

На правах рукописи

КИСЛИЦЫНА МАРИЯ АНАТОЛЬЕВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА КАРИОТИПА ИММУНОСТИМУЛИРОВАННЫХ
В - ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор биологических наук
кандидат медицинских наук

Судариков Андрей Борисович
Обухова Татьяна Никифоровна

Официальные оппоненты:

Мартынкевич Ирина Степановна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Фалалеева Наталья Александровна – доктор медицинских наук, заведующая отделом лекарственного лечения злокачественных новообразований, заведующая отделением противоопухолевого лекарственного лечения Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.И. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «22» декабря 2021 года в 15:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.135.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2021

Ученый секретарь диссертационного совета

кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) отличается гетерогенностью клинических проявлений – от бессимптомного или медленно прогрессирующего до агрессивного течения с показаниями к началу специфической терапии. В клинической практике применяются различные параметры для стратификации: время удвоения лимфоцитов, системы стадирования по Binet и Rai, мутации генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (мутационный статус), концентрация β 2-микроглобулина, наличие CD38 на поверхности опухолевых клеток и генетические нарушения [Hallek M., 2018].

Выявление хромосомных нарушений при ХЛЛ с помощью стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) затруднено в связи с крайне низкой митотической активностью зрелых В-лимфоцитов – субстрата опухоли. Применение стандартных стимуляторов деления В-лимфоцитов, таких как липополисахарид (LPS) и 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА), лишь немного увеличивает количество делящихся клеток [Juliusson G., 1990]. По результатам исследований лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России использование стандартных В-клеточных митогенов позволяет получить митозы у половины больных ХЛЛ и лишь у 18% больных определяется аберрантный кариотип [Захарова А.И., 2006].

Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) позволяет выявлять характерные хромосомные aberrации у 80% больных ХЛЛ: делецию 13q14 - 51%, делецию 11q23/*ATM* - 20%, трисомию хромосомы 12 – 14%, делецию 17p13/*TP53* - 7% [Обухова Т.Н., 2011]. Прогностическое значение этих aberrаций определено: факторами благоприятного прогноза являются нормальный кариотип и наличие делеции 13q14 как единственного нарушения кариотипа, промежуточного прогноза - трисомия хромосомы 12, неблагоприятного - делеция 11q23/*ATM* и крайне неблагоприятным прогностическим фактором является делеция 17p13 с потерей гена-супрессора опухолевого роста *TP53* [Dohner H., 2000].

Однако изменения кариотипа у больных ХЛЛ не ограничиваются этими хромосомными нарушениями. Показано, что наличие любых транслокаций ассоциировано с неблагоприятным течением ХЛЛ [Maug S., 2006]. Имеются сообщения, что несбалансированные структурные aberrации (несбалансированные транслокации, маркерные, дериватные и дицентрические хромосомы) имеют независимое неблагоприятное влияние на течение ХЛЛ [Baliakas P., 2014, Rigolin G.M., 2018]. Результаты предыдущих исследований лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и данные литературы свидетельствуют о независимом неблагоприятном прогностическом значении комплексных нарушений кариотипа (3 и более хромосомных нарушений), сравнимом с наличием делеции 17p13 [Захарова А.И., 2006, Thompson

Р.А., 2015]. Наличие комплексного кариотипа значительно ухудшает результаты лечения ибрутинибом больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ по сравнению с делецией 17p13/*TP53*, определяемой только при FISH-исследовании. Для больных ХЛЛ показано, что наличие ≥ 5 aberrаций в кариотипе является предиктором самого плохого ответа на терапию, в том числе таргентными препаратами [Baliakas P., 2019].

Показано иммуностимулирующее влияние на деление клеток ХЛЛ CpG-олигонуклеотида DSP30 за счет активации внутриклеточных сигнальных путей, приводящей к пролиферации В-клеток, продукции цитокинов, секреции иммуноглобулина на поверхности клетки и экспрессии таких молекул, как CD25, CD80, CD86 [Decker T., 2000]. Молекула CD25 представляет собой переменный домен комплекса рецептора к интерлейкину-2 и определяет высокое сродство к этому цитокину, и добавление интерлейкина-2 (IL2) к олигонуклеотиду CpG-DSP30 еще больше повышает пролиферацию клеток ХЛЛ.

В ряде исследований была показана эффективность использования сочетания CpG-DSP30 и IL2 в качестве стимулятора деления В-лимфоцитов для анализа кариотипа больных ХЛЛ [Dicker F., 2006, Haferlach C., 2007]. Митозы для СЦИ были получены у 98% больных, aberrантный кариотип был выявлен в 83% случаев. Комплексные нарушения кариотипа были обнаружены в 16-20% случаев, однако оценка результатов лечения и выживаемость больных в данных работах не проводилась.

Таким образом, актуальным остается исследование кариотипа больных ХЛЛ с применением иммуностимуляторов деления клеток для изучения спектра и частоты встречаемости отдельных хромосомных аномалий и комплексных нарушений кариотипа, что необходимо для выделения пациентов группы риска и последующей разработки терапевтической тактики.

Цель исследования

Охарактеризовать кариотип иммуностимулированных В-лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом.

Задачи исследования

1. Оценить эффективность использования CpG-олигонуклеотида DSP30 в сочетании с IL2 в сравнении со стандартной комбинацией митогенов LPS и TPA для выявления aberrантного кариотипа при стандартном цитогенетическом исследовании у больных ХЛЛ.
2. Определить спектр и частоту встречаемости хромосомных нарушений, в том числе комплексного кариотипа, при стандартном цитогенетическом исследовании иммуностимулированных В-лимфоцитов у больных ХЛЛ до начала терапии и у больных ХЛЛ с резистентным и рецидивирующим течением.

3. Сравнить информативность стандартного цитогенетического исследования иммуностимулированных В-лимфоцитов и флуоресцентной гибридизации *in situ* у больных ХЛЛ.
4. Оценить взаимосвязь отдельных и комплексных нарушений кариотипа с клиническими и биологическими факторами прогноза ХЛЛ.

Научная новизна исследования

Впервые в РФ разработан протокол культивирования биоматериала с различным клеточным составом с использованием олигонуклеотида DSP30 в сочетании с IL2 у больных хроническим лимфолейкозом.

Охарактеризован кариотип иммуностимулированных опухолевых клеток ХЛЛ с помощью различных молекулярно-цитогенетических методов (FISH, СЦИ, mFISH, mBAND, aCGH).

Определен спектр и частота встречаемости хромосомных aberrаций в группах больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания. Показано различие частоты встречаемости комплексных нарушений кариотипа у больных до начала терапии и у больных в прогрессии и рецидиве заболевания.

Выявлена связь несбалансированных перестроек с неблагоприятными факторами прогноза ХЛЛ (немутированным вариантом генов *IGHV*, комплексным кариотипом).

Показано негативное влияние комплексных нарушений кариотипа на общую выживаемость больных ХЛЛ.

Научно-практическая значимость

Результаты диссертационного исследования дополняют представления о спектре и частоте встречаемости хромосомных нарушений, выявляемых как до начала терапии, так и в прогрессии и рецидиве у больных ХЛЛ. Получены дополнительные сведения о прогностической роли комплексных нарушений кариотипа, а также хромосомных нарушениях, ассоциированных с неблагоприятными факторами прогноза ХЛЛ.

Показано, что внедрение в рутинную практику лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» методики культивирования с иммуностимулятором олигонуклеотидом DSP30 и интерлейкином-2 позволяет с высокой частотой выявлять хромосомные aberrации, имеющие неблагоприятное прогностическое значение у больных ХЛЛ. Проведение СЦИ и FISH необходимо при обследовании до начала терапии и при прогрессии/рецидиве ХЛЛ для определения группы риска и выбора адекватной тактики терапии.

Методология и методы исследования

В основу методологии и теоретической части исследования легли данные, представленные в работах отечественных и зарубежных авторов, а также в научных трудах в

области генетики, диагностики и терапии онкогематологических заболеваний. Особое внимание уделялось исследованиям, в которых изучались патогенетическая роль хромосомных нарушений и современные методы цитогеномного анализа у больных ХЛЛ. Большое значение в теоретическом и практическом аспекте имели научные исследования и концепции о иммуностимулирующем влиянии олигонуклеотида DSP30 на пролиферативную активность опухолевых клеток ХЛЛ и эффективность метода стандартного цитогенетического исследования со специфической стимуляцией.

Перед началом исследования было проведено планирование работы и разработан дизайн исследования. При выполнении данной работы были использованы стандартные цитогенетические (СЦИ) и молекулярно-цитогенетические (mFISH, mBAND, aCGH) методы исследования в соответствии с российскими и международными рекомендациями. Анализ полученных данных был осуществлен с использованием статистических методов обработки результатов. В ходе исследования и при изложении материала применялись общенаучные подходы. Объективность полученных результатов и выводов обеспечена за счет анализа обширного статистического материала.

Положения, выносимые на защиту

1. Эффективность СЦИ у больных ХЛЛ при культивировании с олигонуклеотидом DSP30 в сочетании с IL2 в 1,9 раза выше, чем при использовании стандартных В-клеточных митогенов LPS и TPA.
2. Комплексный кариотип достоверно ассоциирован со снижением общей выживаемости больных хроническим лимфолейкозом.
3. В прогрессии и рецидиве заболевания у больных ХЛЛ делеция 17p13 и комплексные нарушения кариотипа выявлялись достоверно чаще, чем у больных до начала лечения.
4. СЦИ позволяет детализировать структуру хромосомных нарушений: транслокации с делециями 11q22, 13q14, 17p13 и частичную трисомию 12.
5. Несбалансированные транслокации ассоциируются с немутированным вариантом генов *IGHV* и комплексными нарушениями кариотипа.

Внедрение в практику

Полученные результаты используют в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России при обследовании до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания больных ХЛЛ и применяются в отделениях гематологии других клиник.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 2 статьи в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных высшей аттестационной комиссией Российской Федерации, 6 тезисов.

Апробация

Апробация работы состоялась 17 мая 2021 года на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол № 5). Основные положения диссертационной работы доложены на: 4-ом Конгрессе гематологов России (Москва, 2018 г.), 5-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2019 г.), на 12-ом Конгрессе Европейской ассоциации цитогенетиков (Зальцбург, 2019 г.) и 5-ом Конгрессе гематологов России (Москва, 2020 г.).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 10 отечественных и 179 зарубежных источников. Текст диссертации иллюстрирован 35 рисунками и 22 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика больных

В исследование включено 92 больных ХЛЛ, 65 мужчин и 27 женщин (соотношение мужчины : женщины составляет 2,4:1) в возрасте от 30 до 86 лет (медиана возраста 58 лет), которые в период с ноября 2015 по май 2019 года наблюдались в клинических подразделениях ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России: консультативном гематологическом отделении с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии (зав. отделением – к.м.н. Моисеева Т.Н.), отделении интенсивной высокодозной химиотерапии лимфом с круглосуточным и дневным стационарами (зав. отделением – д.м.н. Звонков Е.Е.), отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов с круглосуточным и дневным стационарами (зав. отделением – к.м.н. Кравченко С.К.), отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гематологических заболеваний с круглосуточным и дневным стационарами (зав. отделением – к.м.н. Грибанова Е.О.), отделении интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным и дневным стационарами (зав. отделением – к.м.н. Троицкая В.В.), а также в дневном стационаре Московского городского гематологического центра (зав. отделением – д.м.н. Никитин Е.А.).

Диагноз ХЛЛ устанавливали на основании данных клинического анализа крови и иммунофенотипического исследования (ИФТ) согласно рекомендациям Международной рабочей группы по изучению ХЛЛ (iwCLL). ХЛЛ диагностировали при выявлении более 5000 моноклональных В-лимфоцитов в 1 мкл периферической крови и наличии В-клеточных антигенов CD19, CD20, CD22, CD79b в сочетании с Т-клеточным маркером CD5 и CD23 на поверхности опухолевых В-лимфоцитов. Стадии заболевания определяли по системе Binet.

Общий анализ крови, иммунохимическое исследование белков сыворотки крови и иммунофенотипическое исследование крови выполнялось в централизованной клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. лабораторией – к.м.н. Двирнык В.Н.), мутационный статус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов - в лаборатории молекулярной гематологии (исследование выполнено ст. н.с., к.б.н. Бидерман Б.В., зав. лабораторией – д.б.н. Судариков). 21 больному клинический анализ крови и ИФТ крови проводили по месту жительства.

В лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России всем больным выполнялись стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) (зав. лабораторией к.м.н. Обухова Т.Н.). 18 пациентам с несбалансированными перестройками была проведена многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ* (mFISH), из них 6 пациентам выполнен многоцветный анализ хромосомных сегментов (mBAND). Сравнительная геномная гибридизация выполнена на базе ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» в рамках обучающего семинара.

У 4 больных ХЛЛ синхронно протекал с другими гематологическими заболеваниями. У 2 больных выявлен ХЛЛ в сочетании с миелодиспластическим синдромом с трансформацией в острый миелоидный лейкоз, у 2 больных – сочетание ХЛЛ и лимфомы маргинальной зоны. У одного пациента в анамнезе отмечено состояние после полихимиотерапии по поводу лимфомы Ходжкина.

На момент цитогенетического исследования стадия А определена у 23 (25%) больных, стадия В – у 52 (56,5%) и стадия С – у 17 (18,5%) больных. Концентрация β 2-микроглобулина в сыворотке крови была определена у 37 (40,2%) пациентов, из них концентрация β 2-микроглобулина более 3,5 мг/л была определена у 19 пациентов. Исследование мутационного статуса генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGHV*) проведено 63 больным, вариант без мутаций генов *IGHV* определен у 48 (52,2%) больных. Иммунофенотипическое исследование крови на наличие CD38 выполнено 62 больным, наличие антигена CD38 на поверхности опухолевых В-лимфоцитов выявлено у 41 (44,6%) больного. Определение группы риска больных ХЛЛ по международному прогностическому индексу (МПИ) было возможным для 31 больных

при наличии информации о всех лабораторных показателях: делеции 17p, мутационном статусе генов *IGHV*, концентрации β 2-микроглобулина. Группа низкого риска определена у 4, группа промежуточного риска - у 9, группа высокого риска - у 13, группа очень высокого риска - у 5 больных. Данные клинических параметров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика больных ХЛЛ, включенных в исследование.

Параметры	Количество больных, N (%)
Количество больных	92
Пол:	
мужчины	65 (70,7)
женщины	27 (29,3)
Медиана возраста, лет (диапазон)	58 (30-86)
Стадия ХЛЛ по Binet:	
А	23 (25,0)
В/С	69 (75,0)
β 2-микроглобулин (мг/л):	
$\leq 3,5$	18 (19,6)
$> 3,5$	19 (20,6)
нет данных	55 (59,8)
Мутационный статус генов <i>IGHV</i> :	
мутированный вариант	15 (16,3)
немутированный вариант	48 (52,2)
нет данных	29 (31,5)
Иммунофенотипическое исследование крови:	
наличие CD38	41 (44,6)
отсутствие CD38	21 (22,8)
нет данных	30 (32,6)
Группа риска по МПИ:	
низкая	4 (4,4)
промежуточная	9 (9,8)
высокая	13 (14,1)
очень высокая	5 (5,4)
нет данных	61 (66,3)

СЦИ и FISH-исследование были выполнены всем 92 больным: 49 больным до начала терапии и 43 больным на этапе терапии, из них 36 больным в прогрессии заболевания и 4 больным на момент развития рецидива. Терапия больных ХЛЛ включала разные схемы лечения: иммунохимиотерапию (FCR, FCR-lite, FR, R-CHOP), иммунотерапию (монотерапию ритуксимабом и бендамустин с ритуксимабом), таргетными препаратами (ибрутиниб, венетоклакс).

4 пациентам цитогенетическое исследование проводилось двукратно, 3 из них СЦИ проводили до начала терапии и на момент прогрессии заболевания, одному пациенту - до начала

терапии и после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Одному больному исследование проводили троекратно: до лечения, после окончания курса химиотерапии и на момент прогрессии заболевания. Таким образом, всего выполнено 97 исследований.

Материал исследования

Методом СЦИ с использованием DSP30 и интерлейкина-2 было проведено 97 серий исследований. Для выполнения СЦИ культивировали клетки периферической крови в 44 (46,5%) исследованиях, мононуклеары периферической крови – в 8 (8,3%), одновременно клетки периферической крови и мононуклеары – 24 (24,7%), клетки костного мозга – в 17 (17,2%), одновременно клетки костного мозга и мононуклеары (выделены из костного мозга) - в 3 (3%), клетки биоптата лимфатического узла – в одном исследовании.

Методом СЦИ с использованием LPS и TPA было проведено 85 исследований. Для выполнения СЦИ культивировали клетки периферической крови в 53 (62,4%) исследованиях, одновременно клетки периферической крови и мононуклеары – в 19 (22,4%), клетки костного мозга – в 11 (13,8%), клетки костного мозга и мононуклеары (выделены из костного мозга) - в 2 (2,3%) исследованиях.

Для проведения FISH-исследования в 93 случаях использовали мононуклеары, выделенные из клеток периферической крови, и в 4 случаях – мононуклеары, выделенные из клеток костного мозга.

Методы исследования

СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследование выполняли в 97 случаях (Рисунок 1). СЦИ с 2 комбинациями митогенов: DSP30 в сочетании с IL2 (DSP30+IL2) и LPS с TPA (LPS+TPA) проводили в 85 случаях. Для каждого пациента проводили серию культур (1-4) в зависимости от количества материала и целесообразности. На начальных этапах работы проводили параллельное культивирование мононуклеарных клеток с DSP30+IL2 и культивирование клеток периферической крови с LPS+TPA у каждого больного (1 и 3 серии). В дальнейшем при достаточной клеточности образца проводили 4 серии культур: культивирование клеток крови (костного мозга) и выделенных мононуклеарных клеток с DSP30+IL2 и LPS+TPA (1, 2, 3, 4 серии). После анализа промежуточных результатов СЦИ культивировали только клетки периферической крови (костный мозг, биоптат лимфоузла) с DSP30+IL2 и LPS+TPA (2 и 3 серии). Всего количество культур серии 1 составило 32, серии 2 – 89, серии 3 – 85, серии 4 - 21.

Взятие периферической крови, костного мозга проводилось в пробирки с гепарином лития, биоптат лимфоузла - в пробирки с гепарином лития с транспортной средой (питательная среда RPMI 1640 с гентамицином). Выделение мононуклеаров периферической крови и костного мозга проводили на градиенте плотности 1,077 раствора Lympho Separation Medium (LSM, “ICN Biomedicals”).

Для проведения СЦИ клеточный материал (кровь, костный мозг, мононуклеары, клетки биоптата лимфоузла) из расчета 2 млн. ядросодержащих клеток на 10 мл среды RPMI 1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки в соотношении 4:1, L-глутамин в конечной концентрации 0,584 мг/мл, антибиотика гентамицина в конечной концентрации 0,28 мг/мл культивировали с двумя комбинациями митогенов: (1) DSP30+IL2 - иммуностимулятором деления олигонуклеотидом DSP30 в конечной концентрации 2 нмоль/мл (TibMolBiol, Германия) и интерлейкином-2 (IL2, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 200 Ед/мл; (2) LPS+TPA - стимулятором деления В-лимфоцитов липополисахаридом LPS E.coli (Sigma, США) в конечной концентрации 0,01 мг/мл и TPA в конечной концентрации 0,01 нг/мл (Sigma, США). Суспензию клеток инкубировали при температуре 37⁰С в течение 72 часов, последние 17 часов с добавлением колцемида 0,15 мкг/мл. Затем проводили обработку гипотоническим раствором и фиксацию клеток по стандартной методике. G-дифференциальную окраску хромосом выполняли по методике Seabright с модификациями [Seabright M., 1971]. Изображение метафазных пластинок получали с помощью платформы Metafer (MetaSystems, Германия). Хромосомный анализ проводили с помощью программного обеспечения Ikaros.

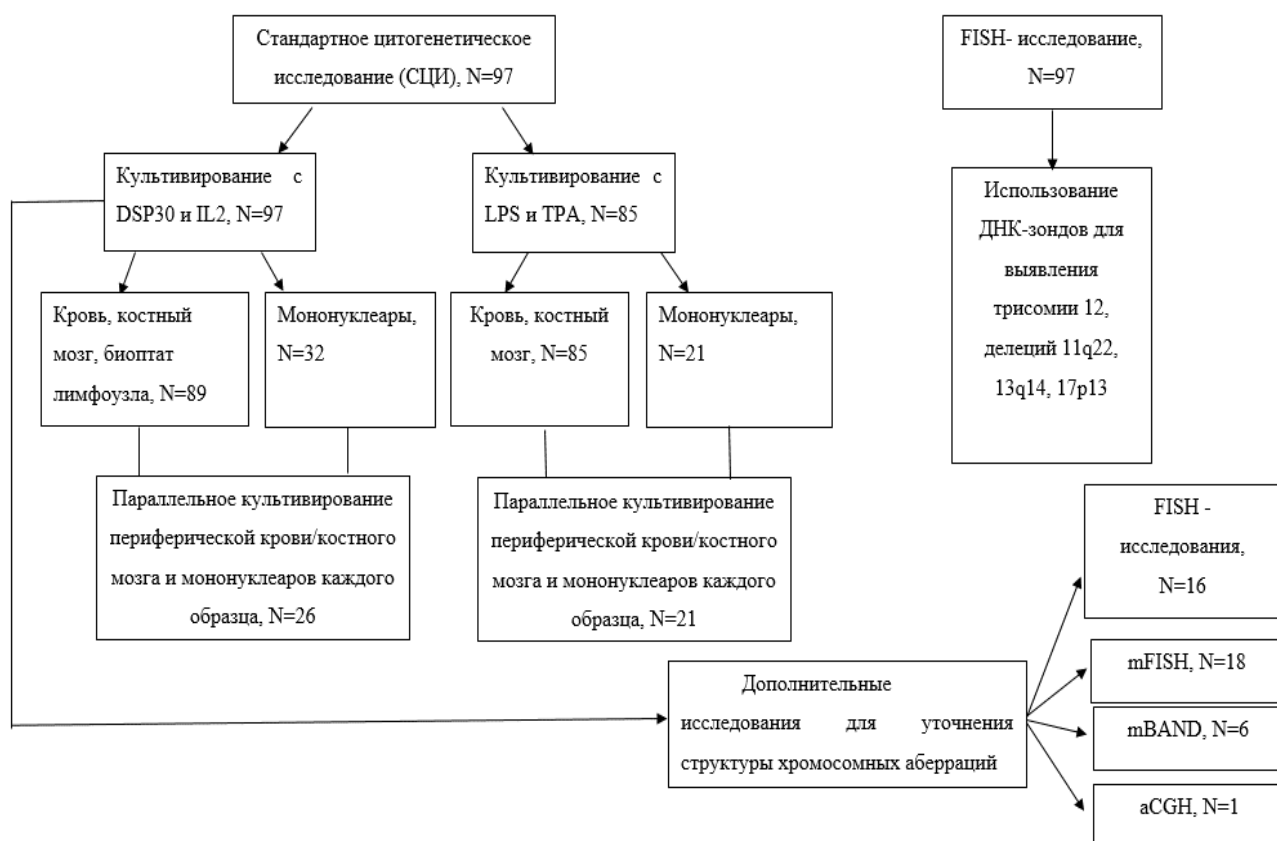


Рисунок 1. Алгоритм цитогенетического исследования у больных ХЛЛ.

Всем больным проводилось FISH-исследование. Для выявления трисомии 12 и делеций 11q22, 13q14, 17p13 в работе использовали многоцветный зонд LSI p53 / LSI ATM and LSI

D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12 Multi-color Probe производителя Abbott (“Vysis”, США с добавлением LSI гибридизационного буфера.

У 7 больных ХЛЛ при выявлении в кариотипе транслокаций, затрагивающих locus генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGH*), проводили дополнительное FISH-исследование для подтверждения перестройки локуса 14q32/*IGH* с ДНК-зондом LSI *IGH* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe производителя Metasystems (Германия). У одного больного для подтверждения частичной трисомии 12 и делеции длинного плеча хромосомы 5 были проведены FISH-исследования с соответствующими ДНК-зондами XL *MDM2* (12q15) XL 5q31/5q33/5p15 производителя Metasystems (Германия). Двум больным выполнено FISH-исследование для подтверждения/исключения перестройки локуса гена *BCL6*/3q27 с ДНК-зондом LSI *BCL6* (ABR) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe производителя Abbott (США). 5 больным по результатам mFISH было проведено дополнительное FISH-исследование для подтверждения перестройки локуса гена *MYC* с использованием зонда LSI *IGH/MYC/CEP 8* Tri-color FISH Probe Kit производителя Abbott (США). 4 больным для исключения транслокации t(11;14)(q13;q32) применялся зонд LSI *IGH/CCND1* DF FISH Probe Kit производителя Abbott (США). FISH-исследование проводили по протоколу фирмы-производителя. Для каждого зонда анализировали по 200 интерфазных ядер с четкими сигналами. Определены границы нормальных значений для каждой пробы многоцветного зонда и других проб. Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения для анализа флуоресцентных сигналов Isis (MetaSystems, Германия).

18 пациентам с выявленными при кариотипировании несбалансированными перестройками при наличии достаточного биоматериала была выполнена многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ* (mFISH), из них 6 пациентам выполнен многоцветный анализ хромосомных сегментов (mBAND). В качестве материала для проведения mFISH- и mBAND-исследований использовали DSP30-стимулированную клеточную культуру. Реакцию mFISH проводили с использованием 24-цветного зонда 24Xyte (MetaSystems, Германия). Дальнейшие процедуры многоцветной флуоресцентной гибридизации выполняли в соответствии с рекомендациями производителя. Для постановки реакции mBAND использовались ДНК-зонды mBand Xyte (MetaSystems, Германия) к хромосомам 11, 12, 13. Для визуализации и анализа результатов применяли программное обеспечение Isis (MetaSystems, Германия). Результаты mFISH и mBAND оценивались в 2 до 20 метафаз, в среднем в 10 метафазах.

Одному пациенту выполнена сравнительная геномная гибридизация (aCGH). Для выполнения aCGH выделение ДНК из препарата мононуклеарных клеток, полученных ранее

для FISH-исследования, проводили с использованием набора innuPREP DNA/RNA MiniKit (Analytik Jena, Германия). Микроматричный анализ был выполнен на оборудовании InnoScan 710 (Innopsys Inc., США) с помощью микроматрицы высокой плотности CytoSure Constitutional v3 8x60K array (OGT, Великобритания). Референсная мужская ДНК для анализа была взята от компании OGT (Великобритания). Определение вариаций числа копий ДНК (CNVs) проводилось по данным измерения интенсивности сигнала с зондов от референсной и исследуемой ДНК, гибридизованных на слайде. Данные были обработаны с помощью программы CytoSure™ Interpret Software. Патогенные вариации числа копий ДНК были оценены в клинической базе DECIPHER v11.0.

Результаты СЦИ, FISH, mFISH, mBAND, aCGH описывали согласно Международной цитогеномной номенклатуре ISCN, 2020. В соответствии с Европейскими рекомендациями по цитогеномному анализу гематологических новообразований при выявлении клональных aberrаций анализировали не менее 10 митозов [Rack К.А., 2019]. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2020. Комплексный кариотип определяли при выявлении любых 3 и более клональных хромосомных нарушений.

Статистические понятия и методы исследования

Статистическая обработка данных проводилась с использованием методов описательной статистики, частотного, регрессионного анализа и событийного анализа. Работа выполнена совместно с сотрудниками информационно-аналитического отдела ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. к.т.н. Куликов С.М.). Расчеты проводили с помощью программы для статистической обработки данных SAS 9.4 и GraphPad Prism 6. Для оценки результатов частотного анализа использовали критерий χ^2 (хи-квадрат), для сравнения очень малых выборок, в которых число случаев составляет меньше 10, применяли точный критерий Фишера. Для парного сравнения количественных данных использовали критерий знаковых рангов Вилкоксона (Уилкоксона), для попарного сравнения категориальных данных – критерий Мак-Немара. Результаты регрессионного анализа оценивались с помощью коэффициента детерминации R². Лог-ранг критерий применяли для оценки статистической значимости различий в группах. При анализе общей выживаемости стартовой точкой считалась дата проведения цитогенетического анализа и датой последнего контакта считалась датой последнего визита к врачу или дата последнего проведенного анализа. Различия считались достоверно значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ результатов СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и стандартной комбинации митогенов

Всего выполнено 97 исследований с использованием при культивировании CpG-олигонуклеотида DSP30 в сочетании с IL2 (DSP30+IL2), из них в 26 случаях проведено

параллельное культивирование клеток крови (костного мозга) и мононуклеарных клеток одного образца. В 85 исследованиях проводили СЦИ с использованием В-клеточных митогенов: LPS и TPA (LPS+TPA), из них в 21 случаях параллельно культивировали клетки крови (костного мозга) и мононуклеаров. В сравнительный анализ были включены результаты культивирования клеток периферической крови и костного мозга с DSP30+IL2 и с LPS+TPA у 76 больных.

При сравнении результатов культивирования с DSP30+IL2 биоматериала разного клеточного состава (кровь/костный мозг и мононуклеарные клетки) выявлены достоверные различия в митотической активности клеток (наличии делящихся клеток): среднее значение количества митозов при культивировании клеток крови/костного мозга и мононуклеаров составило 13,6 и 8,2, соответственно ($p = 0,035$), однако по количеству митозов с абберациями результаты культивирования достоверно не различались ($p = 0,382$). Согласно Европейским рекомендациям по цитогеномному анализу гематологических новообразований при выявлении клональных аббераций должно быть проанализировано не менее 10 митозов. При культивировании мононуклеаров среднее количество митозов составило 8,2. В связи с этим, в дальнейшем при СЦИ фракция мононуклеарных клеток не использовалась.

Анализ результатов культивирования биоматериала разного клеточного состава с LPS+TPA не выявил достоверных различий в митотической активности клеток, в количестве митозов с абберациями и количестве выявленных аббераций, однако, также отмечалось снижение общего количества митозов и % митозов с абберациями в культуре мононуклеарных клеток, что послужило основанием для использования при культивировании только клеток крови или костного мозга на дальнейших этапах исследования.

Таблица 2. Результаты СЦИ с использованием DSP30+IL2 и LPS+TPA у больных ХЛЛ.

Показатели	DSP30+IL2	LPS+TPA	p
Наличие митозов, (%)	81,6 (62/76)	85,5 (65/76)	0,5348
Абберантный кариотип, (%)	82,3 (51/62)	44,6 (29/65)	<0,0001
% митозов с абберациями, среднее \pm SE*	59,0 \pm 4,9	23,0 \pm 4,0	<0,0001
количество аббераций, среднее \pm SE*	2,9 \pm 0,4	1,5 \pm 0,4	<0,0001

* SE (standard error) – стандартная ошибка среднего значения

Сравнительный анализ результатов параллельного культивирования клеток крови или костного мозга с двумя комбинациями митогенов с DSP30+IL2 и LPS+TPA показал достоверно высокую частоту выявления абберантного кариотипа при специфической стимуляции DSP30 и

IL2, в том числе количестве митозов с абберациями и количестве выявленных аббераций ($p < 0,0001$) (Таблица 2).

Методом СЦИ с DSP30+IL2 митозы получены у 62 из 76 (81,6%) больных, из них абберантный кариотип выявлен в 51 из 62 (82,3%) случаев. В среднем на кариотип больного количество митозов с абберациями составило 59,3% и количество выявленных аббераций - 2,9. Аналогично, методом СЦИ с LPS+TPA митозы получены у 65 из 76 (85,5%) больных, из них абберантный кариотип выявлен в 29 из 65 (44,6%) случаев. В среднем на кариотип больного количество митозов с абберациями составило 23,0% и количество выявленных аббераций - 1,5.

Частота характерных для ХЛЛ хромосомных нарушений при культивировании с DSP30+IL2 и LPS+TPA достоверно не различалась для делеции 11q22 – 30,6% и 16,9% ($p = 0,107$); для трисомии 12 – 12,9% и 6,2% ($p = 0,194$); для делеции 17p13 - 20,0% и 13,8% ($p = 0,289$). Делеция 13q14 достоверно чаще выявлялась в культуре DSP30+IL2 по сравнению с LPS+TPA – 16,1% и 4,6%, соответственно ($p = 0,041$), также комплексные нарушения кариотипа с ≥ 3 абберациями – 40,0% и 18,5%, соответственно ($p = 0,004$) (Таблица 3).

Таблица 3. Частота детекции хромосомных нарушений при культивировании с DSP30+IL2 и LPS+TPA у больных ХЛЛ.

Хромосомные нарушения с вовлечением	DSP30+IL2, % (количество) случаев, N=62	LPS+TPA, % (количество) случаев, N=65	p
11q22	30,6 (19)	16,9 (11)	0,107
12q	12,9 (8)	6,2 (4)	0,194
13q14	16,1 (10)	4,6 (3)	0,041
17p13	21,0 (13)	13,8 (9)	0,289
комплексный кариотип (≥ 3 аббераций)	41,9 (26)	18,5 (12)	0,0004

Для графического изображения зависимости количества аббераций от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA использовались логарифмические шкалы по оси абсцисс и ординат, на которых значение «-3» соответствовало нулю - отсутствию аббераций (Рисунок 2). При анализе графика были выделены три области, при которых:

1) значения по оси абсцисс (количество аббераций в культуре DSP30+IL2) и ординат (количество аббераций в культуре LPS+TPA) были равными «-3», что соответствовало отсутствию выявленных аббераций в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA. В этой области значений было определено 10 случаев отсутствия хромосомных нарушений в двух культурах.

2) значения определялись по одной прямой (пунктирная линия проведена условно), что соответствовало случаям выявления хромосомных нарушений в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA. В этой области значений было определено 28 случаев выявления хромосомных нарушений в двух культурах. Исключением являлся один случай обнаружения хромосомного нарушения только в культуре LPS+TPA - на графике это соответствовало значению «-3» на оси абсцисс и «0» по оси ординат.

3) значения по оси ординат были равными «-3», а значению по оси абсцисс ≥ 0 , что соответствовало случаям детекции хромосомных нарушений, выявленных только при культивировании с DSP30+IL2 (область под условно проведенной прямой линией). В этой области значений было определено 18 случаев хромосомных нарушений, выявленных только в культуре DSP30+IL2. Кроме того, у 5 больных с выявленными хромосомными нарушениями в культуре с DSP30+IL2 отсутствовали митозы в культуре LPS+TPA. Так была выделена группа с дополнительными хромосомными нарушениями, выявленными только при культивировании с DSP30+IL2 – 23 случая.

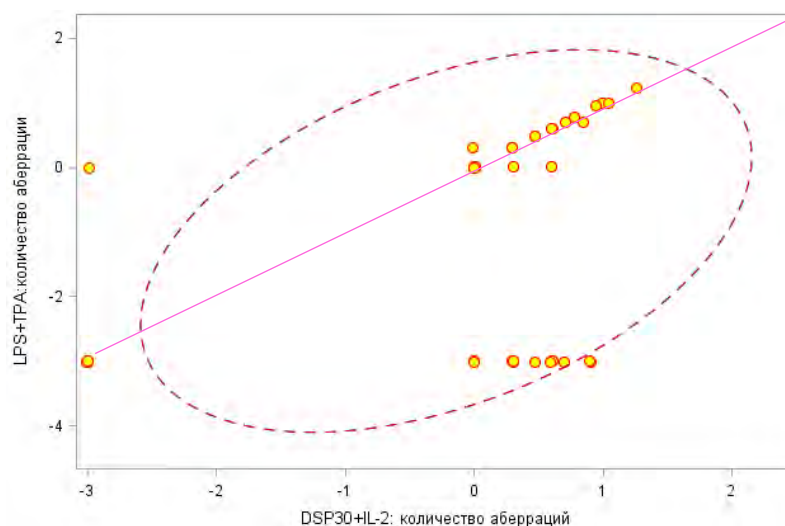


Рисунок 2. График зависимости количества детектируемых aberrаций от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA.

Группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2

Для того, чтобы охарактеризовать группу с дополнительно выявленными хромосомными нарушениями (группа 1), проведено сравнение данной группы с группами больных с нормальным кариотипом (группа 2) и aberrантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA (группа 3). У 8 из 18 (44,4%) больных в культуре с LPS+TPA хромосомные aberrации были выявлены только в одной из 20 метафаз, что не позволяло их расценивать как клональные нарушения, при этом в культуре с DSP30+IL2 они обнаружены в среднем в 59,2% метафаз. В дополнительной группе одно хромосомное нарушение было выявлено у 7 из 23 (30,4%), два хромосомных нарушения – у 4 (17,4%) и комплексные

нарушения кариотипа – у 12 (52,2%). В этой группе хромосомные нарушения с вовлечением локуса 11q22 были определены в 8 (34,8%), 12q – в 2 (8,7%), 13q14 – в 7 (30,4%), делеция 17p13 – в 4 (17,4%) случаях.

Проведен анализ общей выживаемости (ОВ) в трех группах: с дополнительно выявленными абберациями (N=21), с нормальным кариотипом (N=10) и абберантным кариотипом (N=28) (Рисунок 3). Достоверно значимых различий ОВ в трех группах пациентов не выявлено ($p = 0,286$), однако обнаружена тенденция к снижению показателей ОВ в группе 3, и самые низкие показатели ОВ выявлены в группе 1. На сроке наблюдения 32 месяца ОВ больных с нормальным кариотипом составила 100%, с абберантным кариотипом – 85,7%, в группе дополнительных хромосомных нарушений - 76,1%. В трех группах пациентов медиана не достигнута.

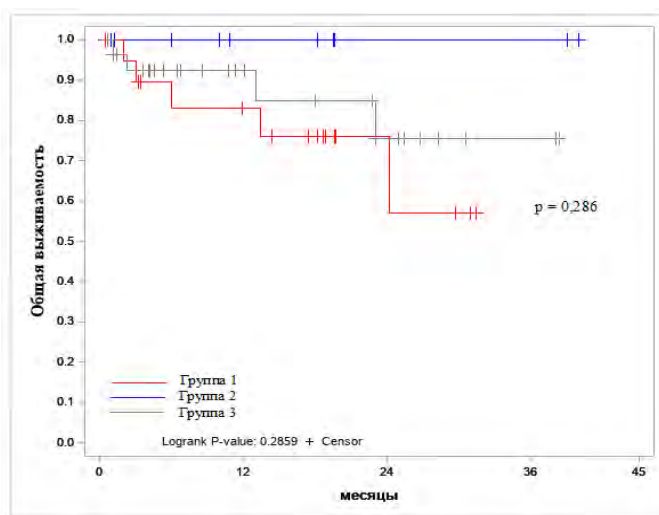


Рисунок 3. ОВ в трех группах больных ХЛЛ с нормальным кариотипом, с абберантным кариотипом и дополнительно выявленными хромосомными нарушениями в культуре DSP30+IL2.

Частотный анализ, отражающий взаимосвязь трех групп с клинико-биологическими параметрами, показал, что по клиническим и биологическим характеристикам группа 1 занимает промежуточное положение между группами 2 и 3. Наиболее наглядно это отражает частотный анализ, проведенный по категориям: стадии по Binet, мутационный статус генов *IGHV*, статус заболевания на момент исследования. В группе 2 преобладали больные со стадией А (40%) и В (40%), с вариантом без мутаций генов *IGHV* (57,1%), которые были обследованы преимущественно до лечения (90%). Группу 3 в основном составили пациенты со стадией В (78,6%), с вариантом без мутаций генов *IGHV* (81,3%), более половины из которых были обследованы в прогрессии или рецидиве заболевания (56,5%). В группе 1 преобладали больные со стадией В (47,8%) и в равном количестве со стадией А (26,1%) и С (26,1%), с вариантом без

мутаций генов *IGHV* (69,2%), из которых в прогрессии и рецидиве заболевания составили 43,5% больных.

Анализ спектра и частоты встречаемости хромосомных aberrаций у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии и рецидиве заболевания

В группу больных до начала терапии было включено 49 больных, из них при СЦИ митозы получены у 39 из 49 (79,6%) больных. В группе больных с резистентным и рецидивирующим течением, включающей 43 пациента, при культивировании митозы получены у 38 из 43 (88,4%) больных. У 4 больных были выполнены повторные цитогенетические исследования как до терапии, так и в прогрессии на фоне лечения. Кариотип оценивался по результатам СЦИ с использованием при культивировании DSP30+IL2 биоматериала разного клеточного состава.

Сравнительный анализ результатов СЦИ, проведенный у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания, показал достоверные различия в частоте выявления aberrантного кариотипа, 74,4% (29/39) и 94,7% (36/38), соответственно ($p = 0,025$) (Таблица 4).

Таблица 4. Частота встречаемости хромосомных аномалий у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания.

Хромосомные нарушения	Частота выявления в группе больных до начала терапии, %, (количество) больных N=39	Частота выявления в группе больных в прогрессии/рецидиве заболевания, %, (количество) больных N=38	p
с вовлечением локуса 11q22	30,8 (12)	31,6 (12)	0,815
трисомия 12	15,4 (6)	13,2 (5)	0,375
с вовлечением локуса 13q14	17,9 (7)	15,8 (6)	1,000
с вовлечением локуса 17p13	10,3 (4)	31,6 (12)	0,026
сбалансированные транслокации	15,4 (6)	14,3 (6)	1,000
несбалансированные перестройки	25,6 (10)	45,2 (16)	0,153
комплексный кариотип (≥ 3 aberrаций)	30,8 (12)	55,3 (21)	0,039
с вовлечением локуса 11q22	30,8 (12)	31,6 (12)	0,815

При сравнении частоты детекции делеций в характерных точках разрыва 11q22, 13q14, 17p13 и трисомии 12 выявлены достоверные различия только по частоте выявления 17p13 и комплексных нарушений кариотипа. В группах больных до начала терапии и в

прогрессии/рецидиве заболевания частота выявления хромосомных нарушений с вовлечением 17p13 составила 10,3% и 31,6% ($p = 0,026$) и комплексного кариотипа – 30,8% и 55,3%, соответственно ($p = 0,039$).

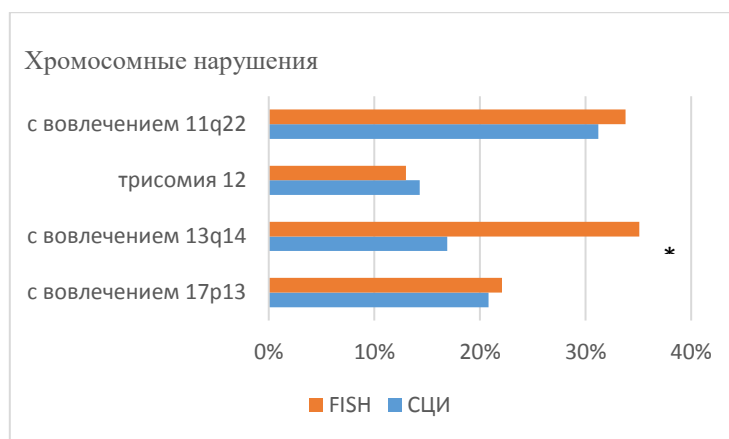
В группе больных до начала терапии выявлены хромосомные aberrации: сбалансированные транслокации, в том числе с вовлечением генов *IGH* - t(2;14)(p14-15;q32), несбалансированные перестройки с участием локусов 3q27, 7q22, 8p23, 8q24, 11p14, 15q26, 22p13, делеции 1q31 и 3p13, 8q22, моносомия по хромосоме 12. У больных в прогрессии/рецидиве заболевания определены хромосомные нарушения: сбалансированные транслокации, в том числе с вовлечением генов *IGH* - t(8;14)(q24;q32), t(14;19)(q32;q13), несбалансированные перестройки с вовлечением локусов 2q31 и 2q37, 4p15-p16, 6p25, 6q27, 7p21-22, 9p11-p21, 12p13, 14q32, 16p13, 19q13, 22q13, делеции 1q22, 1q23, 1q36, 1q42, 2p21 и 3q13, 4q34, 6q13-q14 и 6q21-22, 9p21-p22, 21q21, и моносомии по хромосомам Y, 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 17, 18, 21, 22. В двух группах больных ХЛЛ выявлены повторяющиеся хромосомные нарушения: несбалансированные перестройки с вовлечением локусов 2q27-q31, 4q35, 15p13, 16q24 и 22q13, делеции 4q22-q23 и 14q21-q22, моносомии по хромосомам 4, 8, 10 и 18. По частоте выявления сбалансированных и несбалансированных перестроек две анализируемые группы достоверно не различались.

Повторные СЦИ были выполнены 3 больным: до начала терапии и в прогрессии заболевания. До начала терапии у одного больного выявлена изолированная трисомия и у двух больных - комплексные нарушения кариотипа. В прогрессии ХЛЛ у 3 больных были выявлены дополнительные хромосомные аномалии – моносомии по хромосомам 8 и 17, делеция короткого плеча хромосомы 3, несбалансированные перестройки с вовлечением локусов 6q27, 9p11, что было связано с клональной эволюцией заболевания.

Одному пациенту СЦИ было проведено перед началом терапии и после проведения трансплантации ГКС. Перед трансплантацией в кариотипе были выявлены комплексные нарушения кариотипа, после трансплантации определен нормальный кариотип.

Сопоставление результатов СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследования

Проанализированы результаты СЦИ с использованием при культивировании DSP30+IL2 и FISH-исследования у 92 больных. При культивировании с DSP30 и IL2 митозы получены в 77 из 92 (83,7%) случаях. Хромосомные aberrации выявлены у 65 из 77 (84,4%) больных. Хромосомные нарушения при FISH-исследовании были определены у 75 из 92 (81,5%), из них одна aberrация выявлена у 57 из 75 (76,0%), две aberrации - у 14 (18,7%), три aberrации - у 3 (4,0%) больных. Сравнение результатов СЦИ и FISH проводили у тех пациентов, у которых имелись митозы.



* достоверно значимые различия, $p = 0,021$

Рисунок 4. Частота характерных хромосомных aberrаций, выявленных при СЦИ и FISH у пациентов с успешными результатами культивирования.

При СЦИ и FISH частота хромосомных нарушений составила: 11q22 – 31,2% и 33,8%, трисомии 12q – 14,3% и 13,0%; 13q14 – 16,9% и 35,1%, 17p13 – 20,8% и 22,1%, соответственно (Рисунок 4). Сравнительный анализ результатов культивирования с DSP30+IL2 и FISH-исследования показал достоверно высокую частоту выявления делеции 13q14 при FISH, чем при СЦИ, 35,1% и 16,9%, соответственно ($p = 0,021$). Частота хромосомных aberrаций с вовлечением 11q22 и 17p13, выявленных методами СЦИ и FISH, достоверно не различалась.

Комплексные нарушения кариотипа при культивировании были выявлены у 33 из 77 (42,6%), при FISH-исследовании – у 3 из 92 (3,7%) больных. Сопоставимые различия были получены в выявлении комплексного кариотипа методом СЦИ и FISH - 42,6% и 4,1% ($p < 0,0001$).

У 17 из 77 (22,1%) больных выявленные при FISH делеции 13q14, 11q22 и 17p13 по результатам СЦИ сопровождалась только сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах: у 2 больных в кариотипе выявлены несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 11q22; у 2 обнаружены сбалансированные транслокации и 3 больных несбалансированные транслокации с участием локуса 13q14, у 10 определены несбалансированные перестройки с вовлечением 17p. В 11 из 77 (14,3%) случаях при кариотипировании в разных цитогенетических клонах выявлены хромосомные aberrации – делеции, сбалансированные и несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 13q14 и 17p13 (Рисунок 5). У одного больного с трисомией 12, выявленной при FISH-исследовании, одна из хромосом 12 была вовлечена в $t(12;18)(q10;p10)$. У одного пациента при отсутствии трисомии по результатам FISH в культуре с DSP30+IL2 выявлена несбалансированная $t(12;16)(q14;q23)$ – случай частичной трисомии 12 (наличие дополнительного длинного плеча хромосомы 12), подтвержденный при FISH с использованием ДНК-зонда к локусу гена *MDM2/12q15*.

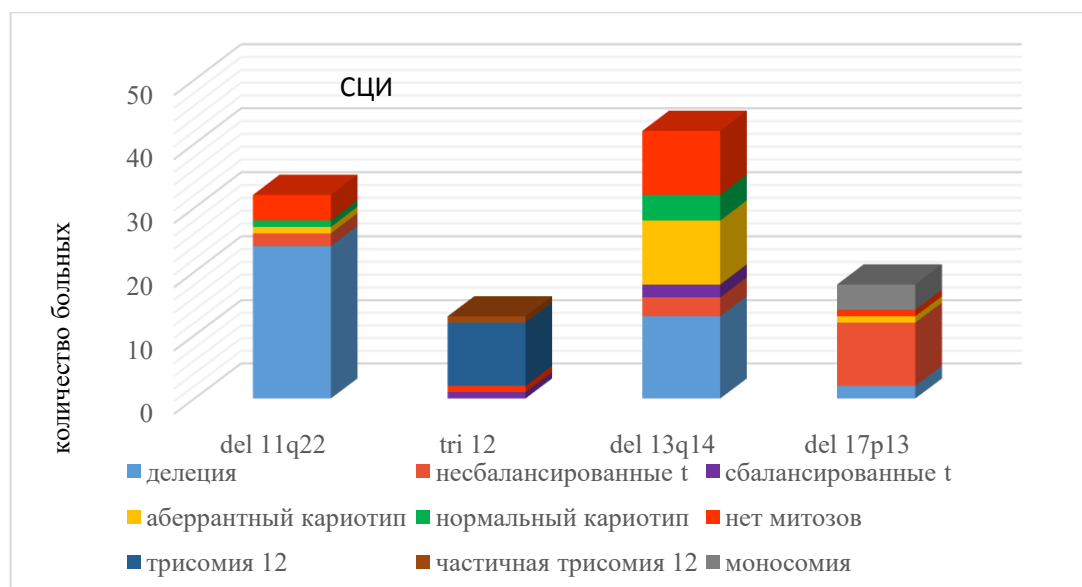


Рисунок 5. Сопоставление результатов СЦИ с использованием DSP30+IL2 и FISH-исследования у больных ХЛЛ.

Из 15 больных с отсутствием митозов при СЦИ хромосомные aberrации методом FISH выявлены у 13 (86,7%): одна aberrация выявлена у 10 (66,7%) и две aberrации – у 3 (20,0%). В данной группе выявлены делеция 11q22 в 2 случаях, делеция 13q14 – в 8 случаях, из них биаллельная делеция 13q14 – в 2 случаях, сочетание делеции 11q22 и трисомии 12 – в одном случае, сочетание делеции 11q22 и делеции 13q14 – в одном случае, сочетание делеции 13q14 и делеции 17p13 – в одном случае. Из 12 пациентов с нормальным кариотипом по результатам культивирования с DSP30+IL2 выявлены хромосомные aberrации методом FISH у 5 (41,7%): делеция 11q22 – 1 случай, делеция 13q14 – 4 случая.

Из 17 случаев отсутствия хромосомных нарушений при FISH-исследовании были выявлены хромосомные нарушения в культуре с DSP30+IL2 в 8 (47,1%), среди них комплексные нарушения кариотипа (3 случая), транслокации с вовлечением генов *IGH* - t(6;14)(p12;q32) и t(14;19)(q32;q13) (2 случая), частичная трисомия 12q (1 случай), сбалансированная t(4;12)(p16;q13) (1 случай) и делеция 6q22 (1 случай).

При выявлении аберрантного кариотипа методом FISH дополнительные хромосомные aberrации при культивировании были определены у 19, среди них комплексный кариотип выявлен у 15 больных.

Дополнительные методы исследования (mFISH, mBAND, aCGH)

В кариотипе у 7 из 77 (9,1%) больных выявлены сбалансированные транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32). В 3 случаях выявлена транслокация t(14;19)(q32;q13), в остальных участвовали локусы партнерских хромосом: 8q24, 6p11, 9q13, 2p14. Во всех 7 случаев перестройка локуса гена *IGH/14q32* подтверждена методом FISH.

В 18 случаях с выявленными при кариотипировании несбалансированными перестройками (в 12 из них в составе КК) проведено исследование методом mFISH, в 6 случаях из них дополнительно проведено исследование mBAND. По результатам mFISH в 12 случаях выявлен дополнительный хромосомный материал (2q, 3q, 4q, 7q, 8q, 9p, 12p, 12q, 20q); в 7 случаях несбалансированные транслокации сопровождались делециями (Xq, 8p, 10q, 13q, 16p, 17p). У 3 пациентов выявлены дицентрические хромосомы (3;4)(p10;p10), (11;17)(p15;p11.1), (12;17)(p13;p13). У 2 пациентов обнаружены сбалансированные $t(6;17)(q22;p13)$, $t(11;12)(q14.1;q24)$, тогда как при СЦИ были определены делеции 6q22, 11q22, дериваты хромосом 12 и 17.

В 5 случаях несбалансированных транслокаций с участием хромосомы 8 при mFISH выявлена дупликация 8q с увеличением копий гена *MYC/8q24* по данным FISH. У 3 больных с транслокациями с вовлечением хромосомы 13 методом mBAND идентифицирован участок делеции - 13q14.1q22. Выявленные при СЦИ маркерные хромосомы определены с помощью mFISH как несбалансированные транслокации с участием ≥ 2 хромосом. По результатам mFISH и mBAND КК с ≥ 5 абберациями выявлен дополнительно у 3 пациентов.

По результатам mFISH и mBAND выделены две наиболее многочисленные группы: транслоцированные хромосомные дупликации без делеции хромосомных партнеров (6/26, 23,1%) и несбалансированные транслокации с делециями (12/26, 46,2%), которые были представлены в кариотипе дополнительным хромосомным материалом (add) или маркерными хромосомами. Не выявлено достоверных различий между группами с дупликациями хромосом с делецией или без нее ($p < 0,145$). Остальные группы были небольшими и представлены дицентрическими хромосомами (3/26), сбалансированными транслокациями (3/26), инверсией (1/26), делециями (1/26). Каждая несбалансированная перестройка рассчитывалась как единичный случай (всего 26 случаев).

У одного больного с делецией 13q, определяемой при СЦИ и FISH, были выявлены дополнительные хромосомные нарушения с помощью сравнительной геномной гибридизации (aCGH), по результатам которой были подтверждены делеция локуса 13q14 в двух аллелях и делеция региона 13q13.1q34 в одном аллеле, делеция локуса гена *IGH* - 14q32.33 и дополнительно выявлены дупликация региона 3q26.1q29 и делеция локуса 22q11.22. Таким образом, с помощью комбинации молекулярных (aCGH) и молекулярно-цитогенетических методов (СЦИ, FISH) выявлены интерстициальная делеция 13q14 в одном аллеле, несбалансированная транслокация $t(3;13)(q26;q13)$ с делецией теломерного участка хромосомы 13 – региона 13q34 в другом аллеле, частичная делеция локуса гена *IGH/14q32*.

Связь отдельных и комплексных нарушений кариотипа с клиническими и биологическими факторами прогноза

В группе больных со сбалансированными транслокациями достоверной связи с возрастом, со стадией заболевания по Binet, мутационным статусом генов *IGHV*, концентрацией β 2-микроглобулина, наличием CD38-положительных клеток, комплексными нарушениями кариотипа не выявлено.

У пациентов с выявленными в кариотипе несбалансированными перестройками достоверно чаще была установлена стадия В или С по Binet ($p = 0,006$) и определен вариант без мутаций генов *IGHV* ($p = 0,032$). Несбалансированные нарушения достоверно чаще обнаруживались в составе комплексного кариотипа ($p < 0,001$).

В группе больных с комплексными нарушениями кариотипа выявлена достоверная взаимосвязь со стадией заболевания и мутационным статусом генов *IGHV*: достоверно чаще в группе больных с комплексным кариотипом диагностировали стадию В или С по Binet ($p = 0,025$) и вариант без мутаций генов *IGHV* ($p = 0,045$). Достоверной связи с возрастом, концентрацией β 2-микроглобулина, наличием CD38-положительных клеток не выявлено.

Анализ общей выживаемости в зависимости от наличия комплексного кариотипа

Показано, что общая выживаемость (ОВ) больных с комплексными нарушениями кариотипа достоверно хуже, чем у больных без нарушений ($p = 0,0232$). На сроке наблюдения 32 месяца показатели ОВ больных с комплексными нарушениями кариотипа и без нарушений составили – 76,7% и 90,0% соответственно. В группе больных с комплексным кариотипом медиана выживаемости составила 24 месяца и в группе больных без комплексных нарушений кариотипа медиана не достигнута (Рисунок 6).

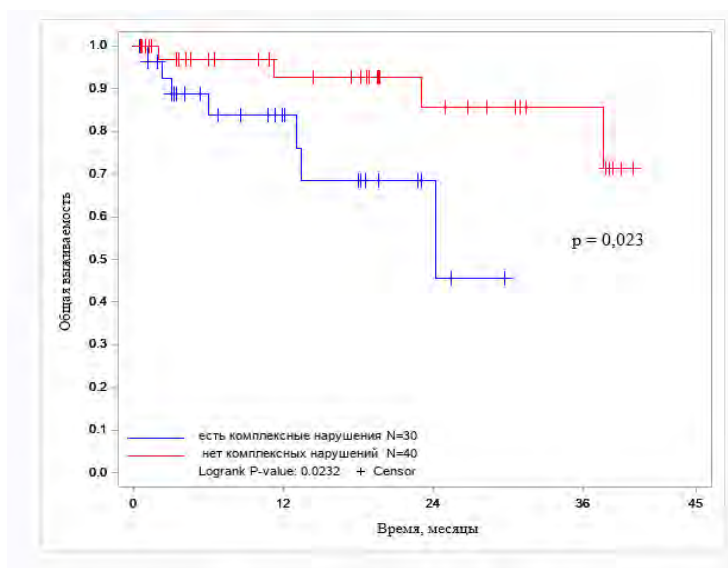


Рисунок 6. ОВ в группе больных ХЛЛ с комплексными нарушениями кариотипа и без них.

ВЫВОДЫ

1. Эффективность стандартного цитогенетического исследования у больных ХЛЛ достоверно выше при использовании олигонуклеотида DSP30 в сочетании с IL2, чем при использовании стандартных митогенов LPS и TPA: aberrантный кариотип выявлен у 82,9% и 44,6% больных, соответственно ($p < 0,0001$). В культуре опухолевых клеток, стимулированных DSP30 с IL2, количество метафаз с хромосомными aberrациями и количество выявленных aberrаций в среднем достоверно превышало таковые в культуре со стандартными митогенами.
2. Показано, что комплексные нарушения кариотипа ассоциированы с ухудшением общей выживаемости больных ХЛЛ ($p = 0,023$): медиана общей выживаемости в группе больных с комплексными нарушениями кариотипа составила 24 месяца, тогда как в группе без них медиана не достигнута. Комплексный кариотип достоверно чаще выявлялся при культивировании с DSP30 и IL2, чем при культивировании с В-клеточными митогенами и при FISH-исследовании – 42,0%, 18,5% ($p = 0,0004$) и 4,1% ($p < 0,0001$), соответственно.
3. Частота выявления aberrантного кариотипа и комплексного кариотипа достоверно значимо увеличивается в прогрессии и рецидиве ХЛЛ по сравнению с частотой выявления до начала терапии - 94,7% и 74,4% ($p = 0,025$) и 55,3% и 30,8% ($p = 0,039$), соответственно.
4. Несбалансированные перестройки и комплексный кариотип достоверно чаще выявлялись у больных без мутаций генов *IGHV* и с продвинутыми стадиями по Binet. Несбалансированные перестройки достоверно чаще определялись в составе комплексного кариотипа ($p < 0,0001$).
5. При сочетанном использовании стандартного цитогенетического исследования и FISH-исследования значительно увеличивается частота выявления хромосомных aberrаций (90,2%). Кариотипирование с DSP30 и IL2 не заменяет FISH-исследование, но является необходимым методом, позволяющим дополнительно выявлять хромосомные aberrации: частичную трисомию 12 (1,3%), сбалансированные и несбалансированные транслокации, сопровождающиеся делециями в локусах 17p13/*TP53*, 13q14 и 11q22/*ATM* по результатам FISH (22,1%), комплексные нарушения кариотипа (42,6%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуется включить в протокол обследования больных ХЛЛ стандартное цитогенетическое исследование с использованием DSP30 и интерлейкина-2 и FISH-исследование до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания для выявления дополнительных параметров для стратификации больных на группы риска и выбора адекватной терапии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кислицына, М.А. Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 и интерлейкина-2 для выявления aberrантного кариотипа у больных хроническим лимфолейкозом. /М.А.

- Кислицына, Т.Н. Обухова, Г.А. Алимova, Л.А. Шишигина, С.Р. Горячева, Т.В. Сорокина, Т.Н. Моисеева, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т.63. – № S1. – С. 140.
2. Кислицына, М.А. Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 для выявления хромосомных aberrаций у больных хроническим лимфолейкозом / М.А. Кислицына, Т.Н. Обухова, Г.А. Алимova, Л.А. Шишигина, Л.А. Гребенюк, Т.В. Абрамова, С.Р. Горячева, Т.Н. Моисеева // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т.64. – №1. – С. 22-35.
 3. Кислицына, М.А. Анализ кариотипа иммуностимулированных В-лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом / М.А. Кислицына, Т.Н. Обухова, Г.А. Алимova, Л.А. Шишигина, Т.В. Абрамова, Л.А. Гребенюк, Т.Ю. Новикова, С.Р. Горячева, Т.Н. Моисеева, В.Г. Савченко // Вестник гематологии. – 2019. – Т. 15. – №2. – С. 38-39.
 4. Kislitsyna, M. Cytogenetic and molecular techniques (karyotype FISH mFISH and array CGH) for precise characterization of structural chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: a case report / M. Kislitsyna, T. Obukhova, T. Abramova, L. Grebenyuk, D. Badmazhapova, M. Tagirova // Molecular Cytogenetics. – 2019. – Т. 12. – № S1. – С. 50.
 5. Кислицына, М.А. Особенности цитогенетической диагностики синхронно протекающих хронического лимфолейкоза и миелодиспластического синдрома: описание клинического случая / М.А. Кислицына, Т.Н. Обухова, А.В. Кохно, Л.А. Гребенюк, А.В. Лучкин, Л.А. Кузьмина, В.Н. Двирнык, А.М. Ковригина, И.В. Гальцева, Б.В. Бидерман В.В. Троицкая, Е.Н. Паровичникова // Онкогематология. – 2019. – Т. 14. – № 3. – С. 29-36.
 6. Обухова, Т.Н. Комплексный кариотип - ключевой предиктор раннего рецидива у пациентов с хроническим лимфолейкозом, получающих терапию ибрутинибом / Т.Н. Обухова, Е.А. Никитин, М.А. Кислицына, Е.А. Дмитриева, Т.Ю. Новикова, М.И. Кислова, Б.В. Бидерман, А.Б. Судариков, В.В. Птушкин // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – № S1. – С. 41-42.
 7. Obukhova, T. Complex karyotype is a strong predictor of short-term progression in chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib / T. Obukhova, E. Nikitin, M. Kislitsyna, E. Dmitrieva, M. Kislova, T. Novikova, V. Ptushkin // Abstract book – EHA25 Virtual. Hemasphere 2020. – Т. 4. – № S1. – С. 293.
 8. Кислицына, М.А. Несбалансированные структурные хромосомные нарушения в кариотипе больных хроническим лимфолейкозом / М.А. Кислицына, Л.А. Гребенюк, Г.А. Алимova, Л.А. Шишигина, Т.В. Абрамова, Т.Ю. Новикова, А.Ю. Борисова, С.Р. Горячева, Т.Н. Моисеева, Е.А. Никитин, Т.Н. Обухова // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т.65. – № S1. – С. 73-74.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВБП – выживаемость без прогрессирования

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ИФТ – иммунофенотипическое исследование

КК – комплексный кариотип

МПИ – международный прогностический индекс

ОВ – общая выживаемость

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

aCGH – сравнительная геномная гибридизация

ATM – ген протеинкиназы ATM

BCR – В-клеточный рецептор

CNA – aberrации числа копий

DSP30 – CpG-олигонуклеотид DSP30

DSP30+IL2 – использование комбинации CpG-олигонуклеотида DSP30 и интерлейкина-2

FC – флударабин, циклофосфамид

FCR – флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб

FR – флударабин, ритуксимаб

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

Ig – иммуноглобулин

IGH – гены тяжелой цепи иммуноглобулинов

IGHV – гены вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов

IL2 – интерлейкин – 2

iwCLL – International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (Международная рабочая группа по изучению ХЛЛ)

U-CLL – вариант без мутаций вариабельных генов тяжелой цепи иммуноглобулинов

LPS – В-клеточный стимулятор: липополисахарид из *E. coli*

LPS+TPA – использование комбинации липополисахарида и 12-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетата

LSI – локуспецифические пробы

mBAND - многоцветный анализ хромосомных сегментов

M-CLL – вариант без мутаций вариабельных генов тяжелой цепи иммуноглобулинов

mFISH - многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ*

MYC – протоонкоген myelocytomatosis viral homolog

R-СНОР – ритуксимаб, циклофосфамид, гидроксидаунорубицин, онковин, преднизолон

TP53 – ген-супрессор опухолевого роста

ТРА – В-клеточный стимулятор: 12-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат