

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»)

Plasma Cell-Free DNA in Patients with Diffuse Large B-Cell and B-Cell High-Grade (Double Hit/Triple Hit) Lymphomas

С.Ю. Смирнова, Е.Е. Никулина, Н.Г. Габеева,
Д.А. Королева, С.А. Татарникова, А.К. Смольянинова,
Э.Г. Гемджян, Е.Е. Звонков, А.Б. Судариков

SYu Smirnova, EE Nikulina, NG Gabeeva, DA Koroleva,
SA Tatarnikova, AK Smol'yaninova, EG Gemdzhian,
EE Zvonkov, AB Sudarikov

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России,
Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

National Research Center for Hematology,
4 Novy Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель. Исследование концентрации свободно циркулирующей ДНК плазмы (сцДНК_n) и В-клеточной клональности у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности до начала и на различных этапах противоопухолевой терапии, а также связи полученных данных с клинико-лабораторными параметрами.

Aim. To study plasma cell-free DNA (pcfDNA) concentration and B-cell clonality in patients with diffuse large B-cell (DLBCL) and B-cell high-grade lymphomas prior to and at different stages of chemotherapy as well as the correlation between the data obtained and clinical and laboratory parameters.

Материалы и методы. В анализ включены 23 больных ДВКЛ и 7 здоровых доноров (ЗД). Плазму получали из цельной крови центрифугированием, сцДНК_n выделяли коммерческим набором Qiagen (Германия). Концентрацию сцДНК_n определяли на флуориметре Qubit (США). В-клеточную клональность оценивали путем исследования генов иммуноглобулинов (протокол BIOMED-2) в биоптате опухолевой ткани и материале костного мозга (трепанобиопсия), полученных при постановке диагноза, а также в сцДНК_n в 5 контрольных точках: до противоопухолевого лечения, после 1, 2, 3 и 4 курсов терапии.

Materials & Methods. The study enrolled 23 DLBCL patients and 7 healthy donors (HD). Plasma was prepared from whole blood by centrifugation, pcfDNA was isolated with the commercial kit Qiagen (Germany). The concentration of pcfDNA was determined using fluorometer Qubit (USA). B-cell clonality was estimated by immunoglobulin gene analysis (BIOMED-2 protocol) in the tumor tissue and bone marrow core biopsy specimens obtained on diagnosis date as well as in the pcfDNA at 5 end points: prior to chemotherapy and after cycles 1, 2, 3, and 4.

Результаты. У всех больных ДВКЛ до начала терапии концентрация сцДНК_n была достоверно выше, чем у ЗД. После 1 курса иммунохимиотерапии отмечено значимое увеличение концентрации сцДНК_n. После 2-го и последующих курсов наблюдалось постепенное снижение концентрации сцДНК_n. После 4-го курса противоопухолевого лечения средняя концентрация сцДНК_n оказалась сопоставимой с таковой у ЗД. У 95 % больных В-клеточная клональность в сцДНК_n соответствовала обнаруженной в материале опухоли. После 1-го курса иммунохимиотерапии В-клеточная клональность выявлена у 50 % больных, после 2-го курса — у 15 %. Только у 1 пациентки В-клеточная клональность сохранялась после 3-го и 4-го курсов терапии. У ЗД В-клеточной клональности в сцДНК_n

Results. Prior to therapy, all DLBCL patients showed significantly higher pcfDNA concentration than HD. Immunochemotherapy cycle 1 resulted in considerable increase in pcfDNA concentration. After cycle 2 and subsequent cycles, pcfDNA concentration gradually decreased. After cycle 4, the mean pcfDNA concentration was comparable with that of HD. In 95 % of patients B-cell clonality in pcfDNA corresponded to that identified in the tumor specimen. After immunochemotherapy cycle 1, B-cell clonality was detected in 50 % of patients, after cycle 2 it was shown by 15 %. Only 1 female patient retained B-cell clonality after therapy cycles 3 and 4. In HD, no B-cell clonality in pcfDNA was identified. Prior to therapy, the analysis revealed no correlation of either pcfDNA concentration or B-cell clonality in pcfDNA with age, sex, tumor spread, presence or absence of extranodal lesions, proliferation index Ki-67, and lactate dehydrogenase concentration.

Conclusion. In patients with malignant hematological tumors, pcfDNA seems to be an interesting, easily accessi-

не выявлено. До лечения корреляции концентрации сцДНК_n и В-клеточной клональности в сцДНК_n с возрастом, полом, распространенностью опухолевого процесса, наличием или отсутствием экстранодальных поражений, индексом пролиферативной активности Ki-67, концентрацией лактатдегидрогеназы не установлено.

Заключение. СцДНК_n у пациентов со злокачественными гематологическими опухолями представляет собой интересный, доступный, но малоизученный биологический материал. СцДНК по мере накопления информации может стать важным диагностическим маркером опухолевой гетерогенности и надежным предиктором развития рецидива.

Ключевые слова: свободно циркулирующая ДНК, плазма, диффузная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, жидкостная биопсия.

Получено: 5 октября 2022 г.

Принято в печать: 3 марта 2023 г.

Для переписки: Светлана Юрьевна Смирнова, канд. мед. наук, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(926)879-65-94; e-mail: smirnova-s-ju@yandex.ru

Для цитирования: Смирнова С.Ю., Никулина Е.Е., Габеева Н.Г. и др. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»). Клиническая онкогематология. 2023;16(2):200–8.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208

ble biological material deserving further investigation. With more and more information, pcfDNA can become an important diagnostic marker of tumor heterogeneity and a reliable relapse predictor.

Keywords: cell-free DNA, plasma, diffuse large B-cell lymphoma, B-cell high-grade lymphoma, liquid biopsy.

Received: October 5, 2022

Accepted: March 3, 2023

For correspondence: Svetlana Yurevna Smirnova, MD, PhD, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(926)879-65-94; e-mail: smirnova-s-ju@yandex.ru

For citation: Smirnova SYu, Nikulina EE, Gabeeva NG, et al. Plasma Cell-Free DNA in Patients with Diffuse Large B-Cell and B-Cell High-Grade (Double Hit/Triple Hit) Lymphomas. Clinical oncohematology. 2023;16(2):200–8. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208

ВВЕДЕНИЕ

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВКЛ) занимает 1-е место в структуре заболеваемости В-клеточными лимфомами и представляет собой крайне гетерогенную группу опухолей лимфоидной ткани, характеризующихся различающимися клиническими проявлениями, ответом на лечение, иммуногистохимическими, иммунофенотипическими признаками, цитогенетическим и молекулярно-генетическим профилями [1]. Стандартом иммунохимиотерапии ДВКЛ является курс R-CHOP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин, винкристин, преднизолон), который позволяет достичь стойкой ремиссии у 90 % пациентов с I–II стадией заболевания, но малоэффективен у пациентов с III–IV стадией и массивным («bulky») опухолевым поражением [2]. По молекулярно-генетическому профилю опухолевых клеток ДВКЛ разделяют на подтипы, некоторые из которых характеризуются неблагоприятным прогнозом и изначально требуют интенсификации противоопухолевой терапии [3–5].

Одной из проблем в лечении неходжкинских лимфом (НХЛ) как с начальными, так и поздними стадиями остается контроль заболевания в процессе противоопухолевой терапии. Для оценки эффективности лечения рекомендуется использование позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с компью-

терной томографией (ПЭТ/КТ), на различных этапах и после окончания программы в целом [6, 7]. Однако, как и другие методы визуализации (УЗИ, МРТ, КТ), ПЭТ/КТ имеет свои недостатки. Один из них заключается в высокой частоте ложноположительных результатов, обусловленных воспалительными/инфекционными осложнениями и гиперплазией тимуса [8, 9], особенно у молодых пациентов. Кроме того, немаловажной проблемой остается повышение вероятности развития второго онкологического заболевания вследствие увеличения лучевой нагрузки [10]. Следует также отметить повышение уровня тревожности у пациентов, которым необходимо после достижения ремиссии и окончания лечения проходить контрольные обследования в течение нескольких лет [11]. В настоящее время есть все больше исследований, в которых подтверждается возможность мониторинга агрессивных НХЛ с помощью молекулярных методов оценки остаточной опухоли без проведения лучевой диагностики [12, 13].

Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) возможна с помощью таких высокочувствительных лабораторных методов, как многоцветная проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование нового поколения (NGS). При этом доступность биологического материала для исследования МОБ имеет первостепенное значение. Костный мозг служит хорошим материалом для контроля МОБ

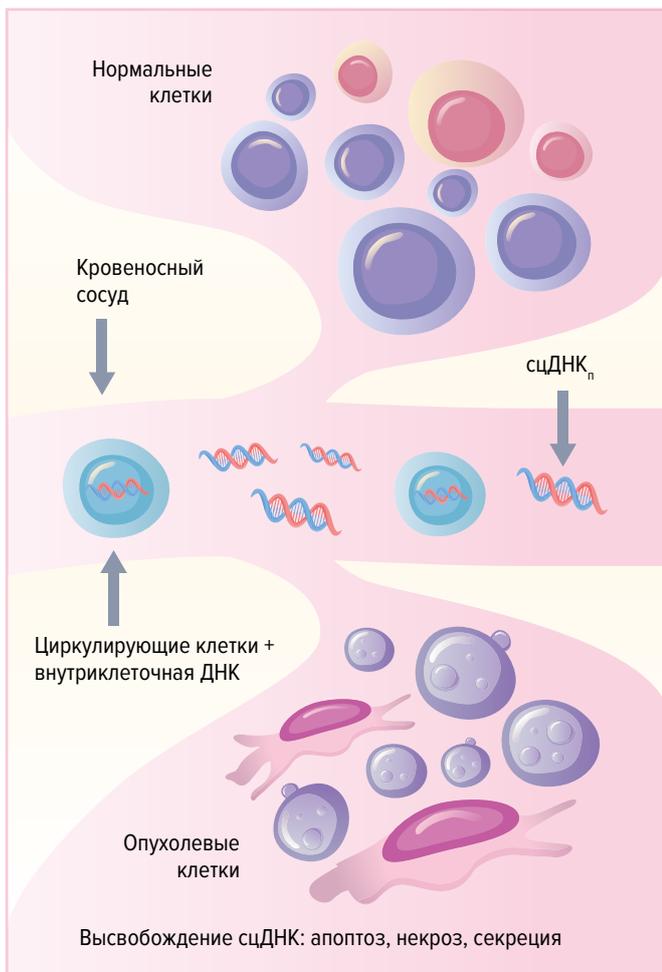


Рис. 1. Свободно циркулирующая ДНК (сцДНК) опухолевых клеток в плазме и сыворотке. Механизм высвобождения сцДНК до конца неизвестен. Предполагается, что это происходит в процессе апоптоза, некроза опухолевых клеток и секреции внеклеточных везикул опухолевыми клетками

Fig. 1. Plasma and serum cell-free DNA (сцДНК) of tumor cells. The release mechanism of cfDNA is not entirely clear. It is assumed to occur in the course of apoptosis, tumor cell necrosis, and extracellular vesicle secretion by tumor cells

при лейкозах, однако применение данных методов при агрессивных лимфомах без вовлечения костного мозга невозможно. Поражение костного мозга при ДВКЛ наблюдается лишь в 3–5 % случаев [1]. Согласно литературным данным, исследование В-клеточной клональности с помощью молекулярного метода в пунктате костного мозга позволяет выявить дополнительные 7 % случаев его вовлечения, которые не диагностируются при гистологическом исследовании трепанобиоптата [14]. В настоящее время в центре внимания исследователей и клиницистов находится так называемая жидкостная биопсия, которая представляет собой новый метод, обеспечивающий более универсальный подход к получению информации об опухоли. Нуклеиновые кислоты (НК) попадают в межклеточную жидкость из нормальных и опухолевых клеток. Они свободно циркулируют (сц) в плазме, отражают гетерогенность опухоли и позволяют прогнозировать развитие резистентности и рецидива заболевания [15–39] даже при локальных поражениях (рис. 1).

У человека впервые сцНК выделена из плазмы здоровых доноров в 1948 г. [40] и описана французскими исследователями Р. Mandel и Р. Metais. В 1987 г. М. Stroun и соавт. выделили и охарактеризовали сцДНК плазмы (сцДНК_n) у пациентов с опухолевыми заболеваниями [41]. К настоящему времени известно, что сцДНК представляет собой двухцепочечные фрагменты длиной в среднем 130–170 пар нуклеотидов. Предположительно, сцДНК высвобождаются в результате фрагментации нуклеосом гемопоэтических клеток нуклеазами [42]. У пациентов со злокачественными заболеваниями опухолевая сцДНК в основном высвобождается в процессе апоптоза опухолевых клеток. Однако, учитывая размеры сцДНК (от 150 пар нуклеотидов до нескольких тысяч), ее высвобождение происходит также в результате некроза опухолевых клеток и путем секреции внеклеточных везикул [43]. В современных исследованиях показано, что концентрация сцДНК_n у пациентов с ДВКЛ коррелирует с агрессивностью лимфомы, объемом опухоли и стадией заболевания, а также может определять ответ на противоопухолевую терапию и прогноз в целом [13, 33–35, 37]. Более того, согласно литературным данным, обнаруживается высокий уровень соответствия мутаций, выявленных в сцДНК_n крови и в опухолевом материале на момент диагностики у пациентов с ДВКЛ. Использование NGS-панелей для секвенирования ряда генов, включая *STAT6*, *CD79B*, *MYD88*, *CD58*, *GNA13*, *MYC*, *CREBBP*, *BCL2*, *PIM1*, *TP53*, *EZH2*, *MEF2B*, *B2M*, на материале сцДНК_n крови позволяет до начала лечения разделить пациентов на подгруппы в соответствии с молекулярно-генетическим профилем так же эффективно, как и проведение NGS на материале биоптатов опухоли [13, 25, 32]. Кроме того, использование таких NGS-панелей для сцДНК_n позволит в дальнейшем проводить динамическое исследование МОБ у абсолютного большинства (87 %) пациентов [13, 25, 28–30, 32].

В качестве универсального опухолевого маркера для оценки МОБ при лимфопролиферативных заболеваниях могут использоваться клональные реаранжировки генов иммуноглобулинов. В настоящей работе мы исследовали концентрацию сцДНК_n и В-клеточную клональность методом фрагментного анализа у пациентов с ДВКЛ на различных этапах противоопухолевой терапии и после ее окончания, а также связь полученных данных с клинико-лабораторными параметрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включено 23 пациента с агрессивными НХЛ, которые проходили обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава РФ с октября 2018 г. по декабрь 2021 г. Соотношение мужчин/женщин 1,5:1. Медиана возраста пациентов составила 44 года (диапазон 24–74 года). Среди них было 15 (65 %) пациентов с диагнозом ДВКЛ, 8 (35 %) — В-лимфомы высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»). Диагноз поставлен согласно критериям классификации ВОЗ 2017 г. Лечение пациентов проводили по схемам протокола R-mNHL-BFM-90. В исследование

также включено 7 здоровых доноров. Соотношение мужчин/женщин 1,5:1. Медиана возраста здоровых доноров составила 37 лет (диапазон 27–47 лет).

Плазму получали из цельной крови (пробирки с ЭДТА), центрифугируя трижды по 20 мин: 2 раза при 800 g для отделения от клеточной фракции и 1 раз при 13 000 g для отделения от «обломков» клеток. Плазму отделяли в течение часа с момента взятия образца венозной крови, чтобы избежать разрушения сцДНК_n ДНКазами, лизиса ядродержащих клеток. сцДНК_n выделяли коммерческим набором (Qiagen, Германия) из плазмы. Для предотвращения разрушения сцДНК_n плазму хранили при температуре –40 °С. По литературным данным, количество сцДНК_n снижается на 30 % в течение 1 года хранения при температуре –20 °С. Кроме того, не рекомендуется размораживать плазму более 2 раз, что позволяет снизить риск деградации ДНК [24]. Концентрацию сцДНК_n определяли на флуориметре Qubit и амплификацией фрагмента контрольного гена (β -глобина). Оценку В-клеточной клональности проводили путем исследования генов тяжелой и легкой κ -цепей иммуноглобулинов (*IgH* и *IgK*) по протоколу BIOMED-2 [44] в материале биопсии, полученном при постановке диагноза, а также в материале костного мозга и крови на момент диагностики, в сцДНК_n в 5 контрольных точках: до противоопухолевого лечения, после 1, 2, 3 и 4 курсов терапии.

Статистический анализ

Статистический анализ включал методы описательной статистики, регрессионный и частотный (точный критерий Фишера) анализы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включено 23 больных с агрессивными НХЛ и 7 здоровых доноров. Распределение пациентов по стадиям Ann Arbor в модификации Cotswold было следующим: 3 (13 %) — I стадия, 6 (26 %) — II стадия, 14 (61 %) — IV стадия. Экстранодальная локализация первичного очага имела место у 10 (43 %) пациентов. Индекс пролиферативной активности Ki-67 равен 40–100 %. Период наблюдения после 4-го курса противоопухолевого лечения составил 3–45 мес. Характеристика пациентов представлена в табл. 1.

У 2 пациенток ответ на проводимое лечение не получен. Одна из них (№ 10) умерла от некупируемых инфекционных осложнений, вторая (№ 13) — от прогрессирования заболевания. У 2 пациенток выявлен рецидив заболевания, у 1 из них (№ 14) удалось добиться ремиссии с помощью второй линии терапии, вторая (№ 11) умерла от прогрессирования заболевания.

Таблица 1. Характеристика пациентов, включенных в исследование ($n = 23$)

№	Пациент		Возраст, лет	Диагноз	Стадия по Ann Arbor	Тип поражения	Рецидив	ПЭТ/КТ после 4 курсов	ЛДГ, ЕД/л	Ki-67, %	Срок от окончания лечения до оформления статьи, мес.	Предфаза (ГКС + циклофосфамид)
	Пол	лет										
1	М	24	ДВКЛ	II	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	963	80–90	34	Нет	
2	М	39	ВЛВСЗ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	751	80	29	Нет	
3	М	38	ДВКЛ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	707	87	42	Нет	
4	М	25	ДВКЛ	II	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	196	40–50	28	Нет	
5	М	61	ВЛВСЗ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	244	50–80	26	Нет	
6	М	54	ДВКЛ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	262	40–60	26	Нет	
7	М	34	ВЛВСЗ	IV	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	233	70–80	24	Нет	
8	Ж	25	ВЛВСЗ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	253	60–70	19	Нет	
9	М	54	ВЛВСЗ	IV	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	575	90	34	Нет	
10	Ж	74	ДВКЛ	IV	Нодальное	Смерть от осложнений	Не выполняли	1009	80	3	Нет	
11	Ж	55	ДВКЛ	IV	Нодальное	Да	Ремиссия	313	80	31	Нет	
12	М	39	ДВКЛ	IV	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	1168	90–95	39	Нет	
13	Ж	39	ВЛВСЗ	IV	Нодальное	Смерть от прогрессирования	Нет ремиссии	НД	НД	10	Нет	
14	Ж	36	ВЛВСЗ	IV	Нодальное	Да	Ремиссия	365	15–25	28	Нет	
15	М	33	ВЛВСЗ	II	Нодальное	Нет	Ремиссия	НД	НД	29	Нет	
16	М	54	ДВКЛ	II	Нодальное	Нет	Ремиссия	177	90	27	Нет	
17	Ж	67	ДВКЛ	II	Нодальное	Нет	Ремиссия	432	90	23	Да	
18	Ж	41	ДВКЛ	IV	Нодальное	Нет	Ремиссия	339	80	29	Да	
19	М	64	ДВКЛ	II	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	327	60	27	Да	
20	Ж	60	ДВКЛ	I	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	221	70–90	26	Да	
21	Ж	47	ДВКЛ	IV	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	2903	100	30	Да	
22	М	31	ДВКЛ	I	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	336	60–70	17	Да	
23	М	60	ДВКЛ	I	Экстранодальное	Нет	Ремиссия	НД	НД	45	Нет	

ВЛВСЗ — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»); ГКС — глюкокортикостероиды; ДВКЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; НД — нет данных.

Оценка концентрации сцДНК_n у пациентов с ДВКЛ, «double hit»/«triple hit» лимфомами и у здоровых доноров

Из 23 больных, включенных в исследование, концентрацию сцДНК_n до проведения противоопухолевой терапии оценивали у 16 (70 %). У 1 (6 %) пациента с изолированным поражением толстой кишки концентрация сцДНК_n была определена после радикального оперативного вмешательства с удалением опухоли, у 6 (38 %) — после предфазы, у 9 (56 %) — до начала противоопухолевой терапии.

У пациента с исходным изолированным поражением толстой кишки концентрация сцДНК_n составила 50 нг/мкл, что сопоставимо с максимальной концентрацией сцДНК_n у здоровых доноров. Средняя концентрация сцДНК_n у 9 пациентов до начала противоопухолевого лечения составила 440 пг/мкл (диапазон 84–1030 пг/мкл), что статистически значимо выше, чем у здоровых доноров ($p < 0,05$). Назначение предфазы (глюкокортикостероиды + циклофосфамид) значимо увеличивало (критерий знаковых рангов Уилкоксона для независимых выборок, $p = 0,05$) среднюю концентрацию сцДНК_n до 5469 пг/мкл (диапазон 343–20 700 пг/мкл).

Полученные данные согласуются с результатами, опубликованными различными группами исследователей: S. Nohaus и соавт. в 2009 г. [15], L.S. Kristensen и соавт. в 2016 г. [16], M. Li и соавт. в 2017 г. [17]. В перечисленных работах сообщалось о том, что, несмотря на существенные различия в концентрации сцДНК_n у каждого конкретного пациента до противоопухолевого лечения, абсолютные значения были выше в 2 раза и более в сравнении со здоровыми донорами. Относительно использования абсолютных значений концентрации сцДНК_n в качестве прогностического маркера мнения авторов различаются. Так, в исследованиях S. Nohaus и соавт. [15], M. Li и соавт. [17] продемонстрировано, что существует прямая зависимость между концентрацией сцДНК_n до противоопухолевого лечения и 2-летней выживаемостью. Однако L.S. Kristensen и соавт. [16] не выявили корреляции концентрации сцДНК_n с 2- и 5-летней выживаемостью. В нашем исследовании средний период наблюдения составил 26 мес. (диапазон 3–45 мес.).

Концентрацию сцДНК_n мы также оценивали на различных этапах противоопухолевой терапии: после 1 курса у 9 (38 %) пациентов, после 2 курсов — у 5 (21 %), после 3 курсов — у 3 (13 %) и после 4 курсов — у 3 (13 %).

После 1-го курса противоопухолевой терапии отмечалось значительное увеличение средней концентрации сцДНК_n до 911 пг/мкл (диапазон 110–3030 пг/мкл). Высвобождение больших количеств сцДНК_n, вероятно, связано с гибелью клеток как опухолевых, так и здоровых тканей из-за токсического действия препаратов. После 2-го курса средняя концентрация сцДНК_n снизилась и составила 580 пг/мкл (диапазон 75–865 пг/мкл). После 3-го курса отмечалось дальнейшее снижение этого показателя до 286 пг/мкл (диапазон 50–522 пг/мкл). После 4-го курса противоопухолевого лечения средняя концентрация сцДНК_n была сопоставима с таковой у здоровых доноров (< 50 пг/мл). По данным ПЭТ/КТ у 21 пациента была достигнута полная ремиссия после 4 курсов противоопухолевой терапии: Deauville 3 у 10 (43 %) больных,



Рис. 2. Средняя концентрация сцДНК_n у пациентов с ДВКЛ и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности до лечения и на фоне проводимой иммунохимиотерапии (ИХТ)

Fig. 2. The mean pcfDNA (сцДНК_n) concentration in DLBCL and B-cell high-grade lymphoma patients prior to and on immunochemotherapy (ИХТ)

Deauville 2 — у 11 (48 %). У 1 пациентки после 4 курсов терапии достигнута ремиссия, однако концентрация сцДНК_n исследовалась только до начала противоопухолевой терапии. У 2 пациентов ПЭТ/КТ после 4 курсов не выполнялась (смерть на фоне прогрессирования заболевания и от осложнений иммунохимиотерапии). Динамика концентраций сцДНК_n на различных этапах терапии продемонстрирована на рис. 2.

Согласно литературным данным, показана связь между эффективностью противоопухолевой терапии и скоростью снижения концентрации сцДНК_n. Так, M. Li и C. Xu [18] в своем исследовании показали, что концентрация сцДНК_n в процессе лечения статистически значимо снижалась у пациентов, восприимчивых к противоопухолевым препаратам. В нашем исследовании у 2 пациентов с резистентным течением заболевания сцДНК_n на этапах противоопухолевой терапии не изучалась.

Оценка В-клеточной клональности в сцДНК_n у пациентов с ДВКЛ, «double hit»/«triple hit» лимфомами и у здоровых доноров

В качестве маркера мы исследовали В-клеточную клональность по реаранжировкам генов *IgH* и *IgK* в биоптате опухолевой ткани до начала противоопухолевой терапии у всех 23 больных. Всего исследовано 34 биоптата (табл. 2): лимфатических узлов — 16 (47 %), слизистой желудка — 8 (24 %), толстой кишки — 3 (9 %), молочной железы — 1 (3 %), щитовидной железы — 1 (3 %), кожи — 1 (3 %), костей — 1 (3 %), печени — 2 (6 %), селезенки (спленэктомия) — 1 (3 %). У 9 (39 %) больных был исследован материал, полученный из различных зон поражения (≥ 2). В-клеточная клональность по реаранжировкам *IgH* или *IgK* была выявлена хотя бы в одном опухолевом материале до лечения у всех 23 (100 %) больных. По данным литературы, В-клеточная клональность суммарно по реаранжировкам генов *IgH* и *IgK* в биоптатах у пациентов с ДВКЛ обнаруживается в 98 % случаев [45], что позволяет использовать ее в качестве универсального диагностического маркера. Материал костного мозга был исследован у 23 (100 %) пациентов до начала лечения, периферической крови —

Таблица 2. Результаты определения В-клеточной клональности по реаранжировкам генов *IgH* в биологическом материале, полученном до начала противоопухолевой терапии

Материал	Количество	В-клеточная клональность, n
Биоптаты	34	27
опухоли		
Лимфатический узел	16	13
Слизистая желудка	8	6
Толстая кишка	3	2
Молочная железа	1	1
Щитовидная железа	1	1
Кожа	1	1
Кости	1	1
Селезенка (спленэктомия)	1	0
Печень	2	1
Периферическая кровь	15	2
Костный мозг	16	3
сцДНК _n до начала противоопухолевой терапии	23	20

у 22 (96 %): В-клеточная клональность выявлена одновременно в материале костного мозга и крови у 2 (9 %) больных. При этом по данным гистологического исследования трепанобиоптата признаков поражения костного мозга не установлено, что не противоречит данным литературы [14].

При исследовании В-клеточной клональности в сцДНК_n клональный продукт, который совпадал по длине (в парах нуклеотидов) с выявленным в материале опухоли, определялся у 21 (95 %) больного. У 1 пациента (№ 23) с изолированной ДВКЛ сцДНК_n крови была исследована после радикального удаления опухоли толстой кишки. В-клеточная клональность в сцДНК_n крови у этого пациента не выявлена, а концентрация сцДНК_n была сопоставима с таковой у здоровых доноров. В дальнейшем этому пациенту проведен курс противоопухолевой терапии для консолидации полученного эффекта. Ко времени оформления статьи пациент находится под наблюдением в состоянии ремиссии уже 45 мес. У 15 (68 %) пациентов в сцДНК_n был выявлен один клональный продукт, который был аналогичен клональному продукту в материале опухолевой ткани. У 6 (27 %) пациентов в сцДНК_n обнаружено несколько (2–3) дополнительных клональных продуктов — олигоклональная картина.

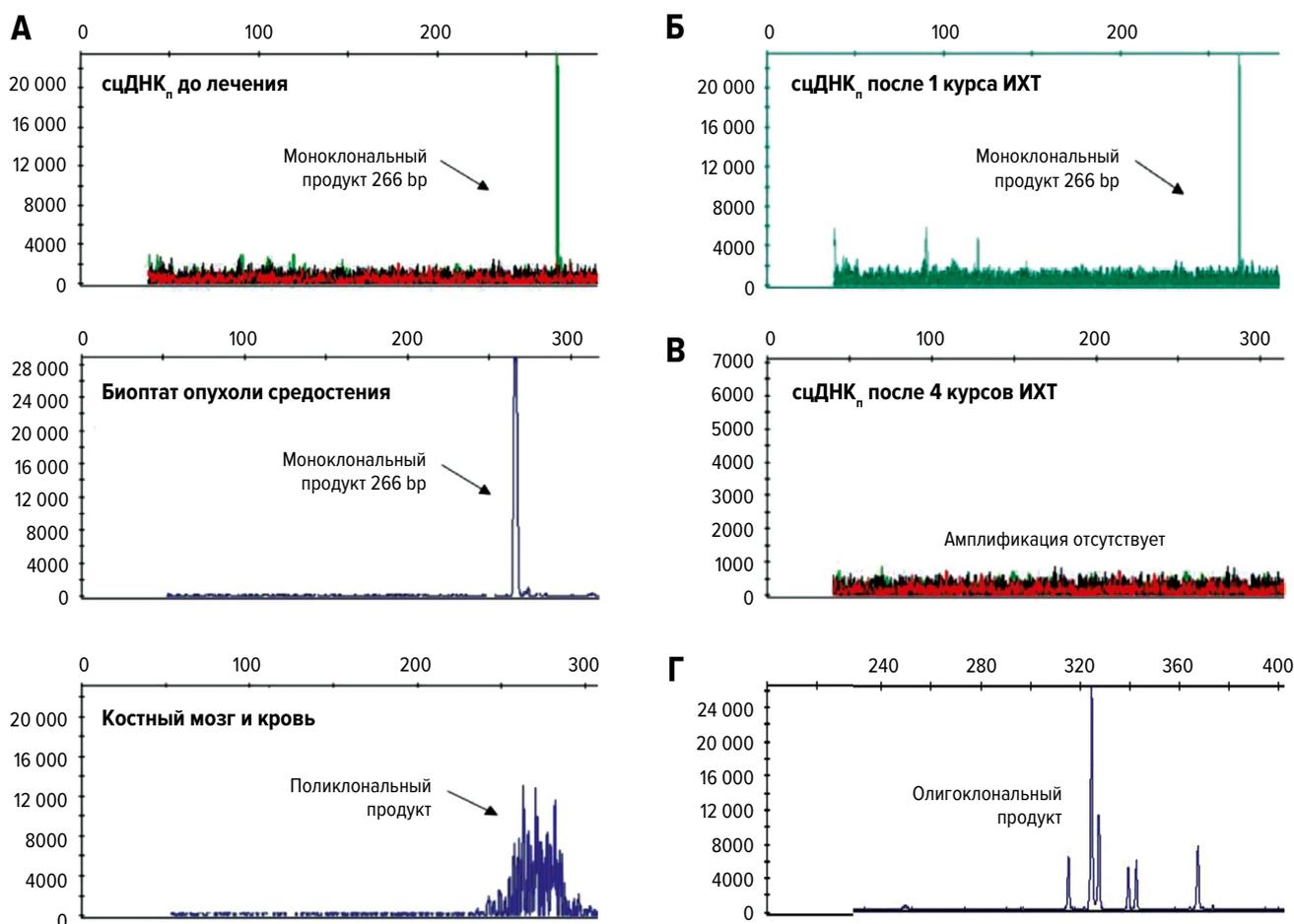


Рис. 3. Пример результатов исследования В-клеточной клональности в биоптате опухоли средостения, в крови, костном мозге и сцДНК_n: А — до лечения; Б — после 1 курса ИХТ; В — после 4 курсов ИХТ; Г — пример олигоклональной картины ИХТ — иммунохимиотерапия.

Fig. 3. An example of B-clonality study results in mediastinum tumor biopsy, blood, bone marrow, and pcfDNA: А — prior to therapy; Б — after 1 immunochemotherapy cycle; В — after 4 immunochemotherapy cycles; Г — an example of oligoclonality ИХТ — immunochemotherapy.

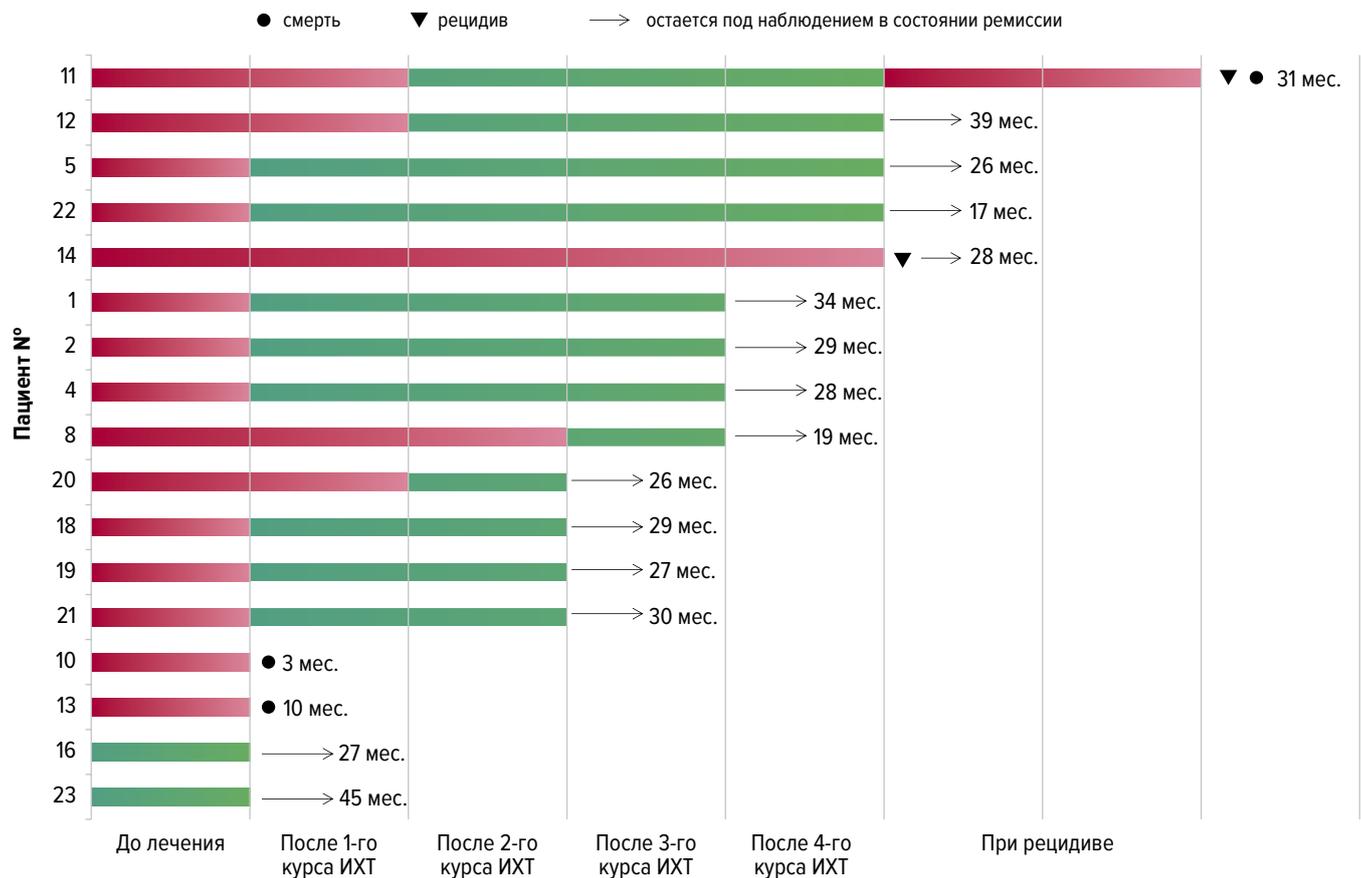


Рис. 4. Динамика В-клеточной клональности в сцДНК_n на различных этапах иммунохимиотерапии (ИХТ) у пациентов с ДВКЛ и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности. Красным цветом обозначено наличие В-клонального продукта в сцДНК_n, зеленым — его отсутствие

Fig. 4. B-cell clonality dynamics in pcDNA at different stages of immunochemotherapy (ИХТ) in DLBCL and B-cell high-grade lymphoma patients. B-cell clonal product in pcDNA is marked in red, the absence of it is marked in green

При этом хотя бы один из выявленных клональных продуктов совпадал с имеющимся в опухоли, что было расценено нами как наличие в плазме опухолевой сцДНК. У 1 пациента (№ 16) с олигоклональной картиной в сцДНК_n ни один из выявленных клональных продуктов не совпадал с обнаруженными в опухоли, в связи с чем динамический контроль В-клеточной клональности в сцДНК_n на этапах противоопухолевой терапии не проводился. Несмотря на это, пациент остается под наблюдением в состоянии ремиссии более 27 мес. Мы можем предположить, что выявленные нами дополнительные клональные продукты являются отражением внутриопухолевой гетерогенности или неспецифической амплификации.

Мы провели оценку связи олигоклональной картины, полученной в материале сцДНК_n, с клинико-лабораторными данными: концентрацией сцДНК_n, наличием маркеров агрессивного течения заболевания, стадией по Ann Arbor, нодальным/экстранодальным поражением, проведением предфазы перед забором плазмы для исследования. В группе пациентов с предфазой частота олигоклонального продукта была статистически значимо выше (в 4,5 раза; $p = 0,05$). При этом у всех пациентов с олигоклональной картиной клональные продукты, не совпадающие с выявленными в опухоли, после 1-го курса блоковой противоопухолевой терапии не определялись.

В нашем исследовании уменьшение количества клональных продуктов, достигнутое после 1-го курса противоопухолевого лечения, было наиболее выраженным и в большинстве случаев достаточно устойчивым в сравнении с последующими курсами.

Мы исследовали В-клеточную клональность в динамике после 1 курса у 16 (73 %) пациентов, после 2 курсов — у 13 (59 %), после 3 курсов — у 9 (41 %) и после 4 курсов — у 5 (23 %). Моноклональный продукт при анализе сцДНК_n после 1-го курса противоопухолевой терапии был выявлен у 8 (50 %) пациентов. После 2-го курса В-клеточная клональность в сцДНК_n крови обнаружена у 2 (15 %) пациентов (№ 14 и 8). При этом у пациентки № 8 клональный продукт не определялся после 3-го курса, она наблюдается в состоянии ремиссии более 19 мес. В то же время у пациентки № 14 сохранялся выявленный моноклональный продукт в сцДНК_n после 3-го и 4-го курсов, несмотря на достижение ПЭТ/КТ-отрицательной ремиссии после 4 курсов противоопухолевой терапии (Deauville 3 балла). В дальнейшем у этой пациентки развился рецидив заболевания. Пример результатов исследования В-клеточной клональности методом фрагментного анализа в биоптате опухоли средостения, в крови, костном мозге и сцДНК_n показан на рис. 3. На рис. 4 схематично представлена динамика В-клеточной клональности в сцДНК_n на различных этапах противоопухолевой терапии.

В настоящем исследовании В-клеточной кло-нальности у здоровых доноров по реаранжировкам генов *IgH* в 3 случаях были выявлены клональные пики, которые при проведении повторной ПЦР-амплификации оказались невоспроизводимыми, что свидетельствовало об отсутствии опухолевой ДНК. Клональные продукты сцДНК_n у пациентов воспроизводились после повторной ПЦР-амплификации.

Корреляционный анализ взаимосвязи В-клеточной кло-нальности сцДНК_n и клинико-лабораторных показателей у больных с ДВКЛ и «double hit»/«triple hit» лимфомами

Аналізу подвергнуты клинико-лабораторные данные 23 пациентов с ДВКЛ и В-клеточными лимфомами высокой степени злокачественности («double hit»/«triple hit»). Учитывали возраст, пол, распространенность опухолевого процесса, наличие или отсутствие экстранодальных поражений, индекс пролиферативной активности Ki-67, концентрацию ЛДГ. В нашем исследовании связи между перечисленными выше параметрами, концентрацией сцДНК_n и наличием В-клеточной кло-нальности в сцДНК_n до противоопухолевого лечения не выявлено ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с гематологическими опухолевыми заболеваниями представляет собой интересный, доступный, но малоизученный биологический материал. Все исследования сцДНК являются трудоемкими и требуют стандартизации методов выделения и хранения образцов, а также обработки полученных данных. В будущем при накоплении достаточной информации сцДНК может стать важным диагностическим маркером опухолевой гетерогенности и надежным предиктором развития рецидива.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: С.Ю. Смирнова, Н.Г. Габеева.
Сбор и обработка данных: С.Ю. Смирнова, Н.Г. Габеева, Е.Е. Никулина, Э.Г. Гемджян.
Предоставление материалов исследования: С.Ю. Смирнова, Н.Г. Габеева, Е.Е. Никулина, Д.А. Королева, С.А. Татарникова, А.К. Смольянинова.
Анализ и интерпретация данных: С.Ю. Смирнова, Н.Г. Габеева.
Подготовка рукописи: С.Ю. Смирнова, Е.Е. Никулина.

Окончательное одобрение рукописи: С.Ю. Смирнова, Е.Е. Никулина, Н.Г. Габеева, Д.А. Королева, Э.Г. Гемджян, Е.Е. Звонков, А.Б. Судариков.

Административная поддержка: А.Б. Судариков.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Swerdlow SH, Steven H, Campo E, et al. (eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th edition. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trumper L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2011;12(11):1013–22. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70235-2.
3. Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. S. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell.* 2017;171(2):481–494.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.027.
4. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* 2018;24(5):679–90. doi: 10.1038/s41591-018-0016-8.
5. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2018;378(15):1396–407. doi: 10.1056/NEJMoa1801445.
6. Eichenauer DA, Aleman BMP, Andre M, et al. Hodgkin lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv19–iv29. doi: 10.1093/annonc/mdy080.
7. Cwynarski K, Marzolini MAV, Barrington SF, et al. The management of primary mediastinal B-cell lymphoma: a British Society for Haematology Good Practice Paper. *Br J Haematol.* 2019;185(3):402–9. doi: 10.1111/bjh.15731.
8. Brink I, Reinhardt MJ, Hoegerle S, et al. Increased metabolic activity in the thymus gland studied with ¹⁸F-FDG PET: age dependency and frequency after chemotherapy. *J Nucl Med.* 2001;42(4):591–5.
9. Cohen JB, Behera M, Thompson CA, Flowers CR. Evaluating surveillance imaging for diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2017;129(5):561–4. doi: 10.1182/blood-2016-08-685073.
10. Chien SH, Liu CJ, Hu YW, et al. Frequency of surveillance computed tomography in non-Hodgkin lymphoma and the risk of secondary primary malignancies: A nationwide population-based study. *Int J Cancer.* 2015;137(3):658–65. doi: 10.1002/ijc.29433.
11. Thompson CA, Charlson ME, Schenkein E, et al. Surveillance CT scans are a source of anxiety and fear of recurrence in long-term lymphoma survivors. *Ann Oncol.* 2010;21(11):2262–6. doi: 10.1093/annonc/mdq215.
12. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):541–9. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70106-3.
13. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018;36(28):2845–53. doi: 10.1200/JCO.2018.78.5246.
14. Гаврилина О.А., Звонков Е.Е., Судариков А.Б. и др. Детекция В-клеточной кло-нальности в костном мозге при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. *Гематология и трансфузиология.* 2015;60(2):26–31. [Gavrilina OA, Zvonkov EE, Sudarikov AB, et al. Detection of bone marrow B-cell clonality in diffuse large B-cell lymphoma. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2015;60(2):26–31. (In Russ)]
15. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol.* 2009;20(8):1408–13. doi: 10.1093/annonc/mdp006.
16. Kristensen LS, Hansen JW, Kristensen SS, et al. Aberrant methylation of cell-free circulating DNA in plasma predicts poor outcome in diffuse large B cell lymphoma. *Clin Epigenet.* 2016;8(1):95. doi: 10.1186/s13148-016-0261-y.
17. Li M, Jia Y, Xu J, et al. Assessment of the circulating cell-free DNA marker association with diagnosis and prognostic prediction in patients with lymphoma: a single-center experience. *Ann Hematol.* 2017;96(8):1343–51. doi: 10.1007/s00277-017-3043-5.
18. Li M, Xu C. Circulating Cell-free DNA Utility for the Surveillance of Patients with Treated Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2017;29(9):637–8. doi: 10.1016/j.clon.2017.03.008.
19. Armand P, Oki Y, Neuberg DS, et al. Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol.* 2013;163(1):123–6. doi: 10.1111/bjh.12439.
20. Bo J, Sun L, Wang W, et al. Novel diagnostic biomarker for patients with Non-Hodgkin's Lymphoma by IgH gene rearrangement. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):903–8. doi: 10.4103/0973-1482.157345.
21. He J, Wu J, Jiao Y, et al. IgH gene rearrangements as plasma biomarkers in Non-Hodgkin's lymphoma patients. *Oncotarget.* 2011;2(3):178–85. doi: 10.18632/oncotarget.235.
22. Herrera AF, Kim HT, Kong KA, et al. Next-generation sequencing-based detection of circulating tumour DNA After allogeneic stem cell transplantation for lymphoma. *Br J Haematol.* 2016;175(5):841–50. doi: 10.1111/bjh.14311.

23. Hossain NM, Dahiya S, Le R, et al. Circulating tumor DNA assessment in patients with diffuse large B-cell lymphoma following CAR T-cell therapy. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(2):503–6. doi: 10.1080/10428194.2018.1474463.
24. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood*. 2015;125(24):3679–87. doi: 10.1182/blood-2015-03-635169.
25. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 2016;8(364):364ra155. doi: 10.1126/scitranslmed.aai8545.
26. Zhong L, Huang WF. Better detection of Ig heavy chain and TCR γ gene rearrangement in plasma cell-free DNA from patients with non-Hodgkin Lymphoma. *Neoplasma*. 2010;57(6):507–11. doi: 10.4149/neo_2010_06_507.
27. Alcaide M, Yu S, Bushell K, et al. Multiplex Droplet Digital PCR Quantification of Recurrent Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell and Follicular Lymphoma. *Clin Chem*. 2016;62(9):1238–47. doi: 10.1373/clinchem.2016.255315.
28. Assouline SE, Nielsen TH, Yu S, et al. Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;128(2):185–94. doi: 10.1182/blood-2016-02-699520.
29. Bohers E, Viailly PJ, Becker S, et al. Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer J*. 2018;8(8):74. doi: 10.1038/s41408-018-0111-6.
30. Bohers E, Viailly PJ, Dubois S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica*. 2015;100(7):e280–e284. doi: 10.3324/haematol.2015.123612.
31. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(9):2171–9. doi: 10.3109/10428194.2016.1139703.
32. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*. 2017;129(14):1947–57. doi: 10.1182/blood-2016-05-719641.
33. Bessi L, Viailly PJ, Bohers E, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by targeted next-generation sequencing and digital droplet PCR in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(2):498–502. doi: 10.1080/10428194.2018.1492123.
34. Kurtz DM. Prognostication with circulating tumor DNA: is it ready for prime time? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2019;2019(1):47–52. doi: 10.1182/hematology.2019000013.
35. Rossi D, Kurtz DM, Roschewski M, et al. The development of liquid biopsy for research and clinical practice in lymphomas: Report of the 15-ICML workshop on ctDNA. *Hematol Oncol*. 2020;38(1):34–7. doi: 10.1002/hon.2704.
36. Sriram D, Lakhota R, Fenske TS. Measurement of circulating tumor DNA to guide management of patients with lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2019;17(9):509–17.
37. Wu FT, Lu L, Xu W, Li JY. Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol*. 2019;98(2):255–69. doi: 10.1007/s00277-018-3529-9.
38. Arzuaga-Mendez J, Prieto-Fernandez E, Lopez-Lopez E, et al. Cell-free DNA as a biomarker in diffuse large B-cell lymphoma: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019;139:7–15. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.04.013.
39. Deeren D, Van Der Linden M, Dedeurwaerdere F, et al. Circulating cell-free DNA for response evaluation of intravascular lymphoma. *Ann Hematol*. 2019;98(8):2021–3. doi: 10.1007/s00277-019-03677-z.
40. Mandel P, Meyais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948;142(3–4):241–3.
41. Stroun M, Anker P, Maurice P, et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318–22. doi: 10.1159/000226740.
42. Siravegna G, Mussolin B, Venesio T, et al. How liquid biopsies can change clinical practice in oncology. *Ann Oncol*. 2019;30(10):1580–90. doi: 10.1093/annonc/mdz227.
43. Maco M, Kupcova K, Herman V, et al. Circulating tumor DNA in Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*. 2022;101(11):2393–403. doi: 10.1007/s00277-022-04949-x.
44. Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257–317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202.
45. Langerak AW, Groenen PJ, van Krieken JHJM, van Dongen JJM. Immunoglobulin/T-cell receptor clonality diagnostics. *Expert Opin Med Diagn*. 2007;1(4):451–61. doi: 10.1517/17530059.1.4.451.