

Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Чечеткин А.В.

ЗНАЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ В ЭРУ ТАРГЕТНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, 191024, г. Санкт-Петербург, Россия

Полная ремиссия (ПР) и длительная беспрогрессивная выживаемость (БПВ) могут быть достигнуты уже после первой линии химиоиммунотерапии у большинства больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Тем не менее в костном мозге значительного числа больных с ПР заболевания иммунологическими и генетическими методами выявляют некоторое количество опухолевых клеток (более 1 на 10 000 нормальных клеток), которые определяют суть минимальной остаточной болезни (МОБ). МОБ-негативный статус больного ассоциируется с длительной БПВ и общей выживаемостью и является единственным благоприятным прогностическим фактором, определяемым после терапии. Появление таргетных препаратов терапии ХЛЛ (ибрутиниб, идедалисиб, венетоклакс), имеющих высокую эффективность и низкий профиль токсичности, позволяет надеяться на увеличение числа МОБ-негативных ремиссий, а изменение тактики лечения – на решение проблемы контроля за остаточным опухолевым клоном.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз; минимальная остаточная болезнь; проточная цитометрия; ибрутиниб.

Для цитирования: Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Клеина Е.В., Чечеткин А.В. Значение минимальной остаточной болезни при хроническом лимфолейкозе в эру таргетных лекарственных препаратов. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 190-196. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-190-196>

Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Martynkevich I.S., Kleina E.V., Chechetkin A.V.

THE MEANING OF THE MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN THE ERA OF TARGETED DRUGS

Russian Scientific-Research Institution of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024, Russian Federation

In the majority of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) the complete remission (CR) and prolonged progression-free survival (PFS) can be achieved already after the first line chemoimmunotherapy. Nevertheless, a number of tumor cells (more than one per normal 10.000 cells) which determine the essence of minimal residual disease (MRD) is revealed by immunological and genetic methods in the bone marrow of significant number of patients in CR of the disease. MRD-negative status of a patient is associated with prolonged PFS and overall survival (OS) and being the only favorable prognostic factor determined after therapy. The delivery of targeted drugs for the therapy of in CLL (Ibrutinib, Idelalisib, Venclexta) possessing of high efficiency and low toxicity, give the hope to increase the number of MRD-negative remissions, and the change in treatment strategy for the solution of problems of control of residual tumor clone

Key words: chronic lymphocytic leukemia; minimal residual disease; flow cytometry; ibrutinib.

For citation: Kuvshinov A. Yu., Voloshin S. V., Martynkevich I. S., Kleina E. V., Chechetkin A. V. The meaning of the minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia in the era of targeted drugs. *Hematology and Transfusiology: Russian Journal (Gematologiya i transfuziologiya)* 2016; 61(4): 190-196. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-190-196>

Acknowledgments. The study was executed in frameworks of the Scientific Research work "Residual disease 15".

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

Received 20 October 2016

Accepted 22 November 2016

За последние десятилетия тактика ведения больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) значительно изменилась. Если раньше целью лечения таких больных было купирование симптомов заболевания и достижение клинико-гематологического улучшения, то в последние 20 лет она определяется как достижение ремиссии (полной или частичной) и увеличение выживаемости. Включение в программы химиотерапии боль-

Для корреспонденции:

Кувшинов Алексей Юрьевич, младший научный сотрудник научной лаборатории ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», 191024, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: kuvshinovmd@gmail.com.

For correspondence:

Voloshin Sergey V., MD, PhD, Russian Scientific-Research Institution of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, 191024, Russian Federation. E-mail: servolos@gmail.com.

Information about authors:

Kuvshinov A. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-4341-2123>; Voloshin S. V., <http://orcid.org/0000-0003-1784-0375>; Martynkevich I. S., <http://orcid.org/0000-0001-5958-0490>; Chechetkin A. V., <http://orcid.org/0000-0002-7569-0697>.

ных ХЛЛ флударабина оказалось достаточно эффективным, однако при этом и весьма токсичным лечением [1–5].

По данным разных авторов [4–5], частота общего ответа (ОО) при монотерапии флударабином составляет 60–83%, полная ремиссия (ПР) – 5–7%. В комбинации с другими химиопрепаратами (циклофосфамид, митоксантрон) частота ОО достигает 75–94%, а ПР встречается приблизительно у 20% больных. Однако, несмотря на высокую эффективность, применение флударабина сопряжено с высокой токсичностью. Основные осложнения терапии связаны с миелосупрессией и развитием инфекционных осложнений. Нейтропения 4-й степени развивается практически у половины больных, а частота инфекционных осложнений достигает 30%.

Внедрение новых диагностических методов и прогностических факторов, разработка современных программ лечения, в том числе с использованием моноклонального антитела ритуксимаб, повысили эффективность терапии ХЛЛ [6–9]. Частота достижения ОО при применении комбинированных программ химиотерапии с включением ритуксимаба соста-

вила более 90%, а ПР достигалась более чем у 60% больных. В связи с тем что у большинства больных ХЛЛ даже при первоначально достигнутой ПР в конечном итоге возникает рецидив заболевания, определение минимальной остаточной болезни (МОБ) приобрело важное значение при оценке эффективности используемых терапевтических программ [10].

Изучение МОБ при ХЛЛ началось два десятилетия назад в исследованиях с использованием 2-цветной иммунофлюоресцентной проточной цитометрии (ПЦ). Еще в 1992 г. L. Robertson и соавт. [2] показали, что даже при определении МОБ с помощью 2-цветной слабочувствительной ПЦ, больные в ПР могут быть разделены на две группы, различающиеся по продолжительности беспрогрессивной выживаемости (БПВ). МОБ-позитивные пациенты имели БПВ 19 мес по сравнению с более чем 30-месячной БПВ у МОБ-негативных. S. O'Brien и соавт. [3] также показали статистически значимое увеличение БПВ у МОБ-негативных больных в ПР по сравнению с МОБ-позитивными после лечения по программе флударабин + циклофосфамид (FC). Важность достижения МОБ-негативной ремиссии также была продемонстрирована и в других исследованиях [8, 11–13].

Накопленные и систематизированные данные легли в основу опубликованных в 2008 г. Международной рабочей группой по изучению ХЛЛ (IWCLL) рекомендаций по диагностике и лечению ХЛЛ [14]. В рекомендациях были представлены принципы диагностики, стадирования и лечения заболевания, определены прогностические факторы течения болезни, а также критерии эффективности терапии. В разделе 5 рекомендаций дано определение понятия МОБ при достижении ПР как состояния организма при наличии опухолевых клеток в количестве 1 и более на 10 000 нормальных клеток и невозможности их выявления морфологическими методами.

В настоящее время разработаны и применяются два основных метода выявления МОБ при ХЛЛ – иммунофенотипический и молекулярно-генетический. Метод с использованием аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов тяжелых цепей иммуноглобулина (AC-IGH-ПЦР) является общепринятым и демонстрирует самую высокую чувствительность для обнаружения МОБ [11, 15]. В основе метода лежит выявление клональной популяции лимфоцитов по вариабельным регионам генов иммуноглобулинов. В настоящее время определены стандартные ПЦР-праймеры, которые используются при ХЛЛ для обнаружения и мониторинга МОБ [16].

Метод проточной цитометрии основан на детекции флюоресценции клеток ХЛЛ, окрашенных моноклональными антителами, а также определении параметров прямого и бокового светорассеяния. Антитела специфично связываются с присутствующими на клетке антигенами. Каждая молекула антител конъюгирована с флюорохромом, который флюоресцирует при возбуждении молекулы светом определенной длины волны. Флюорохромы светятся в узком диапазоне флюоресцентного спектра. Таким образом, флюоресценция клетки в определенной области спектра указывает на присутствие искомого антигена, а флюоресценция в нескольких областях соответственно на коэкспрессию нескольких антигенов.

Несмотря на высокую чувствительность, время, затрачиваемое на получение результатов AC-IGH-ПЦР, часто необоснованно удлиняет сроки принятия решения относительно дальнейшей лечебной тактики. К тому же метод является трудоемким и дорогостоящим. Именно поэтому 4-цветная ПЦ, обладающая чувствительностью, сопоставимой с AC-IGH-ПЦР, и дающая более быстрый результат, является наиболее востребованным методом оценки МОБ при ХЛЛ на сегодняшний день [11, 17, 18]. Имеются данные по оценке МОБ с помощью высокочувствительных 6-, 8- и даже 10-цветной ПЦ [19]. Однако именно 4-цветная ПЦ остается стандартным методом диагностики МОБ с достаточной чувствительностью (10^{-4}), принятой на сегодняшний день в качестве критерияльной [14].

Наиболее масштабное исследование по оценке значимости МОБ выполнено немецкой группой по изучению ХЛЛ (GCLLSG) [9]. В ходе исследования сравнивали группы больных с разным уровнем МОБ по данным ПЦ после проведенной терапии: низкий риск (уровень МОБ менее 10^{-4}), промежуточный риск (уровень МОБ 10^{-4} – 10^{-2}), высокий риск (уровень МОБ более 10^{-2}). Были получены данные о статистически значимом увеличении БПВ у больных из группы низкого риска по сравнению с другими группами (медианы 68,7; 40,5 и 15,4 мес соответственно). Медиана общей выживаемости (ОВ) была выше в группе низкого риска по сравнению с группой высокого риска (не достигнута и 48,4 мес соответственно). При этом различий в ОВ и БПВ в зависимости от вида предшествующей терапии (FC или FC + ритуксимаб – FCR), не выявлено. Но отмечено, что частота достижения более низкого уровня МОБ выше в группе больных, получавших терапевтический режим FCR, содержащий ритуксимаб. Наименьший риск прогрессирования заболевания отмечен у больных в группе низкого риска, чем в группе промежуточного и высокого риска, отношение рисков (OR) 2,49 и 14,7 соответственно; $p < 0,0001$.

G. Kovacs и соавт. [12] также продемонстрировали важность достижения МОБ-негативной ремиссии. В исследование включены 542 больных, получавших следующие программы терапии: FC – 121 (22,3%), FCR – 283 (52,2%), бендамустин + ритуксимаб (BR) – 138 (25,5%) больных. МОБ-негативные ремиссии достигнуты у 175 (81,8%) из 214 больных в ПР и у 157 (47,9%) из 328 больных с частичной ремиссией (ЧР). Были выявлены статистически значимые различия БПВ между МОБ-негативными ПР и МОБ-позитивными ПР (69,2 мес против 40,4 мес; OR 0,445; 95% CI 0,282–0,703; $p = 0,001$). Дополнительно обнаружены значимые различия между МОБ-негативными ЧР и МОБ-позитивными ЧР (61,7 мес против 40,4 мес; OR 0,537; 95% CI 0,34–0,847; $p = 0,008$). Статистически значимые различия между МОБ-негативными ПР и МОБ-негативными ЧР не выявлены (69,2 мес против 61,7 мес; OR 0,822; 95% CI 0,572–1,182; $p = 0,29$).

На следующем этапе изучения МОБ ХЛЛ сравнивали наиболее часто используемые в 1-й линии терапии ритуксимабсодержащие программы лечения (BR и FCR) [13]. В исследование был включен 561 больной ХЛЛ. Ответ на лечение, ОВ и БПВ оценены у 282 больных, получавших химиотерапию FCR и у 279 – BR. Общий ответ в обеих группах был 97,8% ($p = 1,0$). ПР в группе FCR составила 40,7%, BR – 31,5% ($p = 0,026$). МОБ оценена с помощью 4-цветной ПЦ у 355 больных, из них у 185 после FCR, у 170 после BR. Частота достижения МОБ-негативных ремиссий, а значит и более длительная БПВ наблюдались у больных, получавших лечение по программе FCR по сравнению с BR – 58,1 и 31,6% соответственно; $p < 0,001$. Через 12 мес наблюдения 46 (58,2%) из 79 больных из группы FCR оставались МОБ-негативными по сравнению с 20 (26,3%) из 76 после BR ($p < 0,001$); через 18 мес: 35 (53,8%) из 65 против 16 (24,6%) из 65 соответственно ($p = 0,006$). Медиана БПВ составила 53,7 мес в группе FCR и 43,2 мес в группе BR (OR 1,589; 95% CI 1,25–2,079; $p = 0,001$).

Полученные в результате исследований данные подчеркивают важность искоренения болезни на молекулярном уровне (табл. 1). Следовательно, отсутствие МОБ становится решающим показателем успешности лечения. В связи с этим достижение МОБ-негативного статуса было определено в качестве цели терапии при ХЛЛ. По результатам исследования также сделан вывод о том, что достижение МОБ-негативной ремиссии является мощным прогностическим фактором эффективности лечения независимо от клинического ответа, а оценка МОБ необходима не только после завершения программы химиотерапии, но и в период дальнейшего наблюдения.

В последние 5 лет мы вступили в новую эру лечения ХЛЛ. Достижения в области изучения биологии ХЛЛ позволили разработать группу таргетных препаратов ингибиторов

Основные клинические исследования эффективности терапии при ХЛЛ

Источник литературы	Программа терапии	Число больных	Ответ	<i>p</i>	МОБ-	БПВ	<i>p</i>	ОВ
L.Robertson и соавт. (1992) [2]	F + Pred	159	ПР 19% ПРн 30% ЧР 18%		Менее 10 ⁻² ПР 89% ПРн 51% ЧР 19%	2-летняя: ПР 87% ПРн 55% ПР МОБ- 84% ПРн МОБ- 39%	< 0,03 < 0,001	
V.Eichhorst и соавт. (2006) [4]	FC или F	375	ОО 94 и 83% ПР 24 и 7%	0,001 < 0,001		48 и 20 мес	0,001	
I.Flinn и соавт. (2007) [5]	FC или F	278	ОО 74,3 и 59,5% ПР 23,4 и 4,6%	0,013 0,000007		31,6 и 19,2 мес	0,0001	
F.Bosch и соавт. (2008) [1]	FCM	69	ОО 90% ПР 64% ЧРн 14% ЧР 12%		Менее 10 ⁻⁴ ПР 26%	2-летняя: ПР МОБ- 91% ПР МОБ+ 80% ЧРн 37% ЧР 12%	0,21 0,1 0,03	4-летняя: 70%
C.Tam и соавт. (2008) [6]	FCR	224	ОО 95% ПР 72% ЧРн 10% ЧР 12%		Менее 10 ⁻² ПР 82% ЧРн 39% ЧР 55%	6-летняя 51% МОБ- 85% МОБ+ 49%		6-летняя: 77%; ПР 88% ЧРн 77% МОБ- 84% МОБ+ 65%
M.Hallek и соавт. (2008) [8]	FCR или FC	817	ОО 95 и 88% ПР 52 и 27 %	0,001 < 0,01		2-летняя: 76,6 и 62,3%	< 0,0001	
S.Böttcher и соавт. (2012) [9]	FCR или FC	493				Менее 10 ⁻⁴ : 68,7 мес; 10 ⁻⁴ –10 ⁻² : 40,5 мес; менее 10 ⁻² : 15,4 мес	< 0,0001	Не достигнута; не достигнута; 48,4 мес
G.Covacs и соавт. (2014) [12]	FCR, или FC, или BR	542			Менее 10 ⁻⁴ ПР 81,8% ЧР 47,9%	ПР МОБ- 69,2 мес; ПР МОБ+ 40,4 мес; ЧР МОБ- 61,7 мес	0,001 0,008	
V.Eichhorst и соавт. (2014) [13]	FCR или BR	561	ПР 40,7 и 31,5%	0,026	Менее 10 ⁻⁴ 58,1 и 31,6%	53,7 и 43,2 мес	0,001	

Примечание. F – флударабин; Pred – преднизолон; FC – флударабин, циклофосфамид; FCM – флударабин циклофосфамид, митоксантрон; FCR – флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб; BR – бендамустин, ритуксимаб.

В-клеточного сигнального пути (ибрутиниб, иделалисиб) и BCL-2 (венетоклакс), синтезированы новые моноклональные антитела офатумумаб и обинутузумаб с доказанной эффективностью [20], исследуют эффективность и место в терапии ХЛЛ иммуномодуляторов [21, 22]. В связи с появлением новых таргетных лекарственных препаратов (в первую очередь ибрутиниба) тактика лечения и стандарты терапии ХЛЛ претерпевают значительные изменения. В исследованиях доказаны высокая эффективность современных таргетных препаратов и их относительно низкий профиль токсичности [23–26]. В настоящее время большинство этих препаратов одобрено для лечения рецидивирующих и рефрактерных форм ХЛЛ, а ибрутиниб и обинутузумаб еще и в качестве препаратов 1-й линии терапии. Несмотря на высокий потенциал в достижении МОБ-негативного статуса больных ХЛЛ, его клиническое и прогностическое значение при использовании таргетных препаратов до конца не ясно и всесторонне изучается в рамках исследований и в рутинной практике (табл. 2).

Одобрение применения иделалисиба, перорального селективного ингибитора фосфатидилинозитол-3-дельта-киназы (PI3Kδ), играющей ключевую роль в обеспечении жизнеспособности, пролиферации и миграции опухолевых клеток для лечения прогрессирования/рецидива ХЛЛ, было основано главным образом на данных рандомизированного плацебо-контролируемого исследования III фазы Study 116 [25]. В нем иделалисиб и ритуксимаб получали 220 больных, которым не могла быть проведена стандартная химиотерапия. В октябре 2013 г. исследование Study 116 было завер-

шено досрочно в связи с выявлением статистически значимого преимущества по показателям БПВ у больных, которые получали иделалисиб и ритуксимаб, по сравнению с теми, кто получал только ритуксимаб и плацебо (HR 0,18; 95% CI 0,10–0,32; *p* < 0,0001). Медиана БПВ в группе иделалисиба с ритуксимабом не достигнута (95% CI 10,7 мес), а в группе монотерапии ритуксимабом составила 5,5 мес (95% CI 3,8–7,1). Наиболее частыми осложнениями являлись повышение уровня печеночных трансаминаз, диарея, пневмонит и колит. Эффективность иделалисиба продемонстрирована и в других исследованиях [26, 27], но данные об оценке МОБ при его применении пока не опубликованы.

Обинутузумаб представляет собой рекомбинантное, гуманизированное, моноклональное антитело II типа с модифицированной схемой гликозилирования, принадлежащее к классу IgG1 и обладающее специфичностью к антигену CD20. В сочетании с хлорамбуцилом частота достижения МОБ-негативного статуса у больных ХЛЛ составила 19,5% в костном мозге и 37,7% в крови [28]. Пациенты, включенные в это исследование, были пожилыми людьми или имели сопутствующие заболевания. Несмотря на эти отягчающие факторы, программу терапии больные переносили хорошо. Наиболее частыми побочными эффектами являлись реакции, связанные с введением обинутузумаба при первой инфузии (20%) и нейтропения 3–4-й степени.

В исследовании GREEN больные ХЛЛ получали комбинированную терапию обинутузумабом и бендамустином [29]. Частота достижения ОО в этой группе составила 78,5%, а у 32,2% больных достигнута ПР. У значительного числа

Таблица 2

Клинические исследования эффективности таргетных препаратов в терапии ХЛЛ

Препарат	Исследование	БПВ (в группе исследуемого препарата)	Частота достижения МОБ-негативной ремиссии
Ибрутиниб	RESONATE, P/P ХЛЛ, ибрутиниб в сравнении с офатумумабом	26 мес – 75%	
	RESONATE-17, P/P ХЛЛ и терапия 1-й линии больных с del17p	12 мес – 79%	
	RESONATE-2, 1-я линия терапии ХЛЛ, ибрутиниб в сравнении с хлорамбуцилом	18 мес – 94%	
	HELIOS, P/P ХЛЛ, BR + ибрутиниб в сравнении с BR + плацебо	24 мес – 74,8 и 20,9 мес соответственно	18 и 4,8% ($p < 0,0001$)
Иделалисиб	Study 116, P/P ХЛЛ, иделалисиб + ритуксимаб в сравнении с ритуксимабом	Медиана 19,4 мес	
	Study 115, P/P ХЛЛ, BR + иделалисиб в сравнении с BR + плацебо	Медиана 23,1 мес	
	Фаза II иделалисиб + ритуксимаб в 1-й линии терапии больных старше 65 лет	36 мес – 83%	
Венетоклак	Фаза I, P/P ХЛЛ, монотерапия венетоклаком	Медиана 25 мес	55,5%
	Фаза Ib, P/P ХЛЛ, венетоклак + ритуксимаб	24 мес – 83%	49%
Обинутузумаб	CLL11, 1-я линия терапии и P/P ХЛЛ, обинутузумаб+хлорамбуцил, в сравнении с ритуксимабом+хлорамбуцил и монотерапии хлорамбуцилом	Медиана 26,7 мес	19,5%

Примечание. P/P – рефрактерный/рецидивирующий; BR – бендамустин, ритуксимаб.

больных МОБ не выявлялась при анализе костного мозга (у 28%) или крови (у 59%). Наиболее частыми серьезными нежелательными явлениями были нейтропения (у 10,8%), лихорадка (у 7,6%) и синдром лизиса опухоли (у 5,1%).

При использовании венетоклакса, перорального ингибитора белка BCL-2, участвующего в апоптозе клеток, в качестве монотерапии ХЛЛ частота ОО составила 79%, а ПР достигнута у 20% больных [30]. У 17 из 23 больных, достигших ПР, произведена оценка МОБ. Частота МОБ-негативного статуса отмечена у 6 (35%) из 17 больных. В другом исследовании [31], где прием венетоклакса сочетался с введениями ритуксимаба, МОБ-негативный статус достигнут у 26 (53%) из 49 больных. Среди побочных эффектов, связанных с приемом венетоклакса, чаще всего наблюдали нейтропению, диарею, тошноту, анемию, инфекции верхних дыхательных путей, тромбоцитопению и усталость. Следует также отметить, что применение венетоклакса часто приводит к таким серьезным жизнеугрожающим нежелательным явлениям, как синдром лизиса опухоли, несмотря на постепенную эскалацию дозы препарата.

На сегодняшний день проводят большое количество исследований по изучению эффективности и безопасности программ лечения ХЛЛ с включением в них ибрутиниба. Ибрутиниб – мощный низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы Брутона (БТК), которая является компонентом сигнальных путей, начинающихся с пре-В-клеточного и В-клеточного рецепторов, и играет важную роль в созревании и функционировании В-лимфоцитов.

Клиническая эффективность ибрутиниба при ХЛЛ оказалась весьма высокой. На начальном этапе исследования фаз IB/II (P505/1102/1103) была отмечена быстрая регрессия лимфаденопатии, сопровождающаяся увеличением лимфоцитоза, который впоследствии сохранялся на протяжении достаточного длительного времени [32]. Это наблюдение, которое является универсальным при терапии ингибиторами БТК, привело к определению новой категории ответа на терапию «частичная ремиссия с лимфоцитозом» (больные, которые отвечают всем критериям ЧР, но с сохранением лимфоцитоза). Со временем, когда количество лимфоцитов уменьшается, ответ расценивают как ЧР в соответствии со стандартными критериями [14].

В первоначальном докладе частота ОО при монотерапии ибрутинибом составила 71%, при 75% 26-месячной БПВ у больных, ранее получавших минимум одну линию терапии (медиана линий терапии была равна 4). Результаты этого исследо-

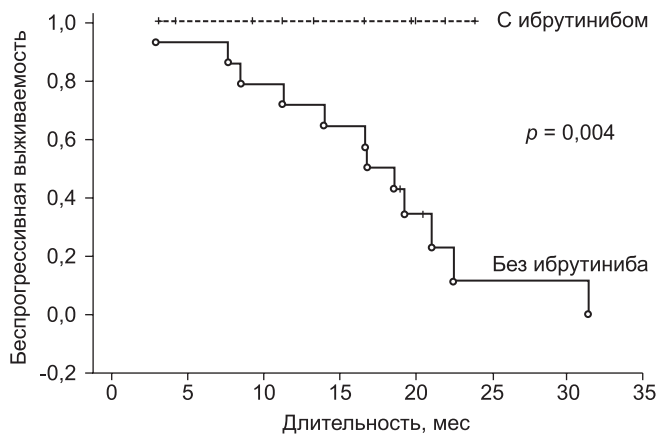
вания привели к тому, что Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в феврале 2014 г. одобрило применение ибрутиниба для больных ХЛЛ после по крайней мере одной предшествующей линии терапии [33].

Подтверждающим высокую эффективность терапии ибрутинибом стали последующие результаты исследования RESONATE, в котором больные с прогрессирующим/рецидивом ХЛЛ были рандомизированы в группы, получавших ибрутиниб или офатумумаб [34]. Результаты показали более длительную БПВ ($p < 0,001$) и ОВ ($p = 0,005$) в группе ибрутиниба. В другое исследование фазы II (RESONATE-17) были включены пациенты, имевшие прогностически неблагоприятную генетическую аномалию (del17) и ранее получившие хотя бы одну линию терапии [35]. Первые результаты продемонстрировали 79% 12-месячную БПВ. На основании этих данных FDA в июле 2014 г. окончательно одобрила ибрутиниб для больных ХЛЛ после по меньшей мере одной предшествующей линии терапии, а также для больных с делецией 17p в любой линии терапии [36].

По результатам 3-летнего периода наблюдения в исследовании фаз IB/II частота ОО у больных с рецидивирующим/рефрактерным течением ХЛЛ увеличилась до 90 с 7% ПР [32]. Медиана длительности терапии составила 23 мес, при этом 53% больных продолжают прием препарата. БПВ через 30 мес составила 69%, при этом медиана БПВ у больных с делецией 17p составила 28 мес; в группе больных с делецией 11q БПВ составила 74% через 30 мес, а среди больных без указанных генетических аберраций – 87%.

Ибрутиниб в целом хорошо переносится, а наиболее частые побочные эффекты включали диарею легкой степени, тошноту, экхимозы и артралгии. Значимыми побочными эффектами в большинстве исследований были фибрилляция предсердий, которая чаще встречалась в группе принимающих ибрутиниб – 5%, а также риски возникновения кровотечения, которые могут быть связаны между собой по крайней мере частично в связи с торможением коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов [24, 32, 34].

Публикуется все больше данных об эффективности ибрутиниба в качестве терапии 1-й линии. В исследовании фаз IB/II был включен 31 больной старше 65 лет, ранее не получавший терапию [32]. После 30-месячного периода наблюдения 81% больных остались в исследовании с частотой ОО 84%, при этом 23% больных имели ПР. БПВ составила 96% через 30 мес с одним рецидивом заболевания и смертью больного с делецией 17p.



Беспрогрессивная выживаемость у больных ХЛЛ в зависимости от программы терапии.

В исследовании RESONATE-2 включены больные ХЛЛ старше 65 лет и без делеции 17p, ранее не получавшие лечение [37]. Пациенты были рандомизированы в группы: 1-я группа – монотерапия ибрутинибом; 2-я группа – монотерапия хлорамбуцилом. В группе получавших ибрутиниб БПВ была значительно выше (18-месячная 94%; ОР 0,16; $p = 0,001$) так же, как и частота ОО и ОВ. В настоящее время 87% больных продолжают принимать ибрутиниб. Наиболее серьезными побочными эффектами среди 136 больных в группе ибрутиниба были кровотечения (5 случаев), внезапная смерть (2 больных), артериальная гипертензия (14%), фибрилляция предсердий (6%). На основании результатов этого исследования FDA в начале марта 2016 г. одобрила монотерапию ибрутинибом в качестве 1-й линии терапии больных ХЛЛ [38].

Также доказано повышение эффективности стандартной химиоиммунотерапии при включении в программу ибрутиниба [39]. В настоящее время проводится исследование III фазы (HELIOS) у 578 больных с рецидивирующим/рефрактерным течением ХЛЛ. Больных рандомизировали поровну на две группы: 1-я группа – химиоиммунотерапия по программе BR + ибрутиниб; 2-я группа – BR + плацебо. Медиана наблюдения в настоящее время составляет 25,4 мес. В течение всего времени наблюдения отмечается тенденция в увеличении БПВ в 1-й группе (БПВ не достигнута) по сравнению со 2-й группой (БПВ 14,2 мес); $p < 0,0001$; 2-летняя БПВ – 74,8 и 20,9% соответственно. Медиана ОВ до сих пор не достигнута в обеих группах ($p = 0,0587$), 2-летняя ОВ составила 86,2% в 1-й группе и 81,5% во 2-й группе. Частота ОО составила 87,2% в группе с ибрутинибом против 66,1% в группе с плацебо ($p < 0,0001$), при этом ПР и ПР с неполностью восстановившимся костно-мозговым кровотоком (ПРн) были у 33,9% против 7,2% соответственно (в первом промежуточном анализе 21,4% против 5,9%). Частота МОБ-негативного статуса наблюдались у 52 (18%) из 289 больных в 1-й группе и у 14 (4,8%) из 289 больных во 2-й группе ($p < 0,0001$; в первом промежуточном отчете 12,8% против 4,8% соответственно). Следует также отметить, что 30% больных из группы, получавшей ибрутиниб, имели прогностически неблагоприятную генетическую аномалию – делецию 11q.

Несмотря на впечатляющие первоначальные результаты, в процессе наблюдения за больными ученые столкнулись с новой проблемой – прогрессирование/рецидив ХЛЛ на фоне приема ибрутиниба. В самом крупном на сегодняшний день исследовании среди больных с прогрессирующим/рецидивирующим течением ХЛЛ во время терапии ибрутинибом кумулятивная частота встречаемости синдрома Рихтера составила 4,5% в течение 1 года и была отмечена у 18 из 31 больного с рецидивом заболевания с медианой выживаемости 3,5 мес [40]. Прогрессирование/рецидив ХЛЛ, как правило,

происходит позже, но также имеет агрессивное течение с медианной ОВ 17,5 мес. Во втором исследовании медиана ОВ после прекращения приема ибрутиниба вследствие прогрессирования/рецидива ХЛЛ составила всего 3,1 мес [41].

Однако следует учесть, что в обеих работах большинство больных относились к группе неблагоприятного прогноза (наличие немутированного статуса тяжелых цепей иммуноглобулинов, делеция 17p, делеция 11q, комплексный кариотип). И тем не менее около 70% больных из этих исследований остаются на терапии ибрутинибом. Таким образом, развитие прогрессирования/рецидива ХЛЛ на фоне применения ибрутиниба становится весьма актуальным и требующим дальнейших исследований вопросом.

В «Российском научно-исследовательском институте гематологии и трансфузиологии» ФМБА России (Санкт-Петербург) в исследование по оценке эффективности применения ибрутиниба у больных с прогрессированием/рецидивом ХЛЛ был включен 21 больной. Стратификация больных основывалась на программе терапии: 1-я группа ($n = 14$) – 2-я и последующие линии ритуксимабсодержащей программы химиотерапии (BR – 10 больных, FCR – 4 больных); 2-я группа ($n = 12$) – ибрутинибсодержащая программа терапии (ибрутиниб ± химиоиммунотерапия). Для определения показаний к началу терапии и оценки ее эффективности использовали рекомендации Международной рабочей группы по изучению ХЛЛ (NCI-IWCLL) [14]. Оценку МОБ проводили с помощью 4-цветной ПЦ на образцах костного мозга у больных, достигших ПР или ЧР: 1-я группа – 7 больных в возрасте от 45 до 83 лет (медиана возраста 60,5 года), предшествующей терапии от 1 до 4 линий (медиана 1); 2-я группа – 5 больных в возрасте от 49 до 82 лет (медиана возраста 62,5 года), предшествующей терапии от 1 до 4 линий (медиана 2). Группы больных были однородны по клиническим характеристикам. С неблагоприятным прогнозом, основанным на выявлении генетических аномалий, были выявлены в каждой группе: в 1-й группе 2 больных – сочетание del(11q) с del(13q); во 2-й группе 1 больной с (del(17p)). Частота ОО в группе стандартной химиотерапии составила 71,4%, из них ПР у 1 больного, ЧР у 9, стабилизация заболевания (СЗ) у 3, прогрессирование у 1 больного. В группе с ибрутинибом частота ОО была 91,7%, из них ПР у 3, ЧР у 8, СЗ у 1 больного. Статистически значимые различия в частоте ОО между группами не выявлены ($p > 0,05$). Частота достижения МОБ-негативного статуса была у 2 (40%) из 5 больных, ПР – у 1 в группе терапии ибрутинибом по сравнению с 1 (14,3%) из 7, ПР в группе терапии без ибрутиниба. Были выявлены различия в БПВ. Медиана БПВ у больных, получавших ибрутиниб, не достигнута, а у больных без ибрутиниба составила 16,9 мес; $p = 0,004$ (см. рисунок).

Таким образом, благодаря рекомендациям FDA [42], количественная оценка МОБ после лечения уже используется в качестве альтернативного средства прогнозирования продолжительности ответа и ОВ, а необходимость ее определения постепенно выходит за рамки клинических испытаний и становится частью рутинной клинической практики. Представленные данные подтверждают высокую эффективность таргетных препаратов в достижении МОБ-негативного статуса больного, а, следовательно, пациенты могут рассчитывать на более длительную БПВ и ОВ. До сих пор остаются вопросы, которые необходимо будет решать в ближайшее время: «Какова длительность терапии?», «Частота развития вторичных опухолей?» и, наверное, самый главный «Что делать при их неэффективности?». Одним из возможных способов решения третьего вопроса является комбинированное использование таргетных препаратов. В настоящее время проводятся исследования таких комбинаций: ибрутиниба с обинутузумабом или венетоклаксом, ибрутиниба с венетоклаксом и обинутузумабом, обинутузумаба с венетоклаксом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР «Остаточная болезнь-15».

ЛИТЕРАТУРА

10. Кувшинов А.Ю., Волошин С.В., Мартынкевич И.С., Kleina E.B., Михалева М.А., Абдулкадыров К.М. Хронический лимфолейкоз: прогностическое значение минимальной остаточной болезни, возможности современных методов ее выявления и коррекции (обзор литературы). *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика*. 2016; 9(2): 191–8. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-191-198.

Остальные источники литературы см. в References.

REFERENCES

1. Bosch F., Ferrer A., Villamor N., González M., Briones J., González-Barca E., et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia: high response rate and disease eradication. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(1): 155–61. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1371.
2. Robertson L.E., Huh Y.O., Butler J.J., Pugh W.C., Hirsch-Ginsberg C., Stass S., et al. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood*. 1992; 80(1): 29–36.
3. O'Brien S.M., Kantarjian H.M., Cortes J., Beran M., Koller C.A., Giles F.J., et al. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2001; 19(5): 1414–20.
4. Eichhorst B.F., Busch R., Hopfinger G., Pasold R., Hensel M., Steinbrecher C., et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(3): 885–91. doi: 10.1182/blood-2005-06-2395.
5. Flinn I.W., Neuberg D.S., Grever M.R., Dewald G.W., Bennett J.M., Paietta E.M., et al. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(7): 793–8. doi: 10.1200/JCO.2006.08.0762.
6. Tam C.S., O'Brien S., Wierda W., Kantarjian H., Wen S., Do K.A., et al. Long-term results of the fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2008; 112(4): 975–80. doi: 10.1182/blood-2008-02-140582.
7. Keating M.J., O'Brien S., Albitar M., Lerner S., Plunkett W., Giles F., et al. Early results of a chemoinmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(18): 4079–88. doi: 10.1200/jco.2005.12.051.
8. Hallek M., Fingerle-Rowson G., Fink A.M., Busch R.M., Mayer J., Hensel M., et al. Immunochemotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) versus fludarabine and cyclophosphamide (FC) improves response rates and progression-free survival (PFS) of previously untreated patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood*. 2008; 112(11): Abstract 325.
9. Böttcher S., Ritgen M., Fischer K., Stilgenbauer S., Busch R.M., Fingerle-Rowson G., et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30(9): 980–8. doi: 10.1200/JCO.2011.36.9348.
10. Kuvshinov A.Yu., Voloshin S.V., Martynkevich I.S., Kleina E.V., Mikhalova M.A., Abdulkadyrov K.M. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance of minimal residual disease and potential of modern methods of its diagnosis and therapy (literature review). *Clinical oncology. Basic Research and Clinical Practice. Russian journal (Klinicheskaya onkogematologiya)*. 2016; 9(2): 191–8. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-191-198. (in Russian)
11. Moreno C., Villamor N., Colomer D., Esteve J., Gine E., Muntañola A., et al. Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107(11): 4563–9. doi: 10.1182/blood-2005-09-3634.
12. Kovacs G., Böttcher S., Bahlo J., Kluth S., Ritgen M., Fink A.M., et al. Value of minimal residual disease (MRD) negative status at response evaluation in chronic lymphocytic leukemia (CLL): combined analysis of two phase III studies of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood*. 2014; 124(21): 23. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/23?sso-checked=true>.
13. Eichhorst B., Fink A.M., Busch R., Kovacs G., Maurer C., Lange E., et al. Frontline chemoinmunotherapy with fludarabine (F), cyclophosphamide (C), and rituximab (R) (FCR) shows superior efficacy in comparison to bendamustine (B) and rituximab (BR) in previously untreated and physically fit patients (pts) with advanced chronic lymphocytic leukemia (CLL): Final analysis of an international, randomized study of the German CLL Study Group (GCLLSG) (CLL10 study). *Blood*. 2014; 124(21): 19. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/19?sso-checked=true>.
14. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008; 111(12): 5446–56. doi: 10.1182/blood-2007-06-093906.
15. Böttcher S., Ritgen M., Pott C., Brüggemann M., Raff T., Stilgenbauer S., et al. Comparative analysis of minimal residual disease detection using four-color flow cytometry, consensus IgH-PCR, and quantitative IgH PCR in CLL after allogeneic and autologous stem cell transplantation. *Leukemia*. 2004; 18(10): 1637–45. doi: 10.1038/sj.leu.2403478.
16. Van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., 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.
17. Milligan D.W., Fernandes S., Dasgupta R., Davies F.E., Matutes E., Fegan C.D., et al. Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses. *Blood*. 2005; 105(1): 397–404. doi: 10.1182/blood-2004-01-0298.
18. Rawstron A.C., Kennedy B., Evans P.A., Davies F.E., Richards S.J., Haynes A.P., et al. Quantitation of minimal disease levels in chronic lymphocytic leukemia using a sensitive flow cytometric assay improves the prediction of outcome and can be used to optimize therapy. *Blood*. 2001; 98(1): 29–35. doi: 10.1182/blood.v98.1.29.
19. Ringelstein-Harlev S., Fineman R. Minimal Residual Disease Surveillance in Chronic Lymphocytic Leukemia by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Rambam Maimonides Med. J.* 2014; 5(4): e0027. doi: 10.5041/RMMJ.10161. <http://www.rmmj.org.il/userimages/421/1/PublishFiles/446Article.pdf>
20. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Non-Hodgkin's lymphomas, version 3.2016. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nhl.pdf.
21. Strati P., Keating M.J., Wierda W.G., Badoux X.C., Calin S., Reuben J.M., et al. Lenalidomide induces long-lasting responses in elderly patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013; 122(5): 734–7. doi: 10.1182/blood-2013-04-495341.
22. Chen C.I., Paul H., Wang T., Le L.W., Dave N., Kukreti V., et al. Long-term follow-up of a phase 2 trial of single agent lenalidomide in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 2014; 165(5): 731–3. doi: 10.1111/bjh.12785.
23. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., Flinn I.W., Burger J.A., Blum K.A., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(1): 32–42. doi: 10.1056/NEJMoa1215637.
24. O'Brien S., Furman R.R., Coutre S.E., Sharman J.P., Burger J.A., Blum K.A., et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: an open-label, multicentre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(1): 48–58. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
25. Furman R.R., Sharman J.P., Coutre S.E., Cheson B.D., Pagel J.M., Hillmen P., et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(11): 997–1007. doi: 10.1056/NEJMoa1315226.
26. O'Brien S., Lamanna N., Kipps T.J., Flinn I., Zelenetz A.D., Burger J.A., et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015; 126(25): 2686–94. doi: 10.1182/blood-2015-03-630947.
27. Brown J.R., Byrd J.C., Coutre S.E., Benson D.M., Flinn I.W., Wagner-Johnston N.D., et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 123(22): 3390–7. doi: 10.1182/blood-2013-11-535047.
28. Goede V., Fischer K., Busch R., Engelke A., Eichhorst B., Wendtner C.M., et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(12): 1101–10. doi: 10.1056/NEJMoa1313984.
29. Stilgenbauer S., Ilhan O., Wozniak D., Renner C., Mikuskova E., Böttcher S., et al. Safety and efficacy of Obinutuzumab plus Bendamustine in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: subgroup analysis of the Green Study. *Blood*. 2015; 126(23): 493. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/493?sso-checked=true>.
30. Roberts A.W., Davids M.S., Pagel J.M., Kahl B.S., Puvvada S.D., Gerecitano J.F., et al. Targeting BCL2 with venetoclax in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(4): 311–22. doi: 10.1056/NEJMoa1513257.
31. Ma S., Brander D.M., Seymour J.F., Kipps T.J., Barrientos J.C., Davids M.S., et al. Deep and Durable Responses Following Venetoclax (ABT-199 / GDC-0199) Combined with Rituximab in Patients with Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia: Results from a Phase 1b Study. *Blood*. 2015; 126(23): 830. <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/830?sso-checked=true>.
32. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., Burger J.A., Blum K.A., Coleman M., et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(16): 2497–506. doi: 10.1182/blood-2014-10-606038.
33. FDA Approves Imbruvica to Treat Chronic Lymphocytic Leukemia. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-chronic-lymphocytic-leukemia-4007.html>
34. Byrd J.C., Brown J.R., O'Brien S., Barrientos J.C., Kay N.E., Reddy N.M., et al. Ibrutinib versus Ofatumumab in Previously Treated Chronic Lymphoid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(3): 213–23. doi: 10.1056/NEJMoa1400376.
35. O'Brien S., Jones J.A., Couture S., Mato A.R., Hillmen P., Tam C., et al. Efficacy and safety of ibrutinib in patients with relapsed or refractory

- chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic leukemia with 17p deletion: results from the phase II RESONATE™-17 trial. (ASH Annual Meeting Abstracts). *Blood*. 2014; 124(21): 327. <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/327?ssoc-checked=true>.
36. FDA Expands Approved Use of Imbruvica for Chronic Lymphocytic Leukemia. <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-expands-approved-imbruvica-chronic-lymphocytic-leukemia-4061.html>.
37. Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M., Robak T., Owen C., Ghia P., et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(25): 2425–37. doi: 10.1056/NEJMoal509388.
38. FDA Approves Imbruvica (ibrutinib) for the First-Line Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-imbruvica-ibrutinib-first-line-chronic-lymphocytic-leukemia-4353.html>.
39. Fraser G., Cramer P., Demirkan F., Silva R.S., Pylypenko H., Grosicki S., et al. Ibrutinib (I) plus bendamustine and rituximab (BR) in previously treated chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): a 2-year follow-up of the HELIOS study. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34: Abstract 7525.
40. Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., Heerema N.A., Zhao W., Abruzzo L., et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol.* 2015; 1(1): 80–7. doi:10.1001/jamaoncol.2014.218.
41. Jain P., Keating M., Wierda W., Estrov Z., Ferrajoli A., Jain N., et al. Outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia after discontinuing ibrutinib. *Blood*. 2015; 125(13): 2062–7. doi:10.1182/blood-2014-09-603670.
42. Public Workshop on Minimal Residual Disease (MRD) as a Surrogate Endpoint in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). <http://www.fda.gov/Drugs/NewsEvents/ucm340707.htm>

Поступила 20.10.16

Принята к печати 22.11.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.155.192-07:575.08

Субботина Т.Н.^{1,3}, Дунаева Е.А.², Миронов К.О.², Дрибноходова О.П.², Харсекина А.Е.¹,
Васильев Е.В.⁵, Хоржевский В.А.⁶, Ольховский И.А.^{1,4}, Шипулин Г.А.²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ МУТАЦИЙ В 12-М ЭКЗОНЕ ГЕНА *JAK2*

¹Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, Россия;

⁴ФГБУН «Красноярский научный центр» Сибирского отделения РАН, 660036, г. Красноярск, Россия;

⁵КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, г. Красноярск, Россия;

⁶КГБУЗ Красноярское краевое патолого-анатомическое бюро, 660022, г. Красноярск, Россия

Соматические мутации в кодонах 532–547 12-го экзона гена *JAK2* высокоспецифичны для подтверждения диагноза истинной полицитемии. Цель настоящей работы – разработка методики для обнаружения и количественной оценки уровня аллельной нагрузки данных мутаций с использованием технологии пиросеквенирования. Определение нуклеотидной последовательности проводили на приборе PyroMark Q24. Для верификации наличия мутаций выполняли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов. Секвенирование клонов проводили с использованием реагентов и оборудования фирмы “Applied Biosystems” (США). После подтверждения наличия мутации в клонх методом Сэнгера, образец, содержащий мутацию, повторно анализировали на приборе PyroMarkQ24 в количественном формате для определения уровня аллельной нагрузки. Среди 48 образцов ДНК от пациентов с высокой клинико-гематологической вероятностью диагноза истинной полицитемии и отсутствием мутации V617F в 14-м экзоне гена *JAK2* был идентифицирован один образец, содержащий наиболее распространенную в области 12-го экзона данного гена соматическую мутацию N542-E543 del. Определение уровня аллельной нагрузки проводили трижды в динамике развития заболевания с августа 2013 г. по июнь 2015 г. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ходе развития заболевания аллельная нагрузка у пациента возрастает и за 23 мес наблюдения этот показатель вырос более чем в 2 раза, что свидетельствует о соответствующем увеличении количества клеток трансформированного клона. В то же время до настоящего момента у пациента наблюдается клинико-гематологическая компенсация заболевания на фоне проведения умеренных терапевтических воздействий – эксфузионной и дезагрегационной терапии. Предложенная методика позволяет детектировать мутации в анализируемом фрагменте, а также проводить количественный мониторинг аллельной нагрузки в динамике заболевания с целью контроля эффективности используемой терапии.

Ключевые слова: мутации в 12-м экзоне гена *JAK2*; миелопролиферативные заболевания; истинная полицитемия; пиросеквенирование.

Для цитирования: Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П., Харсекина А.Е., Васильев Е.В., Хоржевский В.А., Ольховский И.А., Шипулин Г.А. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2*. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 19(4): 196-200. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200>

Для корреспонденции:

Субботина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, старший научный сотрудник Красноярского филиала ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России, 660036, г. Красноярск, Россия. E-mail: stn.25@mail.ru.

For correspondence:

Subbotina Tatiana N., BD, PhD, assistant professor of the Department of Medical Biology of the Siberian Federal University; senior researcher Krasnoyarsk branch of the Federal State budgetary Institution Hematology Research Center. Krasnoyarsk, 660036, Russian Federation. E-mail: stn.25@mail.ru

Information about authors:

Subbotina T.N., <http://orcid.org/0000-0001-7790-5033>; Dunaeva E.A., <http://orcid.org/0000-0002-4477-8506>; Mironov K.O., <http://orcid.org/0000-0001-8207-9215>; Dribnokhodova O.P., <http://orcid.org/0000-0003-4918-4907>; Kharsekina A.E., <http://orcid.org/0000-0003-3395-775X>; Vasiliev E.V., <http://orcid.org/0000-0003-3780-3758>; Khorzhevskiy V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9196-7246>; Olkhovskiy I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2311-2219>; Shipulin G.A., <http://orcid.org/0000-0002-3668-6601>.