
Первичный ответ на терапию			
Полный	35 (72,9)	276 (77,7)	0,455
Частичный	9 (18,8)	50 (14,1)	0,391
Нет ответа	4 (8,3)	24 (6,8)	0,688
Н/Д	—	5 (1,4)	—
Общая 5-летняя выживаемость			
Живы	7 (14,6)	254 (71,5)	< 0,001
Умерли	41 (85,4)	101 (28,5)	

2.3 Клиническая характеристика больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования, имеющих поражение центральной нервной системы

Был проведен анализ данных клинико-лабораторного обследования 82 пациентов с поражением ЦНС при ДВККЛ, диагностированных в онкологическом отделении Федерального нейрохирургического центра и

нейрохирургическом отделении Новосибирского НИИТО им. Я. Л. Цивьяна Минздрава России и находившихся на лечении в Городском гематологическом центре г. Новосибирска, гематологическом отделении Государственной Новосибирской областной клинической больницы и проходивших диагностику заболевания в период 2011–2022 гг.

Клиническая характеристика больных из группы исследования представлена в таблице 6.

В проанализированной группе больных с поражением ЦНС при ДВККЛ было 36 человек женского и 46 человек мужского пола. Средний возраст пациентов на момент диагностики составил $(55,97 \pm 13,13)$ лет, при этом 41 пациент (50 %) был в возрасте старше 60 лет. Все пациенты имели III-IV стадии заболевания, у 27 (32,9 %) пациентов отмечались В-симптомы, статус ECOG, равный 2 или более, имели 66 (80,5 %) пациентов, уровень ЛДГ выше нормы отмечался у 21 пациента из 58 (36,2 %). По данным стратификации риска МПИ 0–2 балла имели 25 из 82 пациентов (30,5 %), МПИ 3–5 баллов – 57 из 82 (69,5 %) пациентов.

Инфицированность ВИЧ в исследуемой группе составила 6 человек из 82 (7,3 %), вирусные гепатиты «В» и «С» были выявлены у 4 человек из 82 (4,9 %). Туберкулез в анамнезе был у 4 человек из 82 (4,9 %).

В структуре сопутствующей патологии преобладали заболевания желудочно-кишечного тракта – у 50 человек из 82 (60,9 %), гипертоническая болезнь (артериальная гипертензия) – у 47 из 82 человек (57,3 %), хронические заболевания почек у 27 из 82 человек (32,9 %).

Реже встречались ишемическая болезнь сердца – у 13 из 82 человек (15,9 %), сахарный диабет – у 12 из 82 человек (14,6 %), заболевания верхних дыхательных путей – у 12 человек из 82 (14,6 %), злокачественные заболевания негемопэтической (злокачественные новообразования яичников, молочной железы, матки, слепой кишки, поджелудочной железы, предстательной железы, базалиомы) и гемопэтической природы (лимфома Ходжкина) – у 12 из 82 человек (14,6 %), заболевания половых органов – у 11 из 82 человек (13,4 %), диффузно-узловой зоб – у 8 из 82 человек (9,8 %). Очень редко у пациентов из группы исследования анамнестически выявлялись гнойные процессы – у 3 из 82

(3,7 %), острое нарушение мозгового кровообращения – у 2 из 82 (2,4 %), аутоиммунное заболевание (аутоиммунный тиреоидит) – у 1 из 82 (1,2 %).

Таблица 6 – Клиническая характеристика пациентов из группы исследования, имеющих поражение центральной нервной системы

Показатель	Частота, Абс. (%) (n = 82)
Характеристика пациентов	
Мужчины	46 / 82 (43,9)
Женщины	36 / 82 (56,1)
Возраст ≥ 60 лет	41 / 82 (50,0)
Стадия заболевания по Ann Arbor III-IV	82 / 82 (100,0)
ECOG score 2 и более	66 / 82 (80,5)
Повышение уровня ЛДГ	21 / 58 (36,2)
Симптомы опухолевой интоксикации	27 / 82 (32,9)
Количество баллов по МПИ	
≤ 2	25 / 82 (30,5)
≥ 3	57 / 82 (69,5)
Инфицированность ВИЧ	6 / 82 (7,3)
Инфицированность ВГВ/ВГС	4/82 (4,9)
Туберкулез в анамнезе	4/82 (4,9)
Сопутствующие заболевания	
ЗНО	12 / 82(14,6)
Перенесенные ОНМК	2 / 82(2,4)
Гнойные процессы	3 / 82 (3,7)
Аутоиммунные заболевания	1 / 82 (1,2)
Диффузно-узловой зоб	8 / 82 (9,8)
Сахарный диабет	12 / 82 (14,6)
Артериальная гипертензия	47 / 82(57,3)
Ишемическая болезнь сердца	13 / 82 (15,9)
Заболевания дыхательных путей	12 / 82 (14,6)
Хронические заболевания почек	27 / 82(32,9)
Заболевания желудочно-кишечного тракта	50 / 82 (60,9)
Заболевания половых органов	11 / 82 (13,4)

2.4 Методы клинического, лабораторного и инструментального обследования в группе больных с поражением центральной нервной системы

Всем больным диагноз был поставлен в соответствии с критериями классификации Всемирной организации здравоохранения 2017 г. на основании гистологического и иммуногистохимического исследования биоптата опухоли. На этапе верификации лимфомы всем больным проводились общеклинические исследования, установление стадии заболевания с применением ультразвукового метода, компьютерной томографии, рентгенологического исследования, трепанобиопсии крыла подвздошной кости с забором материала на цитологическое и гистологическое исследования, диагностической люмбальной пункции, а также у части пациентов (при наличии показаний и возможности выполнить) позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с КТ (ПЭТ/КТ), согласно Российским клиническим рекомендациям.

Осмотр невролога был выполнен 80 пациентам, МРТ – исследование 70 больным. Клинические проявления поражения ЦНС и результаты их инструментальной визуализации представлены в таблицах 7 и 8.

Таким образом, в клинической картине пациентов группы исследования поражение ЦНС при ДВККЛ наиболее часто проявлялось общемозговой симптоматикой: головокружение отмечалось у 43 из 80 человек (53,8 %), тошнота/рвота – у 17 из 80 человек (21,3 %), головные боли – у 9 из 80 человек (11,3 %).

Неврологические дефициты, такие как парезы и параличи конечностей выявлялись часто – у 32 из 80 человек (40 %), тогда как параличи мимической мускулатуры выявлялись реже – у 12 из 80 человек (15 %).

Когнитивные нарушения отмечались у 18 из 80 человек (22,5 %), расстройства эмоционально-волевой сферы – у 11 из 80 человек (13,8 %). Нарушения чувствительности выявлялись у 12 человек из 80 (15 %), нарушения речи – у 15 из 80 человек (18,8 %). Мозжечковые симптомы встречались у 16 человек из 80 (20 %).

Наиболее часто нарушения в работе черепно-мозговых нервов касались зрительных нервов: нарушения зрения имели 21 из 80 пациентов (26,3 %), глазодвигательные нарушения – 10 пациентов из 80 (12,5 %). Снижение слуха было выявлено у 3 из 80 пациентов (3,8 %), снижение обоняния – у 1 из 80 пациентов (1,3 %). Нарушения функции тазовых органов было выявлено у 4 из 80 пациентов (5 %).

В исследуемой группе характер поражения ЦНС был следующим: у 46 из 82 пациентов (46,3 %) выявлялся солитарный очаг, у 22 пациентов из 82 (26,8 %) выявлялось множественное паренхиматозное поражение ЦНС, лептоменингеальный вариант поражения выявлялся у 12 пациентов из 82 (14,6 %), смешанный вариант – у 9 человек (11 %).

Таблица 7 – Клинические проявления поражения центральной нервной системы у больных группы исследования

Показатель		Частота, Абс. (%) (n = 80)
Нарушение сознания		9 (11,3)
Головные боли		46 (57,5)
Тошнота/рвота		17 (21,3)
Галлюцинации		4 (5,0)
Эмоционально-волевые нарушения		11 (13,8)
Головокружение		43 (53,8)
Когнитивные нарушения		18 (22,5)
Нарушение речи		15 (18,8)
Парезы/параличи	конечностей	32 (40,0)
	мимической мускулатуры	12 (15)
Нарушение чувствительности		12 (15,0)
Мозжечковые симптомы		16 (20,0)
Нарушение работы ЧМН	глазодвигательные нарушения	10 (12,5)
	нарушение зрения	21 (26,3)
	снижение слуха	3 (3,8)
	нарушение обоняния	1 (1,3)

Продолжение таблицы 7

Показатель		Частота, Абс. (%) (n = 80)
Нарушение функции тазовых органов		4 (5,0)
Судороги	в конечностях	3 (3,8)
	генерализованные	12 (15,0)

При паренхиматозном поражении наиболее часто выявлялись: лобная локализация – у 33 из 82 человек (40,2 %), теменная – у 27 из 82 человек (32,9 %), височная – у 16 из 82 человек (19,5 %), затылочная – у 12 из 82 человек (14,6 %), локализация в области желудочков головного мозга – у 10 из 82 человек (12,1 %), в области мозолистого тела – у 8 из 82 человек (9,8 %), в пинеальной/гипофизарной области – у 2 из 82 человек (2,4 %), в области мозжечка/мосто-мозжечковой области – у 18 из 82 человек (21,9 %), в области таламуса – у 9 из 82 человек (10,9 %), в области среднего мозга – у 6 из 82 человек (7,3 %), в области моста – у 5 из 82 человек (6,1 %), в области черепно-мозговых нервов – у 4 из 82 (4,9 %), с поражением спинного мозга – у 5 из 82 человек (6,1 %).

Проанализированы данные МРТ головного/спинного мозга у 60 из 82 пациентов. В качестве наиболее часто встречаемых паттернов описаны перифокальный отек (у 33 из 70 человек (47,1 %) и дислокация срединных структур (у 33 из 70 человек (47,1 %)), реже выявлялась гидроцефалия (у 7 из 70 человек (10 %)).

Таблица 8 – Характер поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме в группе исследования

Параметры		Частота, Абс. (%)
Характер поражения ЦНС	солитарный	38 / 82 (46,3)
	множественный	22 / 82 (26,8)
	оболочки мозга, из них:	21 / 82 (25,6)
	- лептоменингеальный	12 / 82 (14,6)
	- смешанный	9 / 82 (11,0)

Продолжение таблицы 8

Параметры		Частота, Абс. (%)
Локализация поражений	доли ГМ, из них:	
	- лобная	33 (40,2)
	- теменная	27 (32,9)
	- височная	16 (19,5)
	- затылочная	12 (14,6)
	желудочки ГМ	10 (12,1)
	мозолистое тело	8 (9,8)
	пинеальная/ гипофизарная область	2 (2,4)
	мозжечок/мосто-мозжечковая область	18 (21,9)
	мост	5 (6,1)
	средний мозг	6 (7,3)
	таламус	9 (10,9)
	ЧМН	4 (4,9)
	спинной мозг	5 (6,1)
МРТ-признаки опухоли	перифокальный отек	33 / 70 (47,1)
	дислокация срединных структур	33 / 70 (47,1)
	гидроцефалия	7/70 (10,0)
	нет данных	12 (14,6)

Данные лабораторного обследования представлены в таблицах 9 и 10.

По данным общего анализа крови анемия выявлялась у 31 из 82 пациентов (37,8 %), из них анемия легкой степени тяжести на момент установки диагноза была выявлена у 29 пациентов из 31 (93,5 %), анемия средней степени тяжести была выявлена у 2 из 31 пациента (6,5 %), анемия тяжелой степени на момент диагностики не определялась в группе исследуемых пациентов.

По данным общего анализа крови обследованных больных средний уровень гемоглобина составил $(127,63 \pm 19,40)$ г/л.

Тромбоцитопения менее $150 \times 10^9/\text{л}$ по данным общего анализа крови выявлялась у 8 из 74 пациентов, у которых был произведен подсчет числа тромбоцитов на момент установки диагноза, до начала терапии (10,8 %).

Средний уровень тромбоцитов составил $226,94 \pm 84,4 \times 10^9/\text{л}$.

Увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) выше лабораторной нормы выявлено у 31 из 68 пациентов, которым была определена СОЭ на момент установки диагноза, до начала терапии (45,6 %). Средний уровень СОЭ составил $(22,59 \pm 18,10)$ мм/ч.

Средний уровень лейкоцитов по данным общего анализа крови в исследуемой группе составил $8,21 \pm 3,30 \times 10^9/\text{л}$.

Повышение основных острофазовых показателей в исследуемой группе: гиперфибриногенемия выявлялась у 21 из 68 пациентов (30,9 %), повышение уровня С-реактивного белка (СРБ) выше лабораторной нормы – у 23 из 53 пациентов (43,4 %), щелочной фосфатазы (ЩФ) выше лабораторной нормы – у 10 из 67 пациентов (14,9 %). По данным биохимического анализа крови средний уровень ЛДГ в группе исследования составил $(559,98 \pm 933,10 / 58)$ ЕД/л, ЩФ – $(116,82 \pm 62,30)$ ЕД/л, СРБ – $(32,9 \pm 54,3)$ г/л, фибриногена – $(3,62 \pm 1,40)$ г/л.

Таблица 9 – Характеристика основных лабораторных параметров в группе исследования

Средний уровень	$M \pm m$
Гемоглобина, г/л.	$127,63 \pm 19,40$
Тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$.	$226,94 \pm 84,40$
Лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	$8,21 \pm 3,30$
СОЭ, мм/ч	$22,59 \pm 18,10$
ЛДГ, ЕД/л	$559,98 \pm 933,10 / 58$
ЩФ, ЕД/л	$116,82 \pm 62,30$
СРБ, г/л	$32,9 \pm 54,30$
Фибриногена, г/л	$3,62 \pm 1,40$

Таблица 10 – Отклонения в лабораторных параметрах в группе исследования

Параметр		Частота, Абс. (%)
Анемия, из них:		31 (37,8)
степень тяжести	- легкая степень	29 (93,5)
	- средняя степень	2 (6,5)
	- тяжелая степень	0
Тромбоцитопения менее $150 \times 10^9/\text{л}$		8 / 74 (10,8)
СОЭ выше лабораторной нормы		31 / 68 (45,6)
Гиперфибриногенемия, выше 4 г/л		21 / 68 (30,9)
Уровень СРБ выше лабораторной нормы		23 / 53 (43,4)
Уровень ЛДГ выше лабораторной нормы		21 / 58 (36,2)
Уровень ЩФ выше лабораторной нормы		10 / 67 (14,9)

Данные исследования ликвора были доступны для анализа у 24 пациентов. Повышение уровня белка в ликворе было выявлено у 15 пациентов (62,5 %), атипичные лимфоциты в ликворе обнаружены всего у 2 больных (8,3 %).

По данным гистологического и иммуногистохимического исследований (Таблица 11) отмечалась выраженная пролиферативная активность злокачественных клеток (высокая экспрессия Ki67 более 75 % клеток) в 35 / 60 (58,3 %) случаев. Среди случаев, в которых было проведено определение подтипа опухоли по протоколу Hans et al., доминировал nonGCB подтип – 30 / 38 (78,9 %).

Таблица 11 – Иммуногистохимические варианты диффузной В-крупноклеточной лимфомы

Параметр		Частота, Абс. (%)
Экспрессия Ki-67, более 75 % клеток		35 / 60 (58,3)
Подтип по Hans et al.	GCB	8 / 82 (9,8)
	nonGCB	30 / 82 (36,6)
	НД	44 / 82 (53,6)

2.5 Характеристика больных системной диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы

Краткая характеристика больных ДВККЛ без вовлечения ЦНС представлена в таблице 12.

В проанализированной группе больных системной ДВККЛ без вовлечения ЦНС лица мужского и женского пола составили 77 / 202 (38,1 %) и 125 / 202 (61,9 %) человек, соответственно. Лица старше 60 лет составили 75 / 202 (37,1 %), 171 / 202 (84,7 %) имели III и IV стадии заболевания, 139 / 202 (68,8 %) – В-симптомы, 82 / 202 (40,6 %) статус ECOG 2 и более. В каждом пятом случае (19,3 %) имели место 2 и более экстранодальных поражений опухолью, в том числе 65 / 202 (32,2 %) – костного мозга. Более половины больных (125 / 202, 61,9 %) относились к группам промежуточного/высокого и высокого риска.

Анализ сопутствующей патологии показал, что единичные больные имели в анамнезе указания на хронические вирусные гепатиты и ВИЧ-инфекцию (5,9 % и 1,0 % соответственно).

В структуре сопутствующей патологии преобладала гипертоническая болезнь (70 / 202, 34,6 %) и ишемическая болезнь сердца (23 / 202, 11,4 %). Реже встречались сахарный диабет – у 20 из 202 человек (9,9 %), злокачественные заболевания и хронические заболевания почек – в 5,4 % и 5,9 % случаев соответственно.

В трети случаев больные системной ДВККЛ имели анемии, среди которых преобладали (82,5 %) анемии легкой степени тяжести. Тромбоцитопения встречалась в данной подгруппе с частотой 19,3 %, 72,3 % больных имели синдром ускоренного СОЭ.

Повышенный уровень ЛДГ отмечался у 123 / 202 (60,9 %), ЩФ – 60 / 202 (29,7 %), СРБ – 91 / 202 (45,0 %), ФГ – 102 / 202 (50,5 %).

По данным иммуногистохимического исследования высокая экспрессия Ki-67 (более 75 % положительных клеток и более) была зарегистрирована лишь в 13,4 % случаев лимфомы. Распределение случаев на подтипы из клеток nonGCB и GCB подтипа – составляло примерно 1 : 1 (38 и 32 случаев соответственно).

Таблица 12 – Краткая характеристика больных системной диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы

Параметры		Частота Абс. (%)
Пол	М	77 / 202 (38,1)
	Ж	125 / 202 (61,9)
Возраст старше 60 лет		75 / 202 (37,1)
В-симптомы		139 / 202 (68,8)
Стадия по Ann Arbor	I-II	31 / 202 (15,3)
	III-IV	171 / 202 (84,7)
ECOG статус 2 и более		82 / 202 (40,6)
Экстранодальные поражения 2 и более		39 / 202 (19,3)
МПИ, баллов	0–2	77 / 202 (38,1)
	3–5	125 / 202 (61,9)
Поражение почек/надпочечников		6 / 202 (2,9)
Поражение костного мозга		65 / 202 (32,2)
ЦНС-МПИ, баллов	0–1	25 / 202 (12,4)
	2–3	105 / 202 (52,0)
	4–6	72 / 202 (35,6)
Инфекции	ВИЧ	2 / 202 (1,0)
	ВГС/ВГВ	12 / 202 (5,9)
Сопутствующие заболевания	ЗНО	11 / 202 (5,4)
	ОНМК	4 / 202 (2,0)
	АИЗ	3 / 202 (1,5)
	ДУЗ	6 / 202 (2,9)
	СД	20 / 202 (9,9)
	ГБ	70 / 202 (34,6)
	ИБС	23 / 202 (11,4)
Анемия, из них:	ХЗП	12 / 202 (5,9)
	- легкая	52 / 63 (82,5)
	- средняя	7 / 63 (11,1)
	- тяжелая	4 / 63 (6,3)
Тромбоцитопения менее 150х10 ⁹ /л		39 / 202 (19,3)

Продолжение таблицы 12

Параметры		Частота Абс. (%)
СОЭ выше лабораторной нормы		146 / 202 (72,3)
Гиперфибриногенемия		102 / 202 (50,5)
Уровень СРБ выше лабораторной нормы		91 / 202 (45,0)
Уровень ЛДГ выше лабораторной нормы		123 / 202 (60,9)
Уровень ЩФ выше лабораторной нормы		60 / 202 (29,7)
Экспрессия Ki-67, более 75 % (+) клеток		27 / 202 (13,4)
Подтип по Hans et al.	GCB	32 / 202 (15,9)
	nonGCB	38 / 202 (18,8)
	неспециф./НД	132 / 202 (65,3)

2.6 Специальные методы исследования

2.6.1 Высокопроизводительное секвенирование образцов

Из архива биологического материала были отобраны диагностические блоки фиксированных формалином и парафинизированных биоптатов опухолевых лимфоузлов и экстранодальных очагов поражения, описанных выше 9 пациентов с ДВККЛ, у которых на этапах течения опухолевого процесса развилось вторичное поражение ЦНС. Все пациенты имели принадлежность к европеоидной расе. В таблице 12 приведена краткая характеристика данных больных.

Таблица 13 – Краткая характеристика пациентов с вторичным поражением центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме, которым было выполнено высокопроизводительное секвенирование

Параметр	Номер случая								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Пол	Ж	Ж	М	Ж	М	Ж	Ж	Ж	Ж
Возраст, лет	54	55	27	66	69	73	53	55	31
ECOG статус, баллов	1	2	3	3	2	2	3	1	2
Стадия по Ann Arbor	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
В-симптомы	+	+	+	+	+	–	–	+	+
Экстранодальные поражения	Печень	—	—	Мягкие ткани	—	—	Подкожная клетчатка	Легкие	Щитовидная железа, молочные железы, плевра
Лейкемизация	+	+	+	+	–	–	–	+	–
Массивные опухолевые поражения, 10 см	–	–	–	+	–	–	+	–	+
Уровень ЛДГ, МЕ/л	609	589	406	986	746	671	807	708	953
Группа риска по ЦНС-МПИ	В	В	П	В	В	В	В	В	В
Подтип опухоли	Non-GCB	Non-GCB	—	Non-GCB	GCB	—	Non-GCB	—	Non-GCB

Продолжение таблицы 13

Параметр	Номер случая								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Период от ремиссии до рецидива с вовлечением ЦНС, мес.	20	2	0	2	5	3	5	48	5
Тип поражения ЦНС	ВМ	ВМ	ВМ + НЛ	ВМ	ВМ	ВМ	ВМ	ВМ	ВМ
Характер поражения мозга	С	С	М	С	С	С	М	С	М

Секвенирование нового поколения выполнялось на базе генетической лаборатории ЗАО «Геноаналитика» (г. Москва). Проводилась фрагментация ДНК ультразвуком на наборе Covaris S2. Полученную геномную ДНК использовали для приготовления и обогащения библиотек при помощи набора NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina и NEBNext FFPE DNA Repair Mix (NEB) согласно инструкции к набору. Полученные библиотеки гибридизовали с SureSelect Human All Exon V7 exome (Agilent) согласно инструкции. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 с генерацией данных до покрытия $\times 100$ [16].

Дальнейшие этапы работ выполнялись на базе лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ИЦиГ СО РАН.

Для анализа были отобраны 75 генов, которые играют важную роль в развитии и функционировании В-лимфоцитов, передаче сигналов в клетку, иммунном ответе, контроле клеточного цикла и программированной клеточной смерти, репарации ДНК, а также эпигенетических модификациях, и которые по данным литературных источников вовлечены в онкогенез. Были включены гены регуляции иммунного ответа (*CIITA*, *B2M*, *TNFRSF14*, *CD58*), клеточного цикла и апоптоза (*RB1*, *MFHAS1*, *XPO1*, *MYC*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *FOXO1*, *TP53*, *ATM*, *GNA13*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FBXW7*, *BCL2*, *GNA11*, *KRAS*, *NRAS*, *NPM1*, *STK11*), пролиферации, дифференцировки и миграции клеток (*ABL1*, *ALK1*, *APC*, *RET*, *SMAD4*, *EGFR*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *CDH1*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *FLT3*, *GNAQ*, *HRAS*, *KDR*, *KIT*, *SOCS1*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*), сигнальных путей NOTCH (*NOTCH1*, *NOTCH2*), сигнальных путей NF κ B (*TNFAIP3*, *MYD88*, *PIM1*, *CARD11*, *IRF4*, *PRDM1*), MAP-киназного пути (*BRAF*, *PTPN11*), сигнальных путей JAK-STAT (*SOCS1*, *STAT6*, *JAK2*, *JAK3*, *MET*), BCR (*CD79A*, *CD79B*, *ITPKB*, *TCF3*, *ID3*), эпигенетической регуляции (*EZH2*, *KMT2D*, *EP300*, *MEF2B*, *CREBBP*, *SMARCB1*, *SMARCA4*, *ARID1A*) и репарации ДНК (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1*) [16].

Биоинформатический анализ необработанных данных проводился на платформе Genomenal [28] по следующей процедуре: контроль качества и

филترация необработанных чтений, выравнивание на референсный геном человека версии GRCh38/hg38 с помощью инструмента BWA версии 0.7.17, отбор SNV/indels с использованием GATK версии 4.1.3.0 с последующими филтрацией и контролем качества. Все выявленные в ходе секвенирования варианты нуклеотидной последовательности (ВНП), частота минорного аллеля которых в популяционных выборках [160] выше 1 %, были исключены из анализа.

Для работы были выбраны ВНП, относящиеся к нонсенс заменам, варианты со сдвигом рамки считывания, замены в сайтах сплайсинга (донорном/акцепторном), миссенс замены. Их дополнительно аннотировали по базам данных COSMIC [71] и dbSNP [160], а также оценивали с помощью предикторов функционального эффекта миссенс замен Polyphen 2 [206], SIFT [135], Mutation Assessor [181] и PROVEAN [16; 181].

При интерпретации клинической значимости выявленных находок использовались «Руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования», «Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2)» и «Стандарты классификации патогенности соматических вариантов при раке: объединенные рекомендации Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC) и Cancer Consortium (VICC)» [8; 16; 20; 207].

2.6.2 Подтверждение выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей

Патогенные и вероятно патогенные ВНП с представленностью минорного аллеля в биоматериале не менее 30 % по данным высокопроизводительного секвенирования были подтверждены методом прямого капиллярного секвенирования по Сенгеру. На первом этапе проводилась ПЦР для наработки

фрагментов последовательностей, содержащих мутацию, с использованием фланкирующих праймеров. Полученные ПЦР продукты подвергались очистке от солей, не включившихся праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов с помощью микроколонок с Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare).

Секвенирование образцов осуществлялось при помощи наборов BigDye Terminator v1.3 (Applied Biosystems) методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) с применением полимера POP-7. Анализ результатов секвенирования и выравнивание фрагментов осуществлялся с помощью программ Chromas и SeqScape v.2.7.

В качестве референсных использовались последовательности генов *MYD88* NG_023225.1, *NOTCH1* NG_007458.1, *TP53* NG_017013.2, *CD79B* NG_007368.1, *PIM1* NG_029601.1, *MSH2* NG_007110.2, *ARID1A* NG_029965.1, *SMARCA4* NG_011556.2.

Делеции были валидированы методом ПЦР с фланкирующими праймерами с последующим электрофорезом в высокопроцентном полиакриламидном геле с добавлением глицерина.

Последовательности всех применяемых праймеров указаны в таблице 14. Праймеры были синтезированы в ООО «Биосинтез» (г. Новосибирск). Амплификация проводилась в термоциклере «Терцик» (ЗАО НПФ «ДНК-Технология», РФ).

Таблица 14 – Последовательности применяемых праймеров, температуры отжига и длины получаемых ампликонов

Ген	Мутация	Последовательность праймеров	Длина ампл-на	T °C отж.
<i>MYD88</i>	p.L265R	F 5'-gcatgtgtgcatgtgttg-3' R 5'-tgaacctcaggatgctggg-3'	264 п. н.	58
	p.V204F	F 5'-ggcatatgcctgagcgtttc-3' R 5'-tcatgcatccacgcaccca-3'	221 п. н.	60
<i>NOTCH1</i>	p.P1390T	F 5'-cttcgagggcgccacgtgtgagaat-3' R 5'-aatttgccggggcacaggcaac-3'	342 п. н.	66

Продолжение таблицы 14

Ген	Мутация	Последовательность праймеров	Длина ампл-на	Т °С отж.
TP53	p.R116Q	F 5'-ttgggagtagatggagcct-3'	445 п. н.	63
	p.R141H	R 5'-agtgttagactggaaacttt-3'		
CD79B	p.L95P	F 5'-ccaggatgacagcaaggct-3' R 5'-cctacagaccacttcacttcc-3'	232 п. н.	54
	p.Y196N	F 5'-gatggggctgggggacactaacact-3' R 5'-acttcacttcccctgtccgcagcgt-3'	270 п. н.	62
	p.E197GfsX6		270 + 255	
	p.G198_D202del		п. н.	
PIM1	p.E135Q	F 5'-atggaagtggctcctgctg-3' R 5'-tttcgtccttgatgtcg-3'	253 п. н.	57
	p.G78E	F 5'-acgagggaacctgacggaga-3' R 5'-agtgccattaggctgcaggg-3'	190 п. н.	60
	p.L80L	F 5'-tgctccaccgcgacatcaa-3' R 5'-gcggcccaatgaccttta-3'	270 + 261	62
	p.195_198del		п. н.	
MSH2	p.D475H	F 5'-acagtaaaatttaagtgggagg-3' R 5'-gaccattcttaccagatct-3'	229 п. н.	54
ARID1A	p.Q1334del	F 5'-ggagcctggaatagggcctgagggaaa-3' R 5'-acacaggattaggggtgggcagtggc-3'	202 + 199 п. н.	64
SMARCA4	p.E187fs	F 5'-aggtagagggggtgagggctgtaa-3' R 5'-ttcttctctccacgggca-3'	182 + 179 п. н.	60

2.6.3 Скрининговая методика обнаружения рекуррентной мутации MYD88 p.L265P

Учитывая обнаружение рекуррентной мутации MYD88 p.L265P дополнительно был разработан способ ее выявления методом ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, который может быть выполнен для быстрого скрининга мутации на стандартном оборудовании в широкой клинической практике. Предлагаемый способ выявления мутации пригоден при использовании ДНК, выделенной из FFPE-образца, которая

характеризуется высокой степенью фрагментации (большая часть фрагментов имеет длину около 200 п. н.).

Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции мутации *MYD88* p.L265P выбирались с помощью программы Vector NTI. Праймеры должны были фланкировать область гена *MYD88*, потенциально содержащую мутацию, протяженностью не более 200 п. н. Обратный праймер содержал введенный сайт рестрикции – однонуклеотидную замену для создания последовательности распознавания эндонуклеазой *HinfI* в случае отсутствия мутации.

ПЦР проводилась с фланкирующими исследуемый район праймерами: 5'-gtacttagatgggggatggctgttg-3' – прямой праймер; 5'-attgccttgacttgatgggggatg-3' – обратный праймер. Параметры ПЦР были следующими: денатурация 30 сек. при 95 °C; отжиг 20 сек. при 62 °C; синтез 20 сек. при 72 °C, всего 33 цикла.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 75 mM Tris-HCl, pH 9,0; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01 % Tween-20; 1 мкл ДНК; по 1 мкМ каждого праймера; 2,5 mM MgCl₂; 1 mM каждого из dNTP; 1 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», г. Новосибирск). Рестрикция проводилась в стандартных условиях с 10 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции *HinfI* («СибЭнзим», г. Новосибирск) при 37 °C в течение 12 часов, с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Результаты рестрикции подвергались электрофорезу в камере НПФ БИОКЛОН (г. Москва) в 4 % полиакриламидном геле с постоянным напряжением 50 вольт и окрашиванием бромистым этидием в течение 3 минут. Разделенные фрагменты ДНК были визуализированы на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с помощью системы гель-документирования (Gel Doc XR+, США). Сохранение и обработка изображений электрофоретических гелей проводилась с помощью программы Quantity One.

При наличии в амплифицируемом участке ДНК сайта рестрикции (нормальный аллель) от продукта амплификации размером 148 п. н. отрезается фрагмент размером 24 п. н., то есть в случае гетерозиготы по мутации *MYD88*

р.L265Р образуются три фрагмента длиной 148 п. н., 124 п. н. и 24 п. н., а в случае мутации в гомозиготном состоянии длина ПЦР продукта остается неизменной – 148 п. н. (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Электрофореграмма результатов генотипирования образцов ДНК на наличие мутации р.L265Р в гене *MYD88*: образец 1 – гетерозигота по мутации р.L265Р (фрагменты 148 п. н. и 124 п. н.), образцы 2, 4, 5 – нормальные гомозиготы (фрагмент 124 п. н.), образец 3 – гомозигота по мутации р.L265Р, М – маркер молекулярных весов 100 п. н.

Фрагмент длиной 24 п. н. короткий и быстро выходит из геля.

2.7 Статистическая обработка материала

Статистическая обработка материала выполнялась с применением программы IBM Statistics 10.0 (IBM, США). Статистически значимыми считались различия при значении $p < 0,05$.

Нормальность распределения параметров проверялась с использованием теста Колмогорова – Смирнова. Описательная статистика для переменных с

нормальным распределением представлена средним значением и стандартным отклонением от него, расчеты производились с использованием теста ANOVA. Для переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, использованы значения медианы (Me), 25-го и 75-го процентиля (Q25–Q75) и тесты Крускала – Уоллиса и тест Манна – Уитни.

Проводился расчет абсолютных и относительных частот признаков. Различия в частотах оценивались с помощью расчета кси-квадрат Пирсона (χ^2) или точного критерия Фишера (F-критерий).

Для оценки ассоциации оцениваемых признаков с риском вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ было рассчитано отношение шансов (ОШ) с 95 %-м доверительным интервалом (ДИ).

Общая 5-летняя выживаемость больных оценивалась с использованием метода Каплана – Мейера и лог-рангового теста (Log-rank test), началом мониторинга считался момент постановки диагноза, событием – смерть от любой причины.

Анализ функциональной значимости выявленных миссенс замен проводился с применением предикторных программ SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor и PROVEAN.

Анализ сочетанного выявления мутаций генов и оценка их комбинаций (картины совместного появления и взаимного исключения мутаций) проводился путем вычисления логарифма отношения шансов (Log Odds Ratio) и точного критерия Фишера (p-value) с помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [127], также была получена картина распределения мутаций в каждом из образцов [16].

Мутационный спектр наиболее часто мутированных генов был создан в формате графика «леденца на палочке» с помощью программы Lollipops [16; 132].

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Сравнение первичной лимфомы центральной нервной системы и диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы

По данным анализа клинической характеристики пациентов в группе лимфом с вторичным вовлечением ЦНС в сравнении с ПЛЦНС на момент диагностики заболевания статистически значимо чаще встречались пациенты старше 60 лет (85,7 % против 55,3 %, $p = 0,004$) и больные с общесоматическим статусом 2 и выше по шкале ECOG (91,4 % против 72,3 %, $p = 0,031$). Также в данной группе чаще отмечались симптомы опухолевой интоксикации (54,5 % против 19,0 %, $p < 0,001$). Высокий и промежуточный/высокий риск по МПИ (3–5 баллов) имели 85,7 % пациентов с вторичным вовлечением ЦНС при ДВККЛ, тогда как в группе пациентов с ПЛЦНС – лишь 57,4 % ($p = 0,006$) (Таблица 15). Следует отметить, что все пациенты с вторичным поражением ЦНС при ДВККЛ имели средний или высокий риск рецидива лимфомы в ЦНС, согласно прогностическому индексу МПИ-ЦНС [18].

Среди сопутствующих заболеваний у пациентов из группы ПЛЦНС в 2,2 раза чаще, чем в группе ДВККЛ с вторичным поражением ЦНС, выявлялась артериальная гипертензия (74,5 против 34,3 %, $p < 0,001$), а также отмечалась тенденция к различиям по частоте выявления диффузного узлового зоба и хронических заболеваний почек (14,9 против 22,9 %, $p = 0,070$ и 40,4 % против 22,9 %, $p = 0,095$ соответственно) (Таблица 15) [18].

Таблица 15 – Клинико-демографическая характеристика пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Параметры		Системная ДВККЛ n = 202 (1)	ПЛЦНС n = 47 (2)	Вторичное поражение ЦНС n = 35 (3)	Значимость различий <i>p</i> <i>p</i> ₁₋₂ <i>p</i> ₁₋₃ <i>p</i> ₂₋₃	ОШ ₁₋₃ (95 % ДИ)
		Абс. (%)				
Пол	М	77 / 202 (38,1)	22 / 47 (46,8)	14 / 35 (40,0)	0,273 0,833	—
	Ж	125 / 202 (61,9)	25 / 47 (53,2)	21 / 35 (60,0)	0,539	
Возраст старше 60 лет		75 / 202 (37,1)	26 / 47 (55,3)	30 / 35 (85,7)	0,023 < 0,001 0,004	10,2 (3,8;27,3)
В-симптомы		139/202 (68,8)	9/47 (19)	18/35 (54,5)	< 0,001 0,107 < 0,001	—
Стадия по Ann Arbor	I-II	31 / 202 (15,3)	0	0	0,005 0,013	—
	III-IV	171 / 202 (84,7)	47/47 (100)	35/35 (100)	1	
ECOG статус 2 и более		82/202 (40,6)	34/47 (72,3)	32/35 (91,4)	< 0,001 < 0,001 0,031	15,6 (4,6;52,7)
Экстранодальные поражения 2 и более		39/202 (19,3)	—	18/35 (51,4)	— < 0,001 —	4,4 (2,1;9,4)
МПИ, баллов	0–2	77/202 (38,1)	20/47 (42,6)	5/35 (14,3)	0,575 0,007	3,7 (1,4;9,9)
	3–5	125/202 (61,9)	27/47 (57,4)	30/35 (85,7)	0,006	
Поражение почек/надпочечников		6/202 (2,9)	—	3/35 (8,5)	— 0,143 —	—

Продолжение таблицы 15

Параметры		Системная ДВККЛ n = 202 (1)	ПЛЦНС n = 47 (2)	Вторичное поражение ЦНС n = 35 (3)	Значимость различий <i>p</i> <i>p</i> ₁₋₂ <i>p</i> ₁₋₃ <i>p</i> ₂₋₃	ОШ ₁₋₃ (95 % ДИ)
		Абс. (%)				
Поражение костного мозга		65 / 202 (32,2)	—	7 / 35 (20,0)	— 0,149 —	—
ЦНС-МПИ, баллов	0–1	25 / 202 (12,4)	—	0 / 35 (0)	— 0,028 —	2,7 (1,3; 5,6)
	2–3	105 / 202 (52,0)	—	14 / 35 (40,0)	— 0,191 —	
	4–6	72 / 202 (35,6)	—	21 / 35 (60,0)	— 0,007 —	
Инфекции	ВИЧ	2 / 202 (1,0)	2 / 47 (4,3)	4 / 35 (11,4)	0,109 < 0,001 0,218	12,9 (2,3; 73,4)
	ВГС/ ВГВ	12 / 202 (5,9)	3 / 47 (6,4)	1 / 35 (2,9)	0,909 0,406 0,464	—
Сопутствующие заболевания	ЗНО	11 / 202 (5,4)	9 / 47 (19,1)	2 / 35 (5,7)	0,002 0,949 0,078	—
	ОНМК	4 / 202 (2,0)	2 / 47 (4,2)	0 / 35 (0)	0,360 0,402 0,217	—
	АИЗ	3 / 202 (1,5)	1 / 47 (2,1)	0 / 35 (0)	0,753 0,469 0,386	—

Продолжение таблицы 15

Параметры		Системная ДВККЛ n = 202 (1)	ПЛЦНС n = 47 (2)	Вторичное поражение ЦНС n = 35 (3)	Значимость различий <i>p</i> <i>p</i> ₁₋₂ <i>p</i> ₁₋₃ <i>p</i> ₂₋₃	ОШ ₁₋₃ (95 % ДИ)
		Абс. (%)				
Сопутствующие заболевания	ДУЗ	6 / 202 (2,9)	7 / 47 (14,9)	1 / 35 (2,9)	< 0,001 0,971 0,070	—
	СД	20 / 202 (9,9)	8 / 47 (17,0)	4 / 35 (11,4)	0,165 0,783 0,479	—
	ГБ	70 / 202 (34,6)	35 / 47 (74,5)	12 / 35 (34,3)	< 0,001 0,191 < 0,001	—
	ИБС	23 / 202 (11,4)	9 / 47 (19,1)	4 / 35 (11,4)	0,153 0,995 0,344	—
	ХЗП	12 / 202 (5,9)	19 / 47 (40,4)	8 / 35 (22,9)	< 0,001 < 0,001 0,095	4,7 (1,8; 12,5)

Неврологическая симптоматика при первичном и вторичном вовлечении ЦНС в опухолевый процесс при ДВККЛ в целом была схожая. Наиболее часто отмечалась общемозговая симптоматика (головные боли, тошнота, рвота), реже – неврологические дефициты, соответствующие локализации очагов поражения (Таблица 16). Вместе с тем, в группе ПЛЦНС отмечалась выраженная тенденция к большей частоте регистрации генерализованного судорожного синдрома ($p = 0,061$), парезов конечностей ($p = 0,052$), а также головокружения ($p = 0,089$), нарушения речи ($p = 0,064$), эмоционально-волевых ($0,095$) и когнитивных нарушений ($p = 0,063$) [18].

Таблица 16 – Характер поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме в группе исследования

Параметры		ПЛЦНС (n = 47)	Вторичное вовлечение ЦНС (n = 35)	Значимость различий <i>p</i>
		Абс. (%)		
Характер поражения ЦНС	солитарный	27 / 47 (57,4)	11 / 35 (31,4)	0,020
	множественный	20 / 47 (42,6)	12 / 35 (34,3)	0,448
	оболочки мозга, из них:	3 / 47 (6,4)	18 / 35 (51,4)	< 0,001
	- лептоменингеальный	0 / 3 (0)	12 / 18 (66,7)	0,031
	- смешанный	3 / 3 (100,0)	6 / 18 (33,3)	
Локализация поражений	доли ГМ, из них:			
	- лобная	23 / 47 (48,9)	10 / 35 (28,6)	0,063
	- теменная	21 / 47 (44,7)	6 / 35 (17,1)	0,009
	- височная	11 / 47 (23,4)	5 / 35 (14,3)	0,303
	- затылочная	7 / 47 (14,9)	5 / 35 (14,3)	0,939
	желудочки ГМ	7 / 47 (14,9)	3 / 35 (8,6)	0,387
	мозолистое тело	5 / 47 (10,6)	3 / 35 (8,6)	0,756
	пинеальная/ гипофизарная область	1 / 47 (2,1)	1 / 35 (2,9)	0,833
	мозжечок/мосто- мозжечковая область	10 / 47 (28,6)	8 / 35 (22,9)	0,865
	мост	4 / 47 (8,5)	1 / 35 (2,9)	0,290
	средний мозг	4 / 47 (8,5)	2 / 35 (5,7)	0,631
	таламус	8 / 47 (17,0)	1 / 35 (2,9)	0,043
	ЧМН	0 / 47 (0)	4 / 35 (11,4)	0,018
	спинной мозг	0 / 47 (0)	5 / 35 (14,3)	0,008
МРТ-признаки	перифокальный отек	29 / 47 (61,7)	4 / 23 (17,4)	< 0,001
	дислокация срединных структур	28 / 47 (59,6)	5 / 23 (21,7)	0,003
	гидроцефалия	5 / 47 (10,6)	2 / 23 (6,1)	0,476

Продолжение таблицы 16

Параметры		ПЛЦНС (n = 47)	Вторичное вовлечение ЦНС (n = 35)	Значимость различий p
		Абс. (%)		
Клинические проявления поражения ЦНС:				
Нарушение сознания		7 / 47 (14,9)	2 / 33 (6,1)	0,219
Головные боли		26 / 47 (55,3)	20 / 33 (60,6)	0,638
Тошнота/рвота		9 / 47 (19,1)	8 / 33 (24,2)	0,584
Галлюцинации		2 / 47 (4,3)	2 / 33 (6,1)	0,716
Эмоционально-волевые нарушения		9 / 47 (19,1)	2 / 33 (6,1)	0,095
Головокружение		29 / 47 (61,7)	14 / 33 (42,4)	0,089
Когнитивные нарушения		14 / 47 (29,8)	4 / 33 (12,1)	0,063
Нарушение речи		12 / 47 (25,5)	3 / 33 (9,1)	0,064
Парезы/параличи	конечностей	23 / 47 (48,9)	9 / 33 (27,3)	0,052
	мимической мускулатуры	5 / 47 (10,6)	7 / 33 (21,2)	0,193
Нарушение чувствительности		7 / 47 (14,9)	5 / 33 (15,2)	0,975
Мозжечковые симптомы		12 / 47 (25,5)	4 / 33 (12,1)	0,140
Нарушение работы ЧМН	глазодвигательные нарушения	4 / 47(8,5)	6 / 33 (18,2)	0,198
	нарушение зрения	12 / 47 (25,5)	9 / 33 (27,3)	0,862
	снижение слуха	1 / 47 (2,1)	2 / 33 (6,1)	0,363
	нарушение обоняния	1 / 47 (2,1)	0 / 33 (0)	0,400
Нарушение функции тазовых органов		2 / 47 (4,2)	2 / 33 (6,1)	0,716
Судороги	в конечностях	2 / 47 (4,2)	1 / 33 (3,0)	0,777
	генерализованные	10 / 47 (28,6)	2 / 33 (6,1)	0,061

Анализ лабораторно-инструментальных показателей свидетельствовал о том, что повышение уровня СРБ и ЩФ значимо чаще ($p < 0,001$) регистрировалось в группе больных ДВККЛ с вторичным поражением

ЦНС – 71,4 % и 37,0 % против 25,0 % и 0 % соответственно. Также в группе вторичного поражения ЦНС при ДВККЛ у пациентов отмечалась тенденция к более частому развитию анемии ($p = 0,083$) и тромбоцитопении ($p = 0,059$) в сравнении с больными ПЛЦНС [18].

По данным гистологического и иммуногистохимического исследований, как для первичной ДВККЛ ЦНС, так и для лимфомы с вторичным вовлечением ЦНС были характерны выраженная пролиферативная активность злокачественных клеток (высокая экспрессия Ki67 более 75 % клеток), а также преобладание nonGCB подтипа опухоли (Таблица 17), определенного по протоколу Hans et al. [167].

Таблица 17 – Результаты лабораторно-инструментальных методов исследования у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Параметры		Системная ДВККЛ (n = 202)	ПЛЦНС (n = 47)	Вторичное вовлечение ЦНС (n = 35)	Значимость различий p p_{1-2} p_{1-3} p_{2-3}	ОШ ₁₋₃ (95 % ДИ)
		(1)	(2)	(3)		
Анемия, из них:		63 / 202 (31,2)	14 / 47 (29,8)	17 / 35 (48,6)	0,852 0,045 0,083	2,1 (1,0;4,3)
Степень тяжести	- легкая степень	52 / 63 (82,5)	14 / 14 (100)	15 / 17 (53,6)	0,092 0,573 0,185	—
	- средняя степень	7 / 63 (11,1)	0 / 14 (0)	2 / 17 (7,1)		
	- тяжелая степень	4 / 63 (6,3)	0 / 14 (0,0)	0 / 17 (0,0)		
Тромбоцитопения менее 150 × 10 ⁹ /л		39 / 202 (19,3)	3 / 46 (6,5)	5 / 28 (17,9)	0,037 0,855 0,059	—

Продолжение таблицы 17

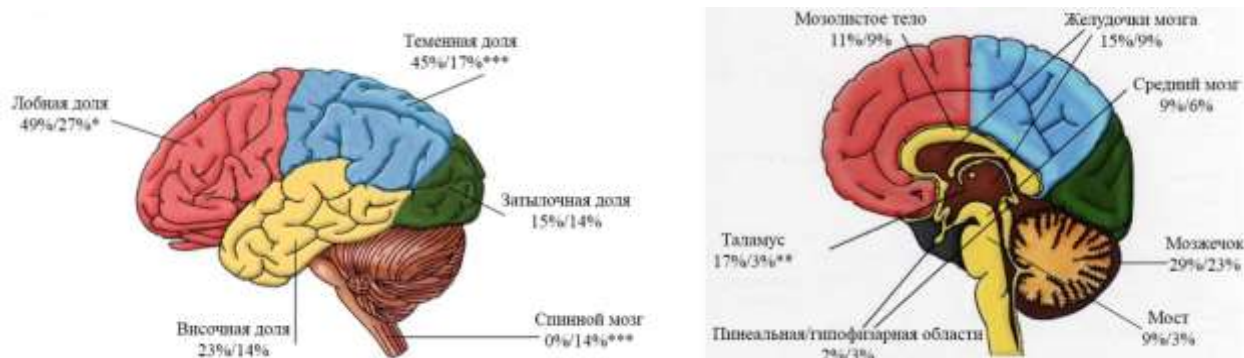
Параметры		Системная ДВККЛ (n = 202) (1)	ПЛЦНС (n = 47) (2)	Вторичное вовлечение ЦНС (n = 35) (3)	Значимость различий p p1-2 p1-3 p2-3	ОШ1-3 (95 % ДИ)
СОЭ выше лаборатор- ной нормы		146 / 202 (72,3)	17 / 42 (40,5)	14 / 24 (58,3)	< 0,001 0,156 0,163	—
Гиперфибриногенемия		102 / 202 (50,5)	9 / 39 (23,1)	12 / 29 (41,4)	0,002 0,359 0,107	—
Уровень СРБ выше лабораторной нормы		91 / 202 (45,0)	8 / 32 (25,0)	15 / 21 (71,4)	0,033 0,022 < 0,001	—
Уровень ЛДГ выше лабораторной нормы		123 / 202 (60,9)	9 / 30 (30,0)	12 / 28 (42,9)	0,002 0,070 0,309	—
Уровень ЦФ выше лабораторной нормы		60 / 202 (29,7)	0 / 40 (0)	10/27 (37,0)	< 0,001 0,438 < 0,001	—
Экспрессия Ki-67, более 75 % (+) клеток		27 / 202 (13,4)	23 / 35 (65,7)	12 / 25 (48,0)	< 0,001 < 0,001 0,171	6,0 (2,5; 14,5)
Подтип по Hans et al.	GCB	32 / 202 (15,9)	2 / 47 (4,3)	6 / 35 (17,2)	0,038 0,847 0,052	—
	nonGCB	38 / 202 (18,8)	15 / 47 (31,9)	15 / 35 (42,8)	0,049 0,002 0,309	3,2 (1,5;6,9)
	неспециф./ НД	132 / 202 (65,3)	30 / 47 (63,8)	14 / 35 (40,0)	— — 0,131	—

По данным нейровизуализации (см. таблицу 16) солитарный опухолевый очаг выявлялся при ПЛЦНС более чем в половине случаев (57,4 %), тогда как при вторичном поражении ЦНС при ДВККЛ – лишь у трети больных (31,4 %, $p = 0,020$) [18].

При анализе характера поражения ЦНС были выявлены следующие особенности: по данным МРТ-исследования пациентов с очаговыми поражениями вещества мозга при ПЛЦНС более чем в половине случаев имели место перифокальный отек (61,7 %) и дислокация срединных структур (59,6 %), для ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС данные показатели составили всего 17,4 % ($p < 0,001$) и 21,7 % ($p = 0,003$) соответственно. Средний объем опухоли при ПЛЦНС составил $(67,33 \pm 14,99) \text{ см}^3$ против $(10,83 \pm 4,74) \text{ см}^3$ ($p < 0,009$) при вторичном поражении ЦНС при ДВККЛ.

Лептоменингеальные формы были диагностированы, в основном, в группе пациентов с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС (51,4 % против 6,4 %, $p < 0,001$ при ПЛЦНС), и в большинстве случаев они носили изолированный характер ($p = 0,031$), тогда как в единичных наблюдениях поражения оболочек мозга при ПЛЦНС всегда сочетались с поражением вещества головного мозга (см. таблицу 16).

Все случаи поражения спинного мозга и черепно-мозговых нервов приходились на группу больных с вторичным вовлечением ЦНС при ДВККЛ, где они составили 14,3 % ($p = 0,008$) и 11,4 % ($p = 0,018$), соответственно, тогда как при ПЛЦНС отмечалась большая частота поражения теменной и лобной долей головного мозга (44,7 % против 17,1 %, $p = 0,009$ и 18,9 % против 28,6 %, $p = 0,063$, соответственно), а также таламуса (17,0 % против 2,9 %, $p = 0,043$) (Рисунок 6, см. таблицу 16) [18].



Примечание: указана частота при ПЛЦНС/вторичном поражении ЦНС, * – уровень значимости различий $p = 0,063$, ** – уровень значимости различий $p < 0,05$, *** – уровень значимости различий $p < 0,01$.

Рисунок 6 – Локализация и частота поражений структур головного и спинного мозга у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования

3.2 Сравнение диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы и системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы без вовлечения центральной нервной системы

Выявлено, что при ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС большая часть больных на момент диагностики заболевания были старше 60 лет (85,7 %), а также имели статус ECOG 2 и более (91,4 %), тогда как в группе ДВККЛ без поражения ЦНС такие пациенты составили лишь около трети случаев (37,1 %, $p < 0,001$ и 40,6 %, $p < 0,001$ соответственно). Все пациенты первой группы имели III и IV стадии заболевания на этапах верификации диагноза, тогда как при системной лимфоме без вовлечения ЦНС частота выявления локализованных стадий (I-II) составила 15,3 %, $p = 0,013$. Следует отметить также, что пациенты с ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС в 2 раза чаще ($p < 0,001$) имели хронические болезни почек (см. таблицу 15) [18].

Статистически значимые различия между группами ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС и системной ДВККЛ без вовлечения ЦНС наблюдались также

по частоте выявления 2 и более экстранодальных очагов опухолевого роста (51,4 % против 19,3 %, $p < 0,001$), ВИЧ-инфекции (11,4 % против 1 %, $p < 0,001$), неблагоприятных групп прогноза по МПИ (3–5 баллов) (85,7 % против 61,9 %, $p = 0,007$), анемического синдрома (48,6 % против 31,2 %, $p = 0,045$), повышения уровня СРБ (71,4 % против 45,0 %, $p = 0,022$) (см. таблицы 15 и 17) [18].

При иммуногистохимическом исследовании субстрата ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС в 3,9 раза чаще ($p < 0,001$) определялась высокая пролиферативная активность, и в 2,3 раза чаще опухоль ($p = 0,002$) относилась к nonGCB подтипу, в сравнении с системными ДВККЛ (см. таблицу 16) [18].

Таким образом, в анализируемой выборке к потенциальным факторам риска развития вовлечения ЦНС при системной ДВККЛ (см. таблицы 15 и 17) можно отнести следующие клинические характеристики: возраст старше 60 лет (ОШ = 10,2; 95 % ДИ (3,8; 27,3), статус ECOG 2 и более (ОШ = 15,6; 95 % ДИ (34,6; 52,7), наличие 2 и более экстранодальных очагов опухоли (ОШ = 4,4; 95 % ДИ (2,1; 9,4), группы высокого и промежуточного/высокого риска согласно МПИ (ОШ = 3,7; 95 % ДИ (1,4; 9,9), наличие хронической патологии почек (ОШ = 4,7, 95 % ДИ (1,8; 12,5). Среди лабораторных параметров к таковым относятся инфицированность ВИЧ (ОШ = 12,9, 95 % ДИ (2,3; 73,4), наличие анемии (ОШ = 2,1; 95 % ДИ (1,0; 4,3), экспрессия Ki-67 более 75 % опухолевых клеток (ОШ = 6,0; 95 % ДИ (2,5; 14,5), а также nonGCB иммуногистохимический подтип ДВККЛ (ОШ = 3,2; 95 % ДИ (1,5; 6,9) [18].

Анализ распределения пациентов на группы прогноза согласно ЦНС-МПИ показал, что в группе больных с вторичным поражением ЦНС при ДВККЛ ни один из пациентов на момент диагностики заболевания не относился к группе низкого риска, тогда как 40 % имели средний и 60 % – высокий риск, что значительно отличалось от данных группы системной ДВККЛ, а именно: к группе низкого риска относились 12,4 % ($p = 0,028$), среднего – 52,0 % ($p = 0,191$) и высокого – 35,6 % ($p = 0,007$) больных (см. таблицу 15) [18].

3.3 Сравнительный анализ первичной лимфомы центральной нервной системы и системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы без вовлечения центральной нервной системы

Сравнительный анализ показал, что, как и при ДВККЛ со вторичным вовлечением ЦНС, среди пациентов с ПЛЦНС на момент диагностики заболевания в сравнении с больными системной ДВККЛ значимо чаще встречались лица в возрасте старше 60 лет (55,3 % против 37,1 %, $p = 0,023$), с продвинутыми (III и IV) стадиями заболевания (100 % против 84,7 %, $p = 0,005$), а также статусом ECOG 2 и более (72,3 % против 40,6 %, $p < 0,001$).

Кроме того, обращало на себя внимание более частое наличие в анамнезе у больных данной группы, помимо хронических болезней почек (в 6,8 раза, $p < 0,001$), следующей сопутствующей патологии: злокачественные новообразования не гематологической природы (3,5 раза, $p = 0,002$), диффузно-узловой зоб (5,1 раза, $p < 0,001$), гипертоническая болезнь (2,2 раза, $p < 0,001$) [18].

Вместе с тем, в группе системной ДВККЛ, наряду с тенденцией к развитию анемий более тяжелой степени ($p = 0,092$), статистически значимо чаще в сравнении с ПЛЦНС имели место симптомы опухолевой интоксикации (68,8 % против 19,0 %, $p < 0,001$), тромбоцитопения (19,3 % против 6,5 %, $p = 0,037$), высокая биохимическая активность процесса: острофазовые реакции в виде увеличения СОЭ (72,3 % против 40,5 %, $p < 0,001$) и СРБ (45,0 % против 25,0 %, $p = 0,033$), гиперфибриногенемии (50,5 % против 23,1 %, $p = 0,002$), а также увеличения выше нормы уровня в сыворотке крови больных таких маркеров опухолевого процесса, как ЛДГ (60,9 % против 30,0 %, $p = 0,002$) и ЩФ (29,7 % против 0 %, $p < 0,001$).

По данным иммуногистохимического исследования при ПЛЦНС отмечалось значительное увеличение частоты выявления nonGCB подтипа опухоли (31,9 %) и высокой экспрессии Ki67 (65,7 %) в сравнении с системной ДВККЛ (18,8 %, $p = 0,049$ и 13,4 %, $p < 0,001$ соответственно) [18].

3.4 Анализ эффективности терапии в выборке пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы

Были проанализированы данные о лечении и его эффективности у 63 пациентов группы исследования.

Так, в выборке ПЛЦНС по схеме R-MPV было пролечено 14 больных, в последующем 7 человек получили дистанционную лучевую терапию на головной мозг, 1 пациенту выполнена аутологичная трансплантация стволовых кроветворных клеток (АСКТ), еще 1 – получил АСКТ с последующей дистанционной лучевой терапией. Всего у 9 пациентов была достигнута клинико-гематологическая ремиссия, однако в дальнейшем у 2 человек (1 не получал в последующем лучевую терапию, у 1 была редукция дозы метотрексата из-за тяжелых мукозитов) развился рецидив, приведший к летальному исходу, тогда как остальные 7, включая больных перенесших трансплантацию, остаются живы на момент проведения анализа.

Из 8 человек, получивших курсы с ломустином, у 4 достигнута ремиссия. Однако в последующем 3 человека погибли, 2 из них в результате рецидива ПЛЦНС, а 1 – вследствие рака простаты.

Четверо пациентов, получавших терапию R-MAT (ритуксимаб, высокие дозы метотрексата), а также ритуксимабом с темодалом из-за наличия противопоказаний к полихимиотерапии, погибли от прогрессирования основного заболевания.

Еще 3 человека с ПЛЦНС погибли от прогрессии лимфомы вследствие отказа от химиотерапевтического лечения или не толерантности к его проведению.

В выборке ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС терапию по схеме R-MPV получили 5 человек, непродолжительная ремиссия была достигнута лишь у 3 пациентов. Все больные погибли.

Еще 15 человек получали курсы R-СНОР или R-СНОЕР в сочетании с тройной интратекальной терапией (дексаметазон, метотрексат, цитарабин). У 5 пациентов достигнута ремиссия, из них 2 живы.

Курсы с ломустином получили 4 человека, ремиссия достигнута у 2, однако жив на момент проведения анализа лишь 1 пациент. Один пациент получивший терапию с темодалом, умер от прогрессирования основного заболевания. Высокими дозами метотрексата получили терапию 6 человек, лишь у 2 достигнута стойкая ремиссия.

Умерли 3 пациента, получавшие метрономную терапию в силу нетолерантности к терапии.

Таким образом, в группе больных ПЛЦНС ремиссия была получена у 13 / 29 (44,8 %) пациентов, а 3-летняя общая выживаемость (ОВ) на момент проведения анализа составила 8 / 29 (27,6 %). Показатели эффективности лечения в группе ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС были ниже: частота ремиссий составила 12 / 34 (35,3 %, $p = 0,441$), а показатель ОВ – 3 / 34 (8,8 %, $p = 0,051$).

Как видно из графика выживаемости, построенной по методу Каплана – Майера (Рисунок 7) при ПЛЦНС и вторичном вовлечении ЦНС при ДВККЛ имеет место высокая ранняя летальность больных. К двум годам от диагностики заболевания ОВ несколько выше в группе ПЛЦНС, однако к моменту 3-летнего наблюдения в обеих группах она становится одинаково низкой (Lok-rang test $p = 0,171$) [18].

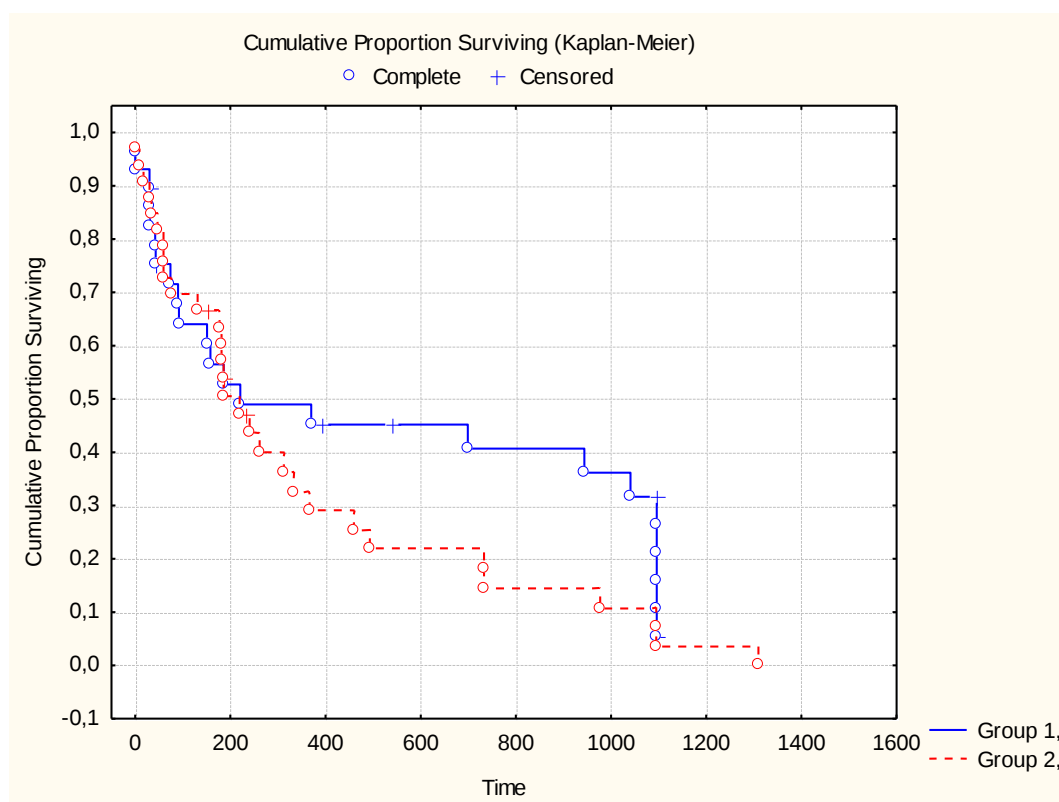


Рисунок 7 – Общая выживаемость больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы: Group 1 – первичная лимфома центральной нервной системы; Group 2 – вторичное поражение центральной нервной системы при системной диффузной В-крупноклеточной лимфоме

3.5 Мутационный статус пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой базы данных CBioPortal for Cancer Genomics database

В настоящее время в публикациях базы данных PubMed [188] содержатся сведения о спектре мутаций, выявляемых в опухолевой ткани системной ДВККЛ и первичной ДВККЛ ЦНС. Данные по высокопроизводительному секвенированию образцов опухоли с поражением нервной ткани в рецидиве заболевания не представлены.

Были проанализированы данные ресурса CBioPortal for Cancer Genomics database, который содержит наборы данных по молекулярным, в том числе

мутационным, профилям и клиническим характеристикам пациентов из крупномасштабных проектов по изучению опухолей. Ценностью представленных в CBioPortal for Cancer Genomics database данных, является то, что в ней можно разграничить случаи, в которых развилось поражение ЦНС в рецидиве заболевания ($n = 48$), а также случаи лимфомы без вовлечения ЦНС ($n = 355$) [15; 214].

Сравнительный анализ количества мутаций в диагностических биоптатах показал, что две выделенные группы практически не различаются по количеству мутаций в образцах ($p > 0,05$) (Рисунок 8). Так в группе пациентов с рецидивами в ЦНС среднее число мутаций в образце составило $8,4 \pm 5,1$, до 5 мутаций имели 142 / 343 (41,4 %), 6–15 мутаций – 181 / 343 (52,8 %) и более 15 мутаций – 20 / 343 (5,8 %) образцов. В группе пациентов без вовлечения нервной системы образцы содержали, в среднем, $7,1 \pm 4,8$ мутаций, 17 / 46 (37,0 %) образцов имели до 5 мутаций, 25 / 46 (54,3 %) – 6–15 мутаций, и 4 / 46 (8,7 %) – более 15 мутаций.

Таким образом, косвенно можно предположить, что различий по выраженности мутационной нагрузки в двух данных клинических подвыборках нет. Однако наблюдались особенности спектра мутированных генов.

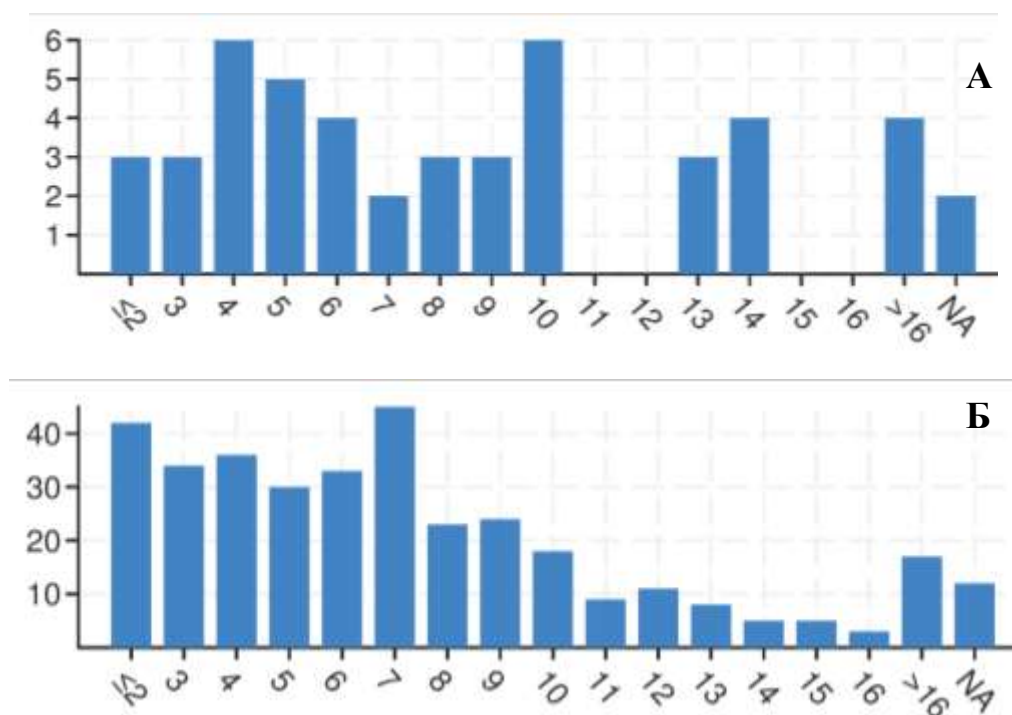


Рисунок 8 – Количество мутаций в диагностических образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания (А) и без поражения центральной нервной системы (Б)

В таблице 18 и на рисунке 9 представлены гены, мутации в которых с наибольшей частотой встречались у больных ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания. Их можно разделить на три группы: гены, относящиеся к JAK/STAT и NF- κ B сигнальным путям (*MYD88*, *PIM1*, *CARD11* и *CD79B*); гены, участвующие в эпигенетической регуляции генома (*CREBBP*, *KMT2D*, *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*), а также главный онкосупрессорный ген *TP53*. При этом значимые различия от группы пациентов без вовлечения ЦНС были получены для частот мутаций в генах *MYD88* ($p = 0,019$), *PIM1* ($p = 0,025$), *CD79B* ($p = 0,043$), *INO80* ($p = 0,028$) и *ARID1A* ($p = 0,040$). Также обращала на себя внимание тенденция к большей частоте выявления мутаций в гене *SMARCA4* у больных с поражением ЦНС в рецидиве заболевания ($p = 0,087$).

Таблица 18 – Сравнение частот мутаций у больных лимфомой без вовлечения центральной нервной системы и с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания (данные CBioPortal for Cancer Genomics database)

Гены	Рецидивы ДВККЛ с поражением ЦНС (n = 48) абс. (%)	ДВККЛ без вовлечения ЦНС (n = 355) абс. (%)	p
<i>MYD88</i>	14 (29,2)	55 (15,5)	0,019
Мутация <i>MYD88</i> p.L265P	12 (25,0)	32 (9,0)	< 0,001
<i>PIM1</i>	13 (27,1)	51 (14,4)	0,025
<i>KMT2D</i>	12 (25,0)	79 (22,3)	0,395
<i>ARID1A</i>	9 (18,8)	32 (9,0)	0,040
<i>TP53</i>	7 (14,6)	38 (10,7)	0,278
<i>CD79B</i>	6 (12,5)	17 (4,8)	0,043
<i>SMARCA4</i>	6 (12,5)	21 (5,9)	0,087
<i>INO80</i>	6 (12,5)	15 (4,2)	0,028
<i>CREBBP</i>	6 (12,5)	43 (12,1)	0,545
<i>CARD11</i>	6 (12,5)	30 (8,5)	0,246
<i>SPEN</i>	6 (12,5)	37 (10,4)	0,401
<i>MYD88/PIM1/CD79B</i>	18 (37,5)	89 (25,1)	0,068
<i>ARID1A/SMARCA4</i>	14 (29,2)	51 (14,4)	0,009
<i>ARID1A/SMARCA4/INO80</i>	19 (39,6)	62 (17,5)	< 0,001
<i>MYD88/PIM1/CD79B/ARID1A/SMARCA4/INO80</i>	30 (62,5)	133 (37,4)	< 0,001

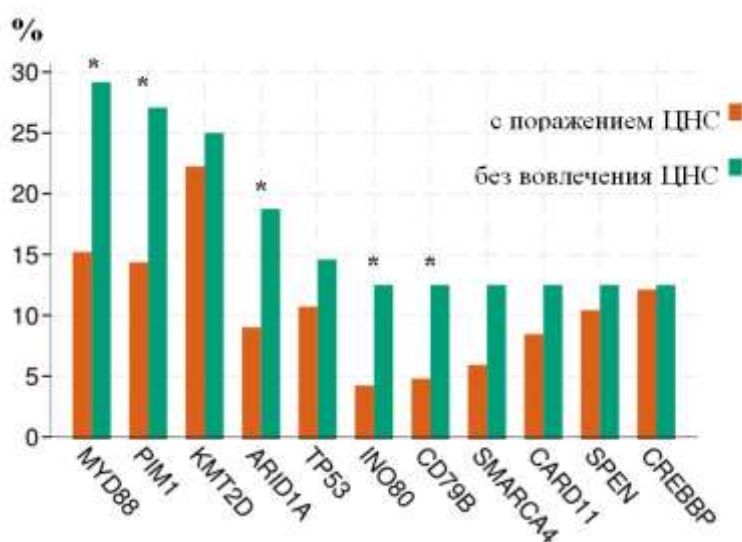
С помощью онлайн-сервиса OncoPrinter [127] была получена картина совместного появления и взаимного исключения мутаций в данных генах при лимфоме.

Суммарно в подгруппе больных ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* имели 37,5 % (18 / 48) пациентов (против 25,1 % (89 / 355), $p = 0,068$ в подгруппе без поражения ЦНС) (Рисунок 10 А и Б; см. таблицу 18). Мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* в

подгруппе больных с рецидивами ДВККЛ в ЦНС достоверно носили сочетанный характер (Таблица 19).

Согласно данным анализа cBioPortal for Cancer Genomics database были получены значимые различия по частоте мутации *MYD88* p.L265P между двумя анализируемыми клиническими подгруппами больных ДВККЛ – с рецидивами в ЦНС и без них: частота p.L265P составила 12 / 48 (25,0 %) и 32 / 355 (9,0 %), соответственно. При этом в подгруппе пациентов с вовлечением ЦНС в рецидиве заболевания мутация p.L265P была доминирующей находкой в *MYD88* – 12 / 14 (85,7 %) случаев, тогда как частота ее в подгруппе без вовлечения ЦНС составила лишь чуть более половины случаев выявления мутаций в данном гене – 32 / 55 (58,2 %) (см. таблицу 18).

Мутации в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*, напротив, имели тенденцию независимо друг от друга встречаться в подгруппе пациентов с рецидивами в ЦНС (Рисунок 10 А, Таблица 19). Суммарно они были выявлены в 39,6 % (19/48) случаев ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания, что было достоверно чаще, чем в подгруппе ДВККЛ без вовлечения ЦНС (17,5 % (62/355), $p < 0,001$).



Примечание: * – отмечен уровень значимости различий $p < 0,05$.

Рисунок 9 – Наиболее частые мутации в генах в группе больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

Таблица 19 – Оценка сочетаний мутаций в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *ARID1A* и *SMARCA4* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания по данным CBioPortal for Cancer Genomics database

Ген 1	Ген 2	Log ОШ	p	Тенденция
<i>MYD88</i>	<i>CD79B</i>	> 3	< 0,001	Сочетание
<i>MYD88</i>	<i>PIM1</i>	> 3	< 0,001	Сочетание
<i>PIM1</i>	<i>CD79B</i>	2,874	0,038	Сочетание
<i>SMARCA4</i>	<i>MYD88</i>	< -3	0,110	Взаимное исключение
<i>ARID1A</i>	<i>PIM1</i>	1,415	0,186	Сочетание
<i>INO80</i>	<i>SMARCA4</i>	< -3	0,427	Взаимное исключение
<i>SMARCA4</i>	<i>CD79B</i>	< -3	0,427	Взаимное исключение
<i>ARID1A</i>	<i>MYD88</i>	-0,637	0,475	Взаимное исключение
<i>SMARCA4</i>	<i>PIM1</i>	-1,000	0,476	Взаимное исключение
<i>INO80</i>	<i>PIM1</i>	0,495	0,524	Сочетание
<i>INO80</i>	<i>CD79B</i>	0,566	0,573	Сочетание
<i>INO80</i>	<i>MYD88</i>	0,322	0,573	Сочетание
<i>ARID1A</i>	<i>INO80</i>	-0,234	0,688	Взаимное исключение
<i>ARID1A</i>	<i>SMARCA4</i>	-0,234	0,688	Взаимное исключение
<i>ARID1A</i>	<i>CD79B</i>	0,234	0,688	Взаимное исключение

Высокую частоту мутаций в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* в подгруппе больных с рецидивами в ЦНС можно объяснить преобладанием среди ДВККЛ с вовлечением ЦНС молекулярного подтипа опухоли из активированных В-лимфоцитов (ABC-like), в основе которого и лежит активация BCR/NF-kB сигнальных путей. Для подтверждения этого факта дополнительно из представленных в CBioPortal for Cancer Genomics database данных были отобраны случаи с доказанными молекулярными подтипами опухоли: ABC-like (n = 67) и GCB-like вариантами опухоли (n = 77). Как видно из таблицы 20, частота мутаций в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* при GCB-like подтипе составила 2,6 %, 8,0 % и 4,0 %, соответственно (Рисунок 10 В и Г). В подгруппе больных с ABC-like

ДВККЛ наблюдалось значимое увеличение частот встречаемости мутаций в генах *MYD88* (32 %), *PIM1* (32 %) и *CD79B* (24 %), что соответствует данным литературы [67; 155; 170].

При ABC-like и GCB-like подтипах опухоли частоты мутаций в генах *INO80* и *SMARCA4* значимо не отличались (3,0 % против 1,3 %, $p = 0,4476$). Наблюдалась тенденция ($p = 0,0833$) к увеличению частоты мутаций в гене *ARID1A* в подгруппе пациентов с GCB-like вариантом ДВККЛ (Рисунок 10 В и Г; Таблица 20). Таким образом, увеличение частоты выявления мутаций в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* при рецидивах ДВККЛ с поражением ЦНС не связано с подтипом лимфомы из активированных лимфоцитов.

Таблица 20 – Частота мутаций в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *ARID1A*, *INO80* и *SMARCA4* при различных подтипах лимфомы по данным CBioPortal for Cancer Genomics database

Ген	ABC-like подтип ДВККЛ (n = 67), абс. (%)	GCB-like подтип ДВККЛ (n = 77), абс. (%)	p
<i>MYD88</i>	22 (32,0)	2 (2,6)	0,000
<i>PIM1</i>	22 (32,0)	6 (8,0)	0,000
<i>CD79B</i>	16 (24,0)	3 (4,0)	0,000
<i>ARID1A</i>	1 (1,5)	6 (8,0)	0,083
<i>SMARCA4</i>	2 (3,0)	1 (1,3)	0,448
<i>INO80</i>	2 (3,0)	1 (1,3)	0,448

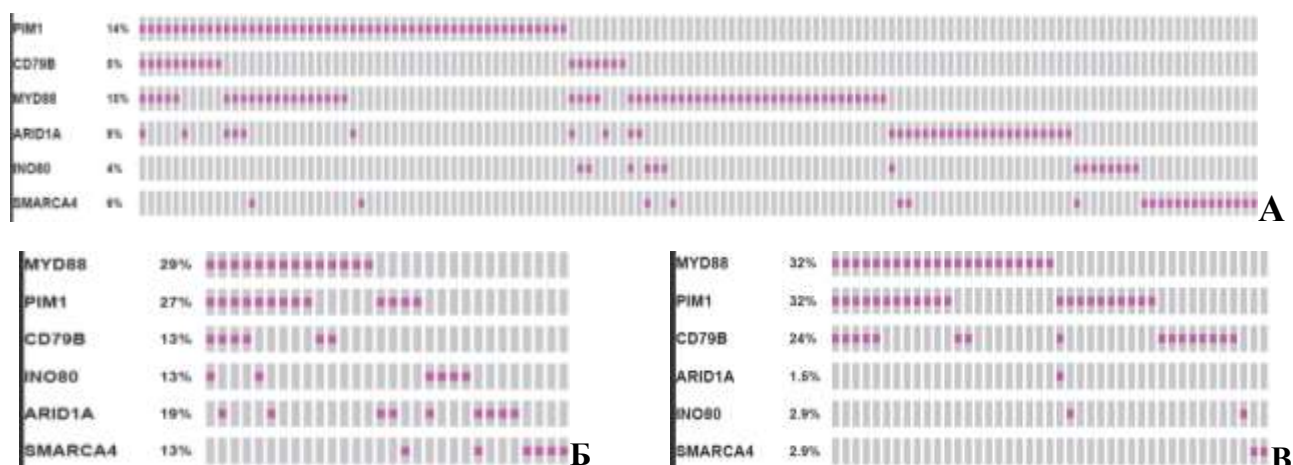


Рисунок 10 – Сочетание мутаций в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *ARID1A* и *SMARCA4* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой по данным CBioPortal for Cancer Genomics database: А – диффузная В-крупноклеточная лимфома без поражения центральной нервной системы; Б – диффузная В-крупноклеточная лимфома с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания; В – ABC-like подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы; Г – GBC-like подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Розовым отмечены случаи заболевания с мутациями

3.6 Прогностическое значение мутаций *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *INO80*, *SMARCA4* и *ARID1A*

Мутации в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *INO80* и *ARID1A* показали прогностическую ценность для развития рецидива ДВККЛ, наибольшую из которых имела мутация *MYD88* p.L265P (Таблица 21). Рецидив ДВККЛ с поражением ЦНС развился в 12 / 44 (27,3 %) случаев с *MYD88* p.L265P, и только в 36 / 359 (10,0 %) случаев – без данной мутации ($p < 0,001$). Отношение шансов риска рецидива лимфомы с вовлечением ЦНС у носителей мутации *MYD88* p.L265P, таким образом, составило ОШ = 3,365; 95 % ДИ (1,593; 7,105). Для мутаций в гене *MYD88* в целом отношение шансов риска рецидива ДВККЛ в ЦНС составило ОШ = 2,246; 95 % ДИ (1,132; 4,458).

Отношение шансов риска вовлечения ЦНС в рецидиве опухоли при обнаружении мутаций в других генах составило следующие значения: ОШ = 2,214 и 95 % ДИ (1,097; 4,469) для *PIM1*; ОШ = 2,329 и 95 % ДИ (1,035; 5,240) для *ARID1A B*; ОШ = 3,238 и 95 % ДИ (1,192; 8,798) для *INO80*; ОШ = 2,840 и 95 % ДИ (1,061; 7,601) для *CD79*.

Таблица 21 – Относительный риск рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы в центральной нервной системе при выявлении мутаций в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* по данным CBioPortal for Cancer Genomics database

Гены	Частота рецидива в ЦНС абс. (%)		ОШ (95 % ДИ)
	при выявлении мутаций	без выявления мутаций	
<i>MYD88</i>	14 / 69 (20,3)	34 / 334 (10,2)	2,246 (1,132; 4,458)
Мутация <i>MYD88</i> p.L265P	12 / 44 (27,3)	36 / 359 (10,0)	3,365 (1,593; 7,105)
<i>PIM1</i>	13 / 64 (20,3)	35 / 339 (10,3)	2,214 (1,097; 4,469)
<i>ARID1A</i>	9 / 41 (22,0)	39 / 362 (10,8)	2,329 (1,035; 5,240)
<i>CD79B</i>	6 / 23 (26,1)	42 / 380 (11,1)	2,840 (1,061; 7,601)
<i>SMARCA4</i>	6 / 27 (22,2)	42 / 376 (11,2)	2,272 (0,868; 5,948)
<i>INO80</i>	6 / 21 (28,6)	42 / 382 (11,0)	3,238 (1,192; 8,798)
<i>ARID1A</i> или <i>SMARCA4</i>	14 / 65 (21,5)	34 / 338 (10,1)	2,454 (1,232; 4,891)

3.7 Собственные результаты высокопроизводительного секвенирования образцов опухоли больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с рецидивами в центральной нервной системе

Методом высокопроизводительного секвенирования 9 диагностических образцов опухоли больных ДВККЛ, у которых в рецидиве заболевания развилось поражение ЦНС, функционально значимые варианты нуклеотидных последовательностей (ВНП) были выявлены в ряде анализируемых генов

(Рисунки 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 и 19). В таблице 22 приведена их краткая характеристика, включающая положение ВНП в геноме сборки GRCh38, тип изменения нуклеотидной и аминокислотной последовательности, а также его идентификатор в базах данных dbSNP [160] и COSMIC [72], частоту минорного аллеля по данным Exome Aggregation Consortium database [99] и глубину чтения.

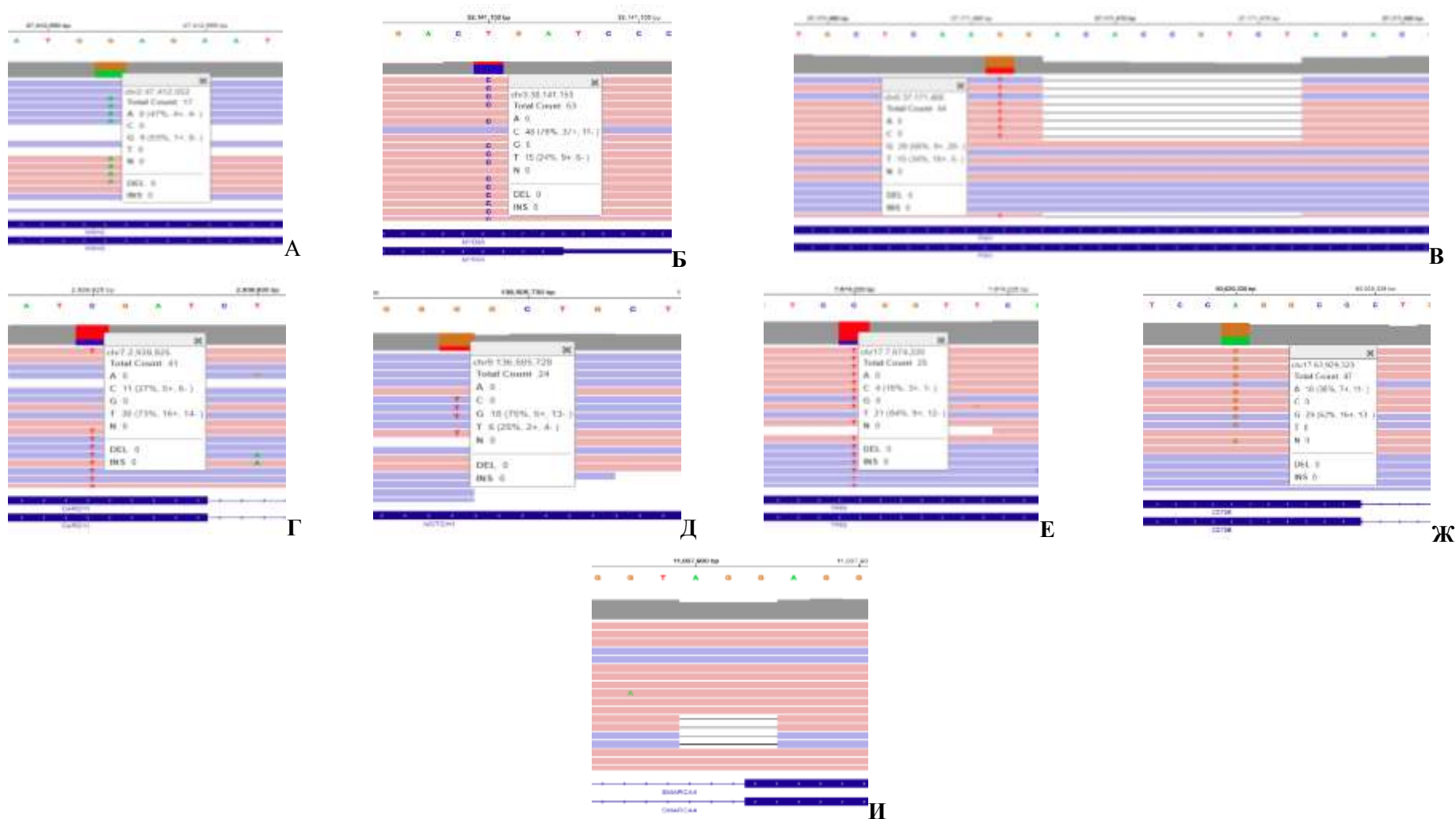


Рисунок 11 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 1: А – *MSH2* P.E262K; Б – *MYD88* p.L265R; В – *PIM1* p.K194N и p.195_198del; Г – *CARD11* p.D230N; Д – *NOTCH1* p.P1390T; Е – *TP53* p.R116Q; Ж – *CD79B* p.L95P; И – *SMARCA4* p.E187fs

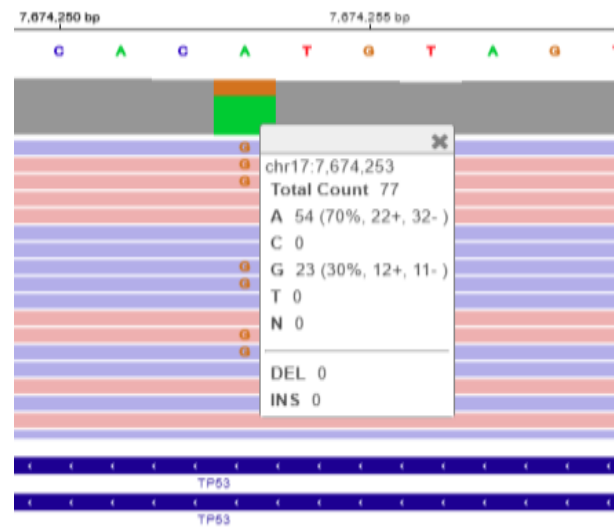


Рисунок 12 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности *TP53* p.M105T пациента № 2

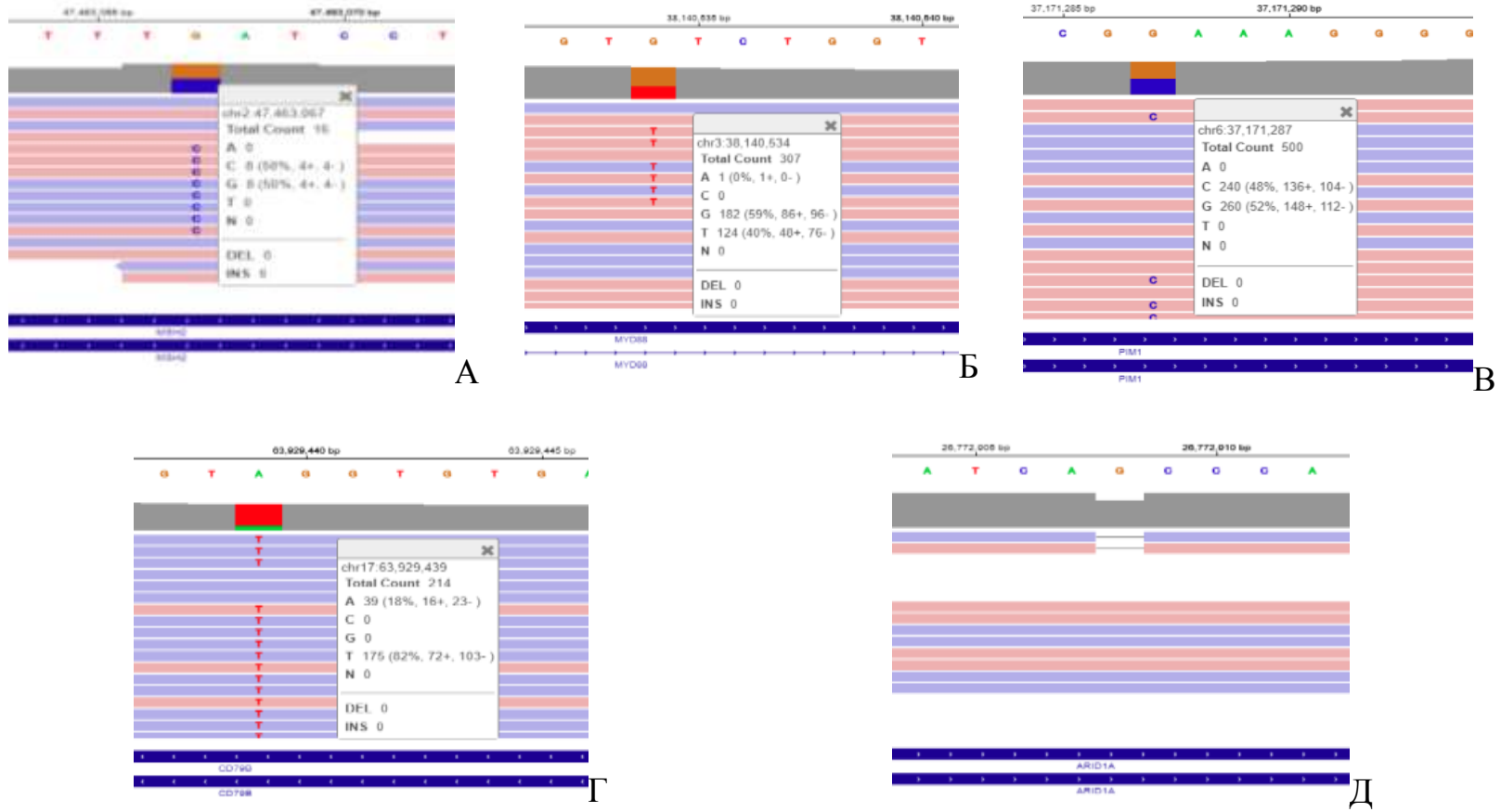


Рисунок 13 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 3: А – *MSH2* p.D475H; Б – *MYD88* p.V204F; В – *PIM1* p.E135Q; Г – *CD79B* p.Y196N; Д – *ARID1A* p.Q1212HfsX4

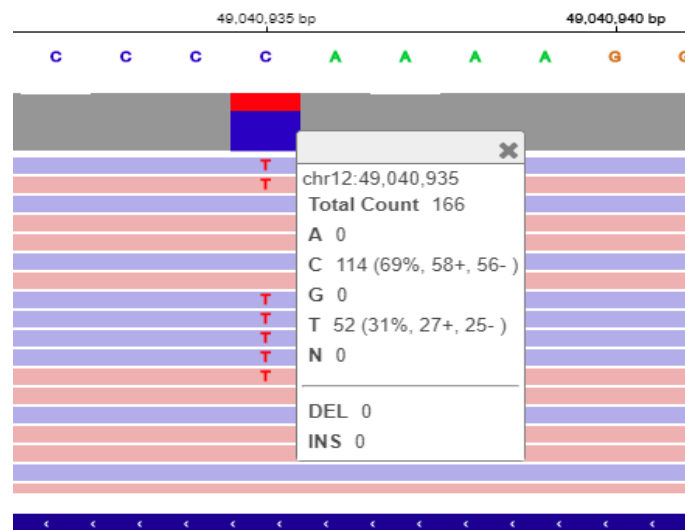


Рисунок 14 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 4: *KMT2D* p.G2279R

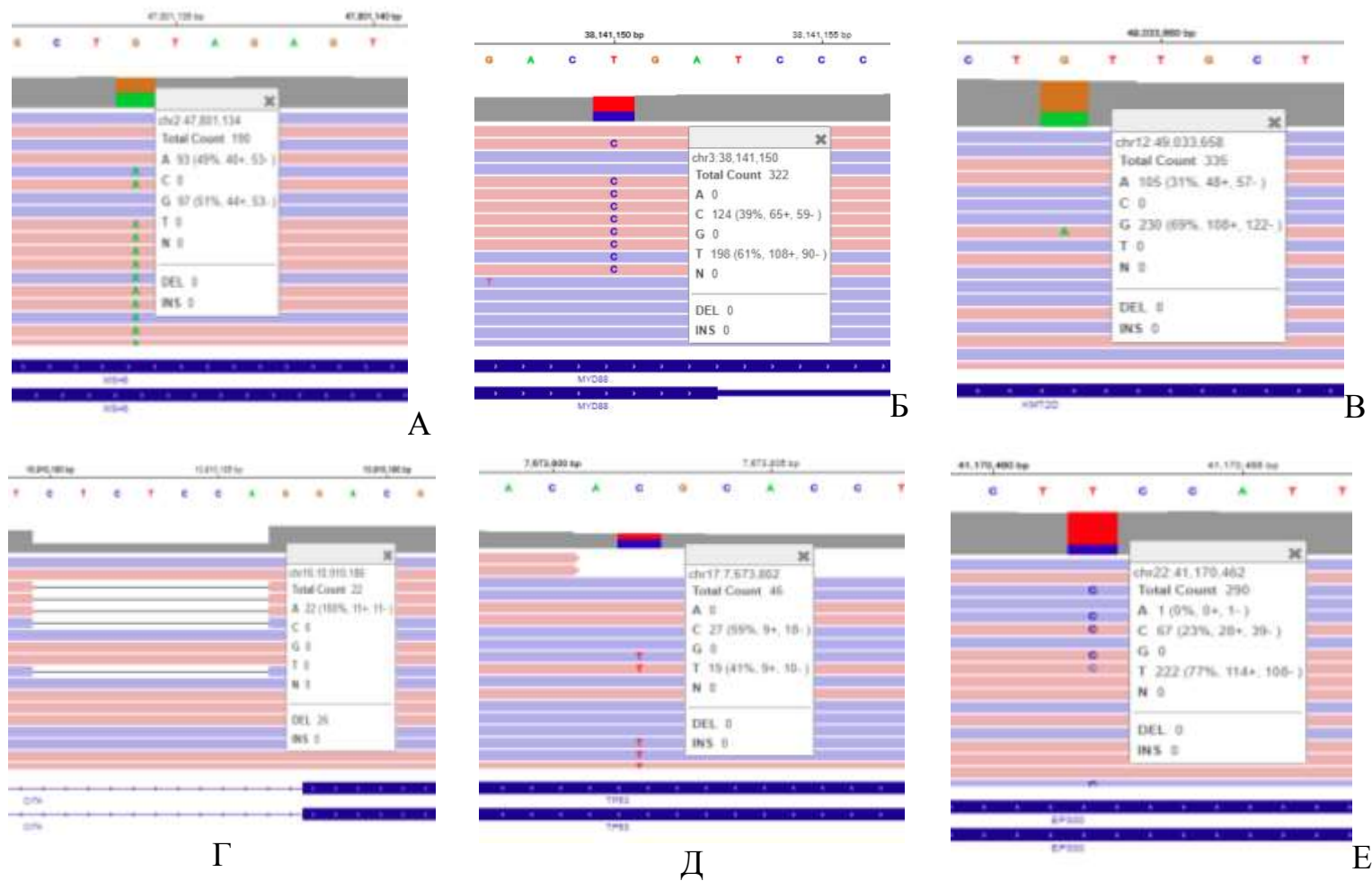


Рисунок 15 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 5: А – *MSH6* p.V921I; Б – *MYD88* p.L265R; В – *KMT2D* p.Q3683X; Г – *CIITA* p.P809fs; Д – *TP53* p.R141H; Е – *EP300* p.F1448S

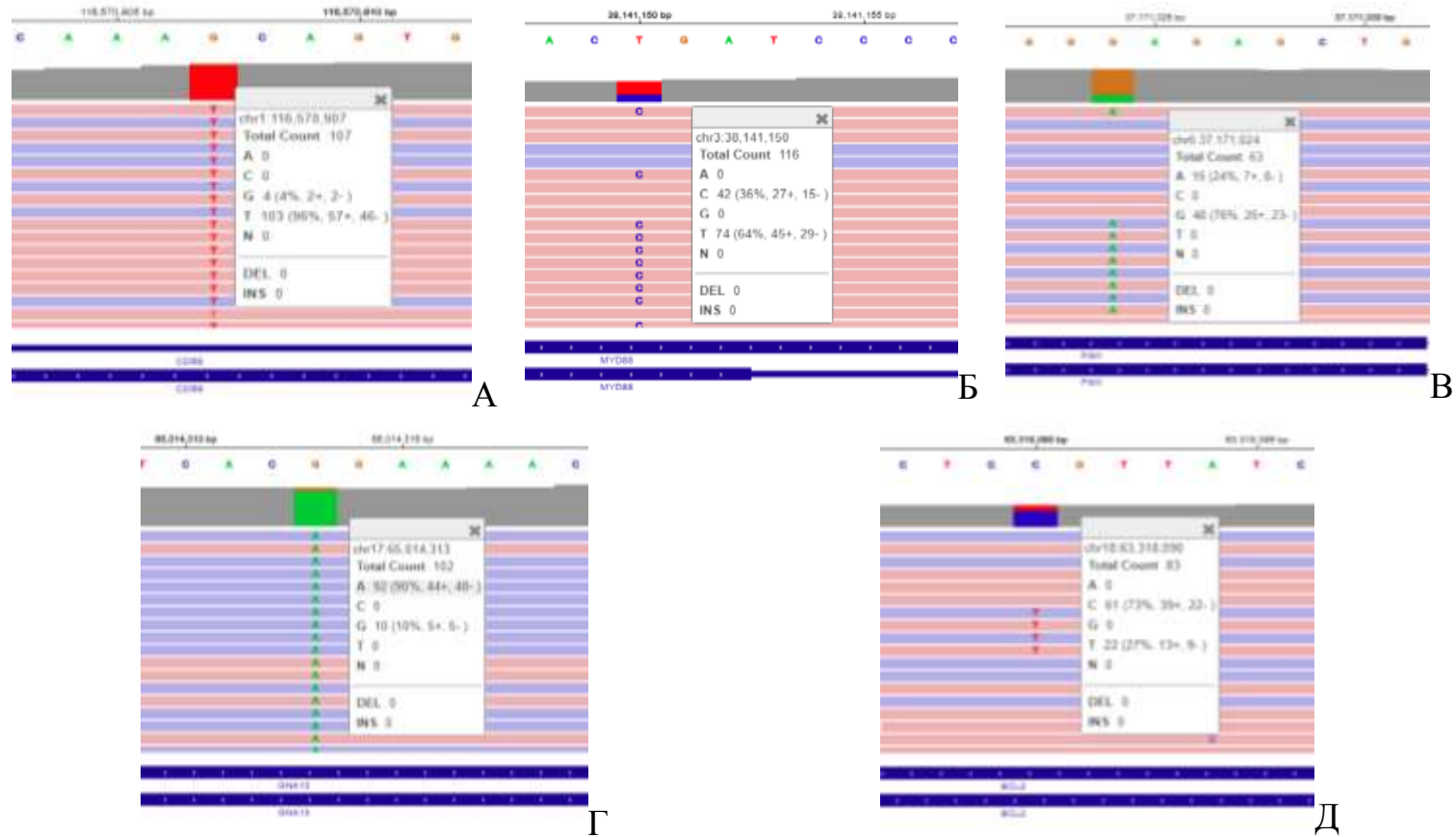


Рисунок 16 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 6: А – *CD58* p.C22X; Б – *MYD88* p.L265R; В – *PIM1* p.G78E; Г – *GNA13* p.R360C; Д – *BCL2* p.G193R

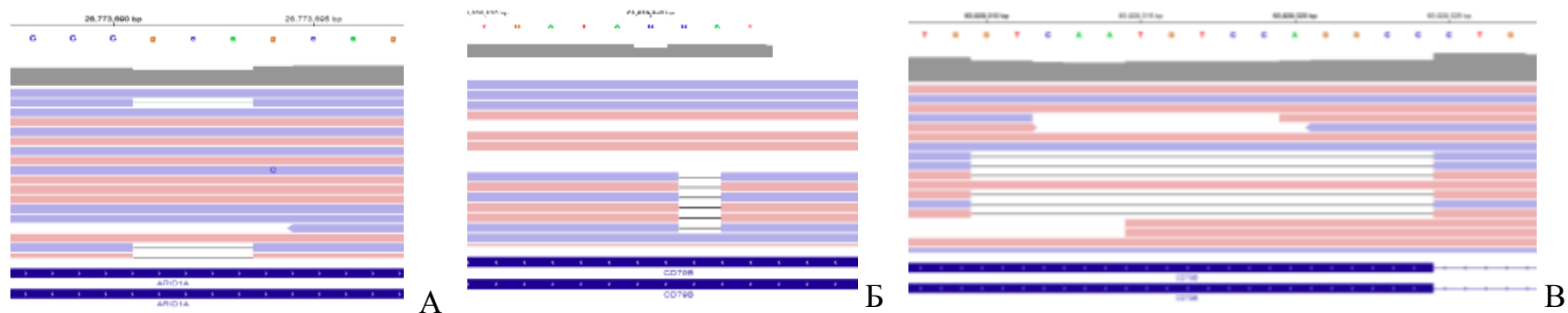


Рисунок 17 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 7: А – *ARID1A* p.Q1334del; Б – *CD79B* p.G198_D202del; В – *CD79B* p.G160VfsX4

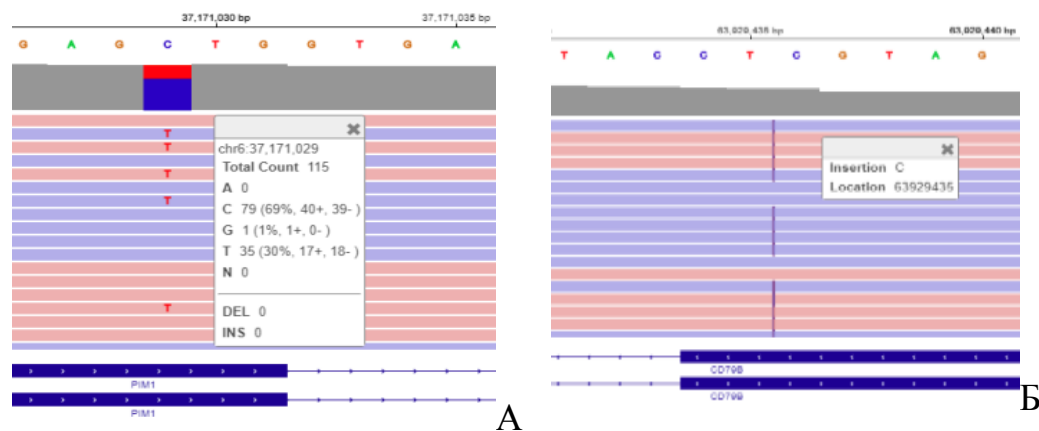


Рисунок 18 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 8: А – *PIM1* p.L80L; Б – *CD79B* p.E197GfsX6

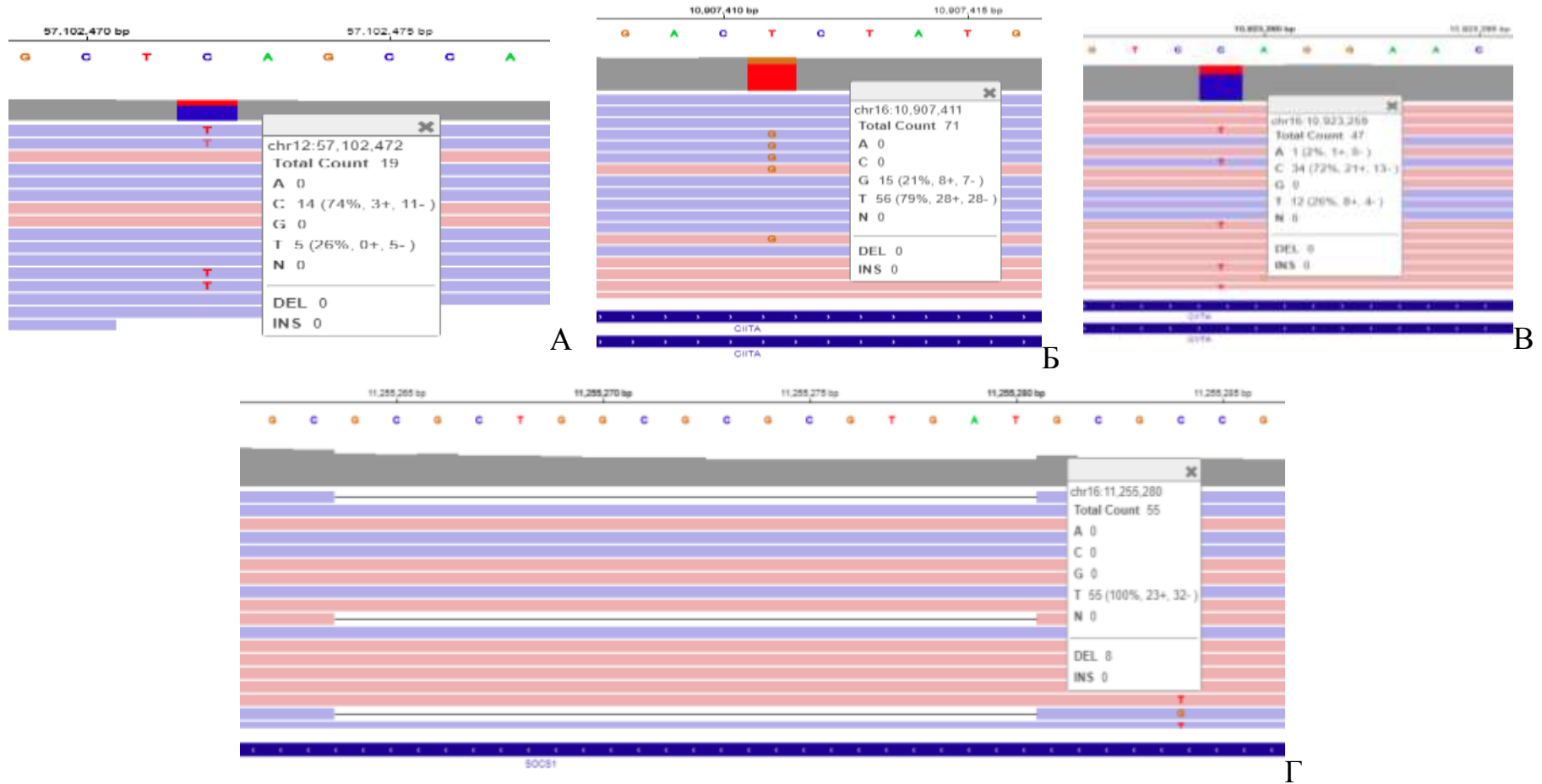


Рисунок 19 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 9: А – *STAT6* p.E444K, Б – *CIITA* p.L641R, В – *CIITA* p.Q1118X, Г – *SOCS1* p.R66-A70del

Таблица 22 – Данные секвенирования образцов опухоли пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, у которых в рецидиве заболевания развилось поражение центральной нервной системы

Ген	Положение мутации (GRCh38)	Генотип	Экзон	Положение		Идентификатор		Частота мутации*	Референсная последовательность	Глуб. чтен. W/M
				в ДНК	в белке	dbSNP	COSMIC			
Образец 1										
<i>MSH2</i>	chr2:47412552 G > A	G/A	4	c.G784A	p.E262K	—	—	н/д	ENST00000233146.6	17х 9 / 8
<i>MYD88</i>	chr3:38141150 T > C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs3879072 72	COSV571 69334	0,0001	ENST00000495303.6	63х 15 / 48
<i>PIM1</i>	chr6:37171466 G > T	G/T	4	c.G582T	p.K194N	—	—	н/д	ENST00000373509.5	44х 29 / 15
	chr6:37171468- 37171476 delACACCGTCT	ACACCG TCT/—	4	c.584_59 2del	p.195_198del	—	—	—		44х 29 / 15
<i>CARD11</i>	chr7:2939925 C > T	C/T	6	c.G688A	p.D230N	—	COSV677 96694	н/д	ENST00000396946.8	41х 11 / 30
<i>NOTCH1</i>	chr9: 136505728 G > T	G/T	25	c.C4168A	p.P1390T	rs1916456 00	COSV531 03214	0,0006	ENST00000277541.7	24х 18 / 6
<i>TP53</i>	chr17:7674220 C > T	C/T	3	c.G347A	p.R116Q	rs1154065 2	COSV526 61580	0,0002	ENST00000504290.5	25х 4 / 21
<i>CD79B</i>	chr17:63929320 A > G	A/G	5	c.T284C	p.L95P	—	COSV500 75918	н/д	ENST00000349817.2	47х 18 / 29

Продолжение таблицы 22

Ген	Положение мутации (GRCh38)	Генотип	Экзон	Положение		Идентификатор		Частота мутации*	Референсная последовательность	Глуб. чтен. W/M
				в ДНК	в белке	dbSNP	COSMIC			
Образец 1										
SMARCA4	chr19:11007900-11007902 delAGG	AGG/-	6	c.559_559del	p.E187fs	rs759896283	—	0,00001	ENST00000643208.1	42x 36 / 6
Образец 2										
TP53	chr17:7674253 A > G	A/G	3	c.T314C	p.M105T	—	COSV53037559	н/д	ENST00000504290.5	77x 54 / 23
Образец 3										
MSH2	chr:47463067 G > C	G/C	9	c.G1423C	p.D475H	—	—	н/д	ENST00000233146	16x 8 / 8
MYD88	chr3:38140534 G > T	G/T	3	c.G610T	p.V204F	rs776995408	—	0,000007	ENST00000495303.6	307x 182 / 124
PIM1	chr6:37171287 G > C	G/C	4	c.G403C	p.E135Q	—	—	н/д	ENST00000373509.6	500x 260 / 240
CD79B	chr17:63929439 T > A	T/A	5	c.T586A	p.Y196N	—	—	н/д	ENST00000006750.7	214x 39 / 175
ARID1A	chr17:26772908 delG	G/-	14	c.3636del	p.Q1212HfsX4	—	—	н/д	ENST00000324856.13	10x 8 / 2

Продолжение таблицы 22

Ген	Положение мутации (GRCh38)	Генотип	Экзон	Положение		Идентификатор		Частота мутации*	Референсная последовательность	Глуб. чтен. W/M
				в ДНК	в белке	dbSNP	COSMIC			
Образец 4										
KMT2D	chr12:49040935 C > T	C/T	31	c.G6835A	p.G2279R	—	—	н/д	ENST00000301067.11	166x 114 / 52
Образец 5										
MSH6	chr2:47801134 G > A	G/A	2	c.G2761A	p.V921I	rs5762693 42	COSV522 73761	0,0009	ENST00000540021.5	190x 97 / 93
MYD88	chr3:38141150 T > C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs3879072 72	COSV571 69334	0,00001	ENST00000495303.6	322x 198 / 124
KMT2D	chr12:49033658 G > A	G/A	39	c.C1104 7T	p.Q3683X	—	COSV564 19976	—	ENST00000301067.11	335x 230 / 105
CIITA	chr16:10910180- 10910186 delCTCTCCA	CTCTCC A/-	11	g. 10910180- 10910186	p.R809fs	—	—	—	ENST00000324288.13	48x 22 / 26
TP53	chr17:7673802 C > T	C/T	4	c.G422A	p.R141H	rs28934576	COSV526 60980	0,00003	ENST00000504290.5	46x 27 / 19
EP300	chr22:41170462 T > C	T/C	27	c.T4343C	p.F1448S	—	COSV543 31536	—	ENST00000263253.8	290x 222 / 67

Продолжение таблицы 22

Ген	Положение мутации (GRCh38)	Генотип	Экзон	Положение		Идентификатор		Частота мутации*	Референсная последовательность	Глуб. чтен. W/M
				в ДНК	в белке	dbSNP	COSMIC			
Образец 6										
CD58	chr1:116570907 G > T	G/T	1	c.C66A	p.C22X	—	—	н/д	ENST00000369487.3	107x 4 / 103
MYD88	chr3:38141150 T > C	T/C	3	c.T794C	p.L265P	rs3879072 72	COSV571 69334	0,00001	ENST00000495303.6	116x 74 / 42
PIM1	chr6:37171024 G > A	G/A	3	c.G233A	p.G78E	—	COSV651 65083	н/д	ENST00000373509.5	63x 48 / 15
BCL2	chr18:63318090 C > T	C/T	1	c.G577A	p.G193R	—	—	н/д	ENST00000398117.1	83x 61 / 22
Образец 7										
ARID1A	chr1:26773690- 26773693 delGCA	GCA/—	16	c.3999- 4001del	p.Q1334del	—	COSV955 90316	0,00005	ESNT00000324856.13	39x 29 / 10
CD79B	chr17:63929309- 63929324 delGTCAATGTCCAG GCC	GTCAAT GTCCAG GCC/-	6	c.592- 606del	p.G198_D20 2del	—	—	н/д	ESNT00000349817.2	28x 22 / 6
CD79B	chr17:63929839- 63929840 delC	C/—	4	c.479del	p.G160VfsX4	—	—	н/д	ESNT00000349817.2	14x 8 / 6

Продолжение таблицы 22

Ген	Положение мутации (GRCh38)	Генотип	Экзон	Положение		Идентификатор		Частота мутации*	Референсная последовательность	Глуб. чтен. W/M
				в ДНК	в белке	dbSNP	COSMIC			
Образец 8										
PIM1	chr6:37171029 C > T	C/T	3	c. C 238T	p.L80L	rs3768342 20	COSV978 48761	н/д	ENST00000373509.6	115x 79/35
CD79B	chr17:63929435 T > TC	T/TC	5	c.589dup	p.E197GfsX6	—	—	н/д	ESNT00000349817.2	130x 75/65
Образец 9										
STAT6	chr12:57102472 G > A	G/A	13	c.G1330A	p.E444K	—	—	н/д	ENST00000300134.8	19x 14/5
CIITA	chr16:10907411 T > G	T/G	11	c.T1919G	p.L641R	—	—	н/д	ENST00000324288.13	71x 56/15
CIITA	chr16:10923259 C > T	C/T	19	c.C3349T	p.Q1118X	—	—	н/д	ENST00000324288.13	47x 34/12
SOCS1	chr16:11255269- 11255284 delGCGCGCGTGATG CGC	GCGCGC GTGATG CGC/-	1	c.195_20 9del	p.R66_A70del	—	—	н/д	ENST00000644787.1	63x 55/8
Примечание: * – данные Exome Aggregation Consortium database.										

На рисунках 20 и 21 приведены результаты подтверждения выявленных находок с долей минорного аллеля в образце более 30 % методами секвенирования по Сенгеру и ПЦР с фланкирующими праймерами [16].

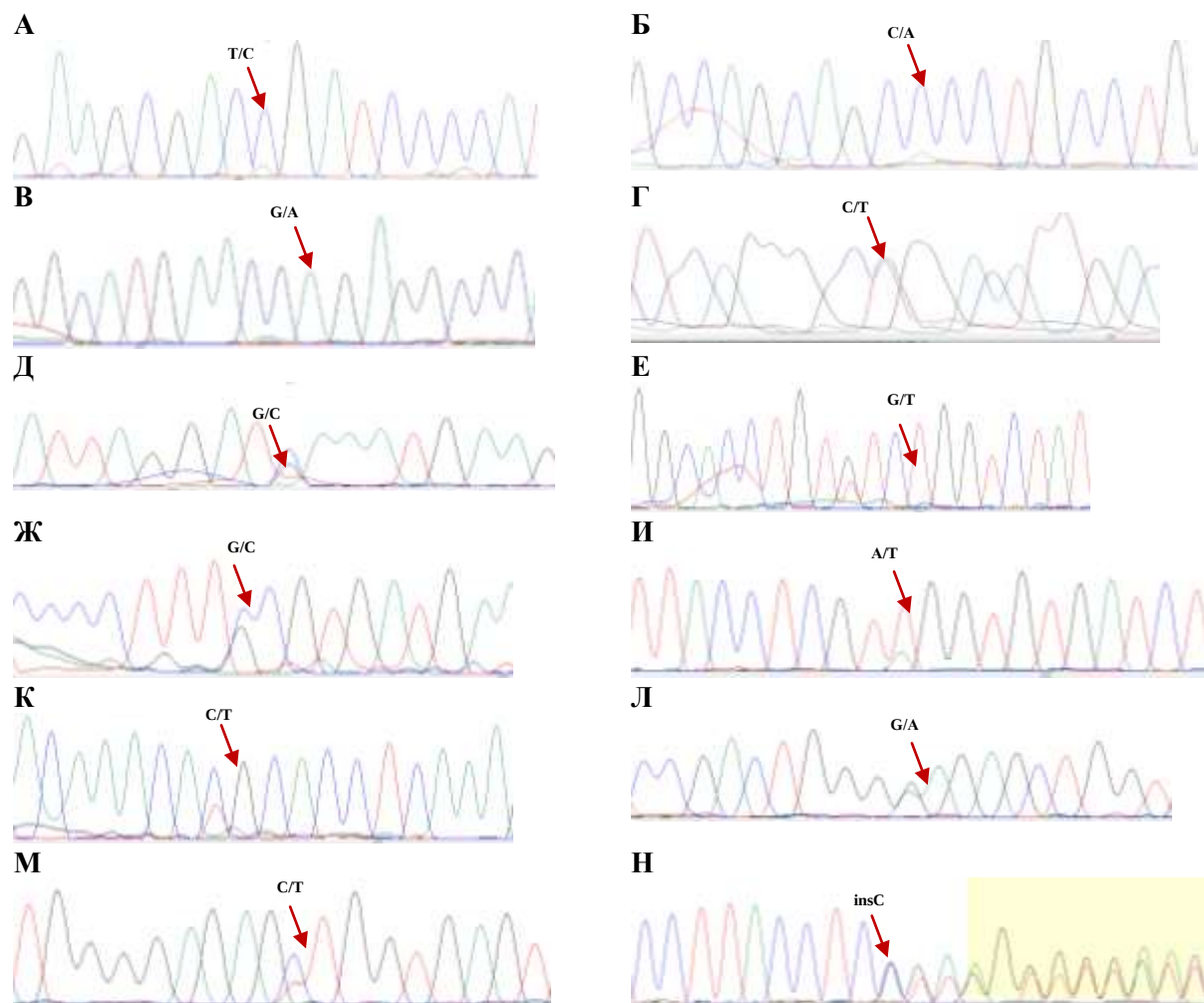


Рисунок 20 – Секвенограммы вариантов нуклеотидных последовательностей:

А – *MYD88* p.L265R; Б – *NOTCH1* p.P1390T; В – *TP53* p.R116Q; Г – *CD79B* p.L95P; Д – *MSH2* p.D475H; Е – *MYD88* p.V204F; Ж – *PIM1* p.E135Q; И – *CD79B* p.Y196N; К – *TP53* p.R141H; Л – *PIM1* p.G78E; М – *PIM1* p.L80L; Н – *CD79B* p.E197GfsX6

В целом миссенс замены составили 22 / 35 (62,8 %), небольшие делеции – 8 / 35 (23 %), замены с образованием «стоп-кодона» – 3 / 35 (8,6 %) и по 1 / 35 (2,8 %) – инсерция нуклеотида и синонимичная замена нуклеотида в сайте сплайсинга. При этом только 3 / 8 делеций приводили к утрате кодонов в

рамке считывания, в остальных случаях, они приводили к сдвигу рамки считывания и преждевременной термации синтеза кодируемого белка [16].

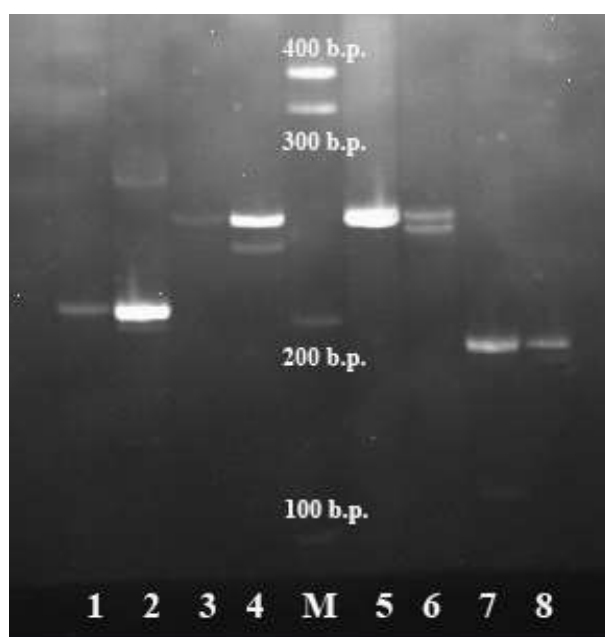


Рисунок 21 – Результаты ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 12 % полиакриламидном геле: 1 – контрольный ампликон длиной 202 п. н.; 2 – *ARID1A* p.Q1334del (202 + 199) п. н.; 3 – контрольный ампликон длиной 270 п. н.; 4 – *CD79B* p.G198_D202del (270 + 255) п. н.; M – маркер молекулярной массы 100 п. н.; 5 – контрольный ампликон длиной 270 п. н.; 6 – *PIM1* p.195_198del (270 + 261) п. н.; 7 – контрольный ампликон длиной 182 п. н.; 8 – *SMARCA4* p.E187fs (182 + 179) п. н.)

Можно выделить четыре группы основных генетических событий в группе исследованных образцов, к которым относятся ВНП в генах NF- κ B сигнального пути – 6 / 9 образцов (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*), нарушения в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *EP300*, *SMARCA4*) – 5 / 9 образцов, ВНП в гене JAK-STAT сигнального пути *PIM1* – 4 / 9 образцов, а также ВНП в главном онкосупрессорном гене *TP53* – 3 / 9 образцов, что в целом подтверждает данные анализа CBioPortal for Cancer Genomics database [16].

3.8 Анализ функциональной значимости выявленных в группе исследований вариантов нуклеотидных последовательностей

В таблице 24 представлен результат анализа функциональной значимости выявленных миссенс замен по данным предикторных программ SIFT, PolyPhen2, LRT, MutationAssessor и PROVEAN. Все они, за исключением *MYD88* p.V204F, были отнесены большинством биоинформационных предикторных программ к патогенным заменам [16].

Распределение выявленных в группе исследования мутаций по функциональным доменам генов представлено на рисунках 22 и 23.

Важно отметить, что нарушения в генах NF- κ B и JAK-STAT сигнальных путей носили сочетанный характер, а наибольшее их число было выявлено в образцах с ВНП в генах *MSH2* и *MSH6* (см. таблицу 22), которые входят в систему мисс-матч репарации и играют критически важную роль в процессах исправления инсерций, делеций и включений ошибочных нуклеотидов в последовательность ДНК в процессе репликации [195].

В 3 / 4 случаев выявления в группе исследования нарушений в гене *MYD88* была зафиксирована рекуррентная замена с.794T > C, p.L265P. Учитывая полученные данные, был разработан способ выявления *MYD88* p.L265P, который может быть выполнен для быстрого скрининга мутации на стандартном оборудовании в широкой клинической практике. Получен патент РФ на изобретение 2756909 С1 от 06.10.2021 и Евразийский патент на изобретение № 043879 от 30.06.2023.

Находкой данного исследования является то, что в 5 / 9 случаев имели место ВНП в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина *ARID1A*, *KMT2D*, *EP300* и *SMARCA4*.

Таблица 23 – Функциональный анализ выявленных вариантов нуклеотидных последовательностей с помощью предикторных программ [220]

Мутация		Функциональный прогноз миссенс замен				
Изменение в белке	Эффект	SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationAssessor	PROVEAN
<i>MYD88</i> p.L265P	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>MYD88</i> p.V204F	замена аминокислоты	не патогенная	не патогенная	не патогенная	не патогенная	не патогенная
<i>MSH2</i> p.E262K	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>MSH2</i> p.D475H	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>PIM1</i> p.E135Q	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>PIM1</i> p.K194N	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>PIM1</i> p.G78E	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>CARD11</i> p.D230N	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>NOTCH1</i> p.P1390T	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>TP53</i> p.R116Q	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>TP53</i> p.M105T	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>TP53</i> p.R141H	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>CD79B</i> p.L95P	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>CD79B</i> p.Y196N	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>KMT2D</i> p.G2279R	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>MSH6</i> p.V921I	замена аминокислоты	не патогенная	не патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>EP300</i> p.F1448S	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>BCL2</i> p.G193R	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная
<i>STAT6</i> p.E444K	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная	патогенная

Продолжение таблицы 23

Мутация		Функциональный прогноз миссенс замен				
Изменение в белке	Эффект	SIFT	PolyPhen2	LRT	MutationAssessor	PROVEAN
<i>CIITA</i> p.L641R	замена аминокислоты	патогенная	патогенная	не патогенная	патогенная	не патогенная
<i>CIITA</i> p.Q1118X	образование «стоп»-кодона	—	—	—	—	—
<i>SOCS1</i> p.R66_A70del	делеция в рамке считывания	—	—	—	—	—
<i>ARID1A</i> p.Q1334del	делеция в рамке считывания	—	—	—	—	—
<i>ARID1A</i> p.Q1212HfsX4	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—
<i>SMARCA4</i> p.E187fs	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—
<i>PIM1</i> p.195_198del	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—
<i>PIM1</i> p.L80L	мутация в сайте сплайсинга	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.G198_D202del	делеция в рамке считывания	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.G160VfsX4	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—
<i>CD79B</i> p.E197GfsX6	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—
<i>KMT2D</i> p.Q3683X	образование «стоп»-кодона	—	—	—	—	—
<i>CD58</i> p.C22X	образование «стоп»-кодона	—	—	—	—	—
<i>CIITA</i> p.R809fs	сдвиг рамки считывания	—	—	—	—	—

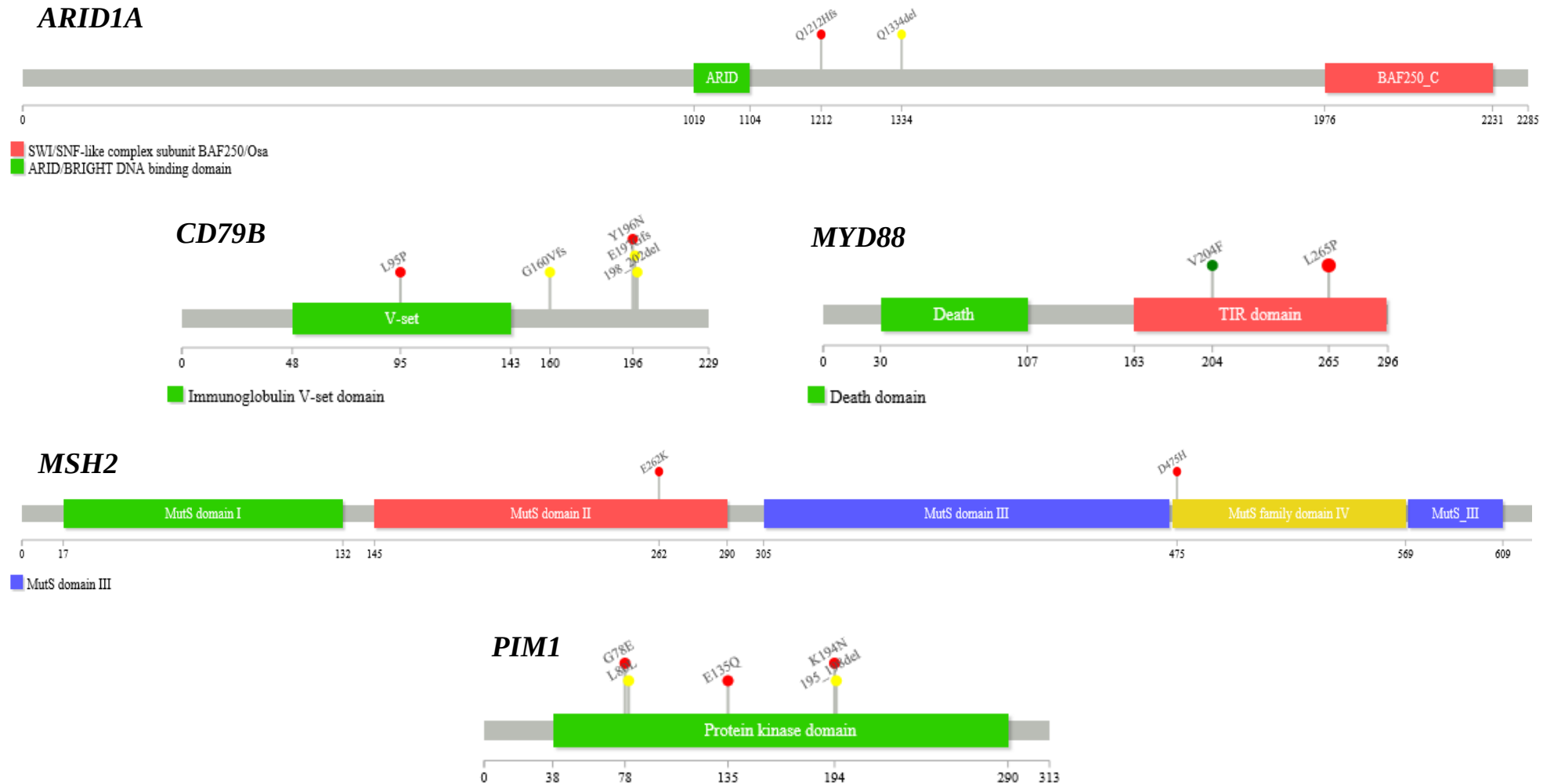


Рисунок 22 – Распределение выявленных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности по функциональным доменам генов *ARID1A*, *CD79B*, *MYD88*, *MSH2* и *PIM1*

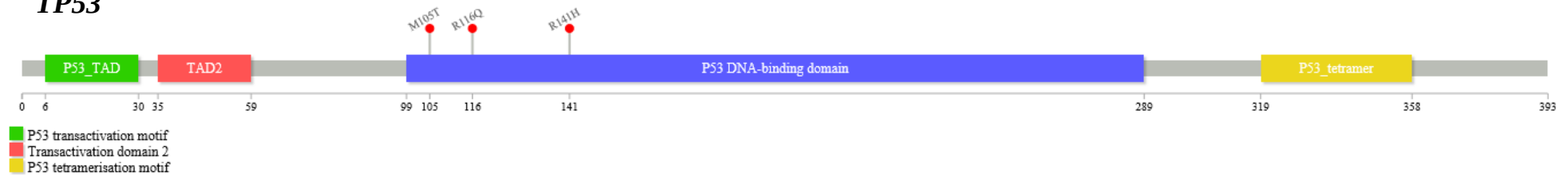
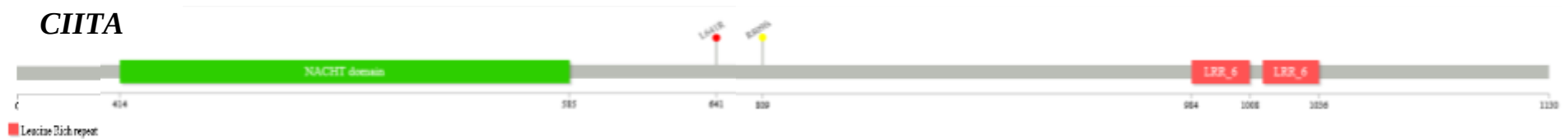
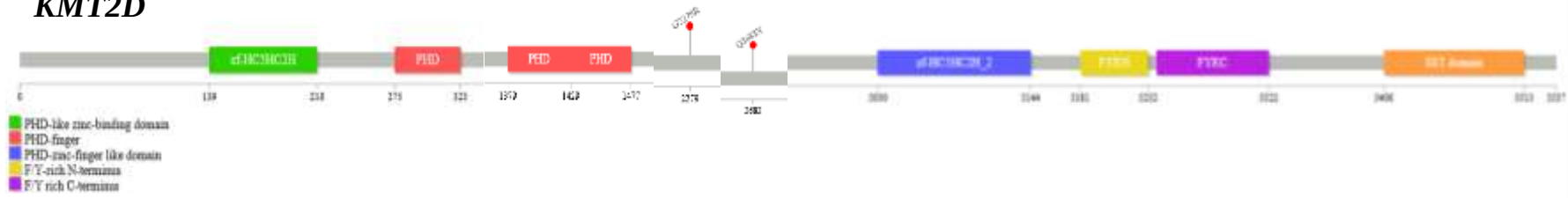
TP53***CIITA******KMT2D***

Рисунок 23 – Распределение выявленных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности по функциональным доменам генов *TP53*, *CIITA* и *KMT2D*

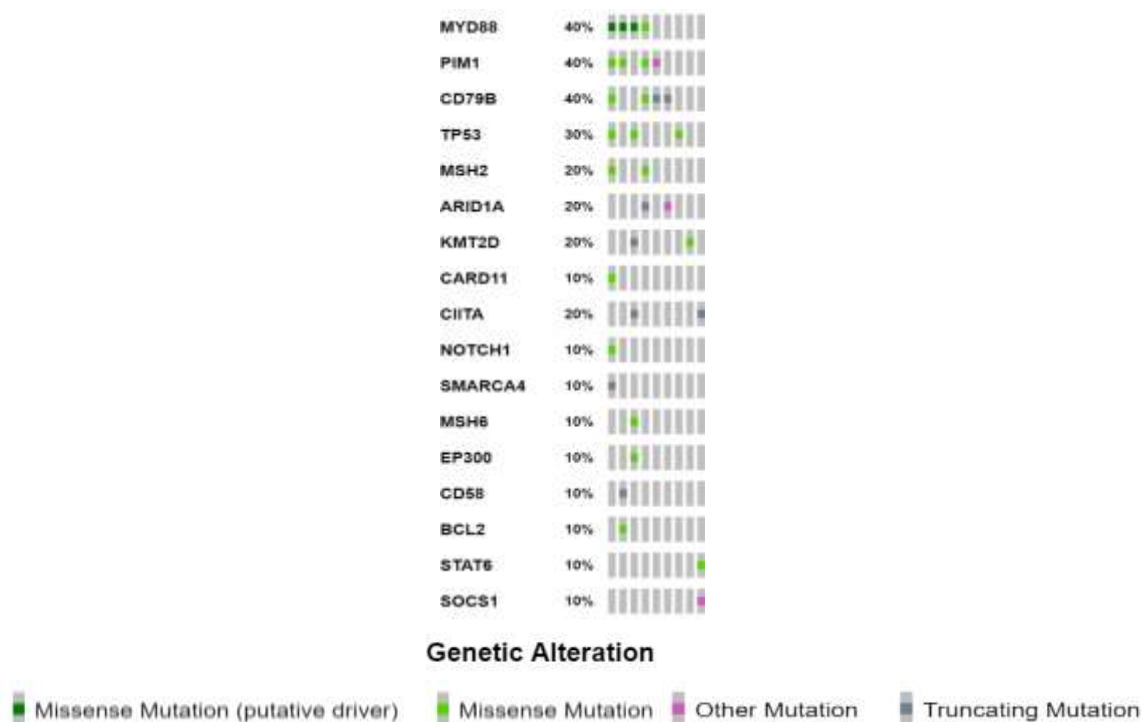


Рисунок 24 – Совместное выявление и взаимное исключение вариантов нуклеотидной последовательности в группе исследования [16]

Так, в 2 образцах выявлены замены в гене *KMT2D* – p.G2279R и p.Q3683X, кодирующем лизин-специфическую метилтрансферазу 2D [217]. В одном из образцов была обнаружена p.F1448S в гене *EP300*, ответственном за синтез фермента гистон-ацетилтрансферазы P300, которая действует как ко-активатор для различных факторов транскрипции и участвует в регуляции генов, контролирующих клеточную пролиферацию, апоптоз, дифференцировку, клеточный цикл и репарацию ДНК [33]. Также в группе исследования были выявлены *SMARCA4* p.E187fs и *ARID1A* p.Q1212HfsX4 и p.Q1334del. Интересно, что все они представляли собой небольшие делеции, две из которых вызывают сдвиг рамки считывания и возникновение преждевременных стоп-кодона, что неминуемо приводит к снижению количественного содержания функционально активного белка [228].

Нарушения в главном онкосупрессорном гене *TP53* были выявлены в трети исследованных случаев: p.R116Q, p.M105T и p.R141H. Все они зафиксированы в базе данных COSMIC при различных злокачественных новообразованиях [16].

При этом p.R116Q и p.R141H упоминаются в базе данных более 1 000 раз и 450 раз, в том числе при 94 и 47 случаях лимфоидных опухолей, соответственно.

В 2019 году группа ведущих российских специалистов в области генетики и биоинформатики представила «Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS)» [20], предназначенное для анализа герминальных вариантов нуклеотидной последовательности, которые разделяются на пять подклассов: патогенные (pathogenic), вероятно патогенные (likely pathogenic), неопределенного значения (uncertain significance), вероятно доброкачественные (likely benign) и доброкачественные (benign). Представленный в руководстве подход делает возможным оценку связи мутаций с развитием наследственного заболевания и мало применим для анализа соматических мутаций, выявленных в опухоли.

В течение последних нескольких лет ряд зарубежных профессиональных обществ опубликовали рекомендации по клинической интерпретации соматических вариантов, в которых особое внимание уделяется их диагностическому, прогностическому и терапевтическому значению. Ни одни из них не содержит прямого, систематического и комплексного набора стандартов и правил для классификации онкогенности соматического варианта нуклеотидной последовательности, выявленного в опухолевой ткани, что создает вариативность в интерпретации данных секвенирования.

В данной работе (Таблица 24) были использованы «Стандарты для классификации патогенности (онкогенности) соматических вариантов опухоли: совместные рекомендации Clinical Genome Resource, Cancer Genomics Consortium и Variant Interpretation for Cancer Consortium» [207] и отечественное «Руководство по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования» [20].

Таблица 24 – Категоризация обнаруженных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности согласно рекомендациям

Мутация	Онкогенность (баллов)	Терапевтическая значимость (в отношении вида терапии)
<i>MYD88</i> p.L265P	Онкогенный (13)	Класс I, уровень A (ингибиторов БТК)
<i>MYD88</i> p.V204F	ВНЗ (0)	Класс III
<i>MSH2</i> p.E262K	ВНЗ (4)	Класс II, уровень E (ингибиторов КТИ)
<i>MSH2</i> p.D475H	ВНЗ (4)	Класс II, уровень E (ингибиторов КТИ)
<i>PIM1</i> p.E135Q	Вероятно-онкогенный (8)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>PIM1</i> p.K194N	Вероятно-онкогенный (8)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>PIM1</i> p.G78E	Вероятно-онкогенный (8)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>PIM1</i> p.195_198del	Вероятно-онкогенный (8)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>PIM1</i> p.L80L	ВНЗ (2)	Класс III
<i>CARD11</i> p.D230N	Онкогенный (10)	Класс II, уровень E (ингибиторов БТК)
<i>NOTCH1</i> p.P1390T	Вероятно-онкогенный (8)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>TP53</i> p.R116Q	Вероятно-онкогенный (7)	Класс I, уровень A (химиоиммунотерапии)
<i>TP53</i> p.M105T	Онкогенный (10)	Класс I, уровень A (химиоиммунотерапии)
<i>TP53</i> p.R141H	Онкогенный (10)	Класс I, уровень A (химиоиммунотерапии)
<i>CD79B</i> p.L95P	ВНЗ (5)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>CD79B</i> p.Y196N	ВНЗ (5)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>CD79B</i> p.G198_D202del	Вероятно-онкогенный (6)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>CD79B</i> p.G160VfsX4	ВНЗ (5)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)
<i>CD79B</i> p.E197GfsX6	Вероятно-онкогенный (6)	Класс II, уровень D (ингибиторов БТК)

Продолжение таблицы 24

Мутация	Онкогенность (баллов)	Терапевтическая значимость (в отношении вида терапии)
<i>KMT2D</i> p.G2279R	ВНЗ (2)	Класс III
<i>KMT2D</i> p.Q3683X	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>MSH6</i> p.V921I	ВНЗ (2)	Класс II, уровень Е (ингибиторов КТИ)
<i>EP300</i> p.F1448S	ВНЗ (3)	Класс III
<i>BCL2</i> p.G193R	ВНЗ (2)	Класс III
<i>STAT6</i> p.E444K	ВНЗ (2)	Класс III
<i>CIITA</i> p.L641R	ВНЗ (2)	Класс III
<i>CIITA</i> p.Q1118X	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>CIITA</i> p.R809fs	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>CD58</i> p.C22X	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>SOCS1</i> p.R66_A70del	ВНЗ (2)	Класс III
<i>ARID1A</i> p.Q1334del	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>ARID1A</i> p.Q1212HfsX4	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III
<i>SMARCA4</i> p.E187fs	Вероятно-онкогенный (9)	Класс III

При оценке онкогенности варианта нуклеотидной последовательности учитываются тип мутации (нонсенс/миссенс/сайлент и т. д.), принадлежность ее к «горячим точкам» мутаций в гене, данные по частоте регистрации в специализированных базах данных, а также популяционной частоте минорного аллеля, результаты функционального анализа по данным экспериментов и предикторных программ. Каждый из критериев имеет свой балльный положительный или отрицательный «вес», сумма баллов позволяет отнести мутацию в одну из подгрупп: доброкачественная (от минус 7 баллов и ниже), вероятно-доброкачественная (от минус 6 до минус 1 балла), вариант неизвестного значения (0–5 баллов), вероятно-патогенная (6–9 баллов) и патогенная (10 и более баллов).

Согласно данной классификации, ВНП, выявленные в группе исследования, могут быть разделены на онкогенные (*MYD88* p.L265P, *CARD11* p.D230N, *TP53* p.M105T и *TP53* p.R141H), вероятно-онкогенные (*PIM1* p.E135Q, *PIM1* p.K194N, *PIM1* p.G78E, *PIM1* p.195_198del, *NOTCH1* p.P1390T, *TP53* p.R116Q, *CD79B* p.G198_D202del, *CD79B* p.E197GfsX6, *KMT2D* p.Q3683X, *CIITA* p.Q1118X, *CIITA* p.R809fs, *CD58* p.C22X, *ARID1A* p.Q1334del, *ARID1A* p.Q1212HfsX4, *SMARCA4* p.E187fs) и варианты неизвестного значения (все оставшиеся).

В отличие от представленной выше интерпретации, которая направлена на выявление онкогенности мутации (причинной связи с развитием заболевания), целью интерпретации вариантов нуклеотидной последовательности, предложенной в «Руководстве по интерпретации клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования» является в первую очередь определение их терапевтического значения (определение чувствительности/резистентности к определенному виду терапии) [8].

Согласно данному руководству, предлагается условное разделение находок секвенирования на классы. Классы I и II включают биомаркеры различных уровней, важные для принятия терапевтической стратегии. К классу I относятся

варианты нуклеотидной последовательности с сильной клинической значимостью и доказательной базой. Класс II включает варианты с потенциальной клинической значимостью, а также варианты, связанные с таргетной терапией, находящейся на стадии доклинических испытаний.

В класс III входят нуклеотидные варианты с неизвестным клиническим значением. Такие варианты должны иметь низкие частоты в популяции (согласно базам данных 1 000 Genomes Project database, Exome Variant Server, or Exome Aggregation Consortium database), и патогенные характеристики, согласно предсказаниям *in silico*.

Класс IV включает в себя редкие полиморфизмы с частотой аллеля в клетках, равной 50 % или 100 % и наблюдаемые с существенной частотой в общей популяции или у определенных этнических групп. Они не представляют собой клинической значимости для терапии злокачественных новообразований.

При этом к вариантам класса I с терапевтической значимостью уровня A (играют существенную роль в терапии, сильную клиническую значимость и доказательную базу) можно отнести выявленные *MYD88* p.L265P, *TP53* p.R116Q, *TP53* p.M105T, *TP53* p.R141H.

К классу II, вариантам с терапевтической и прогностической значимостью значимостью уровня D (терапевтической и прогностической значимостью, выявленными на основании множества небольших исследований, служащие критерием включения в клинические исследования) могут быть отнесены ВНП *CD79B* и *PIM1* (за исключением *PIM1* p.L80L), а также уровня E (обладают вероятной терапевтической значимостью, выявленной в доклинических исследованиях для терапии данного типа опухоли) – ВНП в генах *MSH2* и *MSH6*.

Оставшиеся ВНП можно отнести к классу III.

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение эффективности терапии ДВККЛ с момента появления ритуксимаба привело к улучшению исходов системных вариантов лимфом, но не решило проблемы профилактики вовлечения ЦНС в рецидиве заболевания или лечения уже возникшего поражения опухолью центральной нервной системы в силу малой проницаемости препарата через гематоэнцефалический барьер [19].

Согласно литературе выделяют четыре возможных варианта поражения ЦНС при ДВККЛ: первичная лимфома ЦНС (самостоятельная нозологическая форма), системный вариант лимфомы в виде вовлечения ЦНС в дебюте заболевания у больных с исходно распространенным опухолевым процессом, а также поражение ЦНС одновременно с системным рецидивом или при изолированном рецидиве лимфомы в ЦНС [116].

Вовлечение центральной нервной системы при ДВККЛ одновременно с относительно низкой частотой сопряжено с крайне высокой смертностью. При этом именно рецидивы системной ДВККЛ в ЦНС остаются одной из сложнейших клинических проблем: на одной чаше весов – выраженная клиническая тяжесть больных и высокий уровень летальности пациентов, а на другой – отсутствие достаточно эффективных инструментов для выделения групп больных высокого риска рецидива и схем профилактического лечения [19].

Наилучшим инструментом для прогнозирования их возникновения в настоящее время является ЦНС-МПИ, который может определить группу повышенного риска с частотой рецидива от 10 % до 12 %. При использовании данной прогностической модели можно рассчитывать на предотвращение большого числа рецидивов ДВККЛ в ЦНС. В то же время примерно у 80–90 % пациентов, отнесенных к группе высокого риска, которым должна быть назначена профилактика, рецидивов не будет, что приводит к необоснованно более токсичному лечению этих больных. Кроме того, по данным ряда авторов, половина рецидивов ДВККЛ в ЦНС происходит среди пациентов со средним и даже низким риском по ЦНС-МПИ [97]. Поэтому так важно вести поиск более

эффективных подходов прогнозирования вовлечения ЦНС при лимфоме, а также учитывать дополнительные факторы риска, чтобы избежать чрезмерного или недостаточного лечения пациентов [97; 113; 126].

Практика интратекального введения ритуксимаба с целью профилактики ДВККЛ в ЦНС, несмотря на возлагаемые на нее надежды, не получила распространения, т. к. интратекальный путь введения препарата не зарегистрирован в Российской Федерации.

В случае поражения ЦНС при злокачественных неходжкинских лимфомах глубокого изучения также требуют целый ряд других вопросов. В частности, крайне ограничены данные об эпидемиологии и клинико-демографической характеристике ДВККЛ с первичным и вторичным поражением ЦНС в нашей стране и ее регионах. Мало сведений о факторах риска возникновения вторичного поражения ЦНС при ДВККЛ.

В настоящее время ведется поиск молекулярно-генетических маркеров опухолевых клеток, которые могут насторожить клинициста в отношении высокого риска вторичного вовлечения в опухолевый процесс ЦНС уже на этапе первичной диагностики лимфомы.

Требуется разработка подходов таргетной терапии поражения ЦНС при лимфомах, которые могут быть эффективны при профилактике и терапии данного типа прогрессирования опухоли [232].

Проведенная работа является первым системным отечественным исследованием частоты и клинико-лабораторной характеристики пациентов с ДВККЛ, имеющих вовлечение в опухолевый процесс ЦНС. В группу исследования были включены 82 пациента: 47 человек с ПЛЦНС (гистологический вариант ДВККЛ) и 35 больных с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС при системной ДВККЛ. В качестве группы сравнения были взяты 202 пациента с системной ДВККЛ без вовлечения ЦНС [18].

Согласно данным литературы, клиническая картина при всех вариантах поражения ЦНС при ДВККЛ была схожей и представлена общемозговой и очаговой симптоматикой, которые во многом определяются локализацией и

объемом опухоли. Хронология последовательного появления неврологической симптоматики отражает характер и особенности опухолевого роста. Первичные, локальные очаговые симптомы – это ранние клинические проявления, обусловленные компрессией участков головного мозга, прилежащих к новообразованию. Вторичные очаговые симптомы возникают «на отдалении» вследствие распространения отека, ишемии мозговой ткани или дальнейшего роста опухоли [1].

Иногда начальными проявлениями опухолевого роста могут выступать симптомы раздражения (гиперфункции) сдавливаемого участка мозговой ткани, которые в дальнейшем будут замещаться симптомами выпадения, характерными для ишемических процессов в тканях. Общемозговая симптоматика в большинстве случаев связана с повышением внутричерепного давления и развитием отека головного мозга. На поздних стадиях опухолевого процесса может происходить дислокация мозговых структур с дальнейшим вклиниванием ствола мозга [1].

Было показано, что проявления заболевания при вторичном вовлечении ЦНС при ДВККЛ и ПЛЦНС имели свои особенности, которые суммированы ниже.

При ПЛЦНС не было выявлено случаев поражения спинного мозга ($p = 0,008$) или ЧМН ($p = 0,018$), а вовлечение оболочек мозга имели лишь единичные больные ($p < 0,001$) и всегда в сочетании с поражением ткани мозга, среди которых преобладали солитарные очаги ($p = 0,020$). Полученные данные о преобладании среди ПЛЦНС солитарных интратумор вариантов поражения согласуются с данными литературы [23].

При этом в анализируемой выборке пациентов при ПЛЦНС была обнаружена преимущественно лобно-теменная локализация опухолевых очагов (93,6 %, $p < 0,001$). Также получены сведения о большей частоте в данной подгруппе в сравнении с вторичным поражением ЦНС при ДВККЛ, поражения таламуса (в 5,7 раза чаще, $p = 0,043$), что может быть связано с более интенсивным кровоснабжением данных областей [2; 23].

У больных же с вторичным вовлечением ЦНС поражение спинного мозга имели 14,3 %, а ЧМН – 11,4 % пациентов, солитарные и множественные очаги опухоли в ткани мозга встречались с одинаковой частотой (31,4 % и 34,3 % соответственно), а изолированные лептоменингеальные формы имели около трети больных (34,3 %), что подтверждает данные литературы о частом возникновении многофокусного поражения [201], а также о снижении частоты вовлечения оболочек мозга в случаях вторичного поражения ЦНС при лимфоме с момента включения ритуксимаба в программы терапии системной ДВККЛ [17].

Так, применение ритуксимаба при ДВККЛ привело к патоморфозу заболевания. Лептоменингеальные формы поражения долгие годы являлись доминирующими при вовлечении ЦНС у больных системной ДВККЛ, поскольку оболочки головного мозга, кроме гематогенной диссеминации, могут вовлекаться в опухолевый процесс путем прямого распространения лимфомы с соседних костных очагов или по сосудисто-нервным пучкам [106]. В эпоху же применения ритуксимаба данные формы поражения при ДВККЛ стали выявляться реже, а большинство рецидивов в ЦНС теперь поражают паренхиму головного мозга [225].

Последнее может объясняться тем, что ритуксимаб, по-видимому, способен хорошо санировать попавшие в оболочки мозга опухолевые клетки. Так, в литературе описаны случаи успешного лечения ритуксимабом В-клеточных лимфом, протекающих с изолированным менингеальным поражением [237]. Другими подтверждениями данного предположения могут служить результаты недавних экспериментов, свидетельствующие о том, что в мышинной модели рассеянного склероза моноклональные анти-CD20-антитела приводят практически к полной деплеции В-клеток в менингеальном компартменте ЦНС [123], а также сведения об эффективности применения ритуксимаба в терапии рефрактерного воспаления менингеальных оболочек при ревматологических состояниях [39].

В литературе имеются указания о меньшей частоте компрессии мозга при лимфомах ЦНС в сравнении с не гемопоэтическими опухолями ЦНС [106].

В проанализированной выборке по результатам МРТ-исследования головного мозга при ПЛЦНС данное явление имели около половины больных. Так, в данной подгруппе чаще, чем при вторичном поражении описаны смещение срединных структур ($p = 0,003$) и перифокальный отек вещества головного мозга ($p < 0,001$), а средний объем опухоли при ПЛЦНС в 6,2 раза превосходил таковой при вторичном поражении ($p < 0,009$).

Эти факты, наряду с тенденцией к большей частоте развития при ПЛЦНС в сравнении с вторичным вовлечением ЦНС при ДВККЛ генерализованных судорог ($p = 0,061$), головокружения ($p = 0,089$), эмоционально-волевых ($p = 0,095$) и когнитивных нарушений ($p = 0,063$), а также парезов и параличей конечностей ($p = 0,052$), наряду с нарушениями речи ($p = 0,064$), могут свидетельствовать как о более поздней диагностике опухоли, так и о большей скорости роста опухоли при ПЛЦНС.

Высказанное предположение подкрепляется наблюдением, что если при ПЛЦНС высокую экспрессию маркера клеточной пролиферации Ki67 в более чем 75 % опухолевых клеток, имели две трети пациентов (65,7 %), то при вторичном поражении – менее половины больных (48,0 %, $p < 0,001$).

Выявленная статистически значимо меньшая частота В-симптоматики, анемического синдрома, тромбоцитопении, повышения уровня ЩФ, ЛДГ, а также острофазовых реакций (гиперфибриногенемии, повышения уровня СРБ и СОЭ) при ПЛЦНС в сравнении с системной ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС может быть объяснена забарьерным расположением опухоли.

По причине редкости как ПЛЦНС в популяции (около 5 % от всех опухолей ЦНС и 1–2 % от числа всех лимфом), так и случаев вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ, в настоящее время практически не проведено рандомизированного исследования по лечению данных патологий [17]. Следствием этого является отсутствие общепринятых стандартов лечения.

Были проанализированы данные о лечении и его эффективности у 63 пациентов группы исследования. Была показана низкая частота достижения ремиссии в обеих исследуемых группах: 44,8 % при ПЛЦНС и 35,3 % при наличии

вторичного поражения ЦНС при ДВККЛ. Вместе с тем, в отношении общей выживаемости ПЛЦНС представляет собой, по-видимому, более благоприятную патологию ($p = 0,051$) по сравнению с ДВККЛ с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС, что согласуется с данными литературы [17; 225].

Таким образом, результаты лечения пациентов с вторичным поражением ЦНС в настоящее время остаются крайне неудовлетворительными, зачастую из-за невозможности интенсификации терапии в силу предлеченности, сопутствующей соматической патологии и химиорезистентности. Актуальной остается также проблема поиска новых, менее токсичных и более эффективных курсов лечения ПЛЦНС, особенно для пациентов старших возрастных групп.

Проведение анализа сопутствующей патологии у больных группы исследования позволило увидеть еще одну особенность пациентов с ПЛЦНС. В данной подгруппе в сравнении как с больными системной ДВККЛ, так и с пациентами с вторичным поражением ЦНС в анамнезе чаще имелись указания на другие злокачественные новообразования (в 3,5 раза), диффузно-узловой зоб (в 5,1 раза), гипертоническую болезнь (в 2,2 раза) и хронические заболевания почек (6,8 раза), что сложно объяснить возрастным фактором.

Так, пациенты в возрасте старше 60 лет были наиболее многочисленны в группе больных ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС в сравнении с группами пациентов с системной ДВККЛ ($p < 0,001$) и ПЛЦНС ($p = 0,004$).

Механизм появления патологического клона лимфоцитов в ЦНС при ПЛЦНС до конца не ясен. ЦНС является забарьерной тканью, в норме недоступной для проникновения В-клеток. Существуют две противоположные гипотезы. Согласно первой, опухолевый клон ПЛЦНС возникает вне ЦНС, а лишь потом проникает в структуры мозга. Согласно другой, под воздействием определенных факторов (инфекция, сопутствующий иммунодефицит, генные мутации) «здоровые» В-лимфоциты проникают в структуры ЦНС и уже там происходит их опухолевая трансформация. Допускается также, что патогенез лимфом у больных с иммунодефицитом отличается от такового у иммунокомпетентных лиц [39].

Так или иначе, но для развития ПЛЦНС необходим некий «провоцирующий фактор», временно или долгосрочно дезорганизующий ГЭБ и делающий его проницаемым для В-клеток. Полученные данные позволяют предполагать, что таковыми факторами и могут стать указанные выше предшествующие коморбидные состояния.

Проницаемость ГЭБ повышается при различных патологических процессах (аутоиммунных, инфекционных и паранеопластических) [26]. В первую очередь, это происходит при опухолях [5].

Дезорганизация ГЭБ происходит и на фоне артериальной гипертензии. Одними из наиболее важных факторов в этом процессе являются ремоделирование сосудистой стенки и воспалительные реакции у пациентов с гипертонической болезнью [205].

Показано развитие дисфункции ГЭБ и у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП). Даже на ранней стадии ХБП оксидативный стресс и воспаление приводят к уязвимости эндотелия кровеносных сосудов мозга, что, в свою очередь, ставит под угрозу целостность ГЭБ и облегчает проникновение лейкоцитов и уремических токсинов в ЦНС [24].

Известно также, что гормоны щитовидной железы транспортируются через гематоэнцефалический барьер посредством специальных белков-переносчиков. Они жизненно необходимы для развития и нормальной работы ЦНС [44], а дезорганизацию ГЭБ имеют пациенты с гипотиреозом [133].

Следуя этой логике, при системной ДВККЛ повышение проницаемости ГЭБ должны иметь все пациенты. Однако вторичное вовлечение ЦНС при лимфоме имеет малая часть больных. Чтобы выявить факторы, способствующие данному процессу, было проведено сравнение клинико-лабораторных данных двух групп: пациентов с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС при системной ДВККЛ и больных с системной ДВККЛ без вовлечения ЦНС. Были получены следующие результаты.

В проанализированной выборке [18] была подтверждена прогностическая ценность ЦНС-МПИ. Так, все пациенты с вторичным вовлечением ЦНС при

ДВККЛ относились к группам среднего и высокого риска, согласно данного индекса ($p = 0,007$).

Также в анализируемой группе больных среди клинических характеристик пациентов на момент диагностики заболевания к факторам риска вторичного поражения ЦНС при системной ДВККЛ можно было отнести следующие параметры в порядке убывания значимости: ECOG статус 2 и более (ОШ = 15,6; 95 % ДИ (4,6; 52,7), инфицированность ВИЧ (ОШ = 12,9; 95 % ДИ (2,3; 73,4), возраст старше 60 лет (ОШ = 10,2; 95 % ДИ (3,8; 27,3), хронические заболевания почек в анамнезе (ОШ = 4,7; 95 % ДИ (1,8; 12,5), а также наличие 2 и более экстранодальных очагов лимфомы (ОШ = 4,4; 95 % ДИ (2,1; 9,4), что кажется вполне логичным.

Как известно, поражение ЦНС при ДВККЛ часто развивается у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что связано не только с иммуносупрессией, но также и тем, что инфицирование ВИЧ приводит к нарушению ГЭБ. Вирусные белки, секретируемые инфицированными клетками, также напрямую влияют на число и функцию плотных контактов. ВИЧ-инфицированные макрофаги и микроглия вырабатывают цитокины, хемокины и металлопротеиназы, которые также изменяют морфологию и функцию плотных контактов. А взаимодействия между активированными макрофагами и астроцитами мозга усиливают воспалительный ответ (производство хемокинов), что приводит к дальнейшему увеличению проницаемости ГЭБ [7].

Пожилой возраст, высокий статус по шкале ECOG, которые препятствуют проведению интенсивной полихимиотерапии, а также экстранодальные поражения являются факторами риска при расчете ЦНС-МПИ. Патогенетическая их связь с вовлечением ЦНС при ДВККЛ может объясняться нарушением ГЭБ, которое имеет место при нейродегенеративных заболеваниях, инсульте, диабете, ожирении и других заболеваниях, частота возникновения которых увеличивается с возрастом [47]. Хронические заболевания почек, согласно полученным данным, также могут иметь значение.

Отдельно следует остановиться на том, что в изучаемой когорте больных развитие вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ наблюдалось лишь у пациентов с продвинутыми стадиями заболевания ($p = 0,013$), которые более чем в половине случаев имели два и более экстранодальных очага опухолевого роста ($p < 0,001$). Также в группе пациентов с вторичным поражением ЦНС при ДВККЛ поражение почек и надпочечников имели 8,5 % больных.

К лабораторным факторам риска вторичного вовлечения ЦНС при ДВККЛ в анализируемой выборке относились экспрессия Ki-67 более чем 75 % опухолевых клеток (ОШ = 6,0; 95 % ДИ (2,5;14,5), nonGCB иммуногистохимический подтип опухоли (ОШ = 3,2; 95 % ДИ (1,5; 6,9), а также наличие анемии (ОШ = 2,1; 95 % ДИ (1,0; 4,3) [18].

Полученные данные соотносятся с имеющейся информацией о том, что nonBCV подтип ДВККЛ ассоциирован с рецидивами в ЦНС [104]. В совокупности же они свидетельствуют о том, что опухолевые клетки лимфомы в случаях с вторичным вовлечением ЦНС уже на момент диагностики лимфомы обладают большим пролиферативным потенциалом, а также способностью как к генерализации по лимфатической системе, так и к диссеминации по другим тканям и органам. Следовательно, во многом процессы диссеминации и опухолевого роста лимфомы в ЦНС, должно быть обусловлены особенностями биологии и свойствами самих злокачественных лимфоцитов.

В этой связи обращают также на себя внимание следующие факты.

Биопсия опухолевого поражения в случае вовлечения ЦНС при рецидиве ДВККЛ проводится далеко не всегда, что связано как с тяжестью состояния больного, так и трудной доступностью очага поражения. Это приводит к малой изученности биологических свойств опухоли и отсутствию биобанка образцов.

Согласно опубликованным данным, медиана срока от постановки диагноза ДВККЛ до рецидива с поражением ЦНС составляет около 6-7 месяцев [232]. В клинической практике встречаются изолированные рецидивы в ЦНС или рецидивы в ЦНС, предшествующие системному возобновлению проявления опухоли. Описано развитие поражения ЦНС в ходе проведения или сразу после

завершения первичной химиотерапии, что может указывать на наличие субклинического поражения ЦНС уже на начальных этапах роста опухоли [113]. В совокупности все эти факты могут свидетельствовать о ранней миграции лимфомных клеток за ГЭБ [16].

Наконец, в настоящее время опубликованы результаты таргетного, полногеномного или полноэкзомного секвенирования образцов системной ДВККЛ и первичной ДВККЛ ЦНС, а также нескольких клеточных линий данного варианта лимфомы. Сведения по высокопроизводительному секвенированию ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве в литературе представлены единичными исследованиями [16].

Именно по этим причинам было принято решение об изучении мутационного статуса случаев ДВККЛ с вторичным поражением ЦНС на основании анализа первичного биоматериала – биоптатов опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, полученных на этапе диагностики лимфомы. Также были проведены поиск и анализ доступных баз данных, в которых содержалась бы информация о результатах профилирования методами секвенирования нового поколения случаев ДВККЛ с рецидивами в ЦНС.

В поле внимания попала база C-Bioportal for cancer genomics database, в которой содержатся данные о молекулярно-генетическом профиле и клинических характеристиках более 1200 пациентов с ДВККЛ. И в ней можно было выделить 355 пациентов без вовлечения ЦНС и 48 случаев с рецидивом опухоли в ЦНС [13; 214].

Были проанализированы данные по частоте мутаций в различных генах, определенных методами высокопроизводительного секвенирования [16]. Среди 11 самых часто мутирующих генов в группе больных ДВККЛ с рецидивами в ЦНС значимые различия от группы без вовлечения ЦНС были получены по пяти: *MID88* ($p = 0,019$), *PIMI* ($p = 0,025$), *CD79* ($p = 0,043$), *ARID1A* ($p = 0,040$) и *INO80* ($p = 0,028$). Также тенденция к различиям в подгруппах была получена для мутаций в гене *SMARCA4* ($p = 0,087$).

При этом преобладанием среди случаев ДВККЛ с поражением ЦНС подтипа опухоли из активированных В-клеток можно было объяснить лишь

высокую частоту мутаций в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* ($p < 0,001$). Тогда как различия в частоте мутаций в генах *ARID1A*, *INO80* и *SMARCA4* для пациентов с подтипом лимфомы из активированных В-клеток и клеток герминального происхождения не были характерны ($p > 0,05$). Напротив, наблюдалась тенденция ($p = 0,083$) к увеличению частоты мутаций в гене *ARID1A* в подгруппе пациентов с GCB-like вариантом ДВККЛ.

Обращала на себя внимание еще одна особенность: мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* достоверно чаще сочетались друг с другом, тогда как мутации *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* имели тенденцию к взаимному исключению и редко сочетались с мутациями в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*.

Расчет относительного риска вовлечения ЦНС у пациентов с ДВККЛ – носителей мутации в данных 6 генах – показал, что все они, за исключением мутаций в гене *SMARCA4*, имеют близкую прогностическую ценность: Относительный риск составлял от 2,2 до 3,2. Наибольший же риск вовлечения ЦНС в рецидиве опухоли имели носители рекуррентной мутации 265 кодона гена *MYD88* – ОР = 3,4 и 95 % ДИ (1,593; 7,105) [13; 14; 152].

Для проверки результатов анализа C-Bioportal for cancer genomics database был выполнен собственный эксперимент по полноэкзомному секвенированию с применением технологии Illumina [16]. Для этого в архиве биоматериала были отобраны первичные диагностические блоки 9 больных, у которых на последующих этапах опухолевой прогрессии возникли рецидивы в ЦНС.

В ходе биоинформационной обработки результатов особое внимание уделялось панели, которая включала в себя 75 генов – участников регуляции иммунного ответа, клеточного цикла и апоптоза, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, эпигенетической регуляции и репарации ДНК, а также ряда сигнальных путей. А именно: В-клеточных рецепторов (BCR); эволюционно консервативного внутриклеточного пути передачи сигнала, регулирующего взаимодействия между соседними клетками, NOTCH; MAP-киназный; основного пути внутриклеточной передачи сигнала с рецепторов

цитокинов JAK-STAT; а также сигнального пути NFkB. Спектр aberrаций, выявленных в группе исследования характеризовался следующими чертами.

Наиболее частыми в группе исследования были ВНП в генах NF-kB сигнального пути – 6 / 9 образцов (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*), нарушения в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *SMARCA4*) – 5 / 9 образцов, в гене JAK-STAT сигнального пути (*PIM1* и *STAT3*) – 5 / 9 образцов, а также в главном онкосупрессорном гене *TP53* – 3 / 9 образцов. Что в целом подтверждает данные анализа CBioPortal for Cancer Genomics database.

Как и при анализе базы данных, отмечено наличие сочетанных ВНП в генах NF-kB и JAK-STAT сигнальных путей у ряда больных. А из четырех находок в *MYD88* – 3 составили рекуррентная замена 265 кодона, который является «горячей точкой» мутаций в данном гене.

Варианты нуклеотидной последовательности в гене *ARID1A* были выявлены в двух и *SMARCA4* – в одном исследованном образце.

Таким образом, совокупность полученных данных и данных анализа CBioPortal for Cancer Genomics database свидетельствует, что панель из 6 генов, часто мутирующих при ДВККЛ с рецидивом в ЦНС, позволяет выделить, по меньшей мере, 2 подгруппы случаев.

Первая характеризовалась сочетанными нарушениями в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*. Вторая – мутациями в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*. Согласно данным анализа CBioPortal for Cancer Genomics database к первой подгруппе можно было отнести 18 / 48 (37,5 %), а ко второй – 15 / 48 (31,2 %) случаев ДВККЛ с рецидивами в ЦНС [16].

Литературный поиск показал, что первая подгруппа, по спектру мутаций соответствовала подтипу из активированных В-клеток (ABC-like). Точнее – варианту «MCD», согласно классификации ДВККЛ на основании мутационных профилей и геномных перестроек, предложенной Schmitz et al. [94] или варианту «C5», согласно классификации ДВККЛ на основании мутационных профилей и

оценки копийности генов, предложенной Charu et al. [147], оба из которых ассоциированы с неблагоприятным исходом лимфомы.

Также эта группа по спектру мутаций была близка первичной ДВККЛ ЦНС, пути патогенеза которой хорошо описаны [184], а именно: более 90 % случаев лимфомы имеют абберации в участниках передачи сигнала через Toll-подобные рецепторы и активацию NF- κ B [82]. Мутационный ландшафт случаев лимфомы первой идентифицированной подгруппы также свидетельствовал о хронической активации передачи сигналов через В-клеточные рецепторы (BCR), которые могут модулироваться активностью тирозинкиназы Брутона (BTK). Коротко остановимся на наиболее важных моментах.

Так, ген *MYD88* (Myeloid differentiation primary response gene 88) кодирует белок MYD88 и расположен на хромосоме 3p22.2. Это универсальный адаптерный цитоплазматический белок, через который во время нормального врожденного иммунного ответа сигналы передаются с большинства Toll-подобных рецепторов (TLR) и рецепторов IL-1 и IL-18 внутрь клетки. Стимуляция TLRs активирует сигнальные пути NF- κ B и митоген-активированной протеинкиназы, а также защищает клетки от спонтанного апоптоза [111]. Белок MYD88 координирует сборку мультисубъединичного сигнального комплекса, включающего киназы IRAK1 и IRAK4, в конечном итоге активирующего путь NF- κ B [243].

В настоящее время известно, что мутации гена *MYD88* имеют более 2 140 упоминаний в базе данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer version 91 (COSMIC v.91) [217]. При этом более 1 900 случаев составляет рекуррентная мутация c.818T > C, p.L273P NM_001172567 (Mutation ID COSV57169334), также называемая c.794T > C, p.L265P NM_002468.5.

Эта мутация, с высокой частотой встречающаяся в опухолевой ткани ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, приводит к однонуклеотидной замене T > C в 5-ом экзоне гена и замене 265 аминокислоты лейцин на пролин в Toll/IL-1R (TIR) домене белка. Данный домен необходим для гомотипической и гетеротипической мультимеризации молекул белка MYD88 при связывании с цитоплазматическим

хвостом TLR. Мутация *MYD88* p.L265P вызывает аллостерические изменения в TIR домене белка *MYD88* и приводит к спонтанному связыванию с цитоплазматическим хвостом TLR, а также способствует спонтанному образованию сигнального комплекса *MYD88-IRAK* [111], что приводит к повышенной/постоянной активности NF- κ B.

NF- κ B в свою очередь не только активирует транскрипцию генов, участвующих в выживании и пролиферации клеток, но и приводит к выработке клеткой IL-6 и IL-10 [157].

Практически все случаи обнаружения *MYD88* p.L265P приходятся на гематологические злокачественные новообразования. Единичные случаи выявления данной мутации описаны при опухолях легких, брюшины, толстого кишечника, простаты, слюнных желез, щитовидной железы, мочевыводящего тракта.

Этот факт важен для дифференциальной диагностики опухолей с локализацией в ЦНС. Так, в настоящее время биопсия головного мозга считается золотым стандартом диагностики первичных лимфом ЦНС, но несет в себе риск тяжелых осложнений и может задержать начало системной терапии опухоли, и по этим причинам не выполняется у части пациентов. В то же время ни в одном из исследованных образцов глиом мутация *MYD88* p.L265P не была обнаружена [193], тогда как частота ее выявления при первичной лимфоме ЦНС составляет до 85 %, а для ее обнаружения достаточно исследования ликвора [159].

Помимо дифференциально-диагностического значения, обнаружение мутации *MYD88* p.L265P служит предиктивным биомаркером ответа опухоли на терапию таргетным препаратом ингибитором Брутон-тирозинкиназы ибрутинибом. Однако эффективность такого лечения снижается при сочетании с мутациями в гене *CD79B* [78].

Ген *CD79B* кодирует проксимальный адаптер BCR-рецептора и при распознавании антигена мембранным иммуноглобулином обеспечивает каскадную передачу сигнала для активации ВТК и далее нескольких сигнальных путей ниже по течению, включая NF κ B.

Мутации *CD79B* описаны у 18 % пациентов с ABC-подтипом ДВККЛ, они вызывают делецию большей части домена белка, приводят к ингибированию негативной ауторегуляции и постоянной активации передачи сигнала с BCR. Следует отметить, что у 59 % пациентов с ABC-подтипом ДВККЛ имеет место сочетанное обнаружение мутаций *CD79B* и *MYD88 L265P* [81].

Ген Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (*PIM1*) кодирует серин-треонинкиназу – белок длиной 313 аминокислотных остатков, который обладает антиапоптотической активностью и участвует в выживании клеток, а также способствует неоангиогенезу. Клеточная локализация его может быть различной, но считается, что именно ядерное его расположение необходимо для проонкогенных биологических эффектов *PIM1*. *PIM1* участвует в передаче сигналов цитокинов (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15), TNF α , EGF, IFN γ и других, и экспрессия его активируется через JAK/STAT сигнальный путь [121].

PIM1 способен фосфорилировать многие мишени, участвующие в регуляции клеточного цикла, а также является кофактором для C-MYC. Известно, что этот белок играет важную роль в патогенезе ДВККЛ, но нарушения в нем не являются достаточными для развития лимфомы, а для злокачественной трансформации В-лимфоцитов необходимы дополнительные онкогенные события [178].

Следует отметить, что мутации, приводящие к синтезу усеченного варианта *PIM1*, по данным литературы являются преобладающими у пациентов с ABC-подтипом ДВККЛ. Они стабилизируют *PIM1* и влияют на вышестоящие регуляторы и нижележащие мишени передачи сигналов NF- κ B. Было показано, что введение мутантного *PIM1* в клеточную линию ABC-подтипа ДВККЛ увеличивало образование колоний и снижало чувствительность к ибрутинибу [227].

Помимо этих трех генов у больных ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, согласно данным анализа CBioPortal for Cancer Genomics database и собственного эксперимента, имели место абберрации в онкогене *CARD11*, приводящие к конститутивной активации пути NF- κ B в клетках лимфомы как в ответ на активацию BCR, так и без нее, а также генах *STAT6* и *SOCS1*. Известно, что последние приводят к устойчивому фосфорилированному JAK2 и хронической

активации JAK-STAT сигнального пути в клетках лимфомы. Работы с применением секвенирования нового поколения не показали значительного обогащения мутаций *CARD11* ни в одном из подтипов ДВККЛ, вместе с тем мутации в генах *STAT6* и *SOCS1* были часты при первичной медиастиальной ДВККЛ [81].

Интересно, что все эти случаи укладываются в SHM2 и SHM3 подгруппы ДВККЛ, выделенные Alkodsí et al. [168] на основании паттернов генов, подвергающихся соматической гипермутации при ДВККЛ, основными из которых являются мутации *MYD88* (L265P), *CD79B* и *PIM1*, а также *SOCS1*, *STAT3* и *STAT6*.

Для второй идентифицированной подгруппы образцов ДВККЛ с рецидивами в ЦНС были характерны мутации в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*, редко сочетающиеся с мутациями в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*, что делало эти случаи схожими с лимфомой Беркитта [223].

Применение секвенирования нового поколения значительно расширило понимание генетического ландшафта всех типов неходжкинских лимфом [40]. Анализ данных литературы за последние несколько лет показал, что среди самых часто мутирующих генов при лимфоме Беркитта 4-е и 5-е места занимают именно гены *SMARCA4* и *ARID1A*. Например, частота мутаций в гене *ARID1A* при данном варианте опухоли достигает 17,5 %. При этом лимфома Беркитта является типом НХЛ с очень частым (до 30–35 % случаев) вовлечением в опухолевый процесс ЦНС [42; 101; 215; 223].

Что касается гена *INO80*, то в литературе имеется описание случая В-лимфобластной лимфомы/лейкемии с уникальными, как пишут авторы, морфологическими и иммунофенотипическими беркиттоподобными чертами. Случай был очень тщательно изучен на предмет молекулярно-генетических нарушений, и при цитогенетическом анализе была обнаружена хромосомная перестройка, приводящая по данным микрочипового исследования к делеции гена *INO80* [43].

Rabea Wagener и соавторами обсуждается выделение новой нозологической подгруппы лимфом, подобных лимфоме Беркитта с аберрацией 11q. В нее предлагают включать случаи, аналогичные лимфоме Беркитта на морфологическом, иммунофенотипическом и генном уровнях экспрессии, но без транслокации IG-MYC. Они характеризуются особым дисбалансом на хромосоме 11. Авторы недавнего исследования уточнили, что область дисбаланса 11q содержит связанный с комплексом INO80 ген NFRKB [223].

INO80, *ARID1A* и *SMARCA4* кодируют ключевые функционально-структурные единицы двух белковых комплексов системы ремоделирования хроматина [13; 14] – SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) и INO80 (Inositol 80), которые изменяют структуру, состав и расположение нуклеосом на нити ДНК, тем самым, регулируя архитектуру хроматина для доступа транскрипционных факторов, белков системы репарации ДНК и репликации. Важно отметить, что данные комплексы в ходе реализации процессов репарации ДНК работают совместно [136].

Работа комплексов требует затраты энергии АТФ, и *SMARCA4* и *INO80* являются каталитическими субъединицами для SWI/SNF и INO80 соответственно. В то время как белок, кодируемый геном *ARID1A*, обеспечивает доступность той или иной области генома для SWI/SNF комплекса [51].

Согласно данным анализа C-Bioportal for cancer genomics database, мутации в генах *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* в группе пациентов с рецидивами ДВККЛ в ЦНС крайне редко сочетались, что соотносится с данным литературы: мутации в членах семейства SWI/SNF SMARC и ARID при солидных новообразованиях, действительно, возникают взаимоисключающим образом. Связывают это с их функциональной синонимичностью, т. е. мутации в одном из этих генов сами по себе могут быть достаточными для нарушения нормальной функции всего комплекса [48].

Предполагается следующий механизм участия мутаций в *ARID1A* и *SMARCA4* в онкогенезе. Данные субъединицы комплекса SWI/SNF имеют паралоги, которые включаются в состав комплекса ремоделирования хроматина

на месте мутировавшего белка, что влияет на работу комплекса в целом [228], которая меняет направленность на активное стимулирование онкогенеза [76].

Известно, например, что нокдаун *ARID1A* способствует устойчивости лейкозных клеток к Fas (CD95)-опосредованному апоптозу, механизму уничтожения клеток, принятому Т-клетками и НК-клетками. Также нарушаются процессы репарации ДНК, что способствует промоции генетической нестабильности клеток и ускользанию их от иммунного надзора. А изменение локализации участков ДНК, доступных транскрипции, приводит к нарушению экспрессионного профиля клеток, который должен быть специфичен в отношении определенных мишеней для различных тканей и типов клеток или стадий их дифференцировки. В частности показано, что в опухолевых клетках с дефицитом функции *ARID1A* имеет место активация JAK-STAT, а именно STAT3, сигнального пути и усиленная продукция опухолевыми клетками ИЛ-6 и фактор некроза опухоли-альфа [228].

Кроме того, известно, что STAT3 связывается с промотором гена *PD-L1* и необходим для экспрессии PD-L1 на поверхности клетки [218].

Изменения генов *KMT2D*, *EZH2*, *CREBBP* и *EP300*, также влияющие на эпигенетические модификаторы, приводят к изменениям в экспрессии множества генов, включая молекулы иммунного распознавания, модификаторы иммунного ответа и цитокины, и формируют TME и способствуют прогрессированию лимфомы [218].

Отдельно следует остановиться на мутациях *TP53*, которые встречаются у части пациентов с ДВККЛ с рецидивами в ЦНС (с частотой до 14 %, согласно C-Bioportal for cancer genomics database). Известно, что основной функцией его является защита от опухолевого роста. Отметим, что, помимо прочих онкосупрессорных механизмов, кодируемый *TP53* белок p53 модулирует активность путей передачи сигналов через рецепторы цитокинов. Потеря функции p53 приводит к увеличению фосфорилирования STAT3, который опосредует усиленную передачу сигналов ИЛ-6. Кроме того, некоторые мутанты p53 могут приобретать новые активности, влияющие на передачу сигналов через рецепторы

цитокинов. Например, белок p53, образующийся в результате мутации в одной из «горячих» точек p.R175H, может усиливать передачу сигналов по NF-κB-пути и приводить к повышению продукции злокачественными клетками TNF, IL-1β, IL-6 и других провоспалительных медиаторов [139].

Статус p53 в злокачественных клетках формирует иммунный ландшафт опухоли. Нарушения работы p53 способствуют ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора не только за счет выраженной генетической нестабильности, но и приводят к созданию иммуносупрессивной среды. Делеции или мутации p53 в опухоли нарушают иммунное распознавание с помощью таких механизмов, как снижение на поверхности опухолевых клеток экспрессии главного комплекса гистосовместимости I (МНС-I) и других, необходимых для презентации эндогенного антигена молекул [139].

Описано также увеличение экспрессии PD-L1 на поверхности опухолевых клеток при потере активности p53. Происходит это из-за снижения уровня экспрессии транскрипционной мишени p53 – микроРНК miR-34a, которая является репрессором трансляции PD-L1. Посредством PD-L1 опухолевые клетки участвуют в прямом подавлении функции Т-клеток. Так, контакт этих лигандов с рецепторами PD1 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к снижению их противоопухолевой активности и гибели [175].

Следует обратить внимание на тот факт, что 5 / 9 изученных образцов имели нарушения в генах *СИТА* и *CD58*, также имеющих значение в уклонении опухолевых клеток от иммунного надзора [218].

Так, СИТА постоянно экспрессируется в В-клетках и является основным регулятором транскрипции гена главного комплекса гистосовместимости II (МНС-II). Функция последнего – связывание пептидных фрагментов, полученных при внутриклеточном расщеплении белковых молекул, и презентация этих пептидов на поверхности клеток для распознавания Т- и НК-клеточными рецепторами. Мутации в гене *СИТА* являются наиболее распространенным механизмом подавления экспрессии МНС-II в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, а их наличие коррелирует с уменьшением количества лимфоцитов (в

первую очередь, Т-клеток), инфильтрирующих опухоль, и неблагоприятными исходами заболеваниями [139].

CD58 экспрессируется на поверхности иммунных клеток, в том числе В-лимфоцитов и участвует в усилении адгезии между ними и Т-лимфоцитами. Этот процесс предшествует взаимодействию рецепторов МНС с Т-клеточными рецепторами и активации Т-клеток. Мутации *CD58* являются характерной чертой первично-рефрактерных и рецидивирующих случаев ДВККЛ [175].

Поскольку аберрации *СИТА* и *CD58* часты при ДВККЛ, это убедительно подтверждает важную роль нарушения как адаптивного, так и врожденного иммунного ответа в течении лимфомы [155].

Таким образом, несмотря на различие в спектре мутировавших генов, в большей части случаев для ДВККЛ с рецидивами в ЦНС характерны аберрации, приводящие к активации BCR и далее NF- κ B, а также JAK-STAT сигнальных путей и продукции опухолевыми клетками лимфомы большого количества провоспалительных цитокинов, а также аберрации, снижающие иммуногенность и способствующие избеганию опухоли иммунного надзора. Представляется, что такой мутационный профиль может давать выраженные селективные преимущества клеткам лимфомы на различных этапах опухолевой прогрессии ДВККЛ в ЦНС. Ниже рассмотрены их возможные молекулярные механизмы.

Так, для успешного метастазирования опухолевым клеткам необходимы динамические адаптивные изменения, а именно: утрата адгезии, приобретение способности к миграции и инвазии, избегание атак со стороны иммунной системы, приживание в новом органе и его колонизация, формирование резистентности к лекарственным воздействиям [241].

Диссеминация лимфомных клеток в ЦНС при ДВККЛ должна быть крайне неэффективным процессом, в ходе которого опухолевые В-клетки проявляют не только способность к выходу из первичного очага в кровоток, но и к преодолению ГЭБ, выживанию и далее активной пролиферации в бедной на ростовые стимулы среде нервной ткани, неоваскуляризации и избеганию при этом иммунного надзора [241]. Представляется, что успешное завершение вовлечения в

опухолевый процесс нервной ткани возможно лишь при наличии в опухолевых клетках какого-то универсального механизма, позволяющего проявить все описанные выше свойства одновременно.

Согласно полученным данным и данным литературы известно, что подавляющая часть случаев рецидивов в ЦНС относится к ABC-like подтипу ДВККЛ, и частым молекулярным событием является постоянная активация NF- κ B, что подтверждается описанным мутационным спектром. NF- κ B является транскрипционным фактором, который способствует синтезу металлопротеиназ ММП-3 и ММП-9, которые, в свою очередь, инициируют деградацию матриксных белков и нарушение целостности ГЭБ [226; 229].

В этой связи также интересным представляется исследование D. Foureau et al. (2015), в котором проводилась сравнительная оценка концентрации в сыворотке крови больных 15 NF- κ B-зависимых и 12 NF κ B-независимых хемокинов, цитокинов и факторов роста при ABC- и GCB-подтипах ДВККЛ. Оказалось, что ни по одному из изученных NF- κ B-зависимых параметров авторы не смогли отличить ABC от GCB-подтипа лимфомы, за исключением хемокина CXCL10, который был гиперэкспрессирован при подтипе ABC [73].

CXCL10 (интерферон- γ -индуцируемый белок 10, ранее называемый IP-10) представляет собой небольшой белок, который продуцируется клетками различного типа (в том числе эндотелиальными, дендритными и астроцитарными), относится к провоспалительным молекулам и проявляет плеiotропное действие на широкий спектр биологических процессов, включая иммунитет, ангиогенез и органоспецифическое метастазирование раков. Особенно важно отметить его роль в облегчении трансэндотелиальной миграции Т-клеток через гематоэнцефалический барьер [213].

В работе Wilson et al (2013) проводили оценку эффектов CXCL10 на клетки ЦНС человека *in vitro*. Результаты показывали, что CXCL10 индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга и клеток нейроглии дозозависимым образом, а при высоком уровне вызывают васкулопатию [211]. В другой работе было высказано предположение, что CXCL10 вызывает

нарушение ГЭБ не напрямую, а через нижестоящей TNF- α , который и приводит к снижению синтеза белков плотных контактов нейроваскулярной единицы [130]. При этом мутации, активирующие NF- κ B и STAT3, особенно сочетанные, и приводящие к синтезу CXCL10, безусловно, дают опухолевым клеткам селективное преимущество при преодолении ГЭБ.

Фактически же, активация NF- κ B и STAT3 не только позволяет реализоваться облегченной миграции лимфоцитов через ГЭБ, но и обеспечивает дальнейшие механизмы выживания и промоции опухолевого роста [70].

Несложно представить, что клетки ДВККЛ, проникая в нервную ткань, на первых этапах попадают в крайне неблагоприятные условия (отсутствие ростовых стимулов) и либо погибают, либо некоторое время могут находиться в состоянии «покоя». Именно с этим покоящимся состоянием проникших в ЦНС на начальных этапах опухолевого роста злокачественных В-клеток может быть связано отсутствие неврологических и лабораторно-инструментальных проявлений опухоли, а далее их манифестация уже на фоне проводимой терапии или в форме изолированных рецидивов в ЦНС и рецидивов в ЦНС, предшествующих системному возобновлению роста лимфомы [27].

На сегодняшний день установлено, что устойчивость к программированной клеточной смерти и способность опухолевых лимфоидных клеток к пролиферации в большой степени зависят от внешних стимулов [50]. Например, важнейшее значение в выживании В-клеток, а именно избегании программированной клеточной смерти, имеет сигнализация через В-клеточный рецептор (BCR) [22]. Становится понятным, что конституциональная активация BCR в результате мутаций генов *MYD88*, *CD79B* и *CARD11* дают злокачественным В-клеткам еще одно селективное преимущество для выживания в ЦНС.

Так же заинтересовал тот факт, что в случаях лимфомы с рецидивами в ЦНС часто, но не всегда, наблюдаются сочетанные мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*, которые приводят к конституциональной активации сразу двух внутриклеточных каскадов: BCR и JAK-STAT. Литературный поиск прояснил этот момент. Оказалось, что активация NF- κ B, лежащего ниже по течению

сигнального каскада BCR, индуцирует экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как интерлейкин IL-6 и IL-10, которые, связываясь с цитокиновыми рецепторами на поверхности опухолевого лимфоцита, приводят к фосфорилированию белков каскада JAK-STAT и его активации даже в отсутствие мутаций PIM1 и других участников сигнального каскада [70]. В совокупности эти результаты свидетельствуют также о том, что среди всех случаев ДВККЛ и, в первую очередь, ABC-like подтипа часты случаи лимфомы с биологическим взаимодействием между STAT3 и NF-κB.

Таким образом, нарушения *MYD88*, *CD79B*, *PIM1*, *CARD11*, *STAT6*, *SOCS1*, активирующие BCR и далее NF-κB и/или STAT3, и выявленные в группе исследования в подавляющем большинстве образцов ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, фактически обеспечивают аутокринную передачу сигнала на пролиферацию опухолевых лимфоцитов в ЦНС [70].

Начнет ли далее клетка опухоли активно делиться, либо останется в покое, во многом зависит также от среды вокруг нее [239].

Согласно современным представлениям, важнейшую роль в развитии злокачественного новообразования играет окружение опухоли – особая микросреда, образующаяся в результате перекрестного взаимодействия между опухолевой клеткой и окружающими ее элементами (иммунными, эндотелиальными и стромальными), включающая также внеклеточные сигнальные молекулы, хемокины, цитокины, факторы роста и регуляторы метаболизма [222].

Важно отметить, что специфику в опухолевое микроокружение в каждом органе вносят местные факторы тканевой среды [112]. При этом микроокружение опухолевого В-лимфоцита, проникшего в ЦНС, будет в значительной степени отличаться от «специализированного» микроокружения лимфоидного органа. Состоять оно будет, в основном, из структурно-функциональных компонентов нейроваскулярной единицы, в норме не направленных на поддержание клеток лимфоидного ряда.

Известно, что клетки опухоли и клетки микроокружения находятся в тесном контакте и активно взаимодействуют. При этом под влиянием опухоли клеточные элементы стромы зачастую перепрограммируются, проявляя в последующем проопухолевую активность. Наибольшее же значение в этих механизмах играют три процесса: воспаление, иммуносупрессия и ангиогенез [238].

В настоящее время все большее значение в развитии ДВККЛ и лимфом ЦНС, в частности, придает воспалению [122]. Описано два основных варианта возникновения и поддержания воспаления при опухолях. Во-первых, в трансформированной клетке происходит экспрессия онкогенов, что активирует внутриклеточные сигнальные каскады и продукцию широкого спектра провоспалительных хемокинов и цитокинов клетками опухоли, вовлекающих микроокружение. Этот механизм был рассмотрен выше, и в случае ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, вероятнее всего, обусловлен активацией NF- κ B и JAK-STAT путей в результате мутаций в генах *ARID1A*, *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *TP53*, *STAT3*, *CARD11* и *SOCS1*. Во-вторых, при росте опухоли происходит разрушение тканей пораженного органа, что вызывает воспалительный ответ со стороны его стромы [189].

Более того, в ходе недавних экспериментов была доказана способность клеток ДВККЛ выделять экзосомы и активно перестраивать микроокружение под собственные нужды [166]. В частности, при совместном культивировании экзосомы, полученные из клеток ДВККЛ, с высокой эффективностью могут быть интернализованы макрофагами микроокружения опухоли, что приводит к повышенной продукции ими провоспалительных цитокинов, а именно IL-6, IL-12 и CXCL10. При этом ABC-like подтип обладал более выраженной подобной способностью [219].

В активированной опухолю микроглии через MAPK-, NF- κ B- и STAT3-каскады запускается секреция TNF- α , IL-12, ИЛ-10 и других хемокинов. И фактически речь идет о механизме «перенастраивания» микроглии на паракринную стимуляцию роста лимфомы. Более того, поскольку в организме экзосомы проходят почти везде, включая гематоэнцефалический барьер [231],

можно предполагать, что подобное «перенастраивание» может даже предшествовать миграции опухолевых клеток в ЦНС. В связи с этим в последние годы сформулировано понятие «преметастатическая ниша», которое объединяет стромальные клетки, сосуды, другие поддерживающие клетки, экстрацеллюлярный матрикс и их изменения при взаимодействии с первичной опухолью.

Специфика генетического груза опухоли (набор мутаций, эпигенетических изменений) во многом определяет уникальность иммунного профиля опухолевого окружения, придавая свои индивидуальные особенности и черты [12].

Напомним, что аберрации *TP53*, обнаруживаемые в опухолевой ткани ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, способствуют ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора путем создания иммуносупрессивной среды. Было показано, что потеря или мутация *TP53* в опухоли модулирует иммунное распознавание с помощью таких механизмов, как снижение презентации МНС-I и увеличение набора подавляющих миелоидных клеток и Tregs [46].

Мутации *СИТА* и *CD58*, регистрируемые в большей части случаев ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, сами по себе нарушают презентацию опухолевых антигенов на поверхности В-клеток и способствуют избеганию ими иммунного надзора. Таким образом, с большей вероятностью формировать очаги в ЦНС будут те опухолевые В-лимфоциты, которые способны избегать иммунного надзора, по меньшей мере, двумя путями: формированием вокруг себя иммуносупрессивного микроокружения и собственной низкой иммуногенностью.

Доказано, что трансформированные клетки выживают и приобретают способность к росту только в такой окружающей среде, в которой они обеспечены питательными веществами и кислородом [238]. Поэтому для роста быстро делящейся опухоли критически важными становятся вопросы кровоснабжения. Показано, что при злокачественных опухолях происходит новообразование кровеносных сосудов, процессы которого отличаются от физиологических. В норме ангиогенез является результатом аутокринных и паракринных стимулов,

обеспечиваемых ангиогенными факторами, продуцируемых микроокружением. Но неоангиогенез в опухоли происходит в условиях нарушенных взаимоотношений «паренхима-строма» и измененного экстрацеллюлярного матрикса. В случае лимфом в качестве регуляторов ангиогенеза могут выступать соединения (ангиогенные факторы роста и цитокины), продуцируемые как стромальными элементами, так и самими опухолевыми лимфоцитами [4].

Известно, что новообразование сосудов является признаком прогрессирования ДВККЛ, обладает прогностическим потенциалом и способствует распространению опухоли [79].

Ангиогенный механизм при ДВККЛ объясняется различными взаимодействиями опухолевых клеток и элементов стромы, в основе которых лежит активация онкогенов (например, *PIM1*), а также утрата функции генов-онкосупрессоров (например, *TP53*), которые могут стимулировать онкогенез, непосредственно способствуя пролиферации и выживанию раковых клеток и косвенно влияя на микроокружение опухоли.

Постоянно активированный NF-κB ассоциирован с усилением ангиогенеза [164]. В литературе имеются данные, указывающие, что активация STAT3, может быть важным механизмом ангиогенеза при ДВККЛ [163].

Интересно, что при первичной лимфоме центральной нервной системы опухолевые сосуды были выстланы эндотелиальными клетками, экспрессирующими FVIII и STAT3, в то время как в контрольной ткани головного мозга обнаруживаются только FVIII-положительные сосуды. Объясняется это следующим. Постоянная активация STAT3 в опухолевых В-лимфоцитах способствует экспрессии индуцируемого гипоксией фактора 1 альфа (HIF-1α) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Затем VEGF активирует STAT3 в эндотелиальных клетках и способствует их пролиферации. Кроме того, STAT3 ингибирует экспрессию факторов антиангиогенеза, например, p53 [208]. Активированные под действием провоспалительных цитокинов клетки микроглии также участвуют в ангиогенных процессах, выступая в качестве связующего звена, способствующего прорастанию сосудов вдоль градиента VEGF [69].

Наконец, завершающим звеном в формировании вторичного поражения ЦНС при ДВККЛ является способность клеток противостоять терапевтическим воздействиям, и во многом это становится возможным, благодаря отграничению их от системного кровотока ГЭБ.

Полученные в ходе анализа C-Bioportal for cancer genomics database и собственного эксперимента данные о мутационном спектре ДВККЛ с рецидивами в ЦНС позволяют предполагать несколько направлений таргетной терапии ДВККЛ в момент клинической манифестации рецидива и санации ЦНС на досимптомных этапах. Наиболее перспективными из них представляются: нацеливание на JAK-STAT, BCR-NF- κ B сигнальные каскады и иммунонаправленная терапия, а именно: иммуномодулирующими препаратами, клетками CD19-CART и/или ингибиторами иммунных контрольных точек [242]. Забарьерное расположение опухоли требует применения препаратов, преодолевающих ГЭБ и способных создать в ЦНС терапевтические концентрации [114].

Рекуррентная мутация *MYD88* p.L265P представляет собой хорошую терапевтическую мишень. Поскольку она приводит к активации IRAC- и Брутон-тирозинкиназы (БТК) с последующей нисходящей сигнализацией сразу по двум путям NF- κ B и JAK/STAT3, играющим важную роль в патогенезе ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, как было описано выше.

Ибрутиниб, первый в своем классе пероральный ковалентный ингибитор БТК, для которого была показана способность проникать в паренхиму мозга. Изучение фармакодинамики препарата показало, что ибрутиниб быстро пересекает ГЭБ, а максимальная концентрация его в головном мозге близка значениям в плазме крови [117].

Данный препарат уже продемонстрировал клиническую активность в случае как ПЛЦНС, так и вторичного вовлечения ЦНС в рецидиве системной ДВККЛ. Так, в исследовании, включающем пятнадцать пациентов (9 – с рецидивирующими/рефрактерными формами ПЛЦНС, а также 3 – с рефрактерными/рецидивирующей и 3 – с недавно диагностированными вторичными лимфомами ЦНС) после завершения 4 циклов ибрутинибом в

комбинации с высокодозным метотрексатом и ритуксимабом получали поддерживающую монотерапию ибрутинибом. Общий ответ на лечение составил 80 %: 89 % – при ПЛЦНС и 67 % – при вторичной лимфоме ЦНС. Медиана беспрогрессивной выживаемости для всех пациентов составила 9,2 месяца, а прогрессия заболевания наблюдалась лишь у 2 больных. При этом поддерживающая терапия ибрутинибом имела невысокий уровень токсичности [233].

Монотерапия с использованием перорального ингибитора ВТК второго поколения, тирабрутиниба, который обладает большей селективностью, чем ибрутиниб, была исследована в клинических испытаниях фазы I/II при рецидивирующих/рефрактерных ПЛЦНС и показала общую частоту ответа 64 % с допустимой токсичностью. Основываясь на этих данных, в 2020 году препарат был одобрен для применения по данному показанию в Японии [149].

Однако следует отметить важность учета всего спектра мутационного груза опухоли. Так, в экспериментах на клеточных линиях лимфом препарат ибрутиниб приводил к снижению связывания мутантного белка MYD88 с БТК и увеличению уровня апоптоза [187]. В рамках клинических исследований было показано, что ибрутиниб был эффективен более чем в трети (37 %) случаев ДВККЛ ABC-like подтипа [242]. При этом наиболее высокая частота ответа (до 80 %) наблюдалась при опухолях с сочетанием MYD88 p.L265P с мутациями в гене CD79B [31]. Вместе с тем, мутации в гене CARD11, также выявленные в группе исследованных образцов, напротив, являются предикторами резистентности к ибрутинибу [196].

Сообщается, что точечные мутации в гене киназы PIM1 также снижают чувствительность к ибрутинибу, а комбинация ингибитора пан-PIM с ибрутинибом синергически ингибирует пролиферацию *in vitro* и рост опухоли *in vivo*. Вместе эти данные дают обоснование для комбинирования ингибирования ВТК и PIM1 при лечении ДВККЛ в случае сочетанных мутаций. Например, в последнее время наблюдается повышенный интерес к малым молекулам, которые ингибируют экспрессию PIM1. В экспериментах SGI-1776, низкомолекулярный ингибитор киназ PIM1, PIM2 и PIM3 индуцировал апоптоз в

линии лимфомы клеток мантии человека и острой миелоидной лейкемии, но имел малую токсичность на нормальные лимфоциты человека [168].

Этот или подобные ему препараты могут быть полезными терапевтическими мишенями при ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, однако, по-видимому, оправдан предварительный скрининг пациентов-кандидатов на ингибиторы данной киназы путем секвенирования гена *PIM1*, чтобы определить когорту с наибольшей вероятностью эффективности подобной целенаправленной терапии [179].

Отдельное нацеливание на ось JAK-STAT в случае изолированных мутаций компонентов данного каскада может представлять особый интерес при ДВККЛ с рецидивами в ЦНС. В настоящее время синтезирован подобный фармакологический агент – руксолитиниб (NCT01877005) [82]. Он является селективным ингибитором JAK/STAT и может представлять собой привлекательную молекулу для изучения в качестве препарата направленного лечения ДВККЛ с вовлечением ЦНС в силу его способности проникать через ГЭБ [220].

Можно было бы отметить мутации и в других генах, выявленные в группе пациентов с ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания, которые могли бы представлять собой потенциальную терапевтическую мишень, например, мутаций в *TP53*. Однако эффективность проникновения через гематоэнцефалический барьер предлагаемых для нацеливания на них молекул не описана.

Следует остановиться на потенциальной значимости мутаций в *ARID1A* для таргетного лечения ДВККЛ. Большинство мутаций в данном гене являются инактивирующими мутациями и приводят к потере экспрессии белка *ARID1A*, что делает его непригодным в качестве терапевтической мишени. Однако молекулярные последствия дефицита *ARID1A* создают терапевтическую уязвимость в опухолях, мутантных по *ARID1A*. В ходе протеомного скрининга было обнаружено, что *ARID1A* взаимодействует с белком *MSH2* в ходе мисс-матч репарации. Соответственно, инактивация *ARID1A* нарушает процессы восстановления повреждений ДНК и способствует усилению мутагенеза. Дефицит функции *ARID1A* коррелирует с геномной сигнатурой

микросателлитной нестабильности и повышенной мутационной нагрузкой при различных типах злокачественных новообразований человека [41].

Благодаря выраженной генетической нестабильности злокачественных клеток при ДВККЛ, происходит постоянная селекция в опухоли наиболее агрессивных и резистентных клонов, в том числе приобретающих способность обходить иммунные эффекторные механизмы [12]. Еще одним перспективным направлением исследований по разработке таргетного лечения ДВККЛ, которое позволило бы увеличить эффективность терапии опухоли и снизить риск вовлечения ЦНС, может быть использование иммунотерапии.

Следует обратить внимание на то, что по данным литературы до 20 % образцов нодальной ДВККЛ и до 30 % первичной ДВККЛ ЦНС имеют высокий уровень мутационной нагрузки [37; 172]. Проведенный сравнительный анализ количества мутаций по данным CBioPortal for Cancer Genomics database показал, что подгруппы с рецидивами ДВККЛ в ЦНС и без вовлечения нервной ткани практически не различаются по количеству мутаций в образцах ($p > 0,05$). Но в каждом пятом случае имели место множественные мутации [16].

Также в проанализированной группе из 9-ти образцов ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, в 2 случаях имели место мутации в гене *MSH2* и в 1 – *MSH6*, которые кодируют ключевые белки системы мисс-матч репарации повреждений ДНК и являются одной из причин высокой мутационной нагрузки в опухоли. Эти же случаи характеризовались наибольшим числом мутаций в других генах анализируемой панели.

В настоящее время растет число клинических и экспериментальных доказательства того, что мутационная нагрузка опухоли может быть использована в качестве прогностического биомаркера чувствительности злокачественного новообразования к ингибиторам иммунных контрольных точек (иКТИ) [172]. Средний и высокий уровень мутационной нагрузки в опухоли, с одной стороны, свидетельствует о значительном уровне генетической нестабильности трансформированных клеток, с другой – говорит о большей вероятности

возникновения неоантигенов, которые служат мишенями активированных иммунных клеток [37].

В последние годы антитела, нацеленные на CTLA-4 и/или ось PD1-PDL1, стали активно использовать при лимфоме Ходжкина [181]. Однако терапия ингибиторами иммунных контрольных точек остается недоступной для широкого круга пациентов, так как показатели ее эффективности значительно варьируют.

О потенциальной эффективности препаратов данного класса для лечения поражения ЦНС при ДВККЛ свидетельствуют результаты описанных клинических наблюдений. В частности сообщалось об успешном лечении ниволумабом в монорежиме 4 пациентов с рецидивами и/или рефрактерным течением первичной лимфомы ЦНС. У всех пациентов был достигнут объективный ответ после 3 циклов терапии. При медиане наблюдения 17 месяцев все пациенты были живы, у 3 из них ответ сохранялся [174].

В настоящее время проводится исследование с использованием пембролизумаба, а также ниволумаба при ПЛЦНС. Планируются дополнительные клинические испытания, сочетающие ингибиторы контрольных иммунных точек с целевыми агентами, такими как ибрутиниб или имидазолы [129].

Генетические aberrации в злокачественных клетках могут стать доминирующей движущей силой в формировании иммунного профиля и ответа на иммунотерапию, придавая в каждом отдельном случае индивидуальные черты [12].

Потенциальным терапевтическим подходом для пациентов с мутацией *MYD88* p.L265P может быть индукция Т-клеточного опосредованного иммунного ответа на опухолеспецифические неоэпитопы, полученные из клеток с мутацией. В экспериментах *in vitro* такие неоэпитопы, представленные основными молекулами гистосовместимости класса I, оказывали цитотоксическое действие [169]. Поскольку CD8+Т-лимфоциты способны проникать через гематоэнцефалический барьер, теоретически эти неоэпитопы могут использоваться в качестве модели для терапии Т-клетками с химерными рецепторами антигена (CAR-Т терапии) [157].

Имидозол леналидомид является иммуномодулирующим агентом второго поколения с плеiotропными противоопухолевыми эффектами, включая стимуляцию естественных киллеров, экспансию Т-клеток, усиление антителозависимой клеточной цитотоксичности ритуксимаба, а также прямое собственное цитотоксическое действие на лимфомные клетки [177].

Примечательно, что препарат проникает в терапевтических концентрациях в ликвор у пациентов без признаков вовлечения ЦНС при ДВККЛ, что может иметь важное значение в ведении пациентов с системной лимфомой, которые подвержены риску рецидива ЦНС. Недавние же исследования показали, что леналидомид эффективен в качестве монотерапии при рецидивирующих лимфомах ЦНС [68; 177]. Основываясь на результатах этого и других исследований, обновленные руководящие принципы NCCN 2018 по лечению рецидивирующей/рефрактерной ПЛЦНС включают применение леналидомида в монорежиме или в комбинации ритуксимаб/леналидомид [129].

Иммуномодулятор третьего поколения, помалидомид, также хорошо проникает через ГЭБ. В доклиническом исследовании было показано, что препарат обладает значительной терапевтической активностью на 2 моделях лимфомы ЦНС у мышей. Терапевтическая активность его состоит из прямой цитотоксичности по отношению к клеткам лимфомы и косвенной терапевтической активности посредством модуляции иммунного микроокружения лимфомы. В частности, помалидомид модулирует макрофаги, ассоциированные с опухолью, путем преобразования их поляризационного статуса с M2 на M1 [129].

Вместе с тем, следует учитывать, что мутационный груз не является статичной характеристикой и по мере опухолевой прогрессии может значительно изменяться и качественно, и количественно. Безусловно, происходит клональный отбор лимфомных клеток под избирательным давлением химиотерапии [216]. Но, к сожалению, нынешнее понимание молекулярных механизмов, связанных с рецидивом ДВККЛ, ограничено.

Данные о геномном ландшафте лимфомы с рецидивами в ЦНС практически не опубликованы, вероятно потому, что ДВККЛ редко подвергается повторной биопсии во время рецидива. Исследование генетической эволюции ДВККЛ с рецидивами в ЦНС путем сравнения спектра соматических изменений в опухолях первичной локализации и рецидива, безусловно, представляет большой интерес.

Большой интерес представляют единичные сравнительные исследования спектра соматических изменений в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ, имеющих хороший ответ на стандартную терапию, и с рефрактерным/рецидивирующим течением опухоли [182]. Их результаты показывают, что при лимфоме существует несколько опухолевых клонов, которые эволюционируют независимо друг от друга [240], а рецидив может развиваться как из позднего субклона диагностической опухоли, который содержит большинство мутаций основного диагностического клона (поздний дивергентный режим), так и из раннего второстепенного субклона диагностической опухоли, который может иметь некоторые общие с основным диагностическим клоном мутации и приобретает дополнительные независимые мутации (ранний дивергентный режим).

Кроме того, авторами было показано, что в 11 из 12 изученных парных образцов опухолевой ткани ДВККЛ под действием R-СНОР и прочих программ терапии происходит клональная эволюция, приводящая к обогащению одной или нескольких мутаций. Другим выводом исследования является то, что абберрации в генах иммунного надзора могут рассматриваться в качестве потенциальных факторов, способствующих рецидиву ДВККЛ. Например, неясно, помогают ли генетические мутации, присутствующие в опухоли при постановке диагноза или приобретенные после лечения, определенным популяциям клеток ДВККЛ приобретать устойчивость к лечению.

Авторы другого исследования охарактеризовали профили мутаций 38 биоптатов ДВККЛ, полученных во время прогрессирования после иммунохимиотерапии. Чтобы идентифицировать гены, которые могут быть связаны с рецидивом, они сравнили частоту мутаций в образцах, полученных в рецидиве, с неродственной когортой из 138 диагностических образцов ДВККЛ

[182]. На основе доказательств клонального отбора, среди прочих генов главным кандидатом, участвующим в терапевтической резистентности и рецидивах лимфомы, оказался *TP53*. Была показана тенденция к потере аллеля дикого типа данного гена под избирательным давлением иммунохимиотерапии. Большая частота потери гетерозиготности в гене *TP53* описана и при рецидивах лимфомы Беркитта [223]. Это имеет важные терапевтические последствия, демонстрируя необходимость лечения лимфомы по p53-независимым механизмам.

Мутации, участвующие в регуляции передачи сигналов NF-κB, также подвергаются клональному обогащению при рецидивах ДВККЛ, и наиболее часто мутировавшими генами в данной когорте являются *CD79B*, *MYD88* и два регулятора передачи сигналов NF-κB: *NFKBIE* и *NFKBIZ*, которые были практически не представлены в *de novo* DLBCL, но имели место в 18 % случаев с рефрактерно/рецидивирующим течением.

Другой характерной чертой рецидивов ДВККЛ авторы называли следующее: в диагностических образцах ДВККЛ механизмом усиления передачи сигналов JAK/STAT являлись, в основном, мутации в генах *SOCS1* и *STAT3*. В то время как в рецидиве она была преимущественно обусловлена мутациями *STAT6* [182].

В совокупности эти данные свидетельствуют, с одной стороны, о том, что секвенирование диагностических биопсий может пропустить мутации, которые становятся клонально обогащенными в рецидиве, и повторная биопсия во время рецидива вполне оправдана. Однако она зачастую неосуществима в случаях рецидива ДВККЛ в ЦНС. С другой стороны, только подчеркивают полученные в исследовании данные о важности мутаций *TP53* и активации BCR-NF-κB и JAK-STAT каскадов в опухолевой прогрессии ДВККЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первичные лимфомы центральной нервной системы (ПЛЦНС) составляют около 4 % от всех первичных опухолей ЦНС и 4–6 % от всех экстранодальных лимфом. При этом до 90 % ПЛЦНС морфологически представлено диффузной В-крупноклеточной лимфомой [19].

Системная ДВККЛ является наиболее распространенной формой неходжкинских лимфом, на долю которой приходится около 49 % случаев лимфоидных неоплазий В-клеточного происхождения во всем мире [208].

Вторичное вовлечение ЦНС при ДВККЛ может происходить на различных этапах опухолевого роста. Улучшение подходов к терапии системной опухоли, достигнутых в последние годы, обеспечивает более высокую выживаемость и «дожитие» пациента до рецидива в ЦНС. Так в эпоху применения ритуксимаба у 4–5 % пациентов с ДВККЛ развивается рецидив в ЦНС, что является фатальной неудачей терапии заболевания [18].

До настоящего времени были крайне ограничены данные об эпидемиологии и клинико-демографической характеристике ДВККЛ с первичным и вторичным поражением ЦНС в нашей стране и ее регионах. Проведенная работа является первым системным отечественным исследованием, включающем 47 человек с ПЛЦНС (гистологический вариант ДВККЛ), 35 больных с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС при системной ДВККЛ, а также 202 пациента с системной ДВККЛ без вовлечения ЦНС.

По ее результатам было показано, что проявления заболевания при ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС и ПЛЦНС имели свои особенности по числу и размеру опухолевых очагов, локализации поражения вещества и частоте вовлечения отделов ЦНС, оболочек мозга и ЧМН. Отмечена и большая пролиферативная активность клеток ПЛЦНС в сравнении с опухолевыми лимфоцитами в случаях ДВККЛ с вторичным поражением центральной нервной системы. Все это отражалось в тенденции к большей частоте развития генерализованных судорог, головокружения, эмоционально-волевых и

когнитивных нарушений, нарушений речи, а также парезов и параличей конечностей, наряду с меньшей частотой В-симптоматики, анемического синдрома, тромбоцитопении, повышения уровня ЩФ, ЛДГ, а также острофазовых реакций при ПЛЦНС в сравнении с системной ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС.

Сравнительный анализ эффективности терапии показал низкую частоту достижения ремиссии в обеих исследуемых подгруппах: 44,8 % при ПЛЦНС и 35,3 % при вторичном поражении ЦНС против 61,4 % в группе ДВККЛ без вовлечения ЦНС ($p = 0,118$ и $p = 0,008$ соответственно). Общая 3-летняя выживаемости больных ДВККЛ с вторичным вовлечением ЦНС составила 8,8 %, что было ниже, чем в подгруппах больных ПЛЦНС (27,6 %, $p = 0,051$) и ДВККЛ без вовлечения ЦНС (54,6 %, $p < 0,001$), и соответствовало зарубежным данным [66].

Вместе с тем, складывается впечатление, что в отношении общей выживаемости ПЛЦНС представляет собой патологию с более благоприятным прогнозом ($p = 0,051$) по сравнению с ДВККЛ с вторичным вовлечением в опухолевый процесс ЦНС.

Проведение анализа сопутствующей патологии у больных группы исследования позволило увидеть еще одну особенность пациентов с ПЛЦНС. Несмотря на то, что в данной подгруппе в сравнении как с больными системной ДВККЛ, так и с пациентами с вторичным поражением ЦНС, была меньшая доля лиц пожилого возраста, в анамнезе пациентов чаще имелись указания на другие злокачественные новообразования (в 3,5 раза), диффузно-узловой зоб (в 5,1 раза), гипертоническую болезнь (в 2,2 раза) и хронические заболевания почек (в 6,8 раза). Литературные данные свидетельствуют, что указанные выше заболевания могут являться фактором, временно или долгосрочно дезорганизирующим ГЭБ и делающим его проницаемым для В-клеток.

В настоящее время отбор пациентов для проведения агрессивной профилактики рецидива в ЦНС при ДВККЛ остается сложным. МПИ-ЦНС позволяет определить группу более высокого риска вовлечения ЦНС, что было подтверждено в исследовании. Так в проанализированной группе больных все пациенты с вторичным вовлечением ЦНС при ДВККЛ относились к группам

среднего и высокого риска согласно данного индекса ($p = 0,007$).

Среди клинических и лабораторных характеристик пациентов на момент диагностики заболевания к факторам риска вторичного поражения ЦНС при системной ДВККЛ можно было отнести следующие параметры: статус 2 и выше по шкале ECOG; инфицированность ВИЧ; возраст старше 60 лет; хронические заболевания почек в анамнезе, имеющие значение в дезорганизации ГЭБ; а также наличие 2 и более экстранодальных очагов лимфомы, экспрессию Ki-67 более чем 75 % опухолевых клеток, nonGCB иммуногистохимический подтип опухоли и наличие анемии, свидетельствующие о том, что опухолевые клетки лимфомы в случаях с вторичным вовлечением ЦНС уже на момент диагностики лимфомы обладают большим пролиферативным потенциалом, а также способностью как к генерализации по лимфатической системе, так и к диссеминации по другим тканям и органам.

Вместе с тем, по данным литературы повышенный риск вовлечения ЦНС наблюдается у пациентов с «double-hit» и «triple-hit» ДВККЛ (с перестройками MYC и BCL2 и/или BCL6), а также вовлечением костного мозга, яичек или молочной железы, что подчеркивает необходимость выяснения молекулярных черт опухоли, связанных с повышенным потенциалом проникновения опухолевых В-лимфоцитов за ГЭБ.

Немаловажное значение играет также оптимизация терапии ДВККЛ как на этапах системного течения опухолевого процесса, так и при вовлечении нервной ткани. Однако имеет место исключение пациентов с рецидивами в ЦНС из большинства клинических исследований. Кроме того, в настоящее время отсутствуют модели, которые оптимально моделировали бы клинические параметры поражения ЦНС при лимфоме [97].

Изучение биологических свойств ДВККЛ с вовлечением ЦНС крайне затруднено в силу невысокой частоты события, выраженной тяжести больных и редкости выполнения забора биопсийного материала из очага поражения головного мозга.

Как и для большинства опухолей, естественное течение ДВККЛ

характеризуется прогрессированием опухоли, ведущей к созданию более агрессивного фенотипа, а геном очага лимфомы в ЦНС продолжает эволюционировать независимо от первичной опухоли [240]. Вместе с тем, в соответствии с концепцией раннего метастазирования злокачественных новообразований, основываясь на фактах возникновения изолированных рецидивов ДВККЛ в ЦНС или рецидивов ДВККЛ в ЦНС, предшествующих системному возобновлению проявления опухоли, а также развития поражения ЦНС в ходе проведения или сразу после завершения первичной химиотерапии лимфомы [113; 232], можно предполагать раннюю миграцию злокачественных В-клеток за ГЭБ в ходе опухолевой прогрессии ДВККЛ. В связи с этим, важным представляется изучение молекулярно-генетических черт опухоли уже на этапах диагностики [242].

Технологии высокопроизводительного секвенирования ДНК за последнее десятилетие значительно расширили наше представление о молекулярно-генетической характеристике ДВККЛ. Были идентифицированы мутации во многих генах, которые играют решающую роль в функционировании В-клеток (передача сигналов NOTCH, BCR, Toll-подобных рецепторов, путь NF- κ B и др.), иммунном ответе, регуляции клеточного цикла/апоптоза и другие, большинство из которых можно сгруппировать порядка 20 онкогенных сигнальных путей [64].

Высказываются надежды, что более широкое применение высокопроизводительного секвенирования может оптимизировать имеющиеся прогностические и тераностические подходы при ДВККЛ в целом [81], а обнаружение специфических генетических сигнатур, связанных с рецидивом лимфомы в ЦНС, могло бы улучшить прогнозирование и обосновать выбор пациентов для профилактики вовлечения в опухолевый процесс нервной системы.

Выполненный анализ C-Bioportal for cancer genomics database, основанный на сравнении мутационного профиля 355 пациентов без вовлечения ЦНС и 48 случаев с рецидивом опухоли в ЦНС, полученных в ходе полноэкзомного секвенирования, а также собственный эксперимент по высокопроизводительному

секвенированию 9 диагностических образцов опухолевой ткани больных с ДВККЛ с рецидивами в ЦНС показали, что самыми частыми находками при лимфоме с вовлечением нервной системы являются мутации в генах NF- κ B сигнального пути (*MYD88*, *NOTCH1*, *CD79B*, *CARD11*), нарушения в онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (*ARID1A*, *KMT2D*, *INO80*, *SMARCA4*), мутации в гене JAK-STAT сигнального пути (*PIM1* и *STAT3*), а также главном онкосупрессорном гене *TP53* [18].

Несмотря на кажущуюся гетерогенность мутационного профиля ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, в большей части случаев для опухолевых клеток характерны генетические нарушения, приводящие к продукции злокачественными лимфоцитами большого количества провоспалительных цитокинов, а также аберрации, снижающие иммуногенность и/или способствующие избеганию опухоли иммунного надзора.

В целом, среди ДВККЛ с рецидивами в ЦНС панель из указанных выше генов позволяет выделить, по меньшей мере, 2 подгруппы случаев по спектру драйверных мутаций близких первичной лимфоме ЦНС и лимфоме Беркитта, к каждой из которых может быть отнесено до трети больных.

К первой относятся пациенты с зачастую сочетанными аберрациями в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*. Эта подгруппа соответствует прогностически неблагоприятным вариантам ДВККЛ, выделенным на основании других молекулярно-генетических подходов, таких как профилирование экспрессии генов (ABC-подтип), анализ мутационных профилей и геномных перестроек «MCD» вариант) или оценка мутационных профилей и копияности генов («C5» вариант). Ведущим патогенетическим звеном всех их являются мутации *MYD88* и *CD79B*, приводящие к конституциональной активации BCR-NF- κ B сигнального каскада. Тогда как мутации в гене *PIM1*, часто обнаруживаемые в опухолевой ткани ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, приводят к активации JAK/STAT сигнального пути.

Ко второй группе относятся лица с мутациями *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*, аберрациям в которых при злокачественных новообразованиях в последние годы

уделяется все большее внимание. Данные гены кодируют ключевые структурно-функциональные единицы белковых комплексов системы ремоделирования хроматина, которые необходимы для процессов репликации и транскрипции, а также работают совместно в ходе реализации процессов репарации ДНК [136]. Биологические последствия мутаций *INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4* пока плохо описаны, однако уже сейчас известно, что, помимо поддержания генетической нестабильности опухоли, аберрации, по меньшей мере *ARID1A*, способствуют устойчивости лейкозных клеток к Fas-опосредованному апоптозу при контакте с Т- и NK-клетками и приводят к активации STAT3 с последующим усилением продукции опухолевыми клетками провоспалительных цитокинов [228].

Помимо описанных выше двух подгрупп, у больных ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, согласно данным анализа CBioPortal for Cancer Genomics database и собственного эксперимента, имели место аберрации в онкогене *CARD11*, приводящие к конститутивной активации пути NF-κB в клетках лимфомы как в ответ на стимуляцию BCR, так и без нее, а также мутации *STAT6* и *SOCS1*, активирующие JAK/STAT.

Важным представляется частое обнаружение при ДВККЛ с рецидивами в ЦНС мутаций в гене *TP53*, поскольку одним из недавно описанных при злокачественных новообразованиях эффектов потери его функции также является активация STAT3, тогда как мутации, приводящие к приобретению новых функций, могут усиливать передачу сигналов по NF-κB-пути и приводить к повышению продукции злокачественными клетками провоспалительных медиаторов [139].

Более того, помимо общего стимулирования генетической нестабильности и ускользания от иммунного надзора, дефицит функции p53 приводит к снижению экспрессии МНС-I и увеличению содержания PD-L1 на поверхности опухолевых клеток при потере активности p53 и формирует иммунносупрессорный ландшафт микроокружения опухоли. [139; 175]. Следует обратить также внимание на тот факт, что 5 / 9 изученных образцов имели также нарушения в генах *CIITA* и *CD58*,

также имеющих значение в уклонении опухолевых клеток от иммунного надзора.

Безусловно, полученные в ходе работы данные являются небольшой частью картины, поскольку для полного понимания биологии случаев рецидивов ДВККЛ с вовлечением ЦНС необходимо изучение портрета опухоли на всех уровнях, в том числе транскрипционном, эпигенетическом, протеомном и т. д. Вопрос о том, как и почему эти опухоли возникают в иммунно-привилегированных участках организма, является предметом интенсивных дискуссий в литературе.

Диссеминация лимфомных клеток в ЦНС при ДВККЛ должна быть крайне неэффективным процессом, в ходе которого опухолевые В-клетки должны после выхода из первичного очага в кровоток, преодолеть ГЭБ, выжить и далее активно пролиферировать в бедной на ростовые стимулы среде нервной ткани, избегая при этом иммунного надзора. Понимание на системном уровне того, как опухолевой клетке удастся проявить все эти свойства одновременно, может позволить решить клинические проблемы прогноза, профилактики и лечения поражения ЦНС при ДВККЛ.

Лимфомогенез, безусловно, начинается с процессов поэтапного накопления генетических и эпигенетических изменений в клетках [40], основными из которых являются выключение генов-супрессоров опухолевого роста и активация протоонкогенов. Они, в свою очередь, приводят к потере контроля над регуляцией клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, репарации ДНК, которые необходимы, но недостаточны для объяснения развития рецидивов ДВККЛ в ЦНС.

В случае вовлечения нервной ткани в опухолевый процесс при лимфоме на первое место должны выходить мутации в генах, задействованных в процессах клеточного сигналинга, адгезии и экстравазации, аутокринной стимуляции, индукции и поддержания воспаления, активации неоангиогенеза, а также ускользания от иммунного надзора. Прогрессирование ДВККЛ в ЦНС может быть результатом только четко сформулированного механизма, который требует постоянных перекрестных помех между опухолевыми клетками и окружающей средой.

Было отмечено, что при ДВККЛ с рецидивами в ЦНС часто, хоть и не всегда, наблюдаются сочетанные мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*, которые приводят к конституциональной активации сразу двух внутриклеточных каскадов: BCR-NF- κ B и JAK-STAT. Хотя в биологии большинства случаев лимфомы с вовлечением нервной системы особое внимание уделяется именно абберациям в участниках сигнальной оси BCR-NF- κ B, в патогенезе рецидивов ДВККЛ в ЦНС активация именно второго сигнального пути представляется не менее важной, поскольку абберации к ней приводящие, по всей видимости, имеют место едва ли не во всех случаях.

Интересно, что обусловлена эта активация может быть не только за счет мутаций *PIM1*, *TP53*, *STAT6*, *SOCS1*, *ARID1A*, но и в отсутствии таковых за счет биологического взаимодействия между двумя каскадами. Так индукция NF- κ B (вызванная мутациями *MYD88*, *CD79B*, *CARD11* и др.) приводит к повышенной экспрессии IL-6, IL-10 и других провоспалительных цитокинов, которые связываются с цитокиновыми рецепторами на поверхности опухолевого В-лимфоцита и приводят к фосфорилированию белков JAK-STAT [70].

Складывается впечатление, что формирование рецидива ДВККЛ с вовлечением ЦНС – это динамический процесс взаимодействия опухолевых элементов с окружающими ее на каждом из этапов клетками, а активация JAK-STAT сигналинга, как представляется, позволяет В-клетке успешно пройти все этапы формирования опухолевого очага в ЦНС.

Так, активация JAK-STAT может приводить к дезинтеграции ГЭБ и способствовать проникновению опухолевых В-клеток из системного кровотока в ткань и оболочки мозга, обеспечивать выживание злокачественных лимфоцитов в среде ЦНС по аутокринному механизму, способствовать развитию нейровоспаления, в дальнейшем поддерживающего рост и пролиферацию опухоли паракринным путем, а также формировать иммуносупрессорный фон микроокружения злокачественных В-лимфоцитов и запускать ангиогенез.

Расположение клеток лимфомы за гематоэнцефалическим барьером делает их недоступными для воздействия большего числа препаратов, применяемых для

лечения опухоли. Низкая иммуногенность злокачественных В-клеток, выработка ими иммуносупрессорных молекул, а также анатомическая и функциональная обособленность ЦНС, обеспечиваемая гематоэнцефалическим барьером, препятствуют полноценному функционированию иммунной системы в направлении элиминации опухоли. Не менее важным для развития рецидива ДВККЛ в ЦНС представляется и избегание лимфомными клетками иммунного надзора как вследствие мутаций, приводящих к нарушениям в механизмах презентации антигена, так и за счет экспрессии иммуносупрессорных молекул.

В настоящее время становится очевидным, что успешное лечение опухолей невозможно без учета генетических особенностей опухоли. В будущем внедрение высокопроизводительного секвенирования в рутинную клиническую диагностику сделает генетическое профилирование опухоли более доступным и предоставит возможность выбора персонализированных комбинаций лекарств и индивидуальных стратегий ведения пациентов [157].

Полученные в ходе анализа C-Bioportal for cancer genomics database и собственного эксперимента данные о мутационном спектре ДВККЛ с рецидивами в ЦНС позволяют предполагать несколько подходов терапии, направленных на лечение ДВККЛ в момент клинической манифестации рецидива и санацию ЦНС от опухолевых клеток еще на досимптомных этапах. При этом, нацеливание на путь JAK-STAT, который, по-видимому, может иметь решающее значение в патогенезе рецидивов ДВККЛ в ЦНС, представляется очень перспективным. Ингибирование его может оказывать двойное терапевтическое воздействие – на опухолевые клетки и на микроокружение [240].

Другими наиболее перспективными направлениями являются нацеливание на BCR-NF-kB каскад и иммунонаправленная терапия, а именно: иммуномодулирующими препаратами, клетками CD19-CART и ингибиторами контрольных точек иммунитета. Забарьерное расположение опухоли требует применение препаратов, преодолевающих ГЭБ и способных создать в ЦНС терапевтические концентрации [114].

ВЫВОДЫ

1. К клиническим особенностям вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме в сравнении с первичной лимфомой центральной нервной системы относятся мультифокальный характер ($p = 0,020$) и отсутствие типичной локализаций поражений в паренхиме головного мозга ($p < 0,05$), вовлечение в опухолевый процесс спинного мозга ($p = 0,008$) и черепно-мозговых нервов ($p = 0,018$), частое поражение оболочек мозга ($p < 0,001$), в том числе в виде изолированных лептоменингеальных форм ($p = 0,031$), наряду с меньшими объемом опухолевых очагов ($p < 0,009$), более низкой частотой смещения срединных структур ($p = 0,003$) и перифокального отека вещества головного мозга ($p < 0,001$).

2. Пациенты с первичной лимфомой центральной нервной системы в сравнении с больными диффузной В-крупноклеточной лимфомой с вторичным поражением центральной нервной системы и без такового чаще имели указания на другие злокачественные новообразования (в 3,5 раза, $p = 0,002$ и 3,3 раза, $p = 0,078$ соответственно), диффузно-узловой зоб (в 5,1 раза, $p < 0,001$ и $p = 0,070$ соответственно), гипертоническую болезнь (в 2,2 раза, $p < 0,001$) и хронические заболевания почек (6,8 раза, $p < 0,001$ и 1,8 раза, $p = 0,095$).

3. К клиническим факторам риска вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме можно отнести статус 2 и более по шкале ECOG (ОШ = 15,6; 95 % ДИ (4,6; 52,7), инфицированность ВИЧ (ОШ = 12,9; 95 % ДИ (2,3; 73,4), возраст старше 60 лет (ОШ = 10,2; 95 % ДИ (3,8; 27,3), хронические заболевания почек в анамнезе (ОШ = 4,7; 95 % ДИ (1,8; 12,5), наличие 2 и более экстранодальных очагов лимфомы (ОШ = 4,4; 95 % ДИ (2,1; 9,4), группу высокого и промежуточного/высокого риска по международному прогностическому индексу (ОШ = 3,7; 95 % ДИ (1,4; 9,9) и группу высокого и среднего риска по международному прогностическому индексу центральной нервной системы (ОШ = 2,7; 95 % ДИ (1,3; 5,6).

4. К лабораторным факторам риска вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме относятся высокая пролиферативная активность (экспрессия Ki-67 более 75 %) опухолевых клеток (ОШ = 6,0; 95 % ДИ (2,5; 14,5), nonGCB иммуногистохимический подтип опухоли (ОШ = 3,2; 95 % ДИ (1,5; 6,9), а также наличие анемии любой степени тяжести (ОШ = 2,1; 95 % ДИ (1,0; 4,3).

5. На момент дебюта заболевания мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным поражением центральной нервной системы в 37,5 % случаев характеризовался наличием мутаций в генах JAK/STAT и NF-kB сигнальных путей (*MYD88*, *PIM1* и *CD79B*), в 31,2 % случаев – наличием мутаций в генах системы ремоделирования хроматина (*INO80*, *ARID1A* и *SMARCA4*).

6. С высоким риском вторичного вовлечения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме ассоциированы рекуррентная мутация p.L265R *MYD88* (ОШ = 3,365; 95 % ДИ (1,593; 7,105), а также мутации в генах *PIM1* (ОШ = 2,214; 95 % ДИ (1,097; 4,469), *CD79B* (ОШ = 2,840; 95 % ДИ (1,061; 7,601), *INO80* (ОШ = 3,238; 95 % ДИ (1,192; 8,798) и *ARID1A* (ОШ = 2,329; 95 % ДИ (1,035; 5,240).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На этапах диагностики системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы с целью выделения группы пациентов, имеющих высокий риск вторичного вовлечения в опухолевый процесс центральной нервной системы, необходимо проводить скрининговое тестирование на наличие мутации p.L265P в гене *MYD88*.

2. При доступности на этапах диагностики системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы анализа мутационного спектра методами высокопроизводительного секвенирования (NGS) в панель анализируемых генов помимо *MID88*, *PIMI*, *CD79*, необходимо включение генов *ARID1A*, *INO80* и *SMARCA4*, мутации в которых ассоциированы с рецидивами лимфомы в центральной нервной системе.

3. Выполнение молекулярно-генетического тестирования на этапах диагностики системной диффузной В-крупноклеточной лимфомы может способствовать выявлению у больного мутаций с доказанной терапевтической значимостью и проведению у него высокоэффективной таргетной терапии лимфомы, в том числе препаратами, проникающими через гематоэнцефалический барьер.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АИЗ	аутоиммунные заболевания
АСКТ	аутологичная трансплантация стволовых кроветворных клеток
б/х	биохимический
БТК	тирозинкиназа бруттона
В	высокий риск
ВАК	высшая аттестационная комиссия
ВГВ/ВГС	вирусный гепатит «В»/вирусный гепатит «С»
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВМ	внутричерепное
ВНЗ	вариант неизвестного значения
ВНП	вариант нуклеотидной последовательности
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГБ	гипертоническая болезнь
ГМ	головной мозг
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДВККЛ	диффузная В-крупноклеточная лимфома
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДУЗ	диффузно-узловой зоб
ЗНО	злокачественные новообразования
ИБС	ишемическая болезнь сердца
иКТИ	ингибиторы контрольных иммунных точек
ИТ	интратекально
КТ	компьютерная томография
КТИ	контрольные иммунные точки
ЛДГ	лактатдегидрогеназа

Мб	мегабаза
ММП	матриксная металлопротеиназа
МПИ	международный прогностический индекс
МПИ-ЦНС	международный прогностический индекс центральной нервной системы
МРТ	магнитно-резонансная томография
Н/Д	нет данных
НЛ	нейролейкемия
ОАК	общий анализ крови
ОАМ	общий анализ мочи
ОВ	общая выживаемость
ОНМК	острое нарушение мозгового кровообращения
ОШ	отношение шансов
П. н.	пары нуклеотидов
ПВ	промежуточный высокий риск
ПЛЦНС	первичная лимфома центральной нервной системы
ПН	промежуточный низкий риск
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭТ	позитронно-эмиссионная томография
ПЭТ-КТ	позитронно-эмиссионная томография, совмещенная с КТ
Рг	рентген
РФ	Российская Федерация
СД	сахарный диабет
СОЭ	скорость оседания эритроцитов
СРБ	С-реактивный белок
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФДГ	фтордезоксиглюкоза
ХБП	хроническая болезнь почек
ХЗП	хронические заболевания почек

ЦНС	центральная нервная система
ЧМН	черепно-мозговые нервы
ЩФ	щелочная фосфатаза
ABC	активированная В-клетка
ABC-транспортеры	atp-binding cassette – транспортеры
BCL2	белок В-клеточной лимфомы 2
BCL6	белок В-клеточной лимфомы 6
BCNU	ломустин
BCR	В-клеточные рецепторы
CAR-T терапия	терапия Т-клетками с химерными рецепторами антигена
CCL	хемокин-лиганд
CD	кластер дифференцировки
CHOP	циклофосфан/доксорубицин/винкристин/преднизолон
CXCL10	интерферон-γ-индуцируемый белок 10
CXCR	хемокин-рецептор
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EPOCH	этопозид/преднизолон/винкристин/циклофосфан/ доксорубицин
F-критерий	критерий Фишера
GCB	В-клетка герминального происхождения
GELA	d'études des Lymphomes de l'Adulte
HD-MTX	высокие дозы метотрексата
HIF-1α	индуцируемый гипоксией фактор 1 альфа
hyper-CVAD	блок А: циклофосфамид/винкристин/доксорубицин/ дексаметазон; блок В: метотрексат/цитарабин
ICAM	молекула адгезии
IFLSG	International Extranodal Lymphoma Study Group
IG	иммуноглобулин

IgG	иммуноглобулин класса G
<i>IgH</i>	ген тяжелой цепи иммуноглобулина
IL-1	интерлейкин 1
IL-1R1	рецептор первого типа к интерлейкину-1
Il-6	интерлейкин 6
INO80	Inositol 80
Log Odds Ratio	логарифм отношения шансов
MATRIx	ритуксимаб/высокие дозы метотрексата/тиотепа/ цитарабин
MHC-I	главный комплекс гистосовместимости I
MHC-II	главный комплекс гистосовместимости II
miRNA	микрорибосинуклеиновая кислота
MMP-9	матриксная металлопротеиназа-9
MTX	метотрексат
MYC	myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYD-88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	секвенирование нового поколения (next generation sequencing)
PD-1	программирующий клеточную смерть белок 1
PDL-1	лиганд программирующего клеточную смерть белка 1
<i>PIM1</i>	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RCHOEP	ритуксимаб/циклофосфан/доксорубицин/винкристин/ этопозид/преднизолон
RCHOP	ритуксимаб/циклофосфан/доксорубицин/винкристин /преднизолон
R-HDS	ритуксимаб/циклофосфамид/цитарабин/этопозид
RMBTP	ритуксимаб/высокие дозы метотрексата/ломустин/тени позид/преднизолон

RMPV	ритуксимаб/высокие дозы метотрексата/винкристин/ прокарбазин
RMT	ритумсимаб/высокие дозы метотрексата/темозоломид
s	растворимый
sATIII	растворимый антитромбин III
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
sVCAM-1	растворимая молекула адгезии сосудистого эндотелия 1
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TNF	фактор некроза опухоли
VEGF	сосудистый эндотелиальный фактор роста
χ^2	кси квадрат Пирсона

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы клиники первичных опухолей головного мозга. / Т. И. Ашхацава, М. Ю. Татарина, Л. М. Когония, Д. Р. Насхлеташвили // Медицинский совет. – 2019. – № 19. – С. 181–188. DOI: 10.21518/2079-701X-2019-19-181-188.
2. Бабичева, Л. Г. Экстранодальные неходжкинские лимфомы центральной нервной системы, яичка и поджелудочной железы / Л. Г. Бабичева // Современная Онкология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 7–21.
3. Бархатов, И. М. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии / И. М. Бархатов, А. В. Предеус, А. Б. Чухловин // Онкогематология. – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 56–63. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-56-63.
4. Бессмельцев, С. С. Лимфоидное микроокружение при хроническом лимфоцитарном лейкозе / С. С. Бессмельцев, Н. Ю. Семенова, В. И. Ругаль // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 314.
5. Гареев, И. Ф. Наночастицы: новый подход в диагностике и терапии глиальных опухолей головного мозга / И. Ф. Гареев, О. А. Бейлерли, В. Н. Павлов // Креативная хирургия и онкология. – 2019. – № 9 (1). – С. 66–74. DOI: 10.24060/2076-3093-2019-9-1-66-74.
6. Горбачев, М. И. Гематоэнцефалический барьер с позиции анестезиолога-реаниматолога. Обзор литературы. Часть 1. / М. И. Горбачев, Н. В. Брагина // Вестник интенсивной терапии им. А. И. Салтанова. – 2020. – № 3. – С. 35–45. DOI: 10.21320/1818-474X-2020-3-35-45.
7. Горбачев, В. И. Гематоэнцефалический барьер с позиции анестезиолога реаниматолога. Обзор литературы. Часть 2. // В. И. Горбачев, Н. В. Брагина // Вестник интенсивной терапии им. А. И. Салтанова. – 2020. – № 3. – С. 46–55. DOI: 10.21320/1818-474X-2020-3-46-55.
8. Злокачественные опухоли. Руководство по интерпретации

клинически значимых соматических мутаций при солидных опухолях, выявленных методом секвенирования следующего поколения (NGS), с целью их клинического использования / М. Г. Гордиев, О. И. Бровкина, Р. Ф. Еникеев [и др.]. – Официальный журнал Российского общества клинической онкологии (RUSSECO). – 40 с. – URL: <http://www.cancergenome.ru/materials/NGS.pdf> (дата обращения : 15.09.2022) – Текст : электронный.

9. Клиническое и прогностическое значение молекулярных маркеров диффузной В-крупноклеточной лимфомы / С. М. Расторгуев, Д. А. Королева, Е. С. Булыгина [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – Т. 12, № 1. – С. 95–100. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305.

10. Кондратьев, А. Н. Глимфатическая система мозга: строение и практическая значимость / А. Н. Кондратьев, Л. М. Ценципер // Анестезиология и реаниматология. – 2019. – № 6. – С. 72–80.

11. Корнева, Ю. С. Принципы формирования преметастатической ниши // Ю. С. Корнева, Р. В. Украинец // Современная Онкология. – 2019. – Т. 21, № 4. – С. 6–9. DOI: 10.26442/18151434.2019.4.190715.

12. Микроокружение опухоли: формирование иммунного профиля / Е. К. Олейник, М. И. Шibaев, К. С. Игнатьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, № 2. – С. 207–220.

13. Мутации в генах AR1D1A и SMARCA4 при ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, М. И. Воевода [и др.] // науч.-практ. конф., сентябрь 2020 г. – Новосибирск, 2020. – Т. 1. – С. 35–36.

14. Мутации в генах ARID1A и SMARCA4 при рецидивах диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением ЦНС / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, В. Н. Максимов [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19, № 6. – С. 90–92.

15. Мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с вторичным вовлечением центральной нервной системы: анализ баз и

собственные данные / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, В. С. Карпова [и др.] // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 49–50.

16. Мутационный профиль диффузной В-крупноклеточной лимфомы с рецидивами в центральной нервной системе / Е. Н. Воропаева, Т. И. Поспелова, В. С. Карпова [и др.] // Успехи молекулярной онкологии – 2022. – № 9 (3). – С. 69–84. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-3-69-84.

17. Первичная диффузная В-крупноклеточная лимфома центральной нервной системы (клинический случай и обзор литературы) / К. А. Комратова, Ю. Г. Абугова, С. С. Озеров [и др.] // Онкогематология. – 2017. – Т. 12, № 1. – С. 10–16. DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-1-10-16.

18. Поражение центральной нервной системы при диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфоме / Т. И. Поспелова, Е. Н. Воропаева, В. С. Карпова [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2022. – № 4. – С. 112–132. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-4-112-132

19. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний / под рук. И. В. Поддубной, В. Г. Савченко. – Текст : электронный // Российское общество гематологов : Интернет-портал. – URL: <https://rusoncohem.ru/wp-content/uploads/2019/02/Rossii-skie-klinicheskie-rekomendatsii-po-diagnostike-i-lecheniyu-limfoproliferativnyh-zabolevanii-2018.pdf> (дата обращения : 20.10.2022).

20. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова, О. Л. Кардымон, Е. Б. Прохорчук [и др.] // Медицинская генетика. – 2019. – № 18 (2). – С. 3–23.

21. Современные представления о роли гематоэнцефалического барьера в развитии лимфом центральной нервной системы / Е. Н. Воропаева, В. С. Карпова, Т. И. Поспелова [и др.] // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2022. – № 2. – С. 131–147. DOI: 10.31549/2542-1174-2022-6-2-131-147.

22. Супрун, Е. Н. Рециркуляция лимфоцитов / Е. Н. Супрун. – Текст :

электронный // Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2014. – № 1 (36). – Стр. 32–36. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/retsirkulyatsiya-limfotsitov> (дата обращения : 28.08.2022).

23. Фурсова, Л. А. Таламические инфаркты в бассейне артерии Percheron: клиника и диагностика / Л. А. Фурсова, Д. В. Наumenко // Международный неврологический журнал. – 2013. – № 1 (55). – С. 25–33.

24. Хроническая болезнь почек как фактор риска острого инсульта / О. Н. Ржевская, А. Ю. Моисеева, А. Н. Эсауленко [и др.] // Трансплантология. – 2021. – № 13 (4). – С. 382–397.

25. Эпендимоциты головного мозга в нейрогенезе и регуляции структурно-функциональной целостности гемато-ликворного барьера / Ю. А. Успенская, А. В. Моргун, Е. Д. Осипова [и др.] // Фундаментальная и клиническая медицина. – 2019. – Т. 4, № 3. – С. 83–94.

26. Юдина, Т. В. Изменение проницаемости гисто-гематических барьеров под влиянием химических факторов внешней среды / Т. В. Юдина, Ю. В. Новиков. – Текст : электронный // Гигиена и санитария. – 1971ю – № 11. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/izmenenie-pronitsaemosti-gisto-gematicheskih-barierov-pod-vliyaniem-himicheskikh-faktorov-vneshney-sredy> (дата обращения: 07.09.2022).

27. Яшин, К. С. Иммуноterapia злокачественных опухолей головного мозга (обзор) / К. С. Яшин, И. А. Медяник // СТМ. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 189–200.

28. Genomenal: программное обеспечение нового поколения для работы с геномными данными : [сайт]. – URL: <https://genomenal.ru/> (дата обращения: 24.05.2022). – Текст : электронный.

29. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes / L. R. Teras, C. E. DeSantis, J. R. Cerhan [et al.] // CA Cancer J Clin. – 2016. – Vol. 66 (6). – P. 443–459. DOI: 10.3322/caac.21357.

30. A multicentre retrospective comparison of central nervous system

prophylaxis strategies among patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma / C. Y. Cheah, K. E. Herbert, K. O'Rourke [et al.] // *Br J Cancer*. – 2014. – Vol. 111 (6). – P. 1072–9. DOI: 10.1038/bjc.2014.405.

31. A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma / J. D. Phelan, R. M. Young, D. E. Webster [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 560 (7718). – P. 387–391. DOI: 10.1038/s41586-018-0290-0.

32. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications / G. W. Wright, D. W. Huang, J. D. Phelan [et al.] // *Cancer Cell*. – 2020. – Vol. 37 (4). – P. 551–568. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.

33. A rearranged EP300 gene in the human B-cell lymphoma cell line RC-K8 encodes a disabled transcriptional co-activator that contributes to cell growth and oncogenicity / M. R. Garbati, R. C. Thompson, L. Haery, T. D. Gilmore // *Cancer Letters*. – 2011. – Vol. 302 (1). – P. 76–83. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.12.018.

34. A refined cell-of-origin classifier with targeted NGS and artificial intelligence shows robust predictive value in DLBCL / Y. Z. Xu-Monette, H. Zhang, F. Zhu [et al.] // *Blood Adv*. – 2020. – Vol. 4 (14): 3391–3404. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020001949.

35. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry / D. R. Bentley, S. Balasubramanian, H. P. Swerdlow [et al.] // *Nature*. – 2008. – Vol. 456 (7218). – P. 53–59. DOI: 10.1038/nature07517.

36. An integrated TCGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics / J. Liu, T. Lichtenberg, K. A. Hoadley [et al.] // *Cell*. – 2018. – Vol. 173 (2). – P. 400–416. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.052.

37. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden / Z. R. Chalmers, C. F. Connelly, D. Fabrizio [et al.] // *Genome Medicine*. – 2017. – Vol. 9 (1). – P. 34. DOI: 10.1186/s13073-017-0424-2.

38. Analysis of Lymphocyte Extravasation Using an In Vitro Model of the Human Blood-brain Barrier / A. Schulte-Mecklenbeck, U. Bhatia, T. Schneider-

Hohendorf [et al.] // J. Vis. Exp. – 2017. – Vol. 122. – P. e55390. DOI:10.3791/55390.

39. Anti-CD20 depletes meningeal B cells but does not halt the formation of meningeal ectopic lymphoid tissue / R. M. Brand, V. Friedrich, J. Diddens [et al.] // Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. – 2021. – Vol. 8 (4). – P. e1012. DOI: 10.1212/NXI.0000000000001012.

40. Application of next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma / Y. Wang, S. Jia, X. Cao [et al.] // Pharmacogenomics. – Vol. 24 (1). – P. 59–68. DOI: 10.2217/pgs-2022-0140.

41. ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade / J. Shen, Z. Ju, W. Zhao [et al.] // Nat Med. – 2018. – Vol. 24 (5). – P. 556–562. DOI: 10.1038/s41591-018-0012-z.

42. Atallah-Yunes, S. A. HIV-associated Burkitt lymphoma / S. A. Atallah-Yunes, D. J. Murphy, A. Noy // Lancet Haematol. – 2020. – Vol. 7 (8). – P. e594-e600. DOI: 10.1016/S2352-3026(20)30126-5.

43. B Lymphoblastic Leukemia With a Novel t(11;15) (q23;q15) and Unique Burkittoid Morphologic and Immunophenotypic Findings in a 9-Year-Old Boy / M. C. Smith, M. K. Kressin, E. Crawford [et al.] // Lab Med. – 2015. – Vol. 46 (4). – P. 320–6. DOI: 10.1309/LM0BOC84GSQGHYKD.

44. Bernal, J. The Significance of Thyroid Hormone Transporters in the Brain / J. Bernal // Endocrinology. – 2005. – Vol. 146 (4). – P. 1698–1700. DOI: 10.23873/2074-0506-2021-13-4-382-397.

45. Biomarkers Reflecting The Destruction Of The Blood-Brain Barrier Are Valuable In Predicting The Risk Of Lymphomas With Central Nervous System Involvement / W. Yu, M. Si, L. Li [et al.] // Onco Targets Ther. – 2019. – Vol. 12. – P. 9505–9512. DOI: 10.2147/OTT.S222432.

46. Blagih, J. p53, cancer and the immune response / J. Blagih, M. D. Buck, K. H. Vousden // J Cell Sci. – 2020. – Vol. 133 (5). – P. 237453.

DOI: 10.1242/jcs.237453.

47. Blood-Brain Barrier, Blood-Brain Tumor Barrier, and Fluorescence-Guided Neurosurgical Oncology: Delivering Optical Labels to Brain Tumors / E. Belykh, K. V. Shaffer, C. Lin [et al.] // *Front. Oncol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 739. DOI: 10.3389/fonc.2020.00739.

48. Bögershausen, N. Mutational Landscapes and Phenotypic Spectrum of SWI/SNF-Related Intellectual Disability Disorders / N. Bögershausen, B. Wollnik // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* – 2018. – Vol. 11. – P. 252. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00252.

49. Cai, Q. Primary central nervous system lymphoma: molecular pathogenesis and advances in treatment / Q. Cai, Y. Fang, K. H. Young // *Transl Oncol.* – 2019. – Vol. 12 (3). – P. 523–538. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.11.011.

50. Caligaris-Cappio, F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia / F. Caligaris-Cappio // *Br J Haematol.* – 2003. – Vol. 123. – P. 380–388. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04679.x.

51. Cancer-Associated Gain-of-Function Mutations Activate a SWI/SNF-Family Regulatory Hub / C. R. Clapier, N. Verma, T. J. Parnell, B. R. Cairns // *Cancer cell.* – 2014. – Vol. 26 (3). – P. 309–317. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.09.024.

52. Central nervous system (CNS) prophylaxis in antiCD20-CHOP treated DLBCL at intermediate to high risk for CNS relapse: A systematic review and meta-analysis / G. Ho, C. Tan, S. de Mel [et al.] // *Hematology.* – Vol. 167. – P. 103507. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103507.

53. Central nervous system (CNS) relapse in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL): pre- and post-rituximab / W. M. Tai, J. Chung, P. L. Tang [et al.] // *Ann Hematol.* – 2011. – Vol. 90 (7). – P. 809–18. DOI: 10.1007/s00277-010-1150-7.

54. Central nervous system prophylaxis in diffuse large B-cell lymphoma / M. F. Zahid, N. Khan, S. K. Hashmi [et al.] // *Eur J Haematol.* – 2016. – Vol. 97. – P. 108–20. DOI: 10.1111/ejh.12763.

55. Central nervous system relapse in patients with diffuse large B cell

lymphoma: analysis of the risk factors and proposal of a new prognostic model / Y. Kanemasa, T. Shimoyama, Y. Sasaki [et al.] // *Ann Hematol.* – 2016. – Vol. 95. – P. 1661–9. DOI: 10.1007/s00277-016-2744-5.

56. Central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: results of the UK NCRI R-CHOP-14 versus 21 trial / M. Gleeson, N. Counsell, D. Cunningham [et al.] // *Ann Oncol.* – 2017. – Vol. 28 (10). – P. 2511–2516. DOI: 10.1093/annonc/mdx353.

57. Characterization of genomic alterations in primary central nervous system lymphomas / S.Zorofchian, H.El-Achi, Y.Yan [et al.] // *J Neurooncol.* – 2018. – Vol. 140 (3). – P. 509–517. DOI: 10.1007/s11060-018-2990-6.

58. Cherry, J. D. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed / J. D. Cherry, J. A. Olschowka, M. K. O'Banion // *J Neuroinflammation.* – 2014. – Vol. 11. – P. 98. DOI: 10.1186/1742-2094-11-98.

59. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma / R. E. Davis, V. N. Ngo, G. Lenz [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 463. – P. 88–92. DOI: 10.1038/nature08638.

60. Chukwueke, U. N. Central Nervous System Lymphoma / U. N. Chukwueke, L. Nayak // *Hematol Oncol Clin N Am.* – 2019. – Vol. 33 (4). – P. 597–611 DOI: 10.1016/j.hoc.2019.03.008.

61. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma / K. Hattori, M. Sakata-Yanagimoto, Y. Suehara [et al.] // *Cancer Sci.* – 2018. – Vol. 109 (1). – P. 225–230. DOI: 10.1111/cas.13450.

62. Clinopathologic significance of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis / J. H. Lee, H. Jeong, W. W. Choi [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 1785. DOI: 10.1038/s41598-017-01998-5.

63. CNS events in elderly patients with aggressive lymphoma treated with modern chemotherapy (CHOP-14) with or without rituximab: an analysis of patients treated in the RICOVER-60 trial of the German High-Grade Non-Hodgkin

Lymphoma Study Group (DSHNHL) / V. Boehme, N. Schmitz, S. Zeynalova [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113. – P. 3896–902. DOI: 10.1182/blood-2008-10-182253.

64. CNS International Prognostic Index: a risk model for CNS relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R CHOP / N. Schmitz, S. Zeynalova, M. Nickelsen [et al.] // *J Clin Oncol*. – 2016. – Vol. 34 (26). – P. 3150–3156. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.6520.

65. CNS relapse in patients with DLBCL treated with lenalidomide plus R-CHOP (R2CHOP): analysis from two phase 2 studies / A. O. Ayed, A. Chiappella, L. Pederson [et al.] // *Blood Cancer Journal*. – 2018. – Vol. 8 (7). – P. 63. DOI: 10.1038/s41408-018-0097-0.

66. CNS relapse of diffuse large B cell Lymphoma A single centre experience / A. Nazir, Fawad, N. Siddique, A. Hameed // *Pak J Med Sci*. – 2017. – Vol. 33 (6). – P. 1454–1458. DOI: 10.12669/pjms.336.13812.

67. Comparative analysis of primary versus relapse/refractory DLBCL identifies shifts in mutation spectrum / D. M. Greenawalt, W. S. Liang, S. Saif [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 (59). – P. 99237–99244. DOI: 10.18632/oncotarget.18502.

68. Comprehensive approach to diagnosis and treatment of newly diagnosed primary CNS lymphoma / C. Grommes, J. L. Rubenstein, L. M. DeAngelis [et al.] // *Neuro-Oncology*. – 2018. – Vol. 21 (3). – P. 296–305. DOI: 10.1093/neuonc/noy192.

69. Control of the blood-brain barrier function in cancer cell metastasis / K. G. Blecharz, R. Colla, V. Rohde, P. Vajkoczy // *Biol. Cell*. – 2015. – Vol. 107. – P. 342–371. DOI: 10.1111/boc.201500011.

70. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma / L. T. Lam, G. Wright, R. E. Davis [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111 (7). – P. 3701–3713. DOI: 10.1182/blood-2007-09-111948.

71. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer / J. G. Tate, S. Bamford, H. C. Jubb [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – V. 47 (D1). –

P. D941–D947. DOI: 10.1093/nar/gky1015.

72. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer : [website]. – URL: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> (date of the application: 16.06.2022). – Text : electronic.

73. Cytokine Profiling of ABC-Subtype and GCB-Subtype Diffuse Large B Cell Lymphoma: Systemic Nfkb Activation and Impact on Myeloid-Derived Suppressor Cells Distribution / D. Foureau, L. J. Druhan, N. M. Steuerwald [et al.] // Blood. – 2015. – Vol. 126 (23). – P. 2666. DOI: 10.1182/blood.V126.23.2666.2666.

74. DeRosa, P. Isolated recurrence of secondary CNS lymphoma: case report and literature review / P. DeRosa, J. M. Cappuzzo, J. H. Sherman // J Neurol Surg Rep. – 2014. – Vol. 75 (01). – P. e154–9. DOI:10.1055/s-0034-1378152.

75. Descriptive statistical analysis of a real life cohort of 2419 patients with brain metastases of solid cancers / A. S. Berghoff, S. Schur, L. M. Fureder [et al.] // ESMO Open. – 2016. – Vol. 1. – P. e000024. DOI: 10.1136/esmoopen-2015-000024.

76. Dhodapkar, M. V. Navigating the Fas lane to improved cellular therapy for cancer / M. V. Dhodapkar // J Clin Invest. – 2019. – Vol. 129 (4). – P. 1522–1523. DOI: 10.1172/JCI127581.

77. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience / Y. Oki, M. Noorani, P. Lin [et al.] // Br J Haematol. – 2014. – Vol. 166. – P. 891–901. DOI: 10.1111/bjh.12982.

78. Droplet Digital PCR Assay for MYD88^{L265P}: Clinical Applications in Waldenström Macroglobulinemia / ML Schirico, M Ferrante, I Dogliotti [et al.] / Hema Sphere – 2020. – Vol. 4 (1) – P. e324. DOI: 10.1097/HS9.0000000000000324.

79. Dual effect of DLBCL-derived EXOs in lymphoma to improve DC vaccine efficacy in vitro while favor tumorigenesis in vivo / Z. Chen, L. You, L. Wang [et al.] // J Exp Clin Cancer Res. – 2018. – Vol. 37 (1). – P. 190. DOI: 10.1186/s13046-018-0863-7.

80. Dubois, S. The role of next-generation sequencing in understanding the genomic basis of diffuse large B cell lymphoma and advancing targeted therapies/

S. Dubois, F. Jardin // Expert Review of Hematology. – 2016. – Vol. 9 (3). – P. 255–69. DOI: 10.1586/17474086.2016.1130616.

81. Dubois, S. The role of next-generation sequencing in understanding the genomic basis of diffuse large B cell lymphoma and advancing targeted therapies / S. Dubois, F. Jardin // Expert Review of Hematology. – 2015. – Vol. 9 (3). – P. 255–69. DOI: 10.1586/17474086.2016.1130616.

82. Dubois, S. The role of next-generation sequencing in understanding the genomic basis of diffuse large B cell lymphoma and advancing targeted Therapies / S. Dubois, F. Jardin // Expert Review of Hematology. – 2015. – Vol. 9 (3). – P. 255–69. DOI: 10.1586/17474086.2016.1130616.

83. Erickson, M. A. Neuroimmune axes of the blood–brain barriers and blood–brain interfaces: bases for physiological regulation, disease states, and pharmacological interventions / M. A. Erickson, W. A. Banks // Pharmacol Rev. – Vol. 70 (2). – P. 278–314. DOI: 10.1124/pr.117.014647.

84. EurekaAlert : [website]. – URL: <https://www.eurekaalert.org/news-releases/731479> (date of the application : 16.05.2022). – Text : electronic.

85. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Is Necessary but not Sufficient for Production and Growth of Brain Metastasis / S. Yano, H. Shinohara, R. S. Herbst [et al.] // Cancer Res. – 2000. – Vol. 60 (17). – P. 4959–67.

86. Fidler, I. J. The Biology of Brain Metastasis Challenges for Therapy / I. J. Fidler // Cancer J. – 2015. – Vol. 21 (4). – P. 284–93. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000126.

87. Filiano, A. J. How and why do T cells and their derived cytokines affect the injured and healthy brain? / A. J. Filiano, S. P. Gadani, J. Kipnis // Nat Rev Neurosci. – 2017. – Vol. 18. – P. 375–384. DOI: 10.1038/nrn.2017.39.

88. Fox, C. P. Refining CNS relapse risk in DLBCL: as easy as ABC? / C. P. Fox // Blood. – 2019. – Vol. 133 (9). – P. 886–888. DOI: 10.1182/blood-2019-01-897595.

89. Franchino, F. Mechanisms and therapy for cancer metastasis to the brain

/ F. Franchino, R. Rudà, R. Soffietti // *Front Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 161. DOI: 10.3389/fonc.2018.00161.

90. Frequency of MYD88 and CD79B mutations, and MGMT methylation in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma / M. Zheng, A. M. Perry, P. Bierman [et al.] // *Neuropathology.* – 2017. – Vol. 37 (6). – P. 509–516. DOI: 10.1111/neup.12405.

91. Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis / M. S. Soto, S. Serres, D. C. Anthony, N. R. Sibson // *Neuro Oncol.* – 2014. – Vol. 16 (4). – P. 540–551. DOI: 10.1093/neuonc/not222.

92. Gene mutation profiles in primary diffuse large B-cell lymphoma of central nervous system: next generation sequencing analyses // M. T. Balint, J. Jelcic, B. Mihaljevic [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – P. 683. DOI: 10.3390/ijms17050683.

93. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma / J. Zhang, V. Grubor, C. L. Love [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – Vol. 110 (4). – P. 1398–1403. DOI: 10.1073/pnas.1205299110.

94. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma / R. Schmitz, G. W. Wright, D. W. Huang [et al.] // *New Engl J Med.* – 2018. – Vol. 378 (15). – P. 1396–1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445.

95. Genome-wide analysis uncovers novel recurrent alterations in primary central nervous system lymphomas / E. Braggio, S. Van Wier, J. Ojha [et al.] // *Clin Cancer Res.* – 2015. – Vol. 21 (17). – P. 3986–94. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2116.

96. Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma / K. Fukumura, M. Kawazu, S. Kojima [et al.] // *Acta Neuropathol.* – 2016. – Vol. 131 (6). – P. 865–875. DOI: 10.1007/s00401-016-1536-2.

97. Genomic subtypes may predict the risk of central nervous system recurrence in diffuse large B-cell lymphoma / T. A. Ollila, H. Kurt, J. Waroich [et al.] // *Blood.* – 2021. – Vol. 137 (8). – P. 1120–1124. DOI: 10.1182/blood.2020007236.

98. Georgieva, J. V. Smuggling drugs into the brain: an overview of ligands targeting transcytosis for drug delivery across the blood-brain barrier / J. V. Georgieva, D. Hoekstra, I. S. Zuhorn // *Pharmaceutics*. – 2014. – Vol. 6. – P. 557–583. DOI: 10.3390/pharmaceutics6040557.

99. gnomAD : Genome Aggregation Database : [website]. – URL: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (date of the application: 16.06.2022). – Text : electronic.

100. Goodwin, S. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies / S. Goodwin, J. D. McPherson, W. R. McCombie [et al.] // *Nat. Rev. Genet.* – 2016. – Vol. 17 (6). – P. 333–351. DOI: 10.1038/nrg.2016.49.

101. Greenough, A. New clues to the molecular pathogenesis of Burkitt lymphoma revealed through next-generation sequencing / A. Greenough, S. S. Dave // *Curr Opin Hematol.* – 2014. – Vol. 21 (4). – P. 326–32. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000059.

102. Greenwood, J. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off / J. Greenwood, Y. Wang, V. L. Calder // *Immunology*. – 1995. – Vol. 86 (3). – P. 408–15.

103. Grimm, K. E. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues / K. E. Grimm, D. P. O'Malley // *Ann Diagn Pathol.* – 2019. – Vol. 38. – P. 6–10. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.09.014.

104. Grimm, K. E. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues / K. E. Grimm, D. P. O'Malley // *Ann Diagn Pathol.* – 2019. – Vol. 38. – P. 6–10. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2018.09.014.

105. Guideline on the prevention of secondary central nervous system lymphoma: British Committee for Standards in Haematology / A. McMillan, K. M. Ardeshtna, K. Cwynarski [et al.] // *Br J Haematol.* – 2013. – Vol. 163. – P. 168–81.

DOI: 10.1111/bjh.12509.

106. Guidelines for diagnosis, prevention and management of central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma patients by the Spanish Lymphoma Group (GELTAMO) / F. J. Peñalver, J. M. Sancho, A. de la Fuente [et al.] // *Haematologica*. – 2017. – Vol. 102 (2). – P. 235–245. DOI: 10.3324/haematol.2016.149120.

107. Guidelines for the diagnosis and management of primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma / C. P. Fox, E. H. Phillips, J. Smith [et al.] // *Br J Haematol*. – 2019. – Vol. 184 (3). – P. 348–363. DOI: 10.1111/bjh.15661.

108. Heimann, P. Indications of next-generation sequencing in non-Hodgkin's lymphoma / P. Heimann, L. Dewispelaere // *Curr Opin Oncol*. – 2020. – Vol. 32 (5). – P. 391–397. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000666.

109. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites / W. Kraan, H. M. Horlings, M. van Keimpema [et al.] // *Blood Cancer J*. – 2013. – Vol. 3 (9). – P. e139–e139. DOI: 10.1038/bcj.2013.28.

110. High-dose therapy and autologous stem cell transplantation may only be applicable to selected patients with secondary CNS diffuse large B-cell lymphoma / C. Y. Cheah, D. Joske, G. Cull [et al.] // *Br J Haematol*. – 2017. – Vol. 178 (6). – P. 991–994. DOI: 10.1111/bjh.14187.

111. High-resolution melting analysis for rapid and sensitive MYD88 screening in chronic lymphocytic leukemia / M. Jiang, J. Li, J. Zhou [et al.] // *Oncology letters*. – 2019. – Vol. 18. – P. 814–821. DOI: 10.3892/ol.2019.10342.

112. Host tissue determinants of tumour immunity / H. Salmon, R. Remark, S. Gnjatic, M. Merad // *Nat. Rev. Cancer*. – 2019. – Vol. 19 (4). – P. 215–227. DOI: 10.1038/s41568-019-0125-9.

113. How to Decide Which DLBCL Patients Should Receive CNS Prophylaxis / K. H. Hall, E. H. Panjic, K. Valla [et al.] // *Oncology (Williston Park)*. – 2018. – Vol. 32 (6). – P. 303–9.

114. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases / E. Angeli, T. T. Nguyen, A. Janin, G. Bousquet // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (1). – P. 22. DOI:10.3390/ijms21010022.

115. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood-Brain Barrier to Treat Brain Metastases / E. Angeli, T. T. Nguyen, A. Janin, G. Bousquet // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 21 (1). – P. 22. DOI: 10.3390/ijms21010022.

116. How we treat primary central nervous system lymphoma / T. Calimeri, S. Steffanoni, F. Gagliardi [et al.] // *ESMO Open.* – 2021. – Vol. 6 (4). – P. 100213. DOI: 10.1016/j.esmoop.2021.100213.

117. Ibrutinib brain distribution: a preclinical study/ L. Goldwirt, K. Beccaria, A. Ple [et al.] // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2018. – Vol. 81 (4). – P. 783–789. DOI: 10.1007/s00280-018-3546-3.

118. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP / L. H. Sehn, D. W. Scott, M. Chhanabhai [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 1452–7. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.3419.

119. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL // K. Savage, J. Kerry, G. Slack [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol. 127. – P. 2182–8. DOI: 10.1182/blood-2015-10-676700.

120. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis / A. M. Petrich, M. Gandhi, B. Jovanovic [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 124. – P. 2354–61. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578963.

121. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma / L. Pasqualucci, D. Dominguez-Sola, A. Chiarenza [et al.] // *Nature.* – 2011. – Vol. 471 (7337). – P. 189–195. DOI: 10.1038/nature09730.

122. Inflammatory Cells in Diffuse Large B Cell Lymphoma / R. Tamma, G. Ranieri, G. Ingravallo [et al.] // *J Clin Med.* – 2020. – Vol. 9 (8). – P. 2418. DOI: 10.3390/jcm9082418.

123. Inflammatory meningeal involvement in patients with rheumatic diseases responsive to rituximab / J. Park, E. Kedar, I. Saksen [et al.]. –ACR/ARHP Annual Meeting, 2012. – URL: <https://acrabstracts.org/abstract/inflammatory-meningeal-involvement-in-patients-with-rheumatic-diseases-responsive-to-rituximab/> (date of the application: 07.10.2022). – Text : electronic.

124. Influence of Rituximab on Central Nervous System Relapse in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Role of Prophylaxis – A Systematic Review of Prospective Studies / A. Ghose, H. K. Elias, G. Guha [et al.] // *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. – Vol. 15 (8). – P. 451–7. DOI: 10.1016/j.clml.2015.02.026.

125. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets / K. Karube, A. Enjuanes, I. Dlouhy [et al.] // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32 (3). – P. 675–684. DOI: 10.1038/leu.2017.251.

126. Integration of cell of origin into the clinical CNS International Prognostic Index improves CNS relapse prediction in DLBCL / M. Klanova, L. H. Sehn, I. Bence-Bruckler [et al.] // *Blood*. – 2019. – Vol. 133 (9). – P. 919–926. DOI: 10.1182/blood-2018-07-862862.

127. integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cbiportal / J. Gao, B. A. Aksoy, U. Dogrusoz [et al.] // *Sci Signal*. – 2013. – Vol. 6 (269). – P. 11. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.

128. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma / J. S. Abramson, M. Hellmann, J. A. Barnes [et al.] // *Cancer*. – 2010. – Vol. 116. – P. 4283–90. DOI: 10.1002/cncr.25278.

129. Introduction of novel agents in the treatment of primary CNS lymphoma / C. Grommes, L. Nayak, H. W. Tun, T. T. Batchelor // *Neuro Oncol*. – 2019. – Vol. 21 (3). – P. 306–313. DOI: 10.1093/neuonc/noy193.

130. IP-10 Promotes Blood–Brain Barrier Damage by Inducing Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Japanese Encephalitis / K. Wang, H. Wang,

W. Lou [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1148. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01148.

131. Jardin, F. Next generation sequencing and the management of diffuse large B-cell lymphoma: from whole exome analysis to targeted therapy / F. Jardin // *Discov Med.* – 2014. – Vol. 18 (97). – P. 51–65.

132. Jay, J. J. Lollipops in the clinic: information dense mutation plots for precision medicine / J. J. Jay, C. Brouwer // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11 (8). – P. e0160519. DOI: 10.1371/journal.pone.0160519.

133. Johanson, C. E. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance / C. E. Johanson, E. G. Stopa, P. N. McMillan // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 686. – P. 101–31. DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3_4.

134. Kridel, R. Prevention of CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma / R. Kridel, P. Y. Dietrich // *Lancet Oncol.* – 2011. – Vol. 12 (13). – P. 1258–1266. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70140-1.

135. Kumar, P. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm / P. Kumar, S. Henikoff, P. C. Ng // *Nature Protocols.* – 2009. – Vol. 4 (8). – P. 1073–1081. DOI: 10.1038/nprot.2009.86.

136. Lans, H. ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response / H. Lans, J. A. Marteijn, W. Vermeulen // *Epigenetics Chromatin.* – 2012. – Vol. 5. – P. 4. DOI: 10.1186/1756-8935-5-4.

137. Lederman, L. Sophisticated Risk Assessment and Prophylactic Strategies Needed for CNS Relapse in DLBCL / L. Lederman. – Text : electronic // *Targeted Therapies in Oncology.* – 2019. – Vol. 8 (8). – URL: <https://www.targetedonc.com/view/sophisticated-risk-assessment-and-prophylactic-strategies-needed-for-cns-relapse-in-dlbcl> (date of the application : 28.05.2022).

138. Li, S. Diffuse large B-cell lymphoma / S. Li, K. H. Young, L. J. Medeiros // *Pathology.* – 2018. – Vol. 50 (1). – P. 74–87. DOI: 10.1016/j.pathol.2017.09.006.

139. Loss of major histocompatibility class II expression in non-immune

privileged site diffuse large B -cell lymphoma is highly coordinated and not due to chromosomal deletions / L. M. Rimsza, R. A. Roberts, E. Campo [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – P. 1101–1107. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1510.

140. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? / N. R. Saunders, K. M. Dziegielewska, K. Møllgård, M. D. Habgood // *Front Neurosci* – 2015. – Vol. 9. – P. 385. DOI: 10.3389/fnins.2015.00385.

141. Menter, T. Routinemäßige zielgerichtete Hochdurchsatzsequenzierung von lymphoproliferativen Erkrankungen / T. Menter, S. Dirnhofer, A. Tzankov // *Pathologe*. – 2020. – Vol. 41. – P. 143–148. DOI: 10.1007/s00292-020-00863-z.

142. Merron, B. Double hit lymphoma: how do we define it and how do we treat it? / B. Merron, A. Davies // *Best Pract Res Clin Haematol*. – 2018. – Vol. 31 (3). – P. 233–240. DOI: 10.1016/j.beha.2018.07.012.

143. Microglial recruitment of IL-1b-producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety / D. B. McKim, M. D. Weber, A. Niraula [et al.] // *Mol Psychiatry*. – 2018. – Vol. 23 (6). – P. 1421–1431. DOI: 10.1038/mp.2017.64.

144. MicroRNAs as predictors for CNS relapse of systemic diffuse large B-cell lymphoma / N. Pillar, O. Bairey, N. Goldschmidt [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8 (49). – P. 86020–86030. DOI: 10.18632/oncotarget.20902.

145. Microvasculature of the mouse cerebral cortex exhibits increased accumulation and synthesis of hyaluronan with aging / M. J. Reed, R. B. Vernon, M. Damodarasamy [et al.] // *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. – 2017. – Vol. 72. – P. 740–746. DOI: 10.1093/gerona/glw213.

146. Molecular complexity of diffuse large B-cell lymphoma: can it be a roadmap for precision medicine? / N. Coccaro, L. Anelli, A. Zagaria [et al.] // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12 (1). – P. 185. DOI: 10.3390/cancers12010185.

147. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes / B. Chapuy, C. Stewart, A. J. Dunford

[et al.] // Nat Med. – 2018. – Vol. 24. – P. 679–690.

148. Morin, R. D. Molecular profiling in diffuse large B-cell lymphoma: why so many types of subtypes? / R. D. Morin, S. E. Arthur, D. J. Hodson // British Journal of Haematology. – 2022. – Vol. 196. – P. 814–829. DOI: 10.1111/bjh.17811.

149. Mukasa, A. Genome Medicine for Brain Tumors: Current Status and Future Perspectives / A. Mukasa // Neurol Med Chir (Tokyo). – 2020. – Vol. 60 (11). – P. 531–542. DOI: 10.2176/nmc.ra.2020-0175.

150. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma / A. Bruno, B. Boisselier, K. Labreche [et al.] // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5 (13). – P. 5065–5075. DOI: 10.18632/oncotarget.2080.

151. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing / R. D. Morin, K. Mungall, E. Pleasance [et al.] // Blood. – Vol. 122 (2013). – P. 1256–1265. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing.

152. Mutational profile of diffuse large B-cell lymphoma with central nervous system relapse: analysis of cbiportal for cancer genomics database / E. Voropaeva, V. Maximov, E. Melnikova [et al.] // Proceedings-2020 : Cognitive sciences, genomics and bioinformatics, CSGB, 06-10 July 2020. – Novosibirsk, 2020. – P. 190–194. DOI: 10.1109/CSGB51356.2020.9214638.

153. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma / K. H. Young, D. D. Weisenburger, B. J. Dave [et al.] // Blood. – 2007. – Vol. 110 (13). – P. 4396–4405. DOI: 10.1182/blood-2007-02-072082.

154. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma / M. Compagno, W. K. Lim, A. Grunn [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 459. – P. 717–721. DOI: 10.1038/nature07968.

155. Mutations or copy number losses of CD58 and TP53 genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors / Y. Cao,

T. Zhu, P. Zhang [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7 (50). – P. 83294–83307. DOI: 10.18632/oncotarget.13065.

156. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma / J-W. Choi, Y. Kim, J-H. Lee, Y-S. Kim. // *Hum Pathol*. – 2013. – Vol. 44 (7). – P. 1375–1381. DOI: 10.1016/j.humpath.2012.10.026.

157. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications / R. A. L. de Groen, A. M. R. Schrader, M. J. Kersten [et al.] // *Vermaat Haematologica*. – 2019. – Vol. 104 (12). – P. 2337–2348. DOI: 10.3324/haematol.2019.227272.

158. MyD88 mutation in elderly predicts poor prognosis in primary central nervous system lymphoma: multi-institutional analysis / S. Takano, K. Hattori, E. Ishikawa [et al.] // *World Neurosurg*. – 2018. – Vol. 112. – P. e69–e73. DOI: 10.1016/j.wneu.2017.12.028.

159. MYD88 p. (L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma / L. S. Hiemcke-Jiwa, R. J. Leguit, T. J. Snijders [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2019. – Vol. 185 (5). – P. 940–1007. DOI: 10.1111/bjh.15674.

160. National library of medicine : national center for biotechnology information : [website]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (date of the application: 24.05.2022). – Text : electronic.

161. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): B-cell lymphomas. Version 3.2019 – May 6, 2019. – Text : electronic. – NCCN : website. – URL: <https://education.nccn.org/node/85881> (date of the application : 29.05.2019).

162. Neuroinflammation pathways: a general review // T. Shabab, R. Khanabdali, S. Z. Moghadamtousi [et al.] // *International Journal of Neuroscience*. – 2017. – Vol. 127 (7). – P. 624–633/ DOI: 10.1080/00207454.2016.1212854.

163. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study /

S. Dubois, P.-J. Viailly, S. Mareschal [et al.] // Clin Cancer Res. – 2016. – Vol. 22 (12). – P. 2919–28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2305.

164. NF- κ B pathways in hematological malignancies / C. Gasparini, C. Celeghini, L. Monasta, G. Zauli // Cell Mol Life Sci. – 2014. – Vol. 71 (11). – P. 2083–102. DOI: 10.1007/s00018-013-1545-4.

165. Non Hodgkin lymphoma subtype distribution, geodemographic patterns, and survival in the US: a longitudinal analysis of the National Cancer Data Base from 1998 to 2011 / M. Al-Hamadani, T. M. Haabermann, J. R. Cerhan [et al] // Am J Hematol. – 2015. – Vol. 90 (9). – P. 790–795. DOI: 10.1002/ajh.24086.

166. Ofori, K. Exosomes and extracellular vesicles as liquid biopsy biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: Current state of the art and unmet clinical needs / K. Ofori, G. Bhagat, A. J. Rai // Br J Clin Pharmacol. – 2021. – Vol. 87 (2). – P. 284–294. DOI: 10.1111/bcp.14611.

167. Ollila, T. A. Extranodal diffuse large b cell lymphoma: molecular features, prognosis, and risk of central nervous system recurrence / T. A. Ollila, A. J. Olszewski // Curr Treat Options Oncol. – 2018. – Vol. 19 (8). – P. 38. DOI: 10.1007/s11864-018-0555-8.

168. Oncogenic Mutations of MYD88 and CD79B in Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Implications for Clinical Practice / C. Visco, I. Tanasi, F. M. Quaglia [et al.] // Leukemia. – 2019. – Vol. 33. – P. 2662–2672. DOI: 10.3390/cancers12102913.

169. Oncogenic MYD88 mutations in lymphoma: novel insights and therapeutic possibilities / A. N. R. Weber, G. Y. Cardona, O. Cinar [et al.] // Cancer Immunol Immunother. – 2018. – Vol. 67 (11). – P. 1797–1807. DOI: 10.1007/s00262-018-2242-9.

170. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma / V. N. Ngo, R. M. Young, R. Schmitz [et al.] // Nature. – 2011. – Vol. 470 (7332). – P. 115–9. DOI: 10.1038/nature09671

171. Optimizing initial therapy in DLBCL / C. Thieblemont, S. Bernard,

M. Meignan [et al.] // Best Practice Res Clin Haem. – 2018. – Vol. 31 (3). – P. 199–208. DOI: 10.1016/j.beha.2018.08.001.

172. PATH-20. Comprehensive genomic profiling comparing primary CNS lymphoma to systemic diffuse large B cell lymphoma reveals biomarkers indicating potential benefit from immune checkpoint inhibitors / E. Severson, J-A. Vergilio, L. Gay [et al.] // Neuro-oncology. – 2017. – Vol. 19 (Suppl. 6). – P. 175–175. DOI: 10.1093/neuonc/nox168.711.

173. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group / E. Zucca, A. Conconi, T. Mughal [et al.] // J Clin Oncol. – 2003. – Vol. 21. – P. 20–7. DOI: 10.1200/JCO.2003.11.141.

174. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma / L. Nayak, F. M. Iwamoto, A. LaCasce [et al.] // Blood. – 2017. – Vol. 129 (23). – P. 3071–3. DOI: 10.1182/blood-2017-01-764209.

175. PDL1 regulation by p53 via miR-34 / M. A. Cortez, C. Ivan, D. Valdecanas [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2016. – Vol. 108. – P. 303. DOI: 10.1093/jnci/djv303.

176. Pharmacologic Inhibition of CXCL10 in Combination with Anti-malarial Therapy Eliminates Mortality Associated with Murine Model of Cerebral Malaria / NO Wilson, W Solomon, L Anderson [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8 (4). – P. e60898. DOI: 10.1371/journal.pone.0060898.

177. Phase 1 investigation of lenalidomide/rituximab plus outcomes of lenalidomide maintenance in relapsed CNS lymphoma / J. L. Rubenstein, H. Geng, E. J. Fraser [et al.] // Blood Adv. – 2018. – Vol. 2 (13). – P. 1595–1607. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017014845.

178. PIM1 gene cooperates with human BCL6 gene to promote the development of lymphomas / B. W. Baron, J. Anastasi, E. M. Hyjek [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2012. – Vol. 109 (15). – P. 5735–9.

DOI: 10.1073/pnas.1201168109.

179. Pim-1 kinase as cancer drug target: An update / Y. Tursynbay, J. Zhang, Z. Li [et al.] // *Biomedical Reports*. – 2016. – Vol. 4 (2). – P. 140–146. DOI: 10.3892/br.2015.561.

180. Precision Medicine in Lymphoma by Innovative Instrumental Platforms / A. Di Paolo, E. Arrigoni, G. Luci [et al.] // *Front Oncol*. – 2019. – Vol. 9. – P. 1417. DOI: 10.1101/cshperspect.a035444.

181. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels / Y. Choi, G. E. Sims, S. Murphy [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7 (10). – P. e46688. DOI: 10.1371/journal.pone.0046688.

182. Prevalence of Myd88 L265p mutation in histologically proven, diffuse large b-cell vitreoretinal lymphoma / H Raja, DR Salomão, DS Viswanatha, JS.Pulido // *Retina*. – 2016. – Vol. 36 (3). – P. 624–628. DOI: 10.1097/IAE.0000000000000996

183. Primary breast lymphoma: results of a controlled clinical trial / A. Avilés, S. Delgado, M. J. Nambo [et al.] // *Oncology*. – 2005. – Vol. 69. – P. 256–60. DOI: 10.1159/000088333.

184. Primary central nervous system lymphomas: a diagnostic overview of key histomorphologic, immunophenotypic, and genetic features / M. I. S. Lauw, C. – H. G. Lucas, S. R. Ohgami, K. W. Wen // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10 (12). – P. 1076. DOI: 10.3390/diagnostics10121076.

185. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations / S. Yamada, Y. Ishida, A. Matsuno, K. Yamazaki // *Leukemia & Lymphoma*. – 2014. – Vol. 56 (7). – P. 2141–2145. DOI: 10.3109/10428194.2014.979413.

186. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations / S. Yamada, Y. Ishida, A. Matsuno, K. Yamazaki // *Leuk Lymphoma*. – 2015. – Vol. 56 (7). – P. 2141–2145. DOI: 10.3109/10428194.2014.979413.

187. Prognostic impact of MYD88 mutation, proliferative index and cell

origin in diffuse large B cell lymphoma / L. Fogliatto, K. C. Grokoski, Y. M. Strey [et al.] // Hematol transfus cell ther. – 2019. – Vol. 41 (1). – P. 50–56. DOI: 10.1016/j.htct.2018.05.014.

188. PubMed : National library of medicine. National center for biotechnology information : [website]. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> (date of the application: 16.06.2021). – Text : electronic.

189. Qin, F. X. Dynamic behavior and function of FOXP3⁺ regulatory T cells in tumor bearing host / F. X. Qin // Cell. Mol. Immunol. – 2009. – Vol. 6 (1). – P. 3–13. DOI: 10.1038/cmi.2009.2.

190. Qualls, D. Advances in risk assessment and prophylaxis for central nervous system relapse in diffuse large B cell lymphoma / D. Qualls, J. S. Abramson // Haematological. – 2019. – Vol. 104 (1). – P. 25-34. DOI: 10.3324/haematol.2018.195834.

191. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma / A. Younes, L. H. Sehn, P. Johnson [et al.] // J Clin Oncol. – 2019. – Vol. 37 (15). – P. 1285–1295. DOI: 10.1200/JCO.18.02403.

192. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma / A. Younes, L. H. Sehn, P. Johnson [et al.] // J Clin Oncol. – 2019. – Vol. 37 (15). – P. 1285–1295. DOI: 10.1200/JCO.18.02403.

193. Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas / T. Nakamura, K. Tateishi, T. Niwa [et al.]. – Neuropathol Appl Neurobiol/ – 2016. – Vol. 42 (3). – P. 279–290. DOI: 10.1111/nan.12259.

194. Recurrent mutations of MYD88 and TBL1XR1 in primary central nervous system lymphomas / A. Gonzalez-Aguilar, A. Idhah, B. Boisselier [et al.] // Clin Cancer Res. – 2012. – Vol. 18 (19). – P. 5203–11. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0845.

195. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors / M. E. Salem, J. N. Bodor, A. Puccini [et al.] // *Int J Cancer*. – 2020. – Vol. 147 (10). – P. 2948–2956. DOI: 10.1002/ijc.33115.

196. Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for B-Cell lymphomas / B. George, S. M. Chowdhury, A. Hart [et al.] // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12 (5). – P. 1328. DOI: 10.3390/cancers12051328.

197. Risk-tailored CNS prophylaxis in a mono-institutional series of 200 patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era / A. J. Ferreri, M. Bruno-Ventre, G. Donadoni [et al.] // *Br J Haematol*. – 2015. – Vol. 168 (5). – P. 654–62. DOI: 10.1111/bjh.13194.

198. Rituximab plus hyper-CVAD alternating with MTX/Ara-C in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: 15 year follow up of a phase II study from MD Anderson Cancer Center / D. Chihara, C. Y. Cheah, J. R. Westin [et al.] // *Br J Haematol*. – 2016. – Vol. 172 (1). – P. 80–8. DOI: 10.1111/bjh.13796.

199. Role of the Blood-Brain Barrier in the Formation of Brain Metastases / I. Wilhelm, J. Molnár, C. Fazakas [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2013. – Vol. 14. – P. 1383–1411. DOI: 10.3390/ijms14011383.

200. Savage, K. J. Secondary CNS relapse in diffuse large B-cell lymphoma: defining high-risk patients and optimization of prophylaxis strategies / K. J. Savage // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. – 2017. – Vol. 2017 (1). – P. 578–86. DOI: 10.1182/asheducation-2017.1.578.

201. Schmitz, N. Advances in the Treatment of Secondary CNS Lymphoma / N. Schmitz, H. S. Wu // *J Clin Oncol*. – 2015. – Vol. 33 (33). – P. 3851–3. DOI: 10.1200/JCO.2015.63.1143.

202. Schmitz, N. Central nervous system prophylaxis for aggressive B-cell lymphoma: who, what, and when? / N. Schmitz, M. Nickelsen, K. J. Savage // *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2016. – Vol. 30 (6). – P. 1277–91. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.07.008.

203. Shimkus, G. Molecular classification and therapeutics in diffuse large B-cell Lymphoma / G. Shimkus, T. Nonaka // *Front Mol Biosci.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1124360. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1124360.

204. Site of central nervous system (CNS) relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by the CNS-IPI risk model / R. Kansara, D. Villa, A. S. Gerrie [et al.] // *Br J Haematol.* – 2017. – Vol. 179 (3). – P. 508–10. DOI: 10.1111/bjh.14229.

205. Skvortsova, V. I. Arterial'naya gipertoniya i tserebrovaskulyarnye narusheniya / V. I. Skvortsova // *Systemic Hypertension.* – 2005. – Vol. 2 (2). – P. 3–10.

206. SRA method and server for predicting damaging missense mutations / I. A. Adzhube, S. Schmidt, L. Peshkin [et al.] // *Nat Methods.* – 2010. – Vol. 7 (4). – P. 248–249.

207. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): Joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC) / P. Horak, M. Grif, A. M. Danos [et al.] // *Genet Med.* – 2022. – Vol. 24 (5). – P. 986–998. DOI: 10.1016/j.gim.2022.01.001.

208. STAT-3 RNAscope Determination in Human Diffuse Large B-Cell Lymphoma / R. Tamma, G. Ingravallo, F. Albano [et al.] // *Transl Oncol.* – 2019. – Vol. 12 (3). – P. 545–549. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.12.008.

209. Sushkou, S. A. Pericytes as a Potential Source of Neoangiogenesis / S. A. Sushkou, E. I. Lebedeva, O. D. Myadelets // *Novosti Khirurgii.* – 2019. – Vol. 27 (2). – P. 212–221. DOI: 10.18484/2305-0047.2019.2.212.

210. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas / B. Chapuy, M. G. M. Roemer, C. Stewart [et al.] // *Blood.* – Vol. 127 (7). – P. 869–881. DOI: 10.1182/blood-2015-10-673236.

211. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas / B. Chapuy, M. G. M. Roemer, C. Stewart [et al.] // *Blood.* – 2016. – Vol. 127 (7). – P. 869–881. DOI: 10.1182/blood-2015-10-673236.

212. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S. H. Swerdlow, E. Campo, S. A. Pileri [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127 (20). – P. 2375–2390. DOI: 10.1182/blood-2016-01-643569.

213. The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis / R. Vazirinejad, Z. Ahmadi, M. K. Arababadi [et al.] // *Neuroimmunomodulation*. – 2014. – Vol. 21 (6). – P. 322–330 DOI: 10.1159/000357780.

214. The cBioPortal for cancer genomics : [website]. – URL: <http://cbioportal.org> (date of the application: 24.05.2022). – Text : electronic.

215. The genetic landscape of mutations in Burkitt lymphoma/ C. Love, Z. Sun, D. Jima [et al.] // *Nat Genet*. – 2012. – Vol. 44 (12). – P. 1321–1325. DOI: 10.1038/ng.2468.

216. The genomic landscape of two Burkitt lymphoma cases and derived cell lines: comparison between primary and relapse samples / C. M. Wever, D. Geoffrion, B. M. Grande [et al.] // *Leuk Lymphoma*. – 2018. – Vol. 59 (9). – P. 2159–2174. DOI: 10.1080/10428194.2017.1413186.

217. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development / A. Ortega-Molina, I. Boss, A. Canela [et al.] // *Nat Med*. – 2015. – Vol. 21. – P. 1199–1208. DOI: 10.1038/nm.3943.

218. The Immunology of DLBCL / T. Takahara, S. Nakamura, T. Tsuzuki, A. Satou // *Cancers*. – 2023. – Vol. 15 (3). – P. 835. DOI: 10.3390/cancers15030835

219. The impact of diffuse large B-cell lymphoma-derived exosomes on macrophage polarisation and cytokine release / H. Ling, Z. Yang, Y. Sun [et al.]. – Text : electronic // *Archives of Medical Science*, 2020. – URL : <https://www.archivesofmedicalscience.com/pdf-124646-59563?filename=The%20impact%20of%20diffuse.pdf>. (date of the application : 17.09.2022).

220. The Janus kinase inhibitor ruxolitinib reduces HIV replication in human macrophages and ameliorates HIV encephalitis in a murine model / W. B. Haile,

C. Gavegnano, S. Tao [et al.] // *Neurobiol Dis.* – 2016. – Vol. 92 (Pt B). – P. 137–43. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.02.007.

221. The landscape of tumor cell states and ecosystems in diffuse large B cell lymphoma/ C. B. Steen, B. A. Luca, M. S. Esfahani [et al.] // *Cancer Cell.* – 2021. – Vol. 39 (10). – P. 1422–1437. DOI: 10.1016/j.ccell.2021.08.011.

222. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis / N. K. Altorki, G. J. Markowitz, D. Gao [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2019. – Vol. 19 (1). – P. 9–31. DOI: 10.1038/s41568-018-0081-9.

223. The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma / R. Wagener, J. Seufert, F. Raimondi [et al.] // *Blood.* – 2019. – Vol. 133 (9). – P. 962–966. DOI: 10.1182/blood-2018-07-864025.

224. The mutational pattern of primary lymphoma of the central nervous system determined by whole-exome sequencing / I. Vater, M. Montesinos-Rongen, M. Schlesner [et al.] // *Leukemia.* – 2015. – Vol. 29 (3). – P. 677–685. DOI: 10.1038/leu.2014.264.

225. The number of extranodal sites assessed by PET/CT scan is a powerful predictor of CNS relapse for patients with diffuse large B-cell lymphoma: an international multicenter study of 1532 patients treated with chemoimmunotherapy / T. El-Galaly, D. Villa, T. Y. Michaelsen [et al.] // *Eur J Cancer.* – 2017. – Vol. 75. – P. 195–203. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.12.029.

226. The plasminogen activation system in neuroinflammation / A. Mehra, C. Ali, J. Parcq [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2016. – Vol. 1862. – P. 395–402. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.10.011.

227. The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma / H.-P. Kuo, S. A. Ezell, S. Hsieh [et al.] // *Am J Cancer Res.* – 2016. – Vol. 6 (11). – P. 2489–2501.

228. The roles of mutated SWI/SNF complexes in the initiation and development of hepatocellular carcinoma and its regulatory effect on the immune

system: A review / B. Hu, J.-Z. Lin, X.-B. Yang, X.-T. Sang // Cell Proliferation. – 2020. – Vol. 53 (4). – P. e12791. DOI: 10.1111/cpr.12791.

229. Thompson, W. L. Inflammatory cytokines stimulate the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK dependent pathways in rat astrocytes [corrected] / W. L. Thompson, L. J. Van Eldik // Brain research. – 2009. – Vol. 1287. – P. 47–57. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.06.081.

230. Timing of high-dose methotrexate CNS prophylaxis in DLBCL: a multicenter international analysis of 1384 patients / M. R. Wilson, T. A. Eyre, A. A. Kirkwood [et al.] // Blood. – 2022. – Vol. 139 (16). – P. 2499–2511. DOI: 10.1182/blood.2021014506.

231. Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation / W. A. Banks, P. Sharma, K. M. Bullock [et al.] // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21 (12). – P. 4407. DOI: 10.3390/ijms21124407.

232. Treatment and Prevention of Secondary CNS Lymphoma / S. Nagpal, M. J. Glantz, L. Recht // Semin Neurol. – 2010. – Vol. 30 (3). – P. 263–272. DOI: 10.1055/s-0030-1255222.

233. Tsang, M. Primary central nervous system lymphoma in older adults and the rationale for maintenance strategies: a narrative review / M. Tsang, J. L. Rubenstein, E. J. Pulczynski // Ann Lymphoma. – 2021. – Vol. 5. – P. 25. DOI: 10.21037/aol-20-43.

234. Tumor mutational burden quantification from targeted gene panels: major advancements and challenges / L. Fancello, S. Gandini, P. G. Pelicci [et al.] // J. immunotherapy cancer. – 2019. – Vol. 7. – P. 183. DOI: 10.1186/s40425-019-0647-4.

235. Use of TransFix™ cerebrospinal fluid storage tubes prevents cellular loss and enhances flow cytometric detection of malignant hematological cells after 18 hours of storage / A. H. de Jongste, J. Kraan, P. D. van den Broek [et al.] // Cytometry B Clin Cytom. – 2014. – Vol. 86 (4). – P. 272–279. DOI: 10.1002/cyto.b.21097.

236. Uterine, but not ovarian, female reproductive organ involvement at presentation by diffuse large B-cell lymphoma is associated with poor outcomes and a high frequency of secondary CNS involvement / T. C. El-Galaly, C. Y. Cheah, M. Hutchings [et al.] // *Br J Haematol.* – 2016. – Vol. 175. – P. 876–83. DOI: 10.1111/bjh.14325.

237. Villeneuve, A. Meningeal marginal zone B-cell lymphoma: The meningioma trap/ A. Villeneuve, F. Rubin, P. Bonfils // *European Annals of Otorhinolaryngology Head and Neck Diseases.* – 2018. – Vol. 135 (2). – P. 131–132. DOI: 10.1016/j.anorl.2017.12.002.

238. Wellenstein, M. D. Cancer-cell-intrinsic mechanisms shaping the tumor immune landscape / M. D. Wellenstein, K. E. de Visser // *Immunity.* – 2018. – Vol. 48 (3). – P. 399–416. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.004.

239. What does the concept of the stem cell niche really mean today? / A. D. Lander, J. Kimble, H. Clevers [et al.] // *BMC Biol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 19. DOI: 10.1186/1741-7007-10-19.

240. Whole-brain radiotherapy or autologous stem-cell transplantation as consolidation strategies after high-dose methotrexate-based chemoimmunotherapy in patients with primary CNS lymphoma: results of the second randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 phase 2 trial / A. J. M. Ferreri, K. Cwynarski, E. Pulczynski [et al.] // *Lancet Haematol.* – 2017. – Vol. 4 (11). – P. e510–e523. DOI: 10.1016/S2352-3026(17)30174-6.

241. Zeeshan, R. Cancer metastasis – tricks of the trade / R. Zeeshan, Z. Mutahir // *Bosn J Basic Med Sci.* – 2017. – Vol. 17 (3). – P. 172–182. Cancer metastasis - tricks of the trade.

242. Zhang, J. Drug-Resistance Mechanism and New Targeted Drugs and Treatments of Relapse and Refractory DLBCL / J. Zhang, Y. Gu, B. Chen // *Cancer Manag Res.* – 2023. – Vol. 15. – P. 245–255. DOI: 10.2147/CMAR.S400013.

243. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type / A. Pham-Ledard, D. Cappellen, F. Martinez

[et al.] // Journal of Investigative Dermatology. – 2012. – Vol. 132 (8). – P. 2118–2120. DOI: 10.1038/jid.2012.102.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Строение гематоэнцефалического барьера, нейроваскулярная единица. С. 18
2. Рисунок 2 – Механизмы транспорта веществ через гематоэнцефалический барьер. С. 22
3. Рисунок 3 – Этапы метастазирования лимфомных клеток через гематоэнцефалический барьер. С. 29
4. Рисунок 4 – Дизайн исследования. С. 68
5. Рисунок 5 – Электрофореграмма результатов генотипирования образцов ДНК на наличие мутации p.L265P в гене *MYD88*: образец 1 – гетерозигота по мутации p.L265P (фрагменты 148 п. н. и 124 п. н.); образцы 2, 4, 5 – нормальные гомозиготы (фрагмент 124 п. н.); образец 3 – гомозигота по мутации p.L265P; М – маркер молекулярных весов 100 п. н. С. 89
6. Рисунок 6 – Локализация и частота поражений структур головного и спинного мозга у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой группы исследования. С. 100
7. Рисунок 7 – Общая выживаемость больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы: Group 1 – первичная лимфома центральной нервной системы; Group 2 – вторичное поражение центральной нервной системы при системной диффузной В-крупноклеточной лимфоме. . . С. 105
8. Рисунок 8 – Количество мутаций в диагностических образцах больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания (А) и без поражения центральной нервной системы (Б). С. 107
9. Рисунок 9 – Наиболее частые мутации в генах в группе больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. С. 109

10. Рисунок 10 – Сочетание мутаций в генах *MYD88*, *PIM1*, *CD79B*, *ARID1A* и *SMARCA4* у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой по данным CBioPortal for Cancer Genomics database: А – диффузная В-крупноклеточная лимфома без поражения центральной нервной системы; Б – диффузная В-крупноклеточная лимфома с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания; В – ABC-like подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы; Г – GBC-like подтип диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Розовым отмечены случаи заболевания с мутациями. С. 112
11. Рисунок 11 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 1: А – *MSH2* p.E262K; Б – *MYD88* p.L265R; В – *PIM1* p.K194N и p.195_198del; Г – *CARD11* p.D230N; Д – *NOTCH1* p.P1390T; Е – *TP53* p.R116Q; Ж – *CD79B* p.L95P; И – *SMARCA4* p.E187fs. С. 115
12. Рисунок 12 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности *TP53* p.M105T пациента № 2. С. 116
13. Рисунок 13 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 3: А – *MSH2* p.D475H; Б – *MYD88* p.V204F; В – *PIM1* p.E135Q; Г – *CD79B* p.Y196N; Д – *ARID1A* p.Q1212HfsX4. С. 117
14. Рисунок 14 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 4: *KMT2D* p.G2279R. С. 118
15. Рисунок 15 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 5: А – *MSH6* p.V921I; Б – *MYD88* p.L265R; В – *KMT2D* p.Q3683X; Г – *CIITA* p.P809fs; Д – *TP53* p.R141H; Е – *EP300* p.F1448S. С. 119
16. Рисунок 16 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 6: А – *CD58* p.C22X; Б – *MYD88* p.L265R; В – *PIM1* p.G78E; Г – *GNA13* p.R360C; Д – *BCL2* p.G193R. . . С. 120

17. Рисунок 17 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 7: А – *ARID1A* p.Q1334del; Б – *CD79B* p.G198_D202del; В – *CD79B* p.G160VfsX4. С. 121
18. Рисунок 18 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 8: А – *PIM1* p.L80L; Б – *CD79B* p.E197GfsX6. С. 121
19. Рисунок 19 – Выравнивание варианта нуклеотидной последовательности пациента № 9: А – *STAT6* p.E444K, Б – *СИТА* p.L641R, В – *СИТА* p.Q1118X, Г – *SOCS1* p.R66-A70del. С. 122
20. Рисунок 20 – Секвенограммы варианта нуклеотидной последовательности: А – *MYD88* p.L265R; Б – *NOTCH1* p.P1390T; В – *TP53* p.R116Q; Г – *CD79B* p.L95P; Д – *MSH2* p.D475H; Е – *MYD88* p.V204F; Ж – *PIM1* p.E135Q; И – *CD79B* p.Y196N; К – *TP53* p.R141H; Л – *PIM1* p.G78E; М – *PIM1* p.L80L; Н – *CD79B* p.E197GfsX6. С. 128
21. Рисунок 21 – Результаты ПЦР с фланкирующими праймерами, электрофорез в 12 % полиакриламидном геле: 1 – контрольный ампликон длиной 202 п. н.; 2 – *ARID1A* p.Q1334del (202 + 199) п. н.; 3 – контрольный ампликон длиной 270 п. н.; 4 – *CD79B* p.G198_D202del (270 + 255) п. н.; М – маркер молекулярной массы 100 п. н.; 5 – контрольный ампликон длиной 270 п. н.; 6 – *PIM1* p.195_198del (270 + 261) п. н.; 7 – контрольный ампликон длиной 182 п. н.; 8 – *SMARCA4* p.E187fs (182 + 179) п. н.). С. 129
22. Рисунок 22 – Распределение выявленных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности по функциональным доменам генов *ARID1A*, *CD79B*, *MYD88*, *MSH2* и *PIM1*. С. 133
23. Рисунок 23 – Распределение выявленных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности по функциональным доменам генов *TP53*, *СИТА* и *KMT2D*. С. 134

24. Рисунок 24 – Совместное выявление и взаимное исключение вариантов нуклеотидной последовательности в группе исследования. . С. 135
25. Таблица 1 – Прогностические модели рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы. С. 50
26. Таблица 2 – Дополнительные факторы прогноза, ассоциированные с развитием рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы с поражением центральной нервной системы. С. 52
27. Таблица 3 – Частоты мутаций при различных подтипах диффузной В-крупноклеточной лимфомы для генов «Лимфопанели» из исследования LYSA Study. С. 58
28. Таблица 4 – Наиболее частые мутации при первичной диффузной В-крупноклеточной лимфомы центральной нервной системы по данным литературы. С. 61
29. Таблица 5 – Клиническая характеристика пациентов из базы данных CBioPortal for Cancer Genomics database. С. 69
30. Таблица 6 – Клиническая характеристика пациентов из группы исследования, имеющих поражение центральной нервной системы. . . . С. 72
31. Таблица 7 – Клинические проявления поражения центральной нервной системы у больных группы исследования. С. 74
32. Таблица 8 – Характер поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме в группе исследования. . . . С. 75
33. Таблица 9 – Характеристика основных лабораторных параметров в группе исследования. С. 77
34. Таблица 10 – Отклонения в лабораторных параметрах в группе исследования. С. 78
35. Таблица 11 – Иммуногистохимические варианты диффузной В-крупноклеточной лимфомы. С. 78
36. Таблица 12 – Краткая характеристика больных системной

диффузной В-крупноклеточной лимфомой без вовлечения центральной нервной системы.	C. 80
37. Таблица 13 – Краткая характеристика пациентов с вторичным поражением центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме, которым было выполнено высокопроизводительное секвенирование.	C. 82
38. Таблица 14 – Последовательности применяемых праймеров, температуры отжига и длины получаемых ампликонов.	C. 86
39. Таблица 15 – Клинико-демографическая характеристика пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	C. 92
40. Таблица 16 – Характер поражения центральной нервной системы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме в группе исследования.	C. 95
41. Таблица 17 – Результаты лабораторно-инструментальных методов исследования у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой.	C. 97
42. Таблица 18 – Сравнение частот мутаций у больных лимфомой без вовлечения центральной нервной системы и с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания (данные CBioPortal for Cancer Genomics database).	C. 108
43. Таблица 19 – Оценка сочетаний мутаций в генах MYD88, PIM1, CD79B, ARID1A и SMARCA4 при диффузной В-крупноклеточной лимфоме с поражением центральной нервной системы в рецидиве заболевания по данным CBioPortal for Cancer Genomics database.	C. 110
44. Таблица 20 – Частота мутаций в генах MYD88, PIM1, CD79B, ARID1A, INO80 и SMARCA4 при различных подтипах лимфомы по данным CBioPortal for Cancer Genomics database.	C. 111
45. Таблица 21 – Относительный риск рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы в центральной нервной системе при выявлении мутаций в генах MYD88, PIM1, CD79B, INO80, ARID1A и	

<i>SMARCA4</i> по данным CBioPortal for Cancer Genomics database. . . .	C. 113
46. Таблица 22 – Данные секвенирования образцов опухоли пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой, у которых в рецидиве заболевания развилось поражение центральной нервной системы. . .	C. 123
47. Таблица 23 – Функциональный анализ выявленных вариантов нуклеотидной последовательности с помощью предикторных программ.	C. 131
48. Таблица 24 – Категоризация обнаруженных в группе исследования вариантов нуклеотидной последовательности согласно рекомендациям.	C. 137