

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Кислицына Мария Анатольевна**

**«Характеристика кариотипа иммуностимулированных В-  
лимфоцитов больных хроническим лимфолейкозом»**

14.01.21 - Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук

кандидат медицинских наук

Судариков Андрей Борисович

Обухова Татьяна Никифоровна

Москва, 2021

## Оглавление

Введение.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы диссертации.....	8
Цель исследования.....	8
Задачи исследования.....	9
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость.....	10
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности и апробации результатов.....	11
Объем и структура диссертации.....	12
Глава 1 Обзор литературы.....	13
1.1 Эпидемиология ХЛЛ.....	13
1.2 Этиология и патогенез ХЛЛ.....	14
1.3 Клинико-биологические факторы прогноза ХЛЛ.....	19
1.3.1 Клинические параметры.....	16
1.3.2 Иммунологические прогностические параметры .....	21
1.3.3 Мутационный статус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов....	23
1.3.4 Цитогенетические нарушения.....	25
1.4 Цитогенетические методы исследования .....	35
1.4.1 Стандартное цитогенетическое исследование.....	36
1.4.1.1. Иммуностимулятор CpG-олигонуклеотид DSP30.....	37
1.4.2 Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> .....	42
1.4.3 Сравнительная геномная гибридизация (aCGH).....	43
Глава 2 Материалы и методы.....	44
2.1 Характеристика больных.....	44
2.2 Материал исследования.....	48
2.3 Методы исследования.....	49
2.3.1 Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ).....	53

2.3.2	Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH).....	56
2.3.3	Границы нормальных значений ДНК-зондов.....	58
2.3.4	Многоцветная флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (mFISH).....	59
2.3.5	Многоцветный анализ хромосомных сегментов (mBAND).....	61
2.3.6	Сравнительная геномная гибридизация (aCGH).....	62
2.6	Статистическая обработка данных.....	63
Глава 3 Сравнительный анализ результатов СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и стандартной комбинации митогенов.....		
3.1	Культивирование клеток периферической крови и мононуклеарных клеток с DSP30+IL2 и LPS+TPA.....	65
3.1.1	Параллельное культивирование с DSP30+IL2.....	65
3.1.2	Параллельное культивирование с LPS+TPA.....	67
3.2	Сравнение результатов культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA..	67
3.2.1	Группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2.....	74
Глава 4. Анализ спектра и частоты встречаемости хромосомных aberrаций у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии и рецидиве заболевания .....		
4.1	Результаты СЦИ у больных ХЛЛ до начала терапии.....	80
4.2	Результаты СЦИ у больных ХЛЛ с резистентным и рецидивирующим течением.....	82
4.3	Сравнительный анализ хромосомных нарушений у больных ХЛЛ до начала терапии и с резистентным и рецидивирующим течением .....	85
Глава 5 Сопоставление результатов СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследования .....		
5.1	Хромосомные нарушения с вовлечением локуса 11q22 .....	90
5.2	Трисомия 12q.....	92
5.3	Хромосомные нарушения с вовлечением локуса 13q14 .....	94
5.4	Хромосомные нарушения с вовлечением локуса 17p13.....	97
5.5	Комплексные нарушения кариотипа .....	99

5.6 Сравнительный анализ частоты детекции характерных хромосомных аберраций методом СЦИ и FISH.....	100
Глава 6 Дополнительные методы исследования (mFISH, mBAND, aCGH).....	112
Глава 7 Связь отдельных и комплексных нарушений кариотипа с клиническими и биологическими факторами прогноза .....	127
Глава 8 Анализ общей выживаемости в зависимости от наличия комплексного кариотипа.....	133
Глава 9 Обсуждение.....	135
Заключение.....	146
Выводы.....	148
Практические рекомендации.....	149
Список сокращений.....	150
Список литературы.....	152
Приложение.....	180

## Введение

### Актуальность темы исследования

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) - гетерогенное заболевание по клинической картине, течению заболевания, патогенез которого не до конца изучен. ХЛЛ развивается в основном у пожилых людей, медиана возраста на момент установления диагноза в европейских странах составляет 69 лет [56]. Выбор терапии зависит от возраста, соматического статуса, сопутствующих заболеваний, клинических проявлений, прогностических факторов и результатов предшествующего лечения [70]. Для 40% пациентов с медленно прогрессирующим течением ХЛЛ обоснована тактика выжидательного наблюдения. Клиническая гетерогенность хронического лимфолейкоза требует исследования параметров стратификации пациентов в прогностические группы для определения подходов к лечению, от выжидательной тактики до трансплантации аллогенного костного мозга. В клинической практике применяются различные параметры для стратификации: время удвоения лимфоцитов, системы стадирования по Binet и Rai, мутации генов тяжелой цепи иммуноглобулинов, концентрация  $\beta 2$ -микроглобулина, наличие CD38 на поверхности опухолевых клеток и генетические нарушения [70, 115].

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-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат (ТРА), лишь немного увеличивает количество делящихся клеток [61, 85]. 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; у половины больных с нормальным кариотипом при FISH в интерфазных ядрах выявляются хромосомные

абберации, что свидетельствует о делении остаточной популяции неопухолевых гемопоэтических клеток [3]. Тем не менее, с помощью стандартного цитогенетического исследования были выявлены 4 характерных для ХЛЛ aberrации: делеции 13q14, 11q23, 17p13 и трисомия хромосомы 12 [162].

Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием зондов к локусам, в которых характерны aberrации, позволяет выявлять хромосомные нарушения у 80% больных ХЛЛ: делеция 13q14 - 51% случаев, делеция 11q23/*ATM* - 20%, трисомия хромосомы 12 - 14%, делеция 17p13/*TP53* - 7% [54]. Прогностическое значение этих aberrаций определено: факторами благоприятного прогноза являются нормальный кариотип и наличие делеции 13q14 как единственного нарушения кариотипа, среднего прогноза - трисомия хромосомы 12, неблагоприятного - делеция 11q23/*ATM* и крайне неблагоприятным прогностическим фактором является делеция 17p13 с потерей гена-супрессора опухолевого роста *TP53* [54].

Однако изменения кариотипа у больных ХЛЛ не ограничиваются этими хромосомными нарушениями. Мауг С. с соавторами показали, что наличие любых транслокаций ассоциировано с неблагоприятным течением ХЛЛ [121]. В исследованиях Rigolin с соавт. и Baliakas с соавт. показано, что несбалансированные структурные aberrации (несбалансированные транслокации, маркерные, дериватные и дицентрические хромосомы) имеют независимое неблагоприятное влияние на течение ХЛЛ [16, 149]. 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. По результатам исследования Thompson с соавт. 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 [167]. Для больных ХЛЛ показано, что наличие  $\geq 5$  аберраций в кариотипе является предиктором самого плохого ответа на терапию, в том числе таргентными препаратами [13, 17, 167, 172]. Таким образом, наличие комплексных нарушений кариотипа может быть более важным фактором неблагоприятного прогноза у пациентов с ХЛЛ, чем делеция 17p, выявляемая методом FISH.

В исследованиях Decker с соавт. было 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 [49]. 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 [51, 69]. Митозы для СЦИ были получены у 98% больных, аберрантный 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 особенно важно для выделения пациентов группы риска и последующей разработки терапевтической тактики.

## **Степень разработанности темы диссертации**

Опубликован ряд исследований эффективности использования стандартного цитогенетического исследования со специфической стимуляцией DSP30 и интерлейкином-2 у больных ХЛЛ [51, 69]. Однако показатели эффективности культивирования с DSP30 и интерлейкином-2 различаются у разных авторов. Также результаты культивирования биоматериала с различным клеточным составом подробно не исследовались. При специфической стимуляции опухолевых лимфоцитов дополнительно выявляется широкий спектр хромосомных aberrаций, который не до конца изучен у больных ХЛЛ. Кроме того, сочетанное использование стандартных цитогенетических методов (СЦИ, FISH) и современных молекулярных методов (многоцветный FISH, многоцветный анализ хромосомных сегментов, сравнительная геномная гибридизация) увеличивает спектр выявляемых хромосомных нарушений при ХЛЛ. Мало данных о детальном сравнении выявленных хромосомных aberrаций у больных до начала терапии и в прогрессии и рецидиве заболевания. Высокая эффективность стандартного кариотипирования с новой комбинацией митогенов позволила определить прогностическое значение отдельных хромосомных aberrаций, в том числе комплексного кариотипа и несбалансированных перестроек [17]. Однако обсуждается вопрос о прогностической значимости количества aberrаций для комплексного кариотипа. Актуальным остается вопрос о прогностическом значении отдельных хромосомных aberrаций и комплексного кариотипа с тремя и более нарушениями у больных ХЛЛ, также ассоциации этих факторов с другими факторами неблагоприятного прогноза.

## **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

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 с помощью различных молекулярно-цитогенетических методов (FISH, СЦИ, mFISH, mBAND, aCGH).

Определен спектр и частота встречаемости хромосомных aberrаций в группах больных 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.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Теоретическая значимость данной работы заключается в том, что полученные 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. Дополнены сведения о прогностической роли комплексных нарушений кариотипа, а также хромосомных нарушениях, ассоциированных с неблагоприятными факторами прогноза ХЛЛ.

Практическая значимость работы заключается в том, 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. Показано, что проведение СЦИ и FISH необходимо при диагностическом обследовании и при прогрессии/рецидиве ХЛЛ для определения группы риска и выбора соответствующей 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.

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, комплексные нарушения кариотипа и несбалансированные абберрации 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.

### **Степень достоверности и апробации результатов**

Достоверность и обоснованность выводов, полученных в результате исследования, подтверждены изучением достаточного объема научной и нормативной базы, использованием соответствующей методологии, также

тщательным анализом эмпирических данных, собранных в процессе диссертационного исследования. Полученные результаты представлены на ведущих отечественных и зарубежных конгрессах и конференциях в виде устных докладов 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.).

### **Публикации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 8 научных работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных в ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

### **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.

## Глава 1 Обзор литературы

### 1.1 Эпидемиология ХЛЛ

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ)/лимфома из малых лимфоцитов – опухоль, характеризующаяся клональной пролиферацией и накоплением опухолевых CD5, CD23-позитивных В-клеток в костном мозге, периферической крови, лимфатических узлах и селезенке [1]. ХЛЛ и лимфома из малых лимфоцитов биологически представляют собой одну опухоль, но с тем отличием, что для ХЛЛ характерен моноклональный лимфоцитоз более  $5 \times 10^9/\text{л}$  в периферической крови, а для лимфомы из малых лимфоцитов характерно преобладающее поражение лимфатических узлов, селезенки и костного мозга. Случаи накопления иммунофенотически схожих В-клеток ХЛЛ в периферической крови менее  $5 \times 10^9/\text{л}$  при отсутствии лимфаденопатии, органомегалии и других экстрамедуллярных очагов поражения считаются моноклональным В-клеточным лимфоцитозом [9]. Согласно классификации ВОЗ ХЛЛ относится к зрелым В-клеточным новообразованиям и составляет 7% от всех неходжкинских лимфом [165].

ХЛЛ является самым частым лейкозом у взрослых. Частота его в Европейских странах составляет 4:100000 в год. Риск возникновения ХЛЛ увеличивается с возрастом - у лиц старше 80 лет частота составляет  $>30:100000$  в год [11]. Медиана возраста на момент установления диагноза в Европейских странах - 69 лет, соотношение мужчин и женщин составляет 1,7:1 [56, 126]. В России ХЛЛ выявляется реже и медиана возраста на момент установления диагноза несколько меньше, соразмерно меньшей продолжительности жизни россиян. По данным отечественной литературы по эпидемиологии в 2018 году было диагностировано 4318 новых случаев хронических В- и Т-клеточных лимфоидных лейкозов на 100 тыс. населения, наибольшее число выявленных случаев зарегистрировано в возрастной группе 65-69 лет, что составило 851 случай на 100 тыс. населения, таким образом, «грубый» показатель заболеваемости в России составил 2,94:100000 населения в год [4].

## 1.1 Этиология и патогенез ХЛЛ

Для иммунофенотипического профиля В-клетки ХЛЛ характерна выраженная экспрессия поверхностных антигенов CD5, CD19, CD23, CD43, FMC7, слабая экспрессия CD20, CD22, CD11c, CD79a и поверхностных иммуноглобулинов (SIg) IgM с или без IgD [120, 165]. Несмотря на различие иммунофенотипического профиля опухолевых клеток ХЛЛ и нормальных В-лимфоцитов экспрессия общих CD5 и других В-клеточных антигенов (CD19, CD20, CD22) позволяет предположить их общее происхождение.

На сегодняшний день в литературе представлены противоречивые данные о происхождении опухолевых В-лимфоцитов. В исследовании Seifert с соавт. на основании анализа профиля экспрессии генов различных субпопуляций В-лимфоцитов (наивных В-лимфоцитов, В-лимфоцитов с переключением классов иммуноглобулинов, В-клеток памяти с поверхностным иммуноглобулином М, В-клеток маргинальной зоны селезенки) показал, что опухолевые клетки имеют схожий профиль с CD5-положительными лимфоцитами периферической крови [152]. По данным другого исследования, проведенного Klein с соавт, профиль экспрессии генов В-клетки ХЛЛ имеет большее сходство с В-клетками памяти [96]. Кроме того, по литературным данным клетки ХЛЛ могут происходить из гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). У некоторых пациентов ХЛЛ в клетках-предшественниках выявляются такие характерные хромосомные аберрации, как трисомия 12 и делеция длинного плеча хромосомы 13 [60]. Экспериментальные данные по ксенотрансплантации показали, что ГСК от больных ХЛЛ могут быть источником происхождения моно- или олигоклональных В-клеток с ХЛЛ-подобным фенотипом [91]. Более того, в литературе появились данные о выявленных мутациях в драйверных генах таких, как *BRAF*, *SF3B1*, *NOTCH1*, *XPO1* в мультипотентных гемопоэтических клетках больных ХЛЛ [47].

Нормальные В-лимфоциты происходят из ГСК и проходят последовательные этапы дифференцировки. Условно процесс В-лимфопоэза

можно разделить на две стадии – антигеннезависимую и антигензависимую. При антигеннезависимой дифференцировке в костном мозге происходит созревание В-клеток, которое завершается формированием В-клеточного рецептора (BCR) [10]. BCR зрелого В-лимфоцита представляет собой молекулярный комплекс мембранного иммуноглобулина, состоящего из тяжелых (H) и легких (L) цепей, и молекул антигенов CD79a, CD79b, CD19, CD21, CD81. Преобладающим классом мембранных иммуноглобулинов наивных В-клеток является иммуноглобулин класса М (IgM) [176].

Процесс созревания В-лимфоцитов включает несколько этапов формирования промежуточных форм: про-В (от англ. progenitor – предок) клеток, пре-В (от англ. precursor – предшественник) клеток, незрелых В-клеток, зрелых наивных В-клеток. На стадии про-В-лимфоцитов перестраиваются гены H-цепи иммуноглобулина, которые состоят из регионов переменных генов (V-генов), D-сегмента (от англ. diversity-разнообразие), J-сегмента (от англ. joining-соединительный) и константных генов (C-генов). Первоначально один из 27 генов D-сегмента и один из 6 генов J-сегмента соединяются друг с другом и образуют объединенную DJ-единицу (Рисунок 1) [39]. Далее при связывании одного из 51 V-генов и DJ-единицы формируется «зрелый» VDJ-ген. На этапе пре-В-лимфоцитов аналогичной перестройке подвергаются V-гены L-цепей ( $\kappa$  и  $\lambda$ ). Такая реаранжировка генных сегментов, кодирующих домены цепей иммуноглобулинов, называется соматической рекомбинацией [8]. В результате соматической рекомбинации формируется BCR с уникальным антигенсвязывающим сайтом.

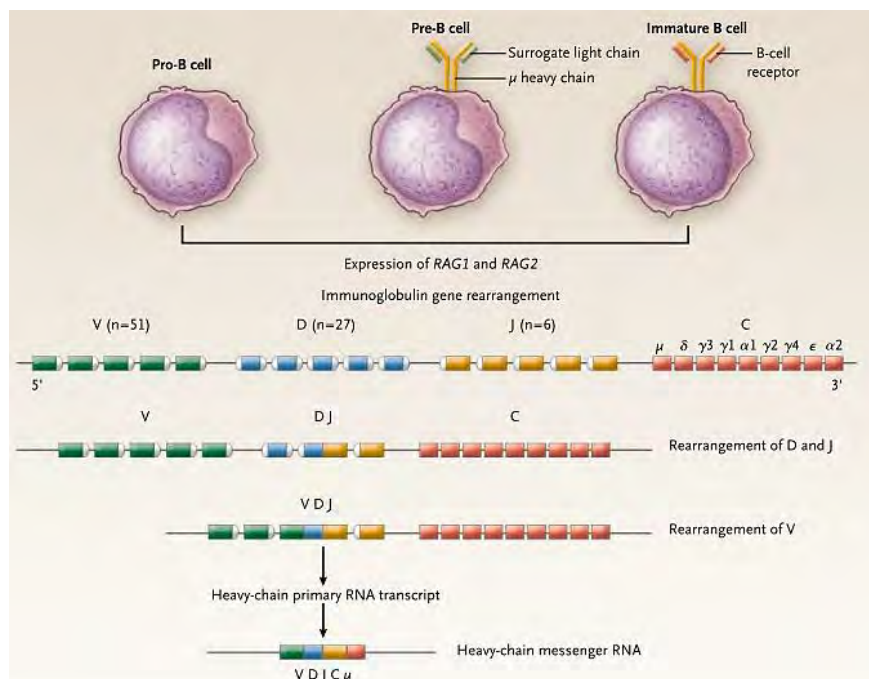


Рисунок 1. Нормальное развитие В-лимфоцитов [39].

V – переменный домен, D – сегмент, J-сегмент, C – константные гены, *RAG1* и *RAG2* – гены, активирующие рекомбиназу

Незрелые В-лимфоциты покидают костный мозг и мигрируют в периферические лимфоидные органы (лимфатические узлы), где проходят антигензависимую дифференцировку. После связывания ВСР с антигеном В-клетка, так называемый центробласт, активируется и начинает делиться в зародышевом (герминативном) центре лимфоидных фолликулов. Пролиферация центробластов запускает соматический гипермутационный процесс – возникновение мутаций V-генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGHV*), результатом которого является образование центроцитов с ВСР с более высокой аффинностью к антигену. В дальнейшем клональная экспансия В-лимфоцитов с различными антигенспецифическими ВСР приводит к образованию поликлональной популяции В-клеток, способных связывать различные антигены.

Кроме того, в герминативном центре фолликулов происходит процесс изотипического переключения класса антител с ранее синтезируемого IgM на IgG, IgA, IgE. Для переключения изотипов необходимо действие цитокинов (интерлейкин-4, трансформирующего фактора роста-β1 и др), секретируемых



в основном Т-хелперами в герминативном центре, что реализует Т-зависимый иммунный ответ [88]. В маргинальной зоне лимфатического узла может осуществляться Т-независимая стимуляция В-клеток, опосредованная в основном за счет взаимодействия BCR с липолисахаридами капсул бактерий и вирусов [171]. С того момента, когда снижается синтез мембранных Ig и образуются секретируемые антитела, центроцит дифференцируется в плазматические клетки или В-клетки памяти.

Как описано ранее, генетические события, приводящие к развитию ХЛЛ, могут происходить на любом уровне дифференцировки В-лимфоцитов (Рисунок 2) [178]. Онкогенные мутации, возникающие на уровне ГСК обеспечивают преимущество выживания опухолевых клеток и их клонального роста [90]. Опухолевые клетки, происходящие из В-лимфоцитов, которые в ходе дифференцировки подверглись соматическому гипермутационному процессу, образуют клон В-клеток ХЛЛ с мутированным вариантом вариабельных генов тяжелых цепей Ig (*IGHV*). В-лимфоциты, не прошедшие этап соматического гипермутационного процесса, дают начало клеткам ХЛЛ с немутированным вариантом генов *IGHV* [58].

Опухолевая трансформация клеток связана с накоплением *de novo* возникших aberrаций и патологическим взаимодействием с микроокружением [40, 131].

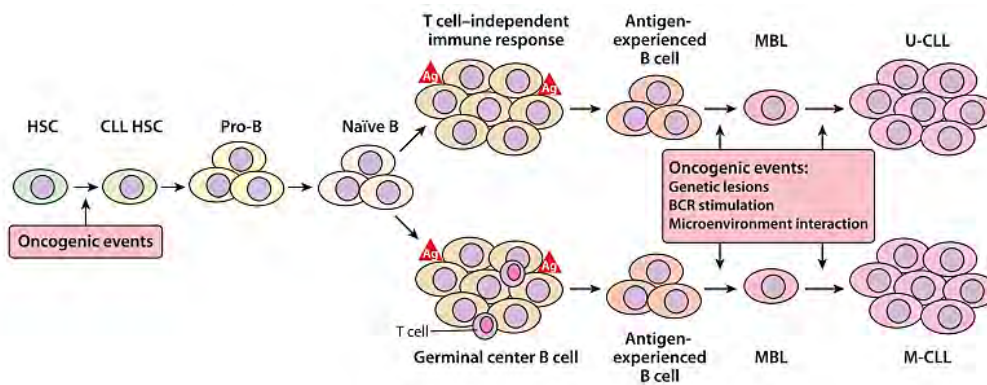


Рисунок 2. Модель развития ХЛЛ [178].

HSC – гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), CLL HSC - опухолевые клетки, мутировавшие на уровне ГСК, Pro-B – про-B-лимфоциты, MBL – моноклональный лимфоцитоз, M-CLL – мутированный вариант генов тяжелых цепей Ig, U-CLL - немутированный вариант генов тяжелых цепей Ig.

Результаты анализа профиля экспрессии выявили гены с повышенной и пониженной экспрессией у больных ХЛЛ по сравнению с нормальными В-лимфоцитами (наивными, центробластами, центроцитами, В-клетками памяти) [19, 96]. Показано, что опухолевые клетки активно экспрессируют гены трансмембранной рецепторной протеинтирозинкиназы *ROR1*, трансформирующего фактора роста- $\beta$ 1 - *TGFB1*, фактор транскрипции семейства Sp/KLF – *SP1*, интерлейкина-4 *IL4*. С пониженной экспрессией выявляются гены, ассоциированные с пролиферацией – протоонкоген *MYC*, убиквитин-конъюгирующий фермент E2-C – *UBE2C*; гены, кодирующие проапоптотические молекулы – *BID*, *RAD9*, *DRAK1*, *DRAK2*; гены, участвующие в регуляции клеточного цикла – *CDK1*, *CCNB1* и др. Недавнее исследование с использованием полноэкзомного секвенирования (WES) семейных случаев ХЛЛ идентифицировали мутации зародышевой линии в гене *POT1* и других генах шелтеринового комплекса, расположенного на концах теломер [158]. Новые исследования в области эпигеномики определили более 30 генов-кандидатов, ассоциированных с риском развития ХЛЛ, среди них гены, участвующие в иммунном ответе (*SP140*, *IRF8*), выживаемости клеток (*BCL2*, *BMF*, *CASP8*, *BCL2L11*) или передаче сигналов Wnt-зависимого пути (*UBR5*, *LEF1*) [157].

Показано, что инициирующими событиями в развитии ХЛЛ являются генетические aberrации числа копий (copy number aberration, CNA), в основном del(11q), del(13q) и трисомия хромосомы 12, за которыми следует приобретение мутаций в генах-драйверах таких, как *SF3B1*, *POT1*, *TP53*, *ATM*, *NOTCH1* или *BIRC3* [106]. С помощью стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) были обнаружены частые хромосомные aberrации, определяемые у больных ХЛЛ – делеция длинного плеча хромосомы 11 – del(11q), затрагивающая ген *ATM*, делеция длинного плеча хромосомы 13 – del(13q)/*MIR-15A/16-1*, делеция короткого плеча хромосомы 17 – del(17p)/*TP53* и трисомия хромосомы 12 [54, 83, 85]. Таким образом, совокупность множества факторов молекулярно-генетических событий (изменение эпигенетического статуса клетки, накопление мутаций, хромосомные aberrации, влияние микроокружения и др.), происходящих на разных этапах дифференцировки, приводит к опухолевой трансформации В-клеток ХЛЛ.

### **1.3 Клинико-биологические факторы прогноза ХЛЛ**

#### **1.3.1. Клинические параметры**

Частота встречаемости ХЛЛ у лиц мужского пола примерно в 1,5 раза выше, чем у женщин [118, 126]. В ряде исследований было подтверждено неравномерное распределение заболеваемости ХЛЛ среди мужчин и женщин [33, 118, 127]. В крупном популяционном исследовании США, включающем 114 548 случаев лимфоидных новообразований, было выявлено преобладание лиц мужского пола по частоте заболевания лимфоидными опухолями. Мужчины заболевали в среднем в 1,9 раз чаще, чем женщины [128]. Стоит отметить, что частота заболеваемости лимфоидными неоплазиями среди мужчин европеоидной расы была на 10% выше, чем у мужчин негроидной расы, и на 70% выше, чем у азиатов. Среди лиц европеоидной расы доля ХЛЛ от всех лимфоидных новообразований составила 16% и с возрастом увеличивалась до 20%.

В метаанализе, проведенным с целью создания Международного прогностического индекса (МПИ), были определены основные прогностические параметры, имеющие независимое неблагоприятное значение при ХЛЛ [166]. При оценке МПИ учитываются наличие делеции 17p и/или мутации гена *TP53*, немутированный вариант генов *IGHV*, концентрация  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке более 3,5 мг/л, клинические стадии по Binet (B, C) и Rai (I-IV), возраст старше 65 лет.

В 1975 году К. Rai разработал классификацию ХЛЛ, согласно которой стратификация больных на 4 стадии заболевания осуществляется по наличию лимфоцитоза, лимфаденопатии, снижению гемоглобина  $< 100$  г/л и количества тромбоцитов  $< 100 \times 10^9$ /л: 0 стадия (наличие лимфоцитоза в периферической крови и в костном мозге), I стадия (наличие признаков лимфаденопатии), II стадия (сочетание лимфаденопатии со спленомегалией/гепатомегалией), III стадия (лимфоцитоз и наличие анемии), IV стадия (сочетание лимфоцитоза и тромбоцитопении) [146].

Таблица 1. Стадирование больных ХЛЛ по Binet [21].

Стадия	Клиническая характеристика	Медиана выживаемости
A	Гемоглобин $\geq 100$ г/л; уровень тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9$ /л; поражено $< 3$ лимфатических областей	как в популяции
B	Гемоглобин $\geq 100$ г/л; уровень тромбоцитов $\geq 100 \times 10^9$ /л; поражено $\geq 3$ лимфатических областей	7 лет
C	Гемоглобин $< 100$ г/л или уровень тромбоцитов $< 100 \times 10^9$ /л при любой клинической картине	2 года

В 1977 году J.L. Vinet предложил другую классификационную систему ХЛЛ, согласно которой выделяют 3 стадии заболевания в зависимости от концентрации гемоглобина, количества тромбоцитов и распространенности поражения лимфоузлов у больных ХЛЛ (табл. 1) [21]. Система стадирования по Vinet является более распространенной в клинической практике.

### 1.3.2 Иммунологические прогностические параметры

В настоящее время в рутинной практике в качестве маркеров используются иммунологические параметры, такие как наличие CD38 на поверхности опухолевых лимфоцитов и концентрация  $\beta$ 2-микроглобулина в сыворотке крови, имеющие прогностическое значение при ХЛЛ [139].

**CD38** – мембранный гликопротеин В-лимфоцитов, входящий в состав комплекса BCR. Молекула CD38 участвует в передаче сигнала и активации В-клеток [45]. Лигандом служит антиген CD31, экспрессируемый «клетками-няньками», дендритными клетками и другими клетками лейкозного микроокружения [48]. «Клетки-няньки» представляют собой моноклеарные клетки, вероятно, происходящие из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и секретирующие подобные им факторы роста стромальных клеток SDF-1 и хемокины (CXCL12, CXCL13 и др.) [31]. Главная роль этих клеток в патогенезе ХЛЛ заключается в поддержании пролиферации опухолевых лимфоцитов.

Связывание лиганда с молекулой CD38 на поверхности клетки ХЛЛ активирует белок ZAP-70 и через него сигнальный путь ERK1/2, усиливающий пролиферацию и хемотаксис опухолевых клеток [116]. Дополнительно взаимодействие между CD38 и ZAP-70 усиливает передачу сигналов BCR и, следовательно, пролиферацию клеток [48]. Кроме того, недавние исследования выявили макромолекулярный комплекс на клетках ХЛЛ, состоящий из расположенных рядом CD38, CD49d, CD44 и матриксной металлопротеиназы MMP-9, который может способствовать дополнительной перекрестной передаче сигналов между BCR и CD44 [30, 179]. CD44 является

рецептором гиалуроновой кислоты, находящейся на базальных мембранах венул лимфоидной ткани в лейкозном микроокружении [179]. В свою очередь, взаимодействия в комплексе CD38 и CD44, MMP-9 и CD49d могут влиять на миграцию, инвазию и возвращение клеток ХЛЛ. Таким образом, усиленная передача сигналов, приводящая к росту или выживанию клеток, обеспечиваемая комплексами CD38, CD44, MMP-9, CD49d и ZAP-70, может объяснить взаимосвязь экспрессии ZAP-70 и/или CD38 с более агрессивным течением заболевания [48, 178].

В литературе представлены данные о роли CD38 в прогрессии заболевания [30, 63, 139]. В исследовании Ghia с соавт. медиана кумулятивной выживаемости при наличии CD38 во всей опухолевой популяции составила 183 месяцев, в то время как у больных с отсутствием CD38 медиана не достигнута ( $p=0,002$ ) [63]. В том же исследовании показано, что экспрессия CD38 независимо от размера опухолевого клона была ассоциирована с немутированным вариантом генов *IGHV*. Таким образом, CD38 является маркером неблагоприятного прогноза и индикатором активации и пролиферации клеток ХЛЛ.

**$\beta$ 2-микроглобулин** – это низкомолекулярный белок, входящий в состав комплекса HLA и связанный с его рецепторной частью [137]. Протеин по своей структуре напоминает переменные домены IgG. Показано, что высокий уровень  $\beta$ 2-микроглобулина обнаруживается при многих злокачественных образованиях, однако наиболее высокий уровень отмечался при лимфопролиферативных заболеваниях, таких как ХЛЛ, волосатоклеточный лейкоз и болезнь Вальденстрема. При ХЛЛ высокие значения концентрации белка ( $> 3$  мг/л) коррелировали с большой массой опухоли, определяемой стадией по Rai ( $p<0,001$ ), количеству лейкоцитов периферической крови ( $p<0,05$ ) и поражению костного мозга ( $p<0,01$ ) [42]. В свою очередь высокая концентрация  $\beta$ 2-микроглобулина коррелировал с высокой пролиферативной активностью опухолевых лимфоцитов [155].

В литературных данных сообщается о связи  $\beta$ 2-микροглобулина с общей выживаемостью (ОВ) и беспрогрессивной выживаемостью (ВБП) пациентов с ХЛЛ [37, 62, 138, 140]. По результатам исследования немецкой группы по изучению ХЛЛ (GCLLSG), включающего 1223 больных ХЛЛ до лечения, было определено пороговое значение  $\beta$ 2-микροглобулина  $>3,5$  мг/л (HR=2,3,  $p=0,001$ ) [138]. В данном исследовании было показано неблагоприятное прогностическое влияние  $\beta$ 2-микροглобулина на ОВ больных. В исследовании Pratt с соавт. в многофакторном анализе подтверждена ассоциация высокой концентрации  $\beta$ 2-микροглобулина с неблагоприятным течением заболевания наряду с такими параметрами, как мужской пол, делеция 11q22, делеция 17p13, немутированный вариант генов *IGHV* и наличие CD38 [140].

### 1.3.3 Мутационный статус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов

Выделяют два основных подтипа заболевания в зависимости от происхождения опухолевых клеток, которое определяет, по крайней мере частично, последующее приобретение геномных и эпигеномных нарушений и течение заболевания. При немутированном варианте вариабельных генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGHV*) (известный как unmutated CLL, U-CLL) В-клетки не проходят этапы антигензависимой дифференцировки и соматической гипермутации в герминативном центре фолликулов, что ассоциируется с более агрессивным течением заболевания, по сравнению с мутированным вариантом генов *IGHV* (mutated CLL, M-CLL), при котором опухолевые лимфоциты происходят из В-клеток, прошедших этапы созревания в зародышевом центре [72]. Мутированными считаются гены *IGHV*, отличающиеся более чем на 2% от генов зародышевой линии и, следовательно, немутированные гены имеют схожую последовательность с герминальными генами на 98% и более [38].

Молекулярный анализ выявил различия в репертуаре генов *IGHV* опухолевых лимфоцитов и нормальных CD5+ В-лимфоцитов периферической

крови [58]. Клетки ХЛЛ экспрессировали суженный репертуар генов *IGHV* [93]. По зарубежным исследованиям у пациентов ХЛЛ преимущественно мутировали гены семейств VH1, VH3, VH4 [38, 58]. Кроме того, частота соматических мутаций значительно различалась в зависимости от семейства (VH3 >VH4 >VH1). Наиболее часто мутировали гены *IGHV1-69*, *IGHV3-23*, *IGHV3-7* и *IGHV4-34*. В отечественной литературе представлены данные по частоте встречаемости генов разных семейств *IGHV* [2]. В российской популяции в группе пациентов с мутированными генами (n=171) преобладали гены семейства VH3 (60%), остальные встречались реже - VH4 (22%) и VH1 (14%). В группе больных без мутаций генов *IGHV* (n=320) приблизительно в равном соотношении встречались гены семейств VH1 (43%) и VH3 (40%). Среди больных с мутированными и немутированными генами *IGHV* были выделены 7 наиболее часто встречающихся вариантов генов: *VH1-69*, *VH4-34*, *VH3-23*, *VH3-30*, *VH1-2*, *VH4-39*, *VH3-7*.

Некоторые исследователи выделяют подтип ХЛЛ с гомологичными, так называемыми «стереотипными», последовательностями области, определяющей комплементарность (complementary-determining region, CDR) переменного региона тяжелой цепи BCR. Чаще описан сегмент D3-3 (CDR3), ассоциированный с геном *VH1-69* и слитым сегментом JH6 [26]. Было определено несколько сотен различных стереотипных BCR в неродственных популяциях клеток, в большинстве случаев ассоциированных с немутированным вариантом генов *IGHV* [160]. Можно предположить, что в отборе лейкоэмического клона играют роль определенные общие аутоантигены или антигены окружающей среды.

Немутированный вариант генов *IGHV* коррелирует с коротким временем до начала терапии, низкой ОБ и прогрессирующим течением заболевания [46, 72, 164]. В исследовании Hamblin с соавт. медиана общей выживаемости в группе больных с немутированными генами *IGHV* составила 117 месяцев по сравнению с группой пациентов с мутированными генами – 293 месяцев (p=0,001) [72].



### 1.3.4 Цитогенетические нарушения

#### Делеция 11q22-q23

На момент установления диагноза делеция длинного плеча хромосомы 11 (делеция 11q) обнаруживается у 5-20% пациентов с ХЛЛ [54, 119]. Делеции значительно различаются по размеру, минимальный делетированный регион (MDR) делеции составляет 2,94 Мб и включает 11q22.3-q23.1, внутри которого располагается ген *ATM* (ataxia telangiectasia mutated) [67]. Описано, что при дефекте гена *ATM* клетки утрачивают способность останавливаться в нескольких контрольных точках клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, активировать репарацию ДНК, индуцируемую повреждением, предотвращать запуск запрограммированной гибели клеток спонтанным и индуцированным повреждением ДНК [123].

Примерно у 8-40% пациентов с делецией 11q22 обнаруживаются инактивирующие мутации второго аллеля *ATM*, которые ассоциируются с более агрессивным течением ХЛЛ [135, 161]. В литературе описан общий проапоптотический сигнальный путь ATM-CHK2-TP53, который инактивируется в ходе делеций 11q (ATM) или 17p (TP53) либо мутаций, повреждающих белок ATM или TP53 [98]. В целом, повреждение гена *ATM* приводит к нарастанию геномной нестабильности в клетке и возникновению хромосомных aberrаций [125].

Описано, что у больных с делецией 11q заболевание протекает с генерализованной лимфаденопатией с формированием больших конгломератов периферических, внутригрудных и абдоминальных лимфоузлов [55]. Показано, что делеция 11q ассоциируется с укорочением времени до начала терапии и немутированным вариантом генов *IGHV* [55, 173]. В исследовании Tsimberidou с соавт. время до начала терапии достоверно различалось в группе с делецией 11q по сравнению с группой без делеции 11q - медиана составила 0,9 месяцев и 17,3 месяцев ( $p=0,002$ ), соответственно [170]. В том же исследовании показано, что на стандартной иммунохимиотерапии с включением флударабина, циклофосфана и

ригуксимаба ОВ больных с делецией 11q и без делеции 11q достоверно не различалась.

### Трисомия хромосомы 12

Трисомия 12 была описана в начале 80-х годов как первая повторяющаяся хромосомная aberrация при ХЛЛ [12]. Трисомия 12 выявляется в 10-25% при стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ) и примерно в 10-16% случаях методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) [54, 85]. В 40-60% случаев данная аномалия встречается как единственное хромосомное нарушение, в других случаях сочетается с хромосомными aberrациями чаще с такими, как трисомия хромосом 18, 19, делеции хромосом 14q, 13q, 11q, 17p и транслокации с перестройкой локуса гена *IGH/14q32* [18, 43].

В некоторых случаях при СЦИ определяется частичная трисомия 12 - дупликация региона длинного плеча q13-q15 хромосомы 12. Область q13-q15 определена, как минимальный дублицирующийся регион [53]. Методом транскриптомного анализа были определены потенциальные гены-кандидаты *CDK4*, *GLI*, *MDM2* и др., роль которых до сих пор в патогенезе ХЛЛ достоверно не определена [89, 174]. Известно, что ген *MDM2* участвует в деградации белка TP53, и что повышенная экспрессия гена может приводить к нарушению регуляции клеточного цикла [100].

Кроме того, при трисомии 12 описана гиперэкспрессия гена *E2F1*. Ген *E2F1* представляет собой транскрипционный фактор, запускающий механизм пролиферации клеток и регулируемый киназами, в частности *CDK4* (циклин-зависимая киназа 4), расположенной в локусе 12q14.1 [89]. Следовательно, непосредственная регуляция гена *CDK4* связана с экспрессией гена *E2F1*, что приводит к повышенной пролиферативной активности опухолевых лимфоцитов у пациентов с трисомией 12. В 4-6% больных ХЛЛ описана другая наиболее часто встречающаяся аномалия - мутация гена *NOTCH1*, которая ассоциирована с трисомией 12 и неблагоприятным прогнозом [64].

Данные о прогностическом значении трисомии 12 до сих остаются спорными. Первоначально у больных ХЛЛ с трисомией 12, как единственной абберацией, была выявлена низкая продолжительность жизни и короткое время до начала терапии [84, 85]. В дальнейших исследованиях независимое неблагоприятное прогностическое значение данной абберации не подтверждено. В прогностической модели, предложенной Döhner с соавт. трисомия 12 определена, как промежуточный фактор риска ХЛЛ [54]. Однако сочетание трисомии 12 с делецией 11q22-23 или 17p13 ассоциируется неблагоприятным прогнозом [163].

### Делеция 13q14

Наиболее частым хромосомным нарушением, выявляемым у 50% больных ХЛЛ при FISH-исследовании, является делеция 13q14. В отсутствие других хромосомных нарушений делеция 13q14 считается благоприятным фактором прогноза ХЛЛ [54]. Примерно у 15-20% больных делеция 13q14 происходит на обеих хромосомах (биаллельная делеция). В 60% случаев делеция 13q имеет относительно одинаковую длину 0,8-1,0 Мб, что составляет минимальный делетированный регион (MDR), и обозначается, как делеция I типа [134]. Делеция I типа включает локусы генов микро-РНК *miR15a* (*MIR15A*) и *miR16-1* (*MIR15A*), первый экзон гена *DLEU7* и другие гены [136]. Данные микро-РНК регулируют экспрессию гена *BCL2*, который обладает антиапоптотической активностью и который экспрессируется в большом количестве при ХЛЛ [94]. Полагают, что делеция генов *DLEU2/ MIR15A/ MIR16-1* приводит к потере контроля пролиферации В-лимфоцитов, определяемой данными генами [95]. Другие гены, локализованные в 13q14, такие как *DLEU7* или *TRIM13*, являются тумор-супрессорными генами.

При делеции II типа происходит потеря гена *RBI*, который участвует в регуляции клеточного цикла и стабильности генома [133]. Показано, что у пациентов с делецией II типа снижается регуляция 10 генов, включая *TPT1* (*TCT1*), который участвует в регуляции антиапоптотической активности через

ингибирование ВАХ-индуцированного апоптоза и сверхэкспрессии гена *TP53*. Другие гены *GPS2 (AMF)*, *GPI*, *BSG*, *LGALS1*, *PAK2*, *PARVB* и *VIM* участвуют в адгезии и миграции опухолевых клеток, регуляции пролиферации, в ангиогенезе и апоптозе [150]. В литературных источниках представлены данные о различной прогностической значимости делеции I и II типа. Описано, что делеция II типа связана с укорочением времени до начала терапии и более короткой ОВ [44, 124, 133].

В исследовании Н. Dohner и соавт. показано, что медиана ОВ и время до начала терапии у больных с единственной делецией 13q14 выше, чем у пациентов с делецией 11q, 17p, трисомией 12 и отсутствием аберраций при FISH-исследовании [54]. Медианы ОВ и времени до начала терапии в группе с делецией 13q составили 133 месяцев и 92 месяцев по сравнению с группами с делецией 11q (79 месяцев и 13 месяцев), трисомией 12 (114 месяцев и 33 месяцев), делецией 17p (32 месяцев и 3 месяцев) и отсутствием аберраций по данным FISH (114 месяцев и 49 месяцев), соответственно. У больных с единственной делецией 13q достоверно чаще выявляется мутированный вариант генов *IGHV* ( $p < 0,001$ ) [153].

По данным литературы с помощью СЦИ выявляются различные варианты делеций 13q14 и транслокации с точкой разрыва в 13q14 [73, 142]. Однако при субмикроскопической делеции 13q данная хромосомная аберрация не выявляется при СЦИ, но определяется при FISH-исследовании. При сочетании с дополнительным хромосомным нарушением делеции 13q14 утрачивает свое благоприятное прогностическое значение при ХЛЛ. В исследовании Puiggros с соавт. продемонстрировали, что выявленные при кариотипировании транслокации с делецией 13q14 достоверно ассоциированы с худшим прогнозом, чем делеции 13q14, выявленные только при FISH [142].

### **Делеция 17p13**

На момент диагноза частота выявления делеции короткого плеча хромосомы 17 (делеция 17p) у больных ХЛЛ варьирует в пределах 3-8% [52,

54]. Однако, она может составлять до 30% у пациентов с прогрессирующим и рефрактерным течением ХЛЛ [186]. Делеция 17p13 приводит к потере локуса гена *TP53* в одном аллеле, а 80% случаях делеция *TP53* сочетается с мутацией гена *TP53* во втором аллеле [117, 188]. Некоторые мутации *TP53* происходят без делеции 17p, как правило, но это встречается довольно редко - в 5% случаев [50, 108].

Ген *TP53* является супрессором опухолевого роста. Важнейшей функцией белка TP53 является подавление роста генетически поврежденных, соответственно, потенциально опухолевых клеток [110]. На TP53 сходятся многочисленные сигналы, отслеживающие состояние клетки и ее окружения. Это достигается за счет разного рода модификаций белковой p53 молекулы посредством фосфорилирования, ацетилирования, связывания с другими молекулами, регулирующими его активность.

В результате действия механизмов, природа которых в настоящее время не ясна, повреждения ДНК в норме стимулируют синтез белка *TP53*. Это в свою очередь "запускает" продукцию белковых молекул: p21, ингибирующих циклин-зависимые киназы, GADD45, тормозящих клеточный рост; ERCC, распознающих и вырезающих поврежденные участки ДНК. Данные молекулы участвуют в задержке роста и деления клеток во время восстановления структуры ДНК [87]. *TP53* элиминирует поврежденные клетки из популяции, опосредуя их необратимый арест в фазе G1, таким образом препятствуя репликации ДНК до репарации повреждения. При необратимом повреждении ДНК индуцируется апоптоз.

Больные с делецией 17p характеризуются низкой ОВ и быстрой прогрессией заболевания [50]. Тем не менее, недавние исследования показали клиническую неоднородность у пациентов с делецией 17p в зависимости от времени возникновения этой аномалии: как раннего события или, более частое, как вторичного изменения [105]. Больные с выявленной делецией 17p в дебюте заболевания имеют более продолжительную ОВ (4-5 лет) в отличие от больных с делецией 17p, приобретенной на этапе прогрессии заболевания

(1-1,5 года). Показано, что делеция 17p достоверно чаще встречается у больных с немутированным вариантом генов *IGHV* ( $p < 0,05$ ) [169].

По литературным данным пациенты с выявленной делецией 17p и/или мутациями *TP53* достоверно хуже отвечают на терапию стандартными протоколами лечения FC (флударабин, циклофосфамид) или FCR (флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб). У данным больных выявляется резистентность к флударабину [177]. В рандомизированном исследовании 3 фазы CLL 8 по сравнению эффективности двух режимов терапии FC и FCR медиана ОБ и ВБП у больных, получавших FCR, составила 62,5 месяцев и 51,8 месяцев, соответственно [71]. Включение в схему терапии новых таргетных препаратов таких, как ингибитор тирозинкиназы Брутона (ибрутиниб, акалабрутниб) и ингибитора bcl-2 (венетоклакс), улучшило показатели ОБ и ВБП [32, 145]. В исследовании 1b/2 фазы RESONATE у пациентов с предшествующей терапией ХЛЛ, рандомизированных на ветви «ибрутиниб» и «офатумумаб», показаны высокие показатели ОБ и ВБП [32].

### **Транслокации и несбалансированные перестройки**

Ряд исследователей выделяет в отдельную группу риска больных ХЛЛ с выявленными при кариотипировании транслокациями [16, 121, 149]. В работе Мауг с соавт. впервые было показано, что наличие любых транслокаций имеет неблагоприятное влияние на течение ХЛЛ. Транслокации встречаются примерно у 30% больных ХЛЛ как в составе комплексного кариотипа, так и в виде единственного нарушения [121]. Выделяют сбалансированные и несбалансированные транслокации. В составе комплексного кариотипа с высокой частотой до 73% выявляются несбалансированные перестройки (несбалансированные транслокации, маркерные, дериватные, дицентрические хромосомы и др.), которые ассоциированы с делецией 17p, комплексным кариотипом, немутированным вариантом генов *IGHV* у больных ХЛЛ [16, 172]. В исследовании Rigolin с соавт. продемонстрирована связь несбалансированных транслокаций в составе комплексного кариотипа у

пациентов с ХЛЛ с низкой ОВ и укорочением времени до начала терапии [149].

Особое внимание среди сбалансированных перестроек занимают транслокации с вовлечением генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGH*) в регионе 14q32. Согласно результатам, полученным в зарубежных исследованиях, данные транслокации встречаются в 5-7% случаев ХЛЛ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом. Показано, что сбалансированные транслокации с вовлечением гена *IGH/14q32* ассоциированы с более короткой ОВ и укорочением времени до начала терапии по сравнению с делецией 13q и трисомией 12 у больных ХЛЛ [24, 35, 85].

### **Комплексный кариотип**

Наличие трех или более хромосомных аномалий (количественных и структурных) называется комплексными нарушениями кариотипа (КК). В составе КК могут быть различные количественные и структурные хромосомные нарушения, в том числе в сочетании с характерными хромосомными aberrациями: делецией 11q22, 13q, 17p и трисомией 12. КК выявляются у 9,5 – 28,6% пациентов больных ХЛЛ до начала терапии [16, 25, 69, 74]. В 1985 году исследовательской группой Juliusson с соавт. впервые было показано отрицательное прогностическое значение КК, связанное с низкой ОВ больных со зрелыми В-клеточными опухолями, в том числе ХЛЛ [12]. В начале 1990-х годов те же исследователи определили несколько прогностических групп на основании выявленных структурных и количественных нарушений у больных ХЛЛ [85]. Анализ общей выживаемости пациентов показал достоверное различие в группе с тремя и более aberrациями (медиана ОВ составила примерно 60 месяцев) по сравнению с группами с отсутствием нарушений (медиана ОВ не достигнута), одной и двумя клональными перестройками (медиана 84 и 110 месяцев, соответственно). Позже в нескольких исследованиях было показано, что КК

ассоциирован с известными факторами неблагоприятного прогноза: делецией 17p, делецией 11q и немутированным вариантом генов *IGHV* [16, 27, 69, 147].

В исследовании Rigolin с соавт. показано, что комплексный кариотип является независимым прогностическим фактором, достоверно влияющим на показатели общей выживаемости и время до начала терапии независимо от групп риска, определенных согласно МПИ. Данные подтверждены в многофакторном анализе.

В 2014 году в крупном многоцентровом исследовании Baliakas с соавт. сообщает о независимом прогностическом значении КК, определяемого методом СЦИ [16]. В проведенном исследовании показано, что комплексные нарушения ассоциированы с коротким временем до начала терапии ( $p=0,01$ ), а КК с пятью и более аберрациями ассоциирован с самым коротким временем до начала терапии ( $p=0,001$ ). Отмечено, что КК сохранял неблагоприятное прогностическое значение среди пациентов с мутированными ( $p=0,009$ ) и немутированными генами *IGHV* ( $p=0,017$ ). Результаты многофакторного анализа, включающего немутированный вариант генов *IGHV*, стадию В/С по Binet и КК, подтвердили независимое неблагоприятное прогностическое значение комплексных нарушений, связанное с укорочением времени до начала терапии.

В 2019 году по результатам расширенного ретроспективного исследования на основе анализа 5290 больных Baliakas с соавт. предложили новую иерархическую модель прогноза ХЛЛ в зависимости от выявленных структурных и количественных перестроек в составе КК. Определяемые при кариотипировании комплексные нарушения объединяли группу больных с различным клиническим течением (Рисунок 3). Исследователи выделили подгруппу КК с трисомией 12, характеризующуюся определенными клинико-биологическими особенностями: низкой частотой встречаемости делеций и/или мутаций гена *TP53* и высокой частотой трисомии 18 и 19, мутированным вариантом генов *IGHV*, наличием CD38 на опухолевых клетках и секрецией моноклональных иммуноглобулинов. Пациенты данной



группы имели более длительную ОВ (медиана не достигнута) по сравнению с группой КК (74 месяца,  $p < 0,0001$ ) и без КК (133 месяцев,  $p < 0,0001$ ). Кроме того, по количеству выявленных нарушений выделены подгруппы КК низкой (3 aberrации), средней (4 aberrации) и высокой (5 и более aberrаций) комплексности. Группа высокой комплексности характеризовалась высокой частотой aberrаций гена *TP53* (делеция 17p и/или мутации *TP53*), немутированного варианта генов *IGHV* и значительным укорочением ОВ (медиана – 37 месяцев) в сравнении с группами низкой (медиана – 148 месяцев) и средней комплексности (медиана – 87 месяцев) ( $p < 0,001$ ). Более того, неблагоприятное прогностическое значение кариотипа высокой комплексности сохранялось в отсутствие аномалий гена *TP53*.

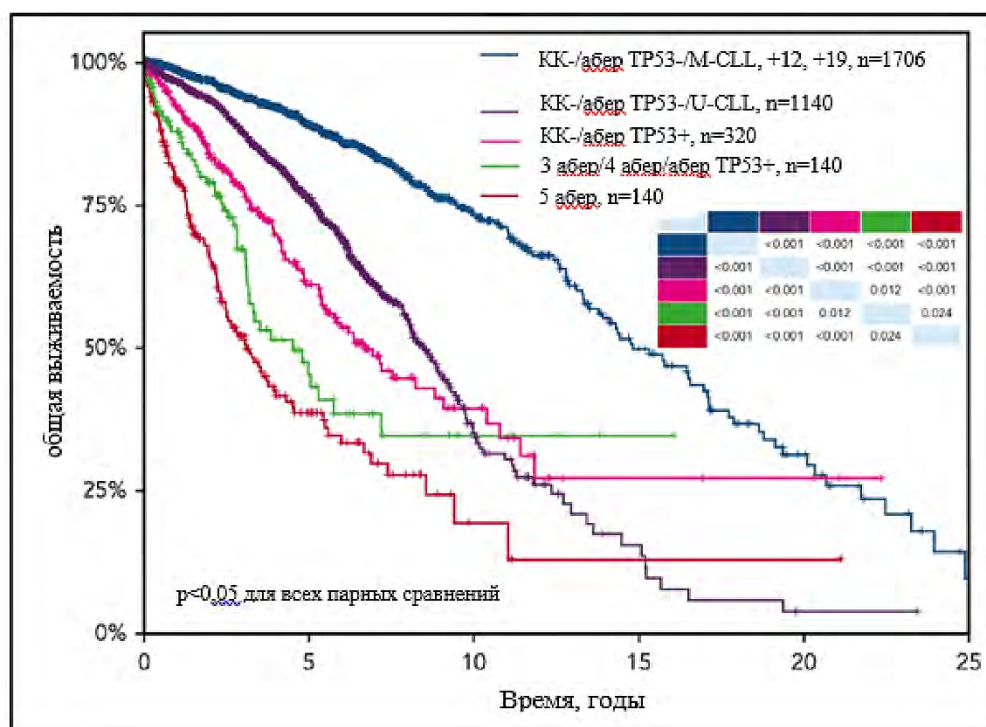


Рисунок 3. Кривые Каплана-Мейера, основанные на иерархической модели ОВ, включающей КК, aberrации гена *TP53* (делеция хромосомы 17p и/или мутации *TP53*) и мутированный (M-CLL) или немутированный (U-CLL) варианты соматического статуса генов *IGHV* (адаптировано с англ. [17]).

КК высокой комплексности (5 aberrаций, красная линия) показывает самую короткую ОВ, за которой следуют случаи с aberrациями гена *TP53* с 3 или 4 aberrациями (низкой и средней комплексности, соответственно; зеленая линия), случаи с отсутствием КК с aberrациями *TP53* (КК-/абер *TP53*, фиолетовая линия) и случаи КК-/абер *TP53*- с немутированным вариантом *IGHV* (КК-/абер *TP53*-/*U-CLL*, черная линия). Пациенты с самой длинной ОВ - это пациенты с КК-/ абер *TP53*-и мутированными генами *IGHV* (М-*CLL*), а также пациенты с КК и +12, +19 (КК-/абер *TP53*/ М-*CLL* – КК, +12, +19, синяя линия). Значения  $p$  для всех парных сравнений представлены во вложенной таблице, в которой цветные ячейки указывают соответствующие подгруппы на основе цвета каждой кривой Каплана-Мейера.

В литературе представлены данные разных исследований о влиянии КК на результаты лечения с применением различных протоколов химиотерапии и/или иммунохимиотерапии. В проспективном исследовании Healing с соавт. впервые показал независимое неблагоприятное влияние КК на выживаемость больных после первой линии терапии хлорамбуцилом и анти-CD20-моноклональными антителами (ритуксимабом, обинутузумабом) [74]. В многофакторном анализе КК ( $n=30$  из 154, 19,5%) был достоверно связан с короткой ОВ ( $p=0,004$ ), а одновременное выявление aberrаций гена *TP53* и КК значительно ухудшало прогноз заболевания ( $p<0,001$ ). В исследовании Le Bris с соавт. у больных на терапии FCR (флударабин, циклофосфан, ритуксимаб) 5-летняя ОВ и ВБП в группе КК составила  $72,4\pm 11\%$  против  $85,8\pm 8,5\%$  ( $p=0,007$ ) и медиана ВБП в группе КК - 21 месяц против 55 месяцев ( $p=0,002$ ) [27]. Негативное прогностическое влияние значения комплексных перестроек на ОВ ( $p=0,03$ ) и ВБП ( $p=0,005$ ) также подтверждалось в многофакторном анализе.

В ряде исследований особенно пристально изучалось влияние КК у больных, получающих в ходе лечения новые таргетные препараты, такие как ингибиторы тирозинкиназы Брутона (БТК) – ибрутиниб, акалобрутиниб и ингибитор антиапоптотического белка Bcl-2 – венетоклакс [13, 27, 101, 141, 167]. Исследователи онкологического центра MD Anderson Техасского университета Thompson с соавт. показали, что комплексный кариотип значительно ухудшает результаты лечения ибрутинибом больных с

резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ [167]. В мультивариантном анализе КК оказал достоверное влияние на ВБП ( $p=0,006$ ) и ОВ ( $p=0,008$ ). Однако по данным проспективного рандомизированного исследования RESONATE в краткосрочном наблюдении (медиана 19 месяцев) отсутствовали достоверно различия ВБП и ОВ в группе больных с КК ( $n=39$  из 154, 25%), получавших ибрутиниб [29].

В исследовании Anderson с соавт., включающем 67 пациентов с рефрактерным и рецидивирующим течением ХЛЛ, оценивались результаты терапии венетоклаксом [13]. По результатам СЦИ, которое выполнялось 38 больным, комплексные нарушения кариотипа выявлены у 42% (16 из 38). В данном исследовании наличие КК ассоциировалось с высоким риском прогрессирования заболевания (ОР=6,6, 95% ДИ 1,5-29,8,  $p=0,005$ ) в то время, как мутация *TP53* и/или делеция 17p не оказывали влияния на время до прогрессирования ( $p=0,75$ ). Таким образом, наличие комплексных нарушений кариотипа может быть более важным фактором неблагоприятного прогноза, чем делеция 17p, выявляемая методом FISH.

#### 1.4 Цитогенетические методы исследования

На сегодняшний день при обследовании больных ХЛЛ используют два основных цитогенетических метода – флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) и стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ). Каждый метод имеет свои преимущества и ограничения.

Применение FISH-исследования с помощью соответствующих зондов позволяет с высокой чувствительностью определять характерные для ХЛЛ хромосомные aberrации. Прогностически значимые aberrации такие, как делеции 11q22 (*ATM*), 13q14, 17p13 (*TP53*) и трисомия 12, выявляются у 80% больных ХЛЛ [54, 57]. Однако, спектр хромосомных aberrаций ограничивается применением известных локус-специфических зондов.

При кариотипировании анализируется весь набор хромосом в клетке, что позволяет выявлять дополнительные аномалии кариотипа [7]. Вместе с

тем, для проведения СЦИ необходимо наличие делящихся клеток в образце, что позволяет при дальнейшей обработке цитогенетических препаратов получать метафазные пластинки. Однако при ХЛЛ количество митотических клеток снижено в виду того, что субстратом опухоли являются зрелые лейкоэмические В-клетки с низкой пролиферативной активностью [84].

Таким образом, результаты, полученные при анализе дифференциально-окрашенных хромосом и FISH, дополняют друг друга [6]. СЦИ позволяет охарактеризовать кариотип при наличии метафазных пластинок в образце. Метод FISH применяется вне зависимости от наличия делящихся клеток, и позволяет с высокой точностью выявлять характерные хромосомные аберрации.

#### **1.4.1 Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ)**

Главным инструментом цитогенетического исследования служит анализ метафазных хромосом после их дифференциальной окраски, в результате которой появляется уникальная для каждой пары хромосом поперечная исчерченность (бэнды). Самой известной и повсеместно используемой методикой дифференциальной окраски хромосом является G-дифференциальная окраска (G-bands, Giemsa-bands) с использованием красителя Гимзы или Райта по методике Seabright с модификациями [183].

На основании тщательного изучения величины, числа и последовательности G-полос, получаемых при дифференциальном окрашивании хромосом, была создана единая цитогенетическая классификация и номенклатура, согласно которой описывают кариотип. В настоящее время анализ кариотипа осуществляется согласно последней номенклатуры «An International System for Human Cytogenomic Nomenclature – ISCN» (2020) [180].

Этап культивирования клеток проводится для того, чтобы увеличить количество делящихся клеток в препарате. При культивировании образцов больных с В-клеточными и Т-клеточными неоплазиями кроветворения

используют В-клеточные и Т-клеточные митогены, соответственно. Митогены - вещества, способные вызывать поликлональную активацию и пролиферацию лимфоцитов. Для культивирования В-лимфоцитов – субстрата ХЛЛ, используют В-клеточные митогены такие, как липополисахарид (Lipopolysaccharide, LPS), выделяемый из грамотрицательных бактерий, ТРА (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate) и ранее широко используемый в зарубежных исследованиях – митоген из лаконоса (Pokeweed mitogen, PWM) [59, 81, 84, 175].

По данным лаборатории кариологии «НМИЦ гематологии» клональные хромосомные aberrации при стимулировании В-клеточными митогенами (LPS и ТРА) выявляются не более чем у половины больных [3]. Таким образом, выявление хромосомных aberrаций у больных ХЛЛ затруднено в связи с крайне низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов. Эффективное применение СЦИ в рутинной клинической практике у пациентов ХЛЛ стало возможным с появлением специфического иммуностимулятора деления – олигонуклеотида DSP30 [51].

#### **1.4.1.1 Иммуностимулятор CpG-олигонуклеотид DSP30**

В 1983 году американский хирург Coley впервые описал опыт применения иммуностимулирующей терапии у больных со злокачественными новообразованиями [41]. Первоначально в качестве иммунотерапевтических агентов он использовал живые стрептококки, но несколько позже из-за вызванных инфекционных осложнений применял смесь термически инактивированных грамположительных и грамотрицательных бактерий, которая приобрела название «токсина Coley» [132].

Применение бактериальных компонентов в качестве иммуностимулирующей терапии для неинфекционных заболеваний вызвало научный интерес многих исследователей. Messin с соавт. обнаружили, что бактериальная ДНК способна активировать В-лимфоциты [122]. Позже Krieg

с соавт. открыли определенные фрагменты бактериальной ДНК, связанные с иммуностимулирующим действием бактериальных компонентов [102, 103]. Эти фрагменты представляли собой короткие последовательности – олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилованные динуклеотиды CpG (CpG-ODN). В исследовании Klinman с соавт. показано, что CpG-ODN не только активируют В-клетки, но и индуцируют синтез цитокинов широкого спектра действия (интерлейкин-6, интерлейкин-12, интерферон- $\gamma$  и др.) [97]. Кроме того, CpG-ODN активируют различные типы клеток: В-клетки, NK-клетки и антигенпрезентирующие клетки (моноциты, макрофаги и дендритные клетки). Таким образом, бактериальная ДНК и синтетические олигодезоксинуклеотиды, содержащие в центре определенную последовательность CpG-динуклеотид, являются мощными иммуностимулирующими средствами.

Liang с соавт. исследовали способность различных олигодезоксинуклеотидов стимулировать В-клетки периферической крови человека, из которой предварительно удаляли Т-клетки [112]. Среди 47 различных ODN-последовательностей было выделено 12 фосфоротиоатных олигодезоксинуклеотидов (sODNs), в том числе DSP30, которые индуцировали выраженную пролиферацию В-клеток и продукцию Ig. Последовательность олигонуклеотида DSP30 включает 27 нуклеотидов и выглядит следующим образом: 5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTGCC-3'. После стимуляции активными sODNs более чем 95% В-лимфоцитов экспрессировали CD25, CD80, CD86. Полученные результаты показали, что ответ В-клеток на sODNs является поликлональным. В тех случаях, когда олигодезоксинуклеотиды культивировали с интерлейкином-2 (IL2), была отмечена повышенная пролиферация клеток и продукция антител классов IgM, IgG и IgA, а также анти-ДНК антител класса IgM. Также Liang с соавт. показали, что шарики сефарозы, покрытые стимулирующими sODNs, индуцируют пролиферацию В-клеток, аналогичную с растворимой формой sODNs, что предполагает присутствие специфических поверхностных

рецепторов. Напротив, Krieg соавт. обнаружили, что CpG-ODN, ковалентно связанные с твердой опорой, не являются стимулирующими [103].

Молекулы CpG-ODN связываются с Toll-подобными рецепторами 9 типа (TLR9) и запускают сигнальный путь, индуцируя митоген-активированные протеинкиназы (МАРК), такие как внеклеточная рецепторная киназа (ERK), p38 и c-Jun NH<sub>2</sub>-терминальная киназа (JNK), которые в конечном счете активируют транскрипционный фактор NFκB [20, 99, 103, 129]. Toll-подобные рецепторы (TLR) представляют собой рецепторы распознавания врожденного иммунитета, связывающие патогенспецифические молекулярные структуры. TLR9 локализуется на внутриклеточных везикулах таких, как эндосомы, лизосомы и эндоплазматический ретикулум (Рисунок 4) [92].

TLR4 располагается на поверхности клеток и является рецептором для липополисахаридов (LPS) бактериальной стенки большинства грамотрицательных бактерий (Рисунок 4). После связывания лиганда происходит активация сигнального пути по двум возможным механизмам: через адаптерный белок MyD88, индуцируя экспрессию генов посредством транскрипционного фактора NFκB, активационного белка AP-1 и факторов к интерферону IRF1, IRF5, IRF7, либо через адаптерный белок TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon), запуская индукцию транскрипционного фактора NFκB, регулируемого фактором к интерферону IRF3 [76, 129]. Эти сигнальные каскады индуцируют транскрипцию воспалительных цитокинов, интерферонов I или II типа и хемокинов. Таким образом, при стимуляции DSP30 и LPS индуцируются разные сигнальные пути, приводящие к активации экспрессии генов с различными биологическими эффектами.

Показаны различия профилей экспрессии рецепторов семейства TLR в нормальных В-лимфоцитах, опухолевых клетках и в субпопуляциях клеток ХЛЛ [130]. В клетках ХЛЛ выявлена повышенная экспрессия TLR7 и пониженная экспрессия TLR4 и TLR8. Кроме того, экспрессия TLR4 была

достоверно ниже в подгруппе больных ХЛЛ с немутированными генами *IGHV* по сравнению с экспрессии TLR4 в подгруппе пациентов с мутированными генами *IGHV* ( $p < 0,005$ ) [14]. Таким образом, стимуляция опухолевых клеток LPS, являющегося В-клеточным стимулятором, будет сниженной, особенно в клетках ХЛЛ без мутаций генов *IGHV*.

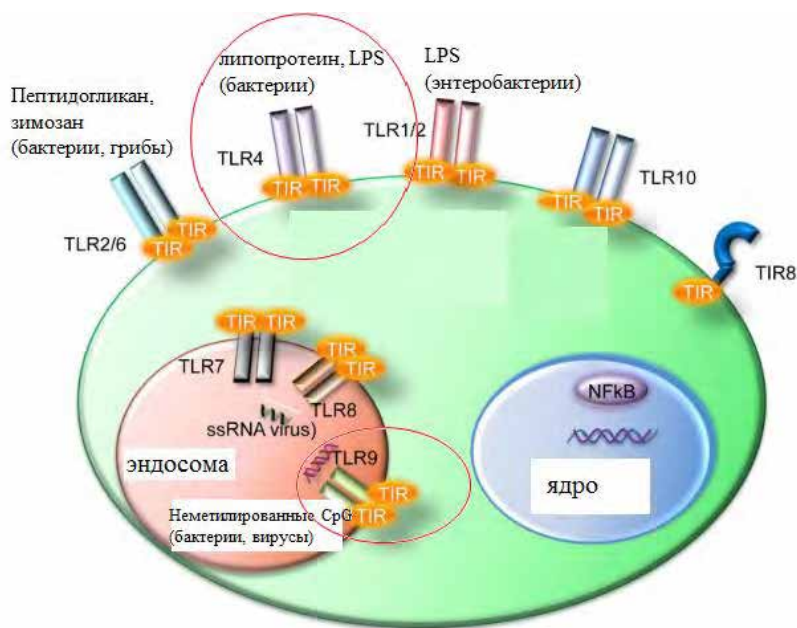


Рисунок 4. Схематическое изображение рецепторов семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) с их лигандами на опухолевых клетках ХЛЛ (адаптировано с англ. [129]).

LPS – липолисахарид, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR10 – поверхностные рецепторы; TLR7, TLR8, TLR9 – внутриклеточные рецепторы; TIR – лиганд к рецептору семейства TLR; ssRNA – одноцепочечная РНК. Красным отмечены рецепторы TLR4 и TLR9 с лигандами.

Выявлено, что В-клетки ХЛЛ в фазу  $G_0$  клеточного цикла и на ранней стадии  $G_1$  попадают под необратимый «арест», что отражается в выраженном снижении ответа на поликлональную активацию различных митогенов. Блокирование клеточного цикла на раннем этапе отличает опухолевые клетки от нормальных В-клеток [105]. CpG-ODN активируют В-лимфоциты, снимая блокирование перехода в фазу  $G_1$  клеточного цикла. Активированные В-лимфоциты секретируют интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), IgM.



Дополнительно, CpG-активированные В-клетки увеличивают экспрессию Fcγ – рецептора, MHC I и MHC II, костимулирующих молекул MHC II класса - CD80 и CD86, и усиливают экспрессию CD25 - высоко аффинного рецептора к IL2. Молекула CD25 представляет собой варибельный домен комплекса рецептора к IL2 и определяет высокое сродство к этому цитокину. Следовательно, добавление IL2 к CpG-ODN увеличивает пролиферацию опухолевых лимфоцитов ХЛЛ по сравнению с нормальными В-лимфоцитами [49].

В ряде клинических исследований была показана эффективность использования сочетания CpG-DSP30 и IL2 в качестве стимулятора деления В-лимфоцитов для исследования кариотипа больных ХЛЛ [51, 69, 143]. В 2006 году Dicker с соавт. применили DSP30 и IL2 для культивирования клеток у 132 больных ХЛЛ [51]. Успешные результаты СЦИ были получены у 125 из 132 (95%), аберрации были выявлены у 101 из 125 (81%) больных. В крупном немецком исследовании Haferlach с соавт., включающем 506 пациентов ХЛЛ, при стимулировании DSP30 и IL2 митозы были получены у 98% больных, из них абберрантный кариотип был выявлен у 83% и КК обнаружен у 21% больных [69].

В части исследовательских работ проводились сравнения результатов культивирования без стимуляции, В-клеточными митогенами и со специфической стимуляцией DSP30 и IL2 [75, 81, 143, 175]. Однако, результаты отличались от исследований, приведенных выше. В работе Jenderny с соавт. митозы были получены в 74% (95 из 129) случаях нестимулированной культуры, в 98% (126 из 129) культуры, стимулированной митогеном PWM, и в 74% (95 из 129) культуры, стимулированной с использованием DSP30 и IL2. Хромосомные аберрации были выявлены при кариотипировании нестимулированной культуры в 6% случаев (6 из 95), с использованием PWM – в 27% (34 из 126), стимулированной DSP30 с IL2 – в 40% (38 из 95) случаях [81]. Таким образом, сочетание иммуностимулятора

DSP30 с IL2 представляет собой мощный специфический активатор опухолевых клеток ХЛЛ, однако, по данным литературы показатели эффективности культивирования с DSP30 и IL2 различаются.

Ряд исследователей рассматривали вопрос о способности DSP30 индуцировать хромосомные aberrации [51, 143, 187]. В исследовании Wu с соавт. показано, что при специфической стимуляции DSP30 и IL2 клеток периферической крови 17 здоровых доноров клональные хромосомные aberrации не выявлялись, что подтверждалось методом FISH с ДНК-зондами к локусам 11q22, 13q14, 17p13 и центромере 12 [187]. Однако в кариотипе встречались неклональные нарушения такие, как трисомия хромосом 3, 12 и транслокации с перестройкой гена *IGH/14q32*. Аналогичные результаты были получены в работах Put с соавт. и Dicker с соавт, которые исследовали периферическую кровь 5 здоровых доноров методом СЦИ с помощью DSP30 и IL2 - ни в одном случае клональные перестройки не обнаруживались [51, 143]. Таким образом, хромосомные нарушения, выявленные при стимулировании DSP30 и IL2, не являются индуцированными, а характеризуют кариотип опухолевых клеток ХЛЛ.

#### 1.4.2 Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

К середине 80-х годов была разработана методика мечения проб с помощью флуоресцентных красителей. С тех пор метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) нашел широкое применение не только в исследовательских, но и в диагностических лабораториях, связанных с анализом хромосомных патологий. В его основе лежит создание ДНК-пробы, содержащей фрагмент или фрагменты нуклеиновых кислот, меченные таким образом, чтобы было возможно проведение их детекции при флуоресцентной микроскопии после гибридизации *in situ* [7]. Мечение ДНК разделяют на прямое и непрямое. При непрямом мечении в ДНК-зонды включаются «метки» - нуклеотиды, связанные с гаптенами (биотином или дигоксигенином), которые обладают высоким сродством к авидину. При

конъюгации авидина с антителами, несущими флуорохром, образуется флуоресцентный сигнал, который регистрируется с помощью флуоресцентного микроскопа.

Прямое мечение предполагает введение в ДНК-зонд элементов, которые могут быть непосредственно выявлены при последующей микроскопии. Для прямого мечения используют различные флуорохромы, такие как флуоресцеинизотиоционат (FITC), родамин, аминотетилкумарин (АМСА) и другие [5]. При использовании «прямых» ДНК-зондов, уже содержащих в своем составе флуорохром, дополнительного этапа инкубирования с антителами не требуется.

Для выявления сложных хромосомных перестроек, в том числе и для идентификации несбалансированных перестроек в клинико-лабораторной практике применяется метод многоцветной FISH (mFISH), позволяющий с помощью псевдоцветов отдельно визуализировать 22 пары хромосом и половые хромосомы [113, 159]. Метод многоцветного анализа хромосомных сегментов (mBAND) позволяет анализировать все сегменты одной пары хромосом и точно идентифицировать точки разрыва хромосомы, участвующей в межхромосомных или внутривхромосомных перестройках [114].

### **1.4.3 Сравнительная геномная гибридизация (aCGH)**

Микроматричный анализ или сравнительная геномная гибридизация на чипах (array Comparative Genomic Hybridization, aCGH) – молекулярно-цитогенетический метод анализа хромосом с использованием микроматриц (биочипов) для гибридизации с геномной ДНК. С помощью aCGH определяют несбалансированные изменения генома – aberrации числа копий (Copy number Variation, CNV) – делеции, моносомии, дупликации, трисомии и другие. Сбалансированные хромосомные нарушения (сбалансированные транслокации, инверсии) не выявляются методом aCGH. На сегодняшний день разрешающая способность метода микроматричного анализа с

использованием биочипов высокой плотности достигает до 200 п.н. и менее [189].

Применение метода aCGH позволило более полно изучить геном больных ХЛЛ. С помощью микроматричного анализа были подтверждены ранее описанные aberrации и выявлены новые часто встречающиеся хромосомные нарушения, среди которых увеличение копийности хромосомных регионов 2p, 3q, 8q, 17q и делеции регионов 6q, 7q, 8p, 9p, 11q, 17p, 18p [65, 68, 77, 109]. Определено прогностическое значение некоторых aberrаций. В исследовании Houlworth с соавт. показали, что увеличение копийности 3q и 8q, делеция 17p являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза, что было подтверждено в многофакторном анализе при оценке ОВ [77]. Выявлено, что частота амплификации локуса 3q26 и связанного с ним гена *PIK3CA* составляет 5,6%, амплификация локуса 8q24/*MYC* – 3,7%, делеция 8p – 5% у пациентов ХЛЛ. Детекция данных нарушений достоверно связана с укорочением времени до начала терапии [28]. Таким образом, метод aCGH, оценивающий геномный дисбаланс опухолевых клеток, может служить мощным прогностическим инструментом для стратификации риска у больных ХЛЛ.

## **Глава 2. Материалы и методы**

### **2.1. 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 устанавливался на основании данных клинического анализа крови и иммунофенотипического исследования согласно рекомендациям Международной рабочей группы по изучению ХЛЛ (iwCLL) [70]. Диагноз ХЛЛ устанавливали 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 [9]. 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 старшим научным сотрудником лаборатории к.б.н. Бидерман Б.В., зав. лабораторией – д.б.н. Судариков). 21 больному клинический анализ крови и иммунофенотипическое исследование крови проводили по месту жительства.

В лаборатории кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России всем больным выполнялось 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).

У 4 больных ХЛЛ сочетался 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 ПХТ 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  $\beta$ 2-микроглобулина в сыворотке крови была определена у 37 (40,2%) пациентов, из них концентрация  $\beta$ 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  $\beta$ 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 2.

Таблица 2. 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 (разброс)	58 (30-86)
Стадия ХЛЛ по Binet:	
А	23 (25,0)
В/С	69 (75,0)
$\beta 2$ -микροглобулин (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)
Имунофенотипическое 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 с включением

разных протоколов терапии, из них 36 больным в прогрессии заболевании и 4 больным на момент развития рецидива. Терапия включала разные схемы терапии: иммунохимиотерапию (FCR, FCR-lite, FR, RCOP), 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 ГСК. Одному больному исследование проводили троекратно: до лечения, после окончания курса химиотерапии и на момент прогрессии заболевания. Таким образом, всего выполнено 97 исследований.

## 2.2. Материал исследования

Методом СЦИ с использованием DSP30 и IL2 было проведено 97 исследований. Для выполнения СЦИ культивировали клетки периферической крови в 44 (45,4%) исследованиях, мононуклеары периферической крови – в 8 (8,3%), параллельно клетки периферической крови и мононуклеары – 24 (24,7%), клетки аспирата костного мозга – в 16 (16,5%), параллельно клетки аспирата костного мозга и мононуклеары - в 4 (4,1%), клетки биоптата лимфатического узла – в одном исследовании (Таблица 3).

Таблица 3. Материал исследования, используемый при культивировании с DSP30 и IL2 у больных ХЛЛ.

Материал исследования, кол-во исследований, %					
кровь	мон	кровь+мон	к/м	к/м+мон	биоптат л/у
45 (45,4)	8 (8,3)	24 (24,7)	18 (16,5)	4 (4,1)	1 (1,0)

мон – мононуклеарные клетки, к/м- костный мозг, биоптат л/у – биоптат лимфоузла



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

Таблица 4. Материал исследования, используемый при культивировании с LPS и TPA у больных ХЛЛ.

Материал исследования, кол-во исследований, %			
кровь	кровь+мон	к/м	к/м+мон
53 (62,4)	19 (22,4)	11 (12,9)	2 (2,3)

мон – мононуклеарные клетки, к/м- костный мозг

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

### 2.3. Методы исследования

СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследование выполняли в 97 случаях (Рисунок 4). 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 (Таблица 5). 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) . 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).

Таблица 5. Серии культур одного образца.

Номер серии культуры	Комбинации митогенов	Клеточный материал	Количество исследований
1	DSP30+IL2	мононуклеарные клетки	32
2	DSP30+IL2	клетки периферической крови, аспирата костного мозга, клетки биоптата лимфоузла	89
3	LPS+TPA	клетки периферической крови, аспирата костного мозга	85
4	LPS+TPA	мононуклеарные клетки	21

При проведении FISH-исследования использовали ДНК-зонды для выявления трисомии 12, делеций 11q22, 13q14, 17p13. При выявлении в кариотипе транслокаций, затрагивающий локус генов тяжелой цепи иммуноглобулинов, проводили дополнительное FISH-исследование для подтверждения перестройки локуса 14q32/*IGH* (N=7). У одного больного для подтверждения частичной трисомии 12 и делеции длинного плеча хромосомы 5 были проведены FISH исследования с зондами к локусам гена *MDM*/12q15 и к локусам 5q31/5q33/5p15. Двум больным выполнено FISH-исследование для

подтверждения/исключения перестройки локуса гена *BCL6/3q27* (N=2). 18 пациентам с выявленными при кариотипировании несбалансированными перестройками при наличии достаточного биоматериала были выполнены mFISH (N=18), из них mBAND выполнен 6 пациентам (N=6). 5 больным по результатам mFISH было проведено дополнительное исследование методом FISH для подтверждения перестройки локуса гена *MYC* (N=5). Одному пациенту выполнен микроматричный анализ (aCGH).

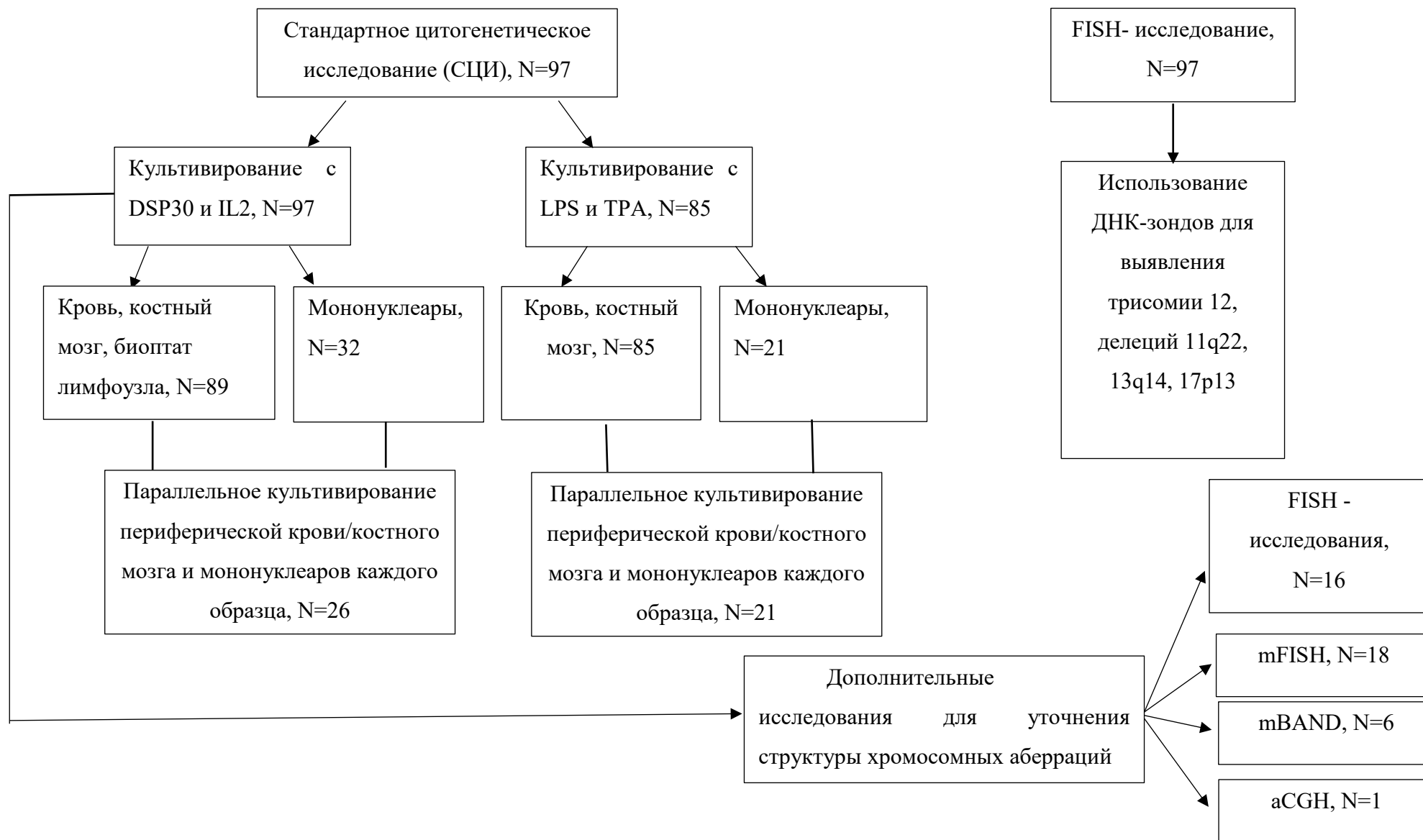


Рисунок 4. Алгоритм цитогенетического исследования у больных ХЛЛ.

### 2.3.1. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ)

Забор периферической крови, костного мозга, проводился в пробирки с гепарином лития, биоптат лимфоузла - в пробирки с гепарином лития, содержащие транспортную среду (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"). В пробирки, содержащие 3 мл охлажденного раствора LSM, наслаивали по 5 мл крови. Далее центрифугировали в течение 30 минут при 1500 об/мин. Из каждой пробирки полученное кольцо мононуклеаров собирали пастеровской пипеткой в одну пробирку объемом 15 мл. Полученную суспензию мононуклеаров трижды отмывали в питательной среде RPMI 1640 (SIGMA, США) добавлением 10 мл среды и центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об/мин. На данном этапе отбирали материал для дальнейшего культивирования из расчета 2 млн. ядросодержащих клеток на 10 мл среды.

Оставшуюся часть мононуклеаров подвергали гипотонической обработке путем добавления 10 мл теплого (37<sup>0</sup>С) гипотонического раствора хлорида калия (0,075М KCl) и выдерживания в термостате при 37<sup>0</sup>С в течение 50 минут. Затем введением 800 мкл 5% уксусной кислоты останавливали действие гипотонического раствора и проводили центрифугирование при 1200 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости суспензию клеток подвергали 3-4 кратной фиксации смесью метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 (фиксатора). Для этого к полученному осадку добавляли 10 мл охлажденного при -18<sup>0</sup>С фиксатора, интенсивно перемешивали и центрифугировали в течение 10 минут при 1200 об/мин., затем удаляли надосадочную жидкость и повторяли процедуру фиксации. Далее полученный осадок и надосадочную жидкость общим объемом 1-1,5 мл перемешивали и переносили в эппендорф и в дальнейшем

использовали для проведения FISH-исследования. Выделение мононуклеаров из костного мозга проводили по аналогичной методике.

Клетки биоптата лимфоузла выделяли путем механической дезагрегации. Образец переносили из пробирки с транспортной средой в стерильную чашку Петри с питательной средой и измельчали шприцевой иглой. Для получения клеточной суспензии фрагмент лимфоузла многократно промывали питательной средой с помощью шприца. Затем проводили подсчет клеток в гомогенизированном образце в камере Горяева.

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 с двумя комбинациями митогенов: (1) DSP30+IL2 - иммуностимулятором деления олигонуклеотидом DSP30 в конечной концентрации 2 нмоль/мл (TibMolBioI, 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).

Для культивирования матрас с клеточной суспензией помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>). Инкубировали при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 72 часов, последние 17 часов с добавлением коллемеида (CaruоMAX, Gibco, США) 0,15 мкг/мл. После окончания срока культивирования культуры клеток переносили в пробирки для центрифугирования, содержимое пробирок тщательно перемешивали и центрифугировали 10 минут при 1200 об/мин. Далее проводили этап гипотонии и фиксации клеток аналогично описанному выше.

Для получения препаратов метафазных пластинок полученную после фиксации суспензию клеток наносили на обезжиренные, охлажденные и

смоченные в дистиллированной воде предметные стекла. Цитогенетические препараты высушивали 3-5 минут при 65<sup>0</sup>С на влажной фильтровальной бумаге на термоплате. Стекла помещали в сухожаровом шкафу при 95<sup>0</sup>С на 30 минут. После этой процедуры препараты остужали и проводили G-дифференциальное окрашивание хромосом по модифицированному методу Seabright (Seabright, 1971). Для этого стекла обрабатывали 0,025% раствором трипсина (Sigma, США) в течение 7 секунд и дважды ополаскивали 0,9% раствором хлорида натрия. Далее на стекла равномерно наносили краску Wright (Merck, Германия), приготовленную из 0,3 г сухой краски и 200 мл метанола и разведенную фосфатным буфером (рН=6,8) в соотношении 1:4, и окрашивали препараты в течение 1,5 мин, затем промывали дистиллированной водой. Препараты высушивали при комнатной температуре.

Изображение метафазных пластинок получали с помощью платформы Metafer (MetaSystems, Германия), оснащенной световым микроскопом AxioImager (Carl Zeiss, Германия) и программным обеспечением для автоматизированного сканирования и обработки изображения метафаз. Сканирование метафаз проводилось под иммерсионным объективом на 63x100 увеличение, после чего полученные изображения направлялись и сохранялись в программе для кариотипирования Ikaros (MetaSystems, Германия). Хромосомный анализ проводили с помощью программного обеспечения Ikaros. По возможности анализировали 20 метафаз в каждой серии культур. Согласно Европейским рекомендациям по цитогеномному анализу гематологических новообразований при выявлении клональных aberrаций анализировали не менее 10 митозов [144]. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2020 [180]. Комплексный кариотип определяли при выявлении 3 и более хромосомных нарушений согласно iwCLL и Европейским рекомендациям по цитогеномному анализу гематологических новообразований [70, 144]. При подсчете учитывались все клональные aberrации в каждом клоне.

### 2.3.2. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Для проведения FISH-исследования использовали мононуклеары крови или костного мозга. Методика выделения мононуклеарной фракции описана в подразделе 2.3.1. Полученную таким образом суспензию клеток и несколько капель фиксатора наносили на обезжиренные, охлажденные и смоченные в дистиллированной воде предметные стекла и высушивали при 65<sup>0</sup>С в течение 5-10 минут. Далее с помощью светового микроскопа с опущенным конденсором отмечали участки диаметром около 10 мм с отдельно расположенными ядрами для нанесения ДНК-зонда.

Для выявления трисомии 12 и делеций 11q22, 13q14, 17p13 в работе использовали многоцветный зонд LSI p53 / LSI ATM и LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12 Multi-color Probe (Abbott, США), разведенный LSI гибридизационным буфером. Данная проба включает ДНК-зонды к локусам хромосом, в которых наиболее часто происходят aberrации при ХЛЛ: LSI p53 - проба, покрывающая локус 17p13.1 (172 kb), включающий ген *TP53*, окрашена флуорохромом оранжевого цвета; LSI ATM – проба для детекции региона 11q22.3 (731 kb), в котором расположен ген *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*, окрашена зеленым флуорохромом; LSI D13S319 – проба для детекции региона 13q14.3 (130 kb) окрашена оранжевым флуорохромом; LSI 13q34 – проба к субтеломерному региону хромосомы 13q34 (612 kb) окрашена флуорохромом голубого цвета; CEP12 – проба к альфа-сателлитному, центромерному участку хромосомы 12 (12p11.1-q11), окрашена зеленым флуорохромом. Эта проба разделена на 2 набора ДНК-зондов: в первый входят пробы LSI p53 и LSI ATM, во второй - LSI D13S319, LSI 13q34, CEP12 (Приложение 1).

Для подтверждения или исключения перестроек локусов генов *IGH/14q32* и *BCL6/3q27* использовали ДНК-зонды на точку разрыва LSI *IGH Dual Color Break Apart Rearrangement Probe* производителя Metasystems (Германия) и LSI *BCL6 (ABR) Dual Color Break Apart Rearrangement Probe* производителя Abbott (США), соответственно. Для подтверждения или



исключения перестройки локуса гена *MYC/8q24* применяли транслокационный зонд LSI IGH/MYC/CEP 8 Tri-color FISH Probe Kit производителя Abbott (США). Для подтверждения частичной трисомии хромосомы 12 использовали ДНК-зонд к локусу гена *MDM2/12q15* – XL MDM2 (12q15) фирмы Metasystems (Германия). Для исключения транслокации t(11;14)(q13;q32) применялся зонд LSI IGH/CCND1 DF FISH Probe Kit производителя Abbott (США). В одном случае для подтверждения делеции длинного плеча хромосомы 5 использовали зонд XL 5q31/5q33/5p15 производителя Metasystems (Германия). Строение ДНК-зондов и результаты гибридизации представлены в приложении 1.

Флуоресцентная гибридизация с различными ДНК-зондами проводилась согласно протоколам производителя. Гибридизацию с ДНК-зондами фирмы Abbott (США) проводили по стандартному протоколу: 1,5 мкл гибридизационной смеси (ДНК-зонд, гибридизационный буфер и дистиллированная вода в соотношении 1:2:7) набора 1 и 1,5 мкл гибридизационной смеси набора 2 наносили на заранее отмеченные участки цитогенетического препарата и покрывали покровными стеклами размером 18 x 18 мм, края заклеивали резиновым клеем для герметизации. Для проведения денатурации и гибридизации стекла помещали в гибридизатор - ThermoBrite™ Slide Hybridization / Denaturation System (Abbott, США). Время денатурации составляло 5 минут при 74-75<sup>0</sup>С, время гибридизации - 16-24 часа при 37<sup>0</sup>С.

После окончания времени гибридизации для удаления несвязанного ДНК-зонда препарат обрабатывали следующим образом: стекла очищали от клея, удаляли покровные стекла, затем помещали их на 2 мин в сосуд Коплина с 0,4% раствором SSC (saline-sodium citrate, Abbott Molecular, США) с игепалом (igepal CA-630, Sigma-Aldrich, США) в водяную баню при 73<sup>0</sup>С, далее стекла погружали в раствор 2SSC/игепал комнатной температуры на 30 сек. После стекла ополаскивали в дистиллированной воде и высушивали в темноте.

Гибридизацию с ДНК-зондами фирмы Metasystems (Германия) проводили по аналогичной методике. На зону гибридизации наносили 1,5 мкл неразведенного ДНК-зонда. Денатурацию ДНК-зонда проводили 2 мин при 75°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), гибридизацию в течение 16-24 часов при 37°C. После проведенной гибридизации отмывку препарата осуществляли с помощью 0,4% раствора SSC в течение 2 минут и 45 секунд при 72°C на водяной бане и 2SSC с 0,05% Tween20 в течение 30 секунд при комнатной температуре.

Для контрастирующей окраски интерфазных ядер наносили 8 мкл раствора DAPI I (Abbott Molecular, США), разведенного в 20 раз antifade solution vectashield (Vector labs, США) до конечной концентрации 250 нг/мл, после наносили квадратные покровные стекла размером 24 x 24 мм. Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope (Carl Zeiss, Германия) с использованием тройного фильтра Dapi/FITC/Spectrum Orange и отдельно фильтров Dapi, Spectrum Orange, FITC, Aqua. Для каждого зонда анализировали по 200 интерфазных ядер с четкими сигналами. Результаты FISH-анализа описывали в соответствии с международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2020 [180].

### 2.3.3. Границы нормальных значений для ДНК-зондов

Граница нормальных значений процента ядер для каждой пробы многоцветного зонда LSI p53 / LSI ATM и LSI D13S319 / LSI 13q34 / CEP 12 Multi-color Probe (Abbott, США) и других проб определялась по формуле  $\mu + 3\delta$ , где  $\mu$  - среднее по совокупности, равное  $(n_1+n_2+n_3+n_4+n_5)/5$  ( $n_1, n_2, \dots$  и т.д. – количество позитивных ядер у первого, второго ... и т.д. доноров; 5 – количество доноров), а  $\delta$  - стандартное отклонение, равное:

$$\sqrt{[(n_1 - \mu)^2 + (n_2 - \mu)^2 + (n_3 - \mu)^2 + (n_4 - \mu)^2 + (n_5 - \mu)^2] / (5-1)}.$$

Анализировали 1000 ядер мононуклеаров периферической крови от 5 здоровых доноров. Определены границы нормальных значений процентов ядер с аномалией:

- для делеции локуса 11q22  $\leq 4\%$ ,
- для делеции локуса 13q14  $\leq 9\%$ ,
- для делеции локуса 13q34  $\leq 2\%$ ,
- для трисомии хромосомы 12  $\leq 3\%$ ,
- для делеции локуса 17p13  $\leq 5\%$ .

Аналогичным образом определены границы норм для амплификации локуса 12q15/*MDM2*  $\leq 1\%$ ; транслокаций с вовлечением локусов 3q27/*BCL6*  $\leq 1\%$ , 8q24/*MYC*  $\leq 0,5\%$ , 14q32/*IGH* -  $\leq 6\%$ , для транслокации t(11;14)(q13;q32) - 0%. Для делеции длинного плеча хромосомы 5, включающей локус 5q31 – 2,5%, локус 5q33 – 2%, регион 5q31q33 – 3%.

#### **2.2.4 Многоцветная флуоресцентная гибридизация *in situ* (mFISH)**

Для постановки mFISH использовали 24-цветный зонд 24XCyte (MetaSystems, Германия), представляющий собой набор из 24 ДНК зондов, связанных с одним из пяти флуорохромов (DEAC, FITC, SpO, TxRed, Cy5) или комбинацией флуорохромов и дополнительным флуорохромом DAPI для фонового окрашивания хромосом (Рисунок 5). В качестве материала для проведения mFISH-исследования использовали клеточную культуру с DSP30+IL2. Приготовление хромосомных препаратов осуществлялось по стандартной методике для СЦИ. С помощью светового микроскопа на стекле отмечали области с достаточным количеством митозов. Дальнейшие процедуры многоцветной флуоресцентной гибридизации проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

#	DEAC	FITC	Spectrum Orange™	Texas Red®	Cy5™
1					
2	■				
3				■	
4		■			
5			■		
6		■			■
7	■				
8				■	■
9			■		
10	■	■			
11		■		■	
12		■	■		
13	■			■	
14	■		■		
15			■	■	
16	■	■			■
17		■		■	
18		■	■		■
19	■			■	■
20	■		■		■
21			■	■	
22	■	■		■	
X	■	■	■		
Y	■			■	

Рисунок 5. Варианты комбинированного мечения 24-х цветного ДНК-зонда, используемого для проведения mFISH.

На этапе денатурации ДНК, содержащейся в препарате, хромосомный препарат инкубировали в течение 30 минут на водяной бане в растворе 2xSSC при  $t=70^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ). По окончании инкубации стекла остужали при  $-18^{\circ}\text{C}$  в течение 20 минут. Затем клеточный препарат помещали в раствор 0,1xSSC комнатной температуры на 1 минуту, далее препарат денатурировали 1 минуту в 0,07N NaOH, после последовательно обрабатывали по 1 минуте в 0,1xSSC при  $4^{\circ}\text{C}$  и в 2xSSC при  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем препарат проводили через серию этиловых спиртов комнатной температуры с возрастающей концентрацией (70%, 85% и 95%) и высушивали на воздухе.

После денатурации образца проводили денатурацию и гибридизацию многоцветного зонда. Объем пробы выбирали в зависимости от размеров исследуемой области: 7 мкл для  $18 \times 18 \text{ мм}^2$  либо 10 мкл для области в  $24 \times 24 \text{ мм}^2$ . Денатурировали пробу путем инкубации при  $75^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) в течение 5 минут и затем быстро погружали в лед на 30-40 секунд. Инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) в течение 30 минут. После пробу перемешивали пипетированием и наносили на исследуемые области цитогенетического препарата.

Накрывали покровным стеклом выбранного размера, края герметизировали с помощью резинового клея. Инкубировали 24-48 часов во влажной камере при 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ).

С целью удаления несвязанного ДНК-зондов препарат предварительно очищали от клея и аккуратно удаляли покровное стекло. Препарат помещали в прогретый до 72°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) раствор 0,4x SSC (pH 7.0 - 7.5) на 2 минуты. Инкубировали в растворе 2xSSC/Tween20 (pH 7.0 - 7.5, содержащий 0,05% Tween20) комнатной температуры в течение 1-2 минут. Для контрастирующей окраски использовали смесь DAPI и antifade (250 нг/мл), процедуру проводили согласно протоколу, описанному выше.

Анализ изображений осуществляли на автоматической системе сканирования и обработки изображений Metafer (MetaSystems, Германия) с использованием автоматических настроек поиска и сканирования метафаз и программного обеспечения для анализа флуоресцентных сигналов Isis (MetaSystems, Германия). С помощью заданных алгоритмов программы Isis всем хромосомам присваивались псевдоцвета в соответствии с цветовой комбинации флуорохромов. Оценивалось от 2 до 20 метафаз, в среднем до 10 метафаз. Результаты анализа описывали согласно Международной цитогенетической номенклатуре ISCN, 2020.

### **2.3.5 Многоцветный анализ хромосомных сегментов (mBAND)**

При выполнении mBAND для маркировки зондов используются 5 флуорохромов, аналогичные для mFISH. За счет гибридизации к разным участкам одной пары хромосом и перекрытия флуорохромов создается множество уникальных комбинаций, что отражается в окрашивании сегментов разными псевдоцветами при программной обработке изображений. На рисунке 6 представлено схематичное расположение флуорохромов на хромосомах 11, 12, 13, анализируемых с помощью mBAND в данном исследовании. Протокол постановки mBAND соответствовал протоколу, описанному ранее для mFISH. Приготовление хромосомных

препаратов осуществлялось аналогично, как для выполнения СЦИ и mFISH. Для постановки реакции использовались ДНК-зонды mBand XCyte (MetaSystems, Германия) к хромосомам 11, 12, 13. Для визуализации и анализа результатов использовалось программное обеспечение Isis (MetaSystems, Германия). По возможности оценивались 20 метафаз, при ограниченном количестве митозов в выделенной области оценивались от 2 до 10 метафаз. Результаты анализа описывали согласно Международной цитогеномной номенклатуре ISCN, 2020.

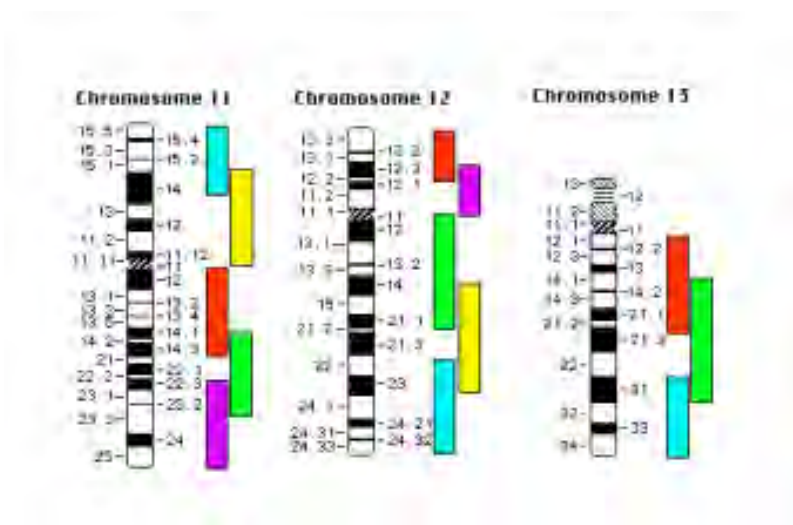


Рисунок 6. Схематичное расположение флуорохромов на хромосомах 11, 12, 13, анализируемых с помощью mBAND.

### 2.3.6. Сравнительная геномная гибридизация (aCGH)

В проведенном исследовании 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 компании 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.

## **2.6 Статистическая обработка данных**

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  $\chi^2$  (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  $R^2$ . 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  $p < 0,05$ .

### **Глава 3 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 случае 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.

Таким образом, выполнен сравнительный анализ результатов СЦИ:

- параллельного культивирования с DSP30+IL2 клеток крови (костного мозга) и мононуклеаров
- параллельного культивирования с LPS+TPA клеток крови (костного мозга) и мононуклеаров
- параллельного культивирования с DSP30+IL2 и с LPS+TPA клеток крови и костного мозга

#### **3.1. Культивирование клеток периферической крови/костного мозга и мононуклеарных клеток с DSP30+IL2 и LPS+TPA**

В 26 случаях было проведено параллельное исследование каждого образца методом СЦИ с использованием DSP30+IL2.

В 21 случае было проведено параллельное исследование каждого образца методом СЦИ с использованием LPS+TPA.



### 3.1.1. Параллельное культивирование с DSP30+IL2

При культивировании с DSP30+IL2 клеток периферической крови и костного мозга митозы получены у 21 из 26 (80,0%), при культивировании мононуклеарных клеток – у 14 из 26 (53,8%) больных.

При культивировании DSP30+IL2 периферической крови/костного мозга и мононуклеаров крови среднее значение % митозов с абберациями составило 67,3% и 61,0%, среднее значение количества аббераций - 2,9% и 2,8%, соответственно (Таблица 6).

Таблица 6. Результаты парного сравнения результатов культивирования с DSP30+IL2 клеток периферической крови/костного мозга и мононуклеарных клеток у больных ХЛЛ.

Биоматериал	количество митозов, среднее $\pm$ SE*	p	% митозов с абберациями, среднее $\pm$ SE*	p	количество аббераций, среднее $\pm$ SE*	p
кровь (N=23)	13,6 $\pm$ 1,8	<b>0,03</b>	67,3 $\pm$ 7,7	0,38	2,9 $\pm$ 0,6	0,25
к/м (N=3)						
мононуклеары (N=26)	8,2 $\pm$ 1,7		61,0 $\pm$ 11,0		2,8 $\pm$ 1,0	

\*SE (standard error) – стандартная ошибка среднего

При сравнении результатов культивирования с DSP30+IL2 клеток крови/костного мозга и мононуклеаров выявлены достоверные различия в митотической активности (наличии делящихся клеток): среднее значение количества митозов при культивировании клеток крови/костного мозга и мононуклеарных клеток составило 13,6 и 8,2, соответственно ( $p = 0,035$ ). Средние значения процентного соотношения митозов с абберациями и

количества aberrаций достоверно не различались. Данные сравнительного анализа результатов культивирования приведены в таблице 6.

Несмотря на то, что по результатам культивирования с DSP30+IL2 биоматериала разного клеточного состава (кровь/костный мозг и мононуклеарные клетки) не выявлено достоверных различий в процентном соотношении митозов с aberrациями ( $p=0,382$ ), в дальнейшем фракция мононуклеарных клеток не использовалась при СЦИ. Согласно Европейским рекомендациям по цитогеномному анализу гематологических новообразований при выявлении клональных aberrаций должно быть проанализировано не менее 10 митозов [144]. При культивировании мононуклеарных клеток среднее значение составило 8,2.

### 3.1.2. Параллельное культивирование с LPS+TPA

При культивировании с LPS+TPA клеток периферической крови митозы получены у 17 из 21 (81,0%), при культивировании мононуклеарных клеток – у 9 из 21 (42,9%) больных.

При культивировании LPS+TPA периферической крови/костного мозга и мононуклеаров среднее значение % митозов с aberrациями составило 27,1% и 5,6%, среднее значение количества aberrаций 1,3% и 1,7%, соответственно (Таблица 7).

Таблица 7. Результаты парного сравнения результатов культивирования с LPS+TPA клеток периферической крови/костного мозга и мононуклеарных клеток у больных ХЛЛ.

Биоматериал	количество митозов, среднее $\pm$ SE*	p	% митозов с aberrациями, среднее $\pm$ SE*	p	количество aberrаций, среднее $\pm$ SE*	p

кровь (N=19)	12,3 ± 1,9	0,126	27,1 ± 9,1	0,13	1,3 ± 0,6	0,35
к/м (N=2)					2	
мононуклеары (N=21)	8,0 ± 2,1		5,6 ± 2,9		1,7 ± 1,0	

\*SE (standard error) – стандартная ошибка среднего

При сравнении результатов СЦИ с LPS+TPA при культивировании крови и мононуклеаров достоверные различия в митотической активности (наличии делящихся клеток), в процентном соотношении митозов с абберациями и количестве аббераций не выявлены. Отмечено, что при культивировании мононуклеарных клеток снижено общее количество митозов и % митозов с абберациями. Данные сравнительного анализа результатов культивирования приведены в таблице 7.

Таким образом, выявлены достоверные различия результатов культивирования с DSP30+IL2 с использованием в качестве субстрата биоматериала разного клеточного состава (кровь/костный мозг и мононуклеарные клетки). В дальнейшем мононуклеарные клетки для СЦИ не использовались в виду того, что при культивировании данного биоматериала достоверно снижено количество делящихся клеток по сравнению с достаточным количеством митозов при культивировании периферической крови или костного мозга ( $p = 0,035$ ).

### 3.2 Сравнение результатов культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA

В 76 случаях было выполнено параллельное исследование каждого образца методом СЦИ с использованием DSP30+IL2 и LPS+TPA. Проведен сравнительный анализ результатов СЦИ с DSP30+IL2 и с LPS+TPA у 76 больных (Таблица 8).

Методом СЦИ с DSP30+IL2 митозы получены у 62 из 76 (81,6%) больных. Аберрантный кариотип выявлен в 51 из 62 (82,3%) случаев. Среднее значение % митозов с аберрациями составило  $59,3 \pm 4,9\%$  и среднее значение количества аберраций  $2,9 \pm 0,4$ , соответственно (Таблица 8).

Хромосомные нарушения были выявлены в 51 из 62 (81,7%): одна аберрация определена в 17 (27,4%), две аберрации - в 8 (12,9%) и комплексные нарушения кариотипа (3 и более нарушений) - в 26 (41,9%) случаях. Частота характерных хромосомных нарушений с вовлечением 11q22 составила 30,6% (19/62), 13q14 - 16,1% (10/62), 17p13 - 21,0% (13/62), трисомии 12/частичной трисомии 12q - 12,9 (8/62) случаев (Таблица 9).

Таблица 8. 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
Аберрантный кариотип, %	<b>82,3 (51/62)</b>	<b>44,6 (29/65)</b>	<b>&lt;0,000</b> <b>1</b>
% митозов с аберрациями, среднее значение $\pm$ SE*	<b>59,3 <math>\pm</math> 4,9</b>	<b>23,0 <math>\pm</math> 4,0</b>	<b>&lt;0,000</b> <b>1</b>
количество аберраций, среднее значение $\pm$ SE*	<b>2,9 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>1,5 <math>\pm</math> 0,4</b>	<b>&lt;0,000</b> <b>1</b>

\* SE (standard error) – стандартная ошибка среднего значения

Методом СЦИ с LPS+TPA митозы получены у 65 из 76 (85,5%) больных. Аберрантный кариотип выявлен в 29 из 65 (44,6%) случаев. Среднее значение % митозов с аберрациями составило  $23,0 \pm 4,0\%$  и среднее значение количества аберраций  $1,5 \pm 0,4$ , соответственно (Таблица 8).

Хромосомные нарушения были выявлены в 29 из 65 (44,6%): одна аберрация обнаружена в 12 (18,5%), две аберрации - в 5 (7,6%) и комплексные

нарушения кариотипа - в 12 (18,5%) случаях. Частота характерных хромосомных нарушений с вовлечением 11q22 составила 16,9% (11/65), 13q14 - 4,6% (3/65), 17p13 - 13,8% (9/65), трисомии 12/частичной трисомии 12q - 6,2% (4/65) случаев (Таблица 9).

Таблица 9. Частота детекции хромосомных нарушений, выявленных 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	<b>16,1 (10)</b>	<b>4,6 (3)</b>	<b>0,041</b>
17p13	21,0 (13)	13,8 (9)	0,289
комплексный кариотип $\geq 3$ aberrаций	<b>41,9 (26)</b>	<b>18,5 (12)</b>	<b>0,0004</b>

Сравнительный анализ результатов культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA показал достоверные различия в выявлении aberrантного кариотипа, в том числе в процентном соотношении митозов с aberrациями и количестве aberrаций ( $p < 0,0001$ ). В таблице 8 приведены результаты культивирования опухолевых клеток с DSP30+IL2 и LPS+TPA у больных ХЛЛ.

Выявление характерных для ХЛЛ хромосомных нарушений методом СЦИ 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% ( $p = 0,289$ ). В культурах с DSP30+IL2 и с LPS+TPA получены достоверно значимые

различия по частоте выявления делеции 13q14 – 16,1% и 4,6% ( $p = 0,041$ ) и комплексных нарушений кариотипа с  $\geq 3$  абберациями – 40,0% и 18,5%, соответственно ( $p = 0,004$ ).

Для наглядного представления выявления абберантного кариотипа от способа культивирования были построены графики зависимости процентного соотношения метафаз с абберациями и количества аббераций, выявленных в двух видах культур DSP30+IL2 и LPS+TPA. При анализе графического изображения зависимости процентного соотношения метафаз с абберациями от способа культивирования выявлено увеличение процентного соотношения митозов с хромосомными аномалиями в культуре с DSP30+IL2 (на графике область под условной прямой линией). На рисунке 7 представлен график зависимости процентного соотношения метафаз с абберациями от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA.

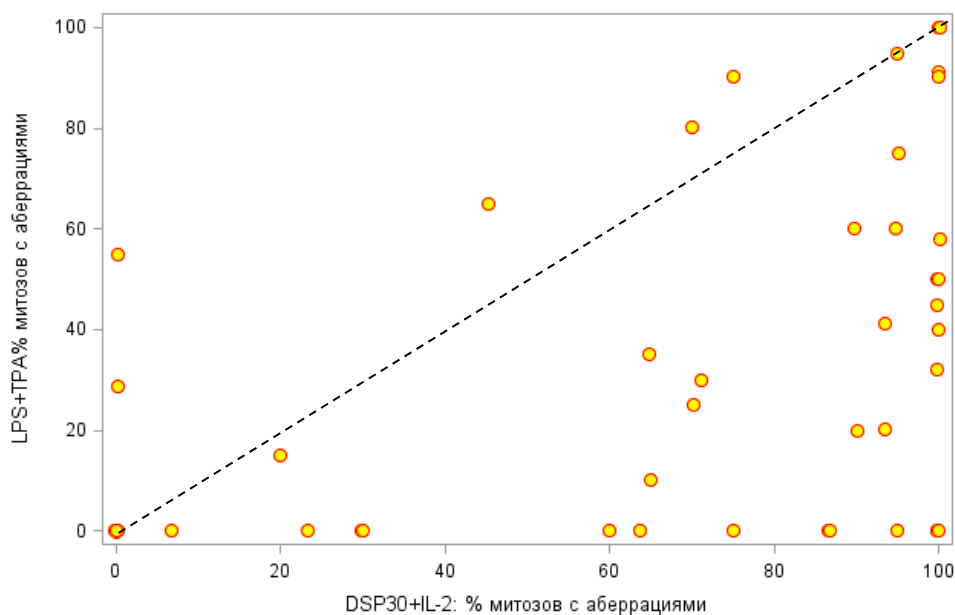


Рисунок 7. График зависимости доли метафаз с абберациями от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA.

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 aberrаций (Рисунок 8). При анализе графика были выделены три области, при которых:

- 1) значения по оси абсцисс (количество aberrаций в культуре DSP30+IL2) и ординат (количество aberrаций в культуре LPS+TPA) были равными «-3», что соответствовало отсутствию выявленных aberrаций 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  $\geq 0$ , 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.

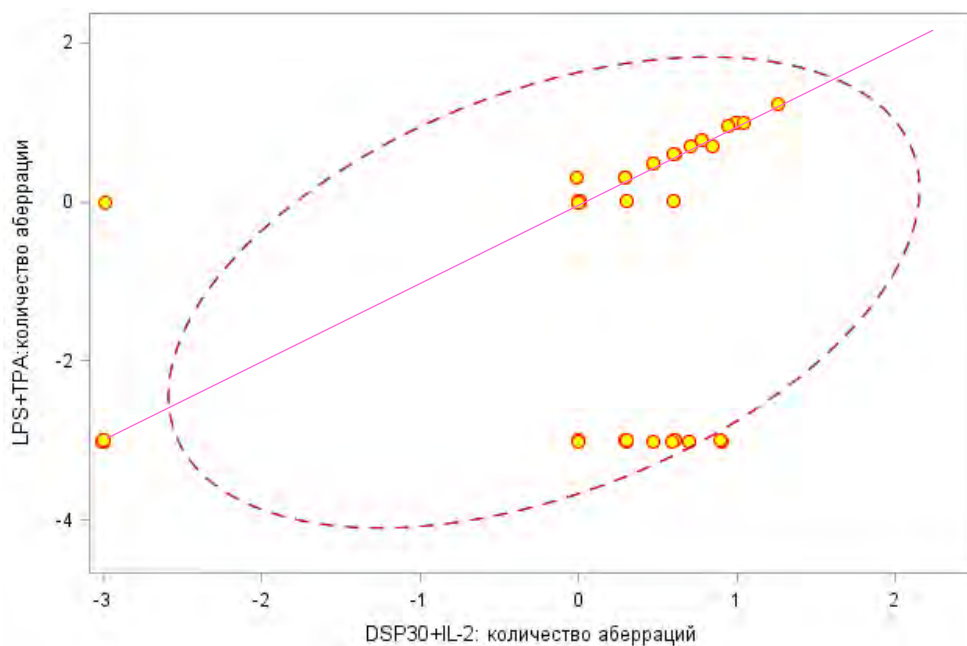


Рисунок 8. График зависимости количества детектируемых aberrаций от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA.

Для исследования области, в которых значения количества хромосомных aberrаций определялись по одной прямой - случаи выявления хромосомных нарушений в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA, был проведен регрессионный анализ. Результаты регрессионного анализа показали выявление равного количества хромосомных aberrаций в случаях обнаружения aberrантного кариотипа одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA (коэффициент детерминации,  $R^2 = 0,68$ ,  $p < 0,0001$ ). На рисунке 9 представлен график линейной зависимости количества хромосомных aberrаций от способа культивирования.



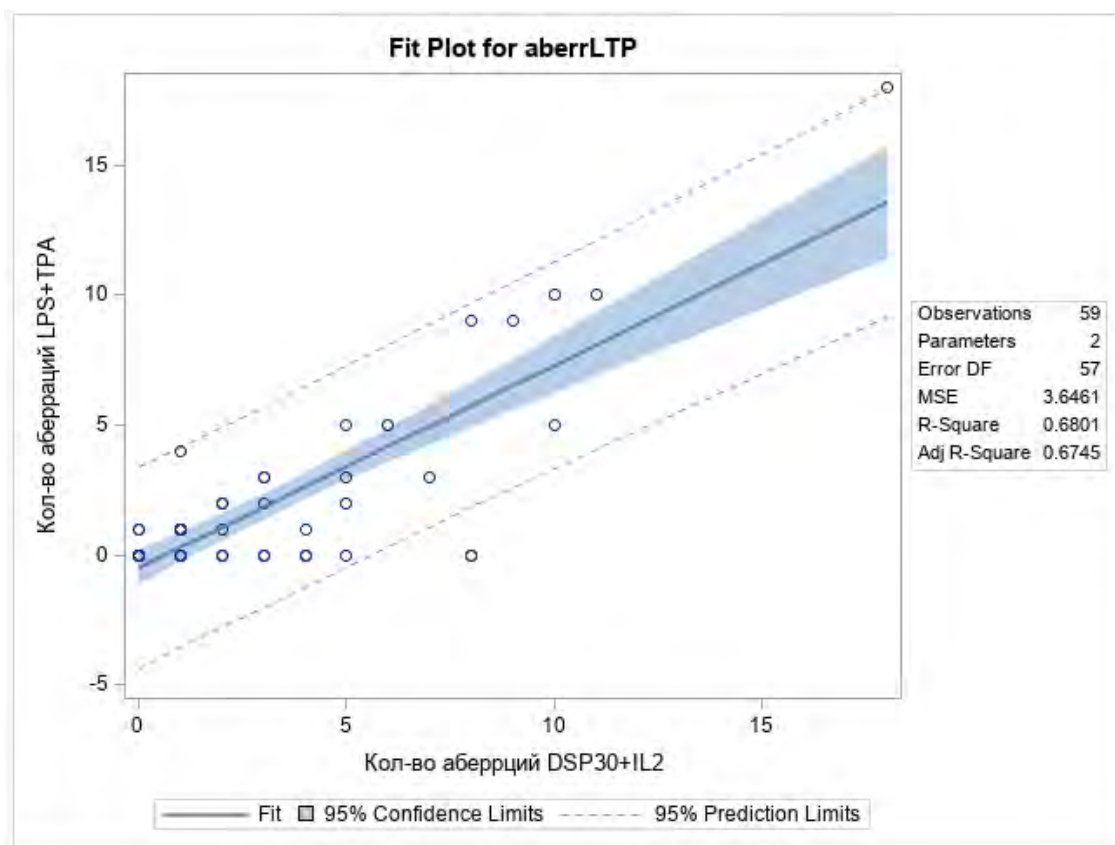


Рисунок 9. График линейной зависимости выявления количества хромосомных aberrаций методом СЦИ от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA.

В области значений по оси ординат равных «-3» и по оси абсцисс  $\geq 0$ , выделена группа, включающая 18 случаев детекции хромосомных нарушений, выявленных только при культивировании с DSP30+IL2. Кроме того, у 5 больных с выявленными хромосомными нарушениями в культуре с DSP30+IL2 отсутствовали митозы в культуре LPS+TPA.

Таким образом, эффективность СЦИ у больных ХЛЛ достоверно выше при культивировании с DSP30 и IL2, чем со стандартными В-клеточными митогенами LPS и TPA: aberrантный кариотип выявлен у 51 из 62 (82,3%) и 29 из 65 (44,6%) больных, соответственно ( $p < 0,0001$ ). Определена дополнительная группа с хромосомными нарушениями, выявленными только при культивировании с DSP30+IL2 – 23 случая. В случаях одновременного выявления хромосомных нарушений в двух культурах с DSP30+IL2 и

LPS+TPA выявлены достоверные различия в процентном соотношении митозов с абберациями -  $59,3 \pm 4,9\%$  и  $23,0 \pm 4,0\%$ , и количестве аббераций –  $2,9\% \pm 0,4$  и  $1,5 \pm 0,4$ , соответственно ( $p < 0,0001$ ).

### **3.2.1 Группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2**

При анализе зависимости количества детектируемых аббераций от способа культивирования с DSP30+IL2 и LPS+TPA была выделена группа, включающая 23 пациента, у которых хромосомные нарушения были выявлены только при культивировании с DSP30+IL2, тогда как с LPS+TPA был выявлен нормальный кариотип либо отсутствовали митозы (Рисунок 8). У 8 из 18 (44,4%) больных в культуре с LPS+TPA хромосомные абберации были выявлены только в одной из 20 метафаз (неклональные нарушения), при этом в культуре с DSP30+IL2 они обнаружены в среднем в 59,2% метафаз. У 5 больных в культуре LPS+TPA отсутствовали митозы.

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 – 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.

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 абберантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA (группа 3). Группа 2 составила 10 больных, группа 3 – 28 больных.

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 10). 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.

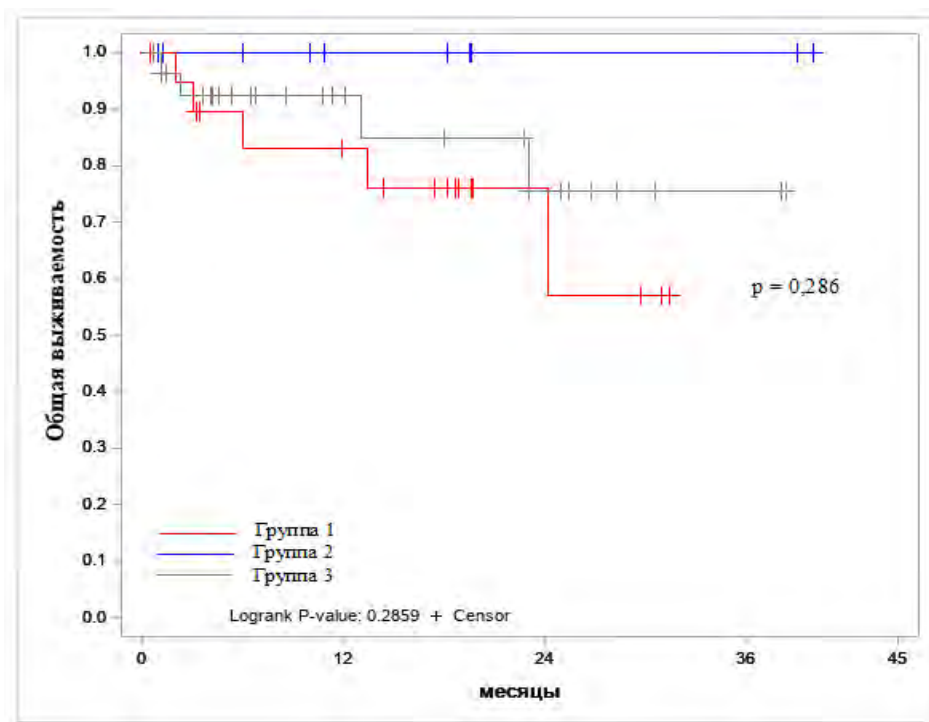


Рисунок 10. ОВ в трех группах больных ХЛЛ.

Группа 1 – группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2; группа 2 – группа больных с нормальным кариотипом; группа 3 – группа больных с абберантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA.

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.

Анализ взаимосвязи трех групп со стадией по Vinet показал, что в группе 2 преобладали стадия А - 4 из 10 (40%) и стадия В - 4 из 10 (40%); в группе 3 преобладала стадия В – 22 из 29 (75,9%) и в меньшем количестве присутствовали больные со стадией А – 4 из 29 (13,8%) и стадией С – 3 из 29 (10,3%); в группе 1 в наибольшем количестве присутствовали больные со стадией В – 11 из 23 (47,8%) и равном количестве со стадией А – 6 из 23 (26,1%) и стадией С - 6 из 23 (26,1%) ( $p = 0,150$ ) (Рисунок 11).

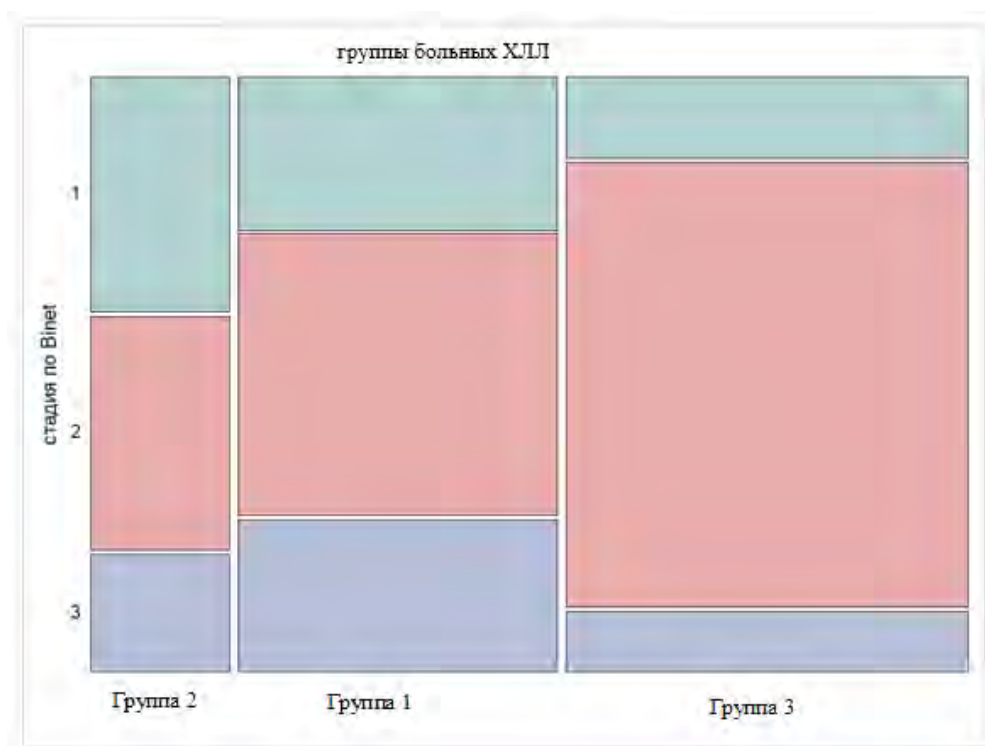


Рисунок 11. Взаимосвязь трех групп больных ХЛЛ со стадией заболевания по Vinet.

Группа 1 – группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2; группа 2 – группа больных с нормальным кариотипом; группа 3 – группа больных с aberrантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA. 1 – стадия А, 2 – стадия В, 3 – стадия С по Vinet.

В группе 2 в равном соотношении присутствовали два варианта с мутациями генов *IGHV* – 4 из 8 (50,0%) и без мутаций генов *IGHV* – 4 из 8 (50,0%), в группе 3 преобладал вариант без мутаций генов *IGHV* – 19 из 21

(90,5%), в группе 1 так же преобладал вариант без мутаций генов *IGHV* – 11 из 15 (73,3%) ( $p = 0,061$ ) (Рисунок 12).

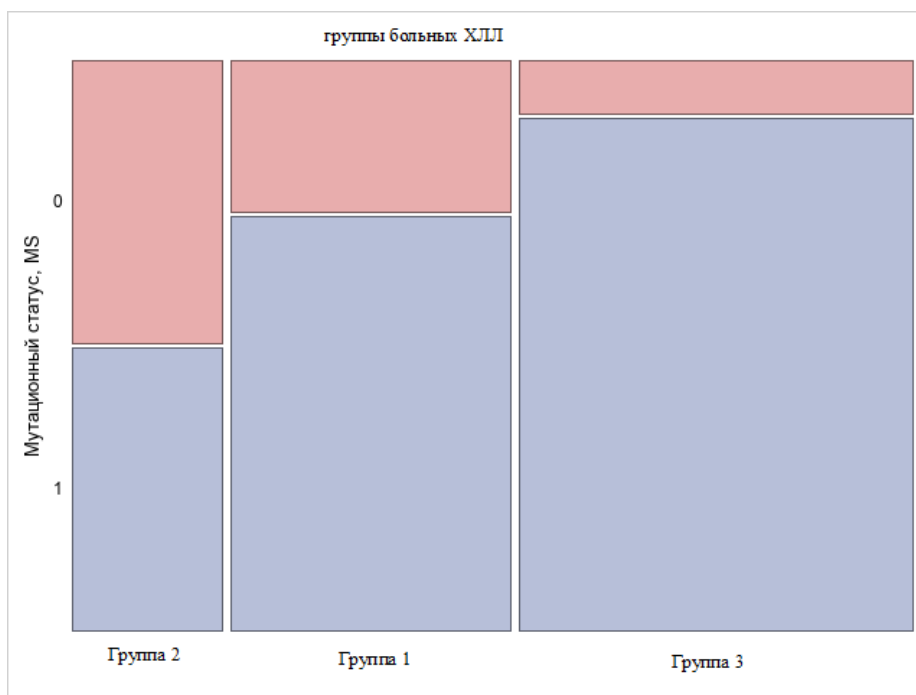


Рисунок 12. Взаимосвязь трех групп больных ХЛЛ с мутационным статусом генов *IGHV*.

Группа 1 – группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2; группа 2 – группа больных с нормальным кариотипом; группа 3 – группа больных с aberrантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA. 0 – вариант с мутациями генов *IGHV*, 1 – вариант без мутаций генов *IGHV*.

На момент исследования в группе 2 преобладали пациенты, обследованные до лечения – 9 из 10 (90%), в группе 3 было увеличено количество больных в прогрессии и рецидиве заболевания – у 16 из 28 (57,1%), в группе 1 больные, обследованные до лечения, составили 13 из 23 (56,5%) и в прогрессии/рецидиве заболевания – у 10 из 23 (43,5%) ( $p = 0,384$ ) (Рисунок 13).

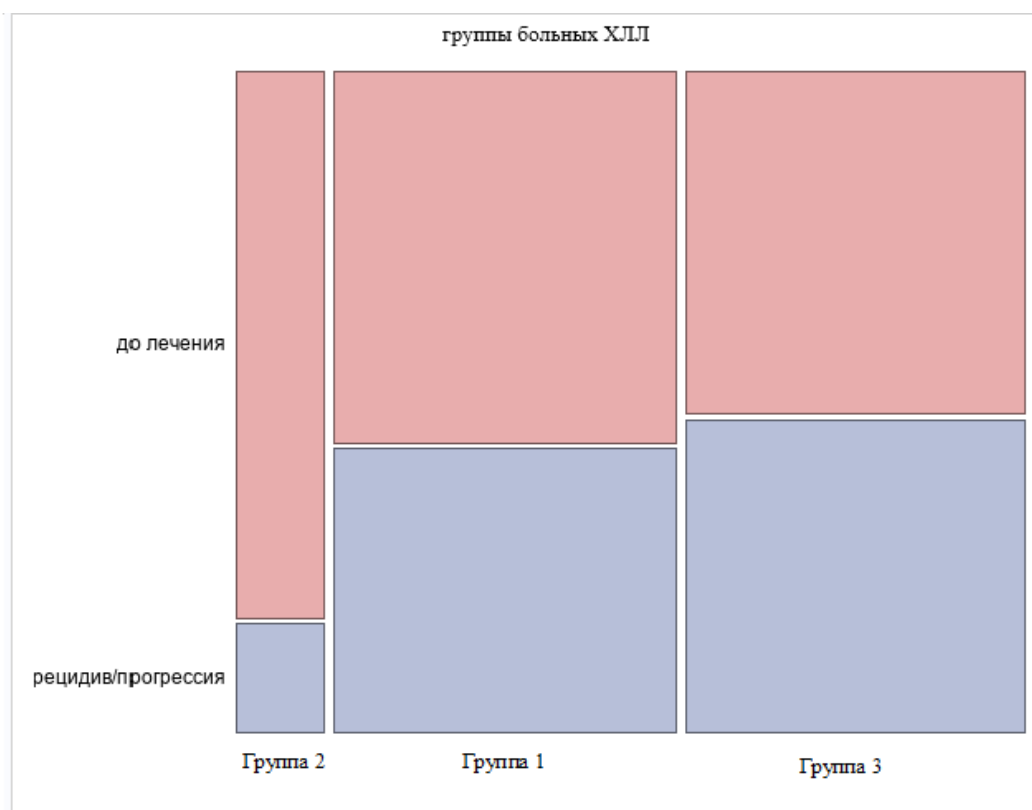


Рисунок 13. Взаимосвязь трех групп больных ХЛЛ со статусом заболевания на момент исследования.

Группа 1 – группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре DSP30+IL2; группа 2 – группа больных с нормальным кариотипом; группа 3 – группа больных с aberrантным кариотипом, определяемым одновременно в двух культурах DSP30+IL2 и LPS+TPA.

Таким образом, группа с дополнительными хромосомными нарушениями, выявленными только в культуре в DSP30+IL2, по клинико-биологическим характеристикам (стадии по Vinet, мутационный статус генов *IGHV*, статус заболевания на момент исследования) занимает промежуточное положение между группой с нормальным кариотипом и aberrантным кариотипом и имеет наибольшее сходство с группой aberrантного кариотипа. 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. На сроке наблюдения 32 месяца ОВ больных с нормальным кариотипом составила 100%, с абберантным кариотипом – 85,7%, в группе дополнительных хромосомных нарушений - 76,1%, медианы ОВ не достигнуты. В трех группах пациентов не выявлено достоверно значимых различий ОВ ( $p = 0,286$ ), однако определяется тенденция к снижению показателей ОВ в группе с абберантным кариотипом и самым низким показателем в группе с дополнительно выявленными хромосомными абберациями.

## Глава 4. Анализ спектра и частоты встречаемости хромсомных 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 в прогрессии на фоне лечения. Кариотип оценивался по результатам СЦИ с использованием при культивировании DSP30+IL2 биоматериала разного клеточного состава (периферической крови, костного мозга и биоптата лимфоузла и мононуклеаров крови).

### 4.1 Результаты СЦИ у больных ХЛЛ до начала терапии

В группе больных до начала терапии при кариотипировании нормальный кариотип выявлен у 10 из 39 (25,6%), aberrантный кариотип - у 29 из 39 (74,4%), из них одна aberrация определена в 11 из 29 (28,2%), две aberrации - в 6 (15,4%) и комплексные нарушения кариотипа - в 12 (30,8%) случаях (Рисунок 14).

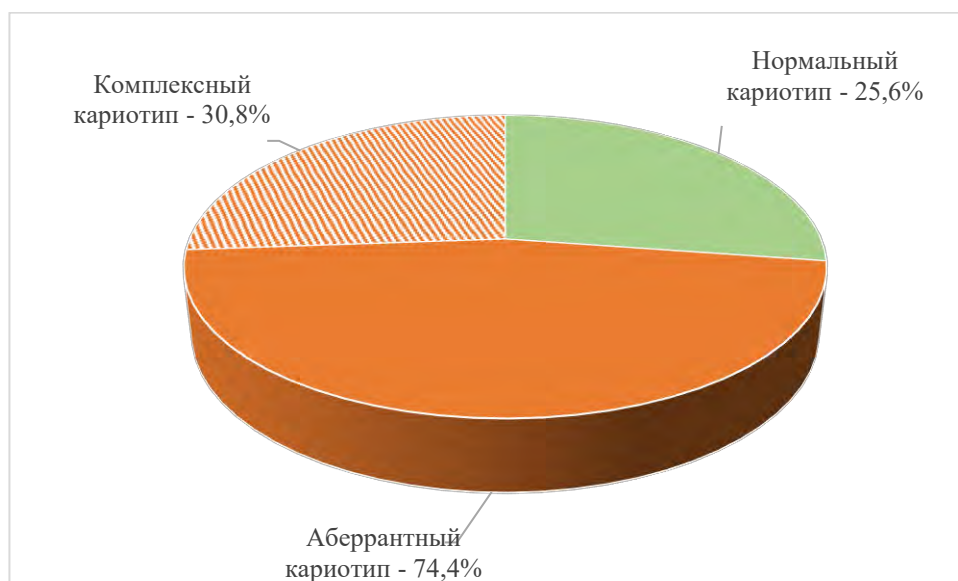




Рисунок 14. Результаты СЦИ в группе больных, обследованных до начала лечения

При СЦИ в данной группе частота хромосомных нарушений с вовлечением локуса 11q22 составила 30,8% (12/39), трисомии 12q – 15,4% (6/39), локуса 13q14 – 17,9% (7/39), короткого плеча хромосомы 17 – 10,3% (4/39) (Таблица 10).

По данным FISH-исследования частота делеции локуса 11q22 составила 33,3% (13/39), локуса 13q14 – 25,6% (10/39), локуса 17p13 – 10,3% (5/39) и трисомии 12q – 12,8% (5/39). У одного больного (2,6%) одновременно выявлены делеция 11q22, трисомия 12 и делеция 13q14.

Комплексные нарушения кариотипа были выявлены у 12 (32,5%), из них 5 и более aberrаций – 6 (15,0%) больных. Хромосомные нарушения с вовлечением 17p13 в составе комплексного кариотипа были выявлены у 3 из 12 (25,0%) больных. У 7 из 9 (77,8%) больных с комплексным кариотипом без делеции 17p13 при FISH-исследовании определена делеция 11q22. В составе комплексного кариотипа выявлены следующие хромосомные нарушения: сбалансированные транслокации, в том числе с вовлечением генов *IGH* - t(2;14)(p14-15;q32), несбалансированные транслокации с участием 1q44, 2q27, 3q27, 4q35, 7q22, 8p23, 8q24, 11p14, 15p13, 15q26, 16q24, 22p13 и 22q13, делеции 1q31 и 3p13, 4q23, 8q22, 14q21, моносомии по хромосомам 4, 8, 10, 12, 18 и маркерные хромосомы.

Сбалансированные транслокации и несбалансированные перестройки, определенные в кариотипе как изолированно, так и в сочетании с одним или несколькими хромосомными aberrациями, были выявлены у 6 из 39 (15,4%) и у 10 (25,6%) больных, соответственно.

Таблица 10. Результаты СЦИ и FISH в группе больных, обследованных до начала лечения.

Хромосомные нарушения с вовлечением	СЦИ, % (количество) случаев, N=39	FISH, % (количество) случаев, N=39
11q22	30,8 (12)	33,3 (13)
12q	15,4 (6)	12,8 (5)
13q14	17,9 (7)	25,6 (10)
17p13	10,3 (4)	10,3 (4)
КОМПЛЕКСНЫЙ кариотип ( $\geq 3$ аберраций)	30,8 (12)	2,6 (1)
сбалансированные транслокации	15,4 (6)	-
несбалансированные перестройки	25,6 (10)	-

У 10 больных с отсутствием митозов по результатам культивирования были выявлены хромосомные аберрации методом FISH: делеция 11q22 - в одном случае и делеция 13q14 - в 7 случаях, из них биаллельная делеция 13q14 - в одном случае.

#### 4.2 Результаты СЦИ у больных ХЛЛ с резистентным и рецидивирующим течением

В группе больных с резистентным и рецидивирующим течением нормальный кариотип выявлен у 2 из 38 (5,3%), хромосомные нарушения определены у 36 из 38 (94,7%) больных, из них одна аберрация обнаружена в 10 из 38 (24,3%), две аберрации - в 5 (13,2%) и комплексные нарушения кариотипа - в 21 (55,3%) случаях (Рисунок 15).

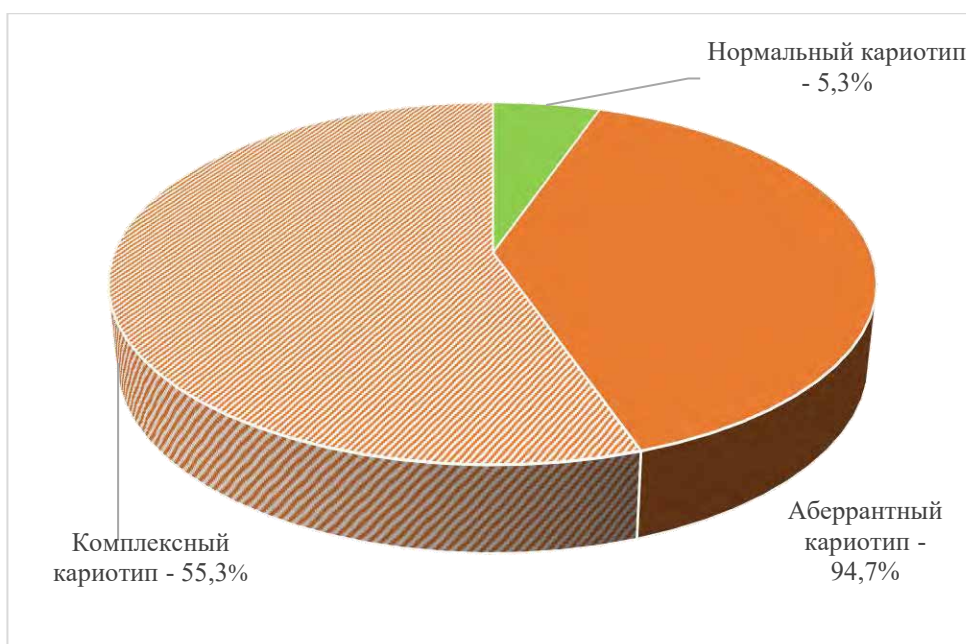


Рисунок 15. Результаты СЦИ в группе больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ

Методом СЦИ в данной группе частота хромосомных нарушений с вовлечением локуса 11q22 составила 31,6% (12/38), локуса 13q14 – 15,8% (6/38), короткого плеча хромосомы 17 – 31,6% (12/38), и трисомии 12q – 13,2% (5/38) случаев (Таблица 11).

По данным FISH-исследования частота делеции 11q22 составила 34,2% (13/38), 13q14 – 36,8% (14/38), 17p13 – 34,2% (12/38) и трисомии 12q – 13,2% (4/38). У 2 больных (5,3%) одновременно выявлены делеция 11q22, 13q14 и 17p13.

Комплексные нарушения кариотипа были определены у 21 из 38 (55,3%), из них 5 и более aberrаций выявлено у 11 из 21 (52,4%) больного. При кариотипировании хромосомные aberrации с вовлечением 17p в составе комплексного кариотипа были выявлены у 11 из 21 (52,4%) больных. У 7 из 10 (70,0%) больных с комплексным кариотипом без хромосомных нарушений 17p определена делеция 11q22 методом FISH. В составе комплексного кариотипа выявлены следующие хромосомные нарушения: сбалансированные транслокации в том числе транслокации с вовлечением

генов *IGH* -  $t(8;14)(q24;q32)$ ,  $t(14;19)(q32;q13)$ , несбалансированные транслокации с участием 1q44, 2q31 и 2q37, 3q27, 4p15-p16 и 4q35, 6p25, 6q27, 7p21-22, 9p11-p21, 12p13, 14q32, 15p13, 16p13 и 16q24, 19q13, 22q13, делеции 1q22, 1q23, 1q36, 1q42, 2p21, 3p13 и 3q13, 4q22-q23, 4q34, 6q13-q14 и 6q21-22, 9p21-p22, 14q22, 21q21, и моносомии по хромосомам Y, 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 17, 18, 21, 22.

Сбалансированные транслокации и несбалансированные перестройки, определенные в кариотипе как изолированно, так и в сочетании с одним или несколькими хромосомными aberrациями, были выявлены у 6 из 38 (15,8%) и 16 (42,1%) пациентов, соответственно.

У 5 больных при отсутствии хромосомных aberrаций при СЦИ выявлены хромосомные нарушения методом FISH: делеция 11q22 - у 3 больных, делеция 13q14 - у 3 и делеция 17p13 у одного.

Таблица 11. Результаты СЦИ и FISH в группе больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ

Хромосомные нарушения с вовлечением	СЦИ, % (количество) случаев, N=38	FISH, % (количество) случаев, N=38
11q22	31,6 (12)	35,1 (13)
12q	13,2 (5)	10,8 (6)
13q14	15,8 (6)	40,5 (15)
17p13	31,6 (12)	32,4 (12)
комплексный кариотип ( $\geq 3$ aberrаций)	55,3 (21)	5,4 (2)
сбалансированные транслокации	15,8 (6)	-

несбалансированные перестройки	42,1 (16)	-
-----------------------------------	-----------	---

### 4.3 Сравнительный анализ хромосомных нарушений у больных ХЛЛ до начала терапии и с резистентным и рецидивирующим течением

Сравнительный анализ результатов СЦИ, проведенный у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания, показал достоверные различия в частоте выявления аберрантного кариотипа, 74,4% (29/39) и 94,7% (36/38), соответственно ( $p = 0,025$ ) (Таблица 13).

Таблица 13. Результаты СЦИ у больных ХЛЛ до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания

Показатели	Частота выявления в группе больных до начала терапии, %, (количество) больных,	Частота выявления в группе больных в прогрессии/рецидиве заболевания, %, (количество) больных	p
Наличие митозов	79,6 (39/49)	88,4 (38/42)	0,265
Аберрантный кариотип	<b>74,4 (29/39)</b>	<b>94,7 (36/38)</b>	<b>0,025</b>

При сравнении частоты детекции хромосомных нарушений в характерных точках разрыва 11q22, 13q14, 17p13 и трисомии 12 выявлены достоверные различия только по частоте выявления 17p13 – 10,3% и 31,6% ( $p = 0,026$ ) (Таблица 14). Кроме того, в группах больных до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания были выявлены достоверные различия в

частоте выявления комплексного кариотипа – 30,8% и 55,3%, соответственно (p=0,039).

Таблица 14. 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	<b>10,3 (4)</b>	<b>31,6 (12)</b>	<b>0,026</b>
сбалансированные транслокации	15,4 (6)	14,3 (6)	1,000
несбалансированные перестройки	25,6 (10)	45,2 (16)	0,153
комплексный кариотип ( $\geq 3$ aberrаций)	<b>30,8 (12)</b>	<b>55,3 (21)</b>	<b>0,039</b>

На рисунке 16 представлена доля больных с комплексным кариотипом в сочетании с хромосомными нарушениями 17p и без них в группах до начала

терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания, что составило 3 (6,1%) и 10 (20,8%), 6 (12,3%) и 11 (22,9%), соответственно.

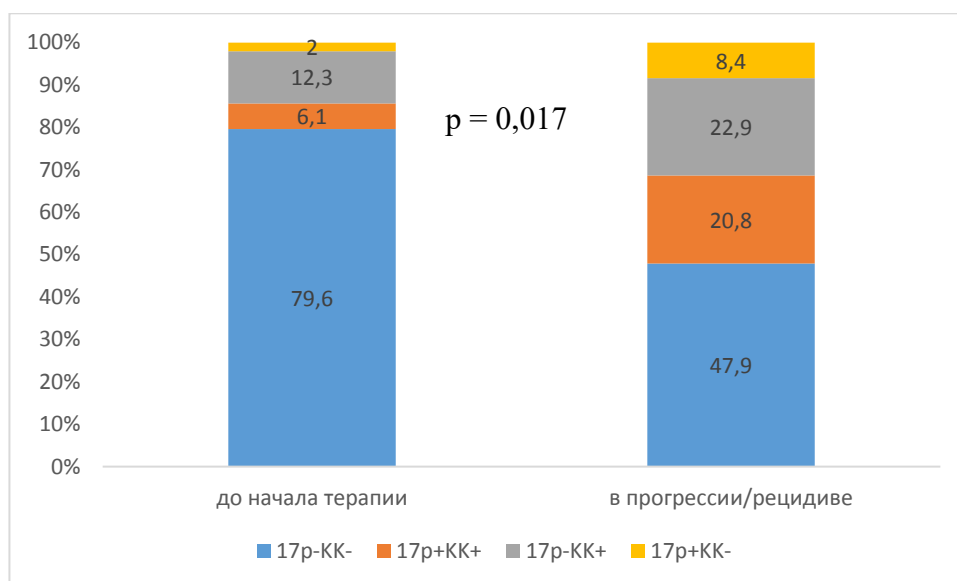


Рисунок 16. Частота встречаемости комплексного кариотипа и хромосомных aberrаций 17p в группах больных до начала терапии и прогрессии/рецидиве ХЛЛ.

KK- комплексный кариотип, 17p – хромосомные aberrации с вовлечением короткого плеча хромосомы 17

В двух группах больных ХЛЛ выявлены повторяющиеся хромосомные нарушения: несбалансированные перестройки с вовлечением локусов 16q24 и 22q13, делеции 4q22-q23 и 14q21-q22, моносомии по хромосомам 4, 8, 10 и 18. По частоте выявления сбалансированных транслокаций ( $p=1,000$ ) и несбалансированных перестроек ( $p=0,153$ ) две анализируемые группы достоверно не различались.

Таким образом, в группах больных до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания были выявлены достоверные различия в частоте выявления aberrантного кариотипа – 74,4% и 94,7% ( $p = 0,025$ ). В двух группах больных получены достоверно значимые различия частоты детекции хромосомных нарушений с вовлечением 17p13 - 10,3% и 31,6% ( $p = 0,026$ ) и комплексного кариотипа – 30,8% и 55,3%, соответственно ( $p=0,039$ ).

## Выполнение повторного цитогенетического исследования у больных ХЛЛ

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. (Таблица 12).

В прогрессии заболевания у больного с трисомией 12 выявлен дополнительный субклон с делецией 3p22. У одного больного с t(8;14)(q24;q32) и комплексными нарушениями кариотипа в прогрессии заболевания выявлен субклон с дополнительным хромосомным материалом на коротком плече хромосомы 9 и моносомией 17. Отмечено, что первоначально при кариотипировании моносомия 17 была обнаружена в одном митозе (неклональные изменения кариотипа).

У пациента с делецией 11q22 и комплексными нарушениями кариотипа при повторном СЦИ в прогрессировании заболевания выявлен субклон с дополнительным материалом на длинном плече хромосомы 6 и моносомией 8. Результаты СЦИ, выполненного больным до начала терапии и в прогрессии заболевания, представлены в таблице 12. Дополнительные хромосомные aberrации, выявленные в прогрессии заболевания, мы обозначили, как вторичные хромосомные aberrации.

Таблица 12. Результаты СЦИ, выполненного больным ХЛЛ до терапии и в прогрессии ХЛЛ

N	Результаты СЦИ до начала терапии	Результаты повторного СЦИ в прогрессии заболевания
1	47,XY,+12[25]/45,XY,-3[1]	47,XY,+12[14]/ 47,XY,del(3)(p22),+12[3]/ 47,XY,der(1),der(3),+12[1]/46,XY[2 ]



2	46,XY,t(8;14)(q24;q32),der(14)[16]/ 46,XY,t(8;14)(q24;q32),?del(11) (q22- 23),add(14)(q32)[4]/46,XY,t(2;10)(q 10;q26),t(8;14)(q24;q32),add(14)(q3 2)[1]/ 46,XY,3,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q2 2-23),-17,add(17)(q24)[1]	46,XY,t(8;14)(q24;q32),add(14)(q32 )[3]/46,idem,del(11)[1]/45,idem, <b>add (9)(p?11),-17[14]/</b> 45~48,idem,+8[1],add(9)(p?11)[2],+ 15[1],-17,i(17)(q10)[1],+19[1][cp2]
3	45,XY,add(3)(q27),- 4,del(11)(q22)[4]/45,XY,del(1)(q31), add(3)(q27),del(3)(?p13),-4,?- 10,del(11)(q22),+mar[cp2]/45,XY,ad d(1)(q44),add(3)(q27),del(3)(?p13),- 4,del(11)(q22)[8]/47,XY[6]	42~46,XY,add(1)(q44),add(3)(q27), <b>der(3),add(6)(q?27),-8,-</b> 10,del(11)(q22),+3mar,inc[cp14]/46, XY[13]

Таким образом, у 3 больных в прогрессии ХЛЛ были выявлены дополнительные хромосомные аномалии, которые можно отнести к вторичным хромосомным aberrациям – моносомии по хромосомам 8 и 17, делеция короткого плеча хромосомы 3, несбалансированные перестройки с вовлечением локусов 6q27, 9p11, возникшим в результате клональной эволюции заболевания.

## **Глава 5 Сопоставление результатов СЦИ с использованием DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследования**

Проанализированы результаты 92 случаев СЦИ с использованием при культивировании DSP30+IL2 и FISH-исследования. Оценивались результаты СЦИ с использованием DSP30+IL2 при культивировании биоматериала разного клеточного состава (кровь, костный мозг, биоптат лимфатического узла, мононуклеары). При культивировании с DSP30 в сочетании с IL2 митозы получены в 77 из 92 (83,7%) случаях. Хромосомные aberrации выявлены у 65 из 77 (84,4%) больных.

FISH-исследование было выполнено с ДНК-зондами к локусам 11q22/*ATM*, 13q14, 17p13/*TP53* и трисомии 12. Хромосомные нарушения при FISH-исследовании были определены у 75 из 92 (81,5%), из них 1 aberrация выявлена у 57 из 75 (76,0%), 2 aberrации - у 14 (18,7%), 3 aberrации - у 3 (4,0%) больных. Среди наиболее часто встречающихся хромосомных нарушений были выявлены делеция 13q14 (40,2%) и делеция 11q22 (32,6%), сочетания делеций 11q22 и 13q14 в 11 (14,1%), сочетания делеций 13q14 и 17p13 – в 3 (3,3%), сочетания делеций 11q22, 13q14 и 17p13 (комплексные нарушения кариотипа) - в 2 (2,2%). Всего 3 aberrации выявлено у 3 (3,3%) больных.

### **5.1. Хромосомные нарушения с вовлечением локуса 11q22**

При кариотипировании хромосомные аномалии с вовлечением 11q22 определены в 24 из 77 (31,2%) случаях. Делеция 11q22 выявлена у 22 из 24 (91,7%), из них изолированно у 6 (25,0%) и в составе комплексного кариотипа у 14 (58,3%) больных (Рисунок 17).

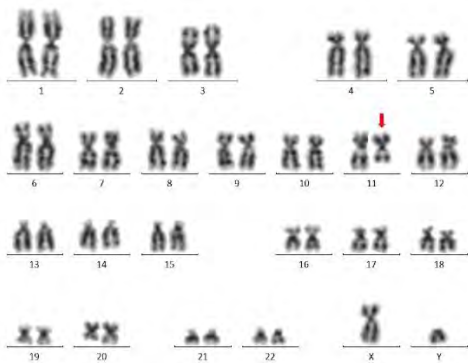


Рисунок 17. Кариограмма больного ХЛЛ с делецией длинного плеча хромосомы 11.

Кариотип: 46,XY,del(11)(q22).

У 2 из 24 больных (8,3%) в кариотипе определены несбалансированные транслокации с вовлечением 11q22 (Рисунок 18).

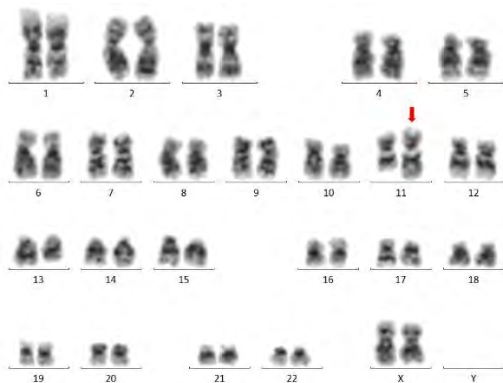


Рисунок 18. Кариограмма больной ХЛЛ со сбалансированной транслокацией с вовлечением длинного плеча хромосомы 11.

Кариотип: 46,XX,9qh+,add(11)(q22),del(13)(q12q14).

Методом FISH делеция 11q22/*ATM* была выявлена у 30 из 92 (32,6%), как единственное хромосомное нарушение - у 18 из 30 (60,0%) больных (Рисунок 19). У одного пациента определена амплификация локуса гена *ATM/11q22*.

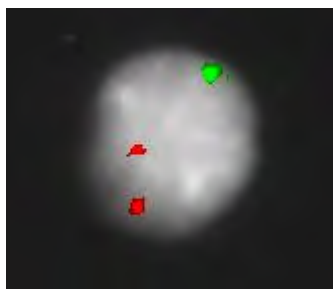


Рисунок 19. Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом LSI p53/LSI *ATM* (Abbott “Vysis”, США).

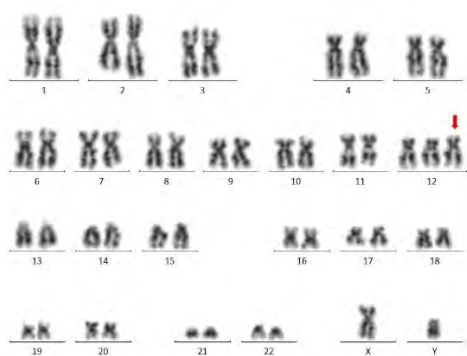
Делеция локуса гена 11q22/*ATM*: отсутствует один зеленый сигнал от локуса 11q22, два красных сигнала от локуса 17p13/*TP53*.

Хромосомные нарушения с вовлечением 11q22 и делеция 11q22 одновременно при СЦИ и FISH выявлены у 24 из 77 (31,2%) больных, у 2 (2,6%) из них в кариотипе были определены несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 11q22, у 6 из 92 (6,5%) выявлена только методом FISH. В данных 6 случаях в культуре с DSP30+IL2 отсутствовали митозы у 4 больных, выявлен нормальный кариотип у одного и комплексный кариотип у одного больного (Рисунок 28).

## 5.2 Трисомия 12q

При культивировании трисомия 12q была выявлена у 11 из 77 (14,3%) больных. Изолированная трисомия 12 была выявлена в 4 из 11 (36,4%) случаях, с одним хромосомным нарушением - в 2 (18,2%), в одном из них обнаружен дериват хромосомы 16 - *der(16)(16pter→16q23::12q13→12qter)* - случай частичной трисомии 12q (Рисунок 20).

А)



Б)

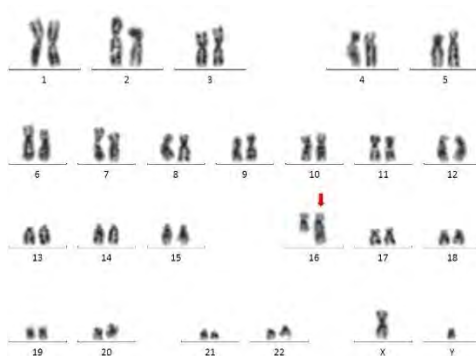


Рисунок 20. Кариограммы больных ХЛЛ с трисомией 12 и частичной трисомией 12.

А) Кариотип: 46,XY,+12

Б) Кариотип: 46,XY,der(16)(16pter→16q23::12q13→12qter).

В составе комплексного кариотипа трисомия 12 встречалась в 5 (45,4%) случаях, в одном из них выявлена сбалансированная транслокация t(12;18)(q10;p10) (Рисунок 21).

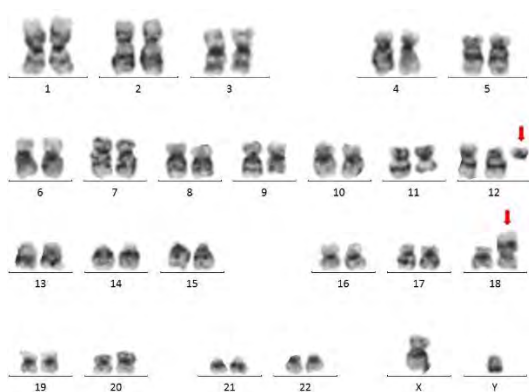


Рисунок 21. Кариограмма больного ХЛЛ со сбалансированной транслокацией с вовлечением длинного плеча хромосомы 12.

Кариотип: 47,XY,del(11)(q22),+12,t(12;18)(q10;p10).

При FISH-исследовании трисомия 12 была определена у 11 из 92 (12,0%), из них изолированно – у 7 из 10 (70,0%) больных (Рисунок 22).

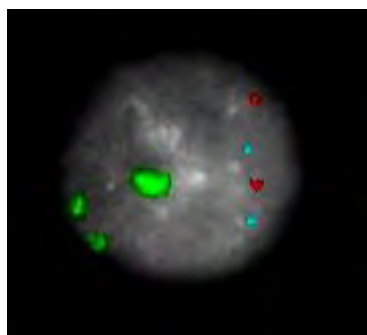


Рисунок 22. Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12 (Abbott “Vysis”, США).

Трисомия 12: три зеленых сигнала от центромеры хромосомы 12, два красных сигнала от локуса 13q14 и два голубых сигнала от локуса 13q34.

При кариотипировании и FISH-исследовании трисомия 12 одновременно была выявлена у 10 из 77 (14,1%) больных, у одного из них хромосома 12 участвовала в транслокации  $t(12;18)(q10;p10)$ . У одного больного (2,2%) при отсутствии митозов трисомия 12 была определена методом FISH и у одного больного (2,6%) обнаружена только в культуре с DSP30+IL2 в виде частичной трисомии 12q. В случае выявления в кариотипе частичной трисомии 12q было проведено дополнительное FISH-исследование к локусу 12q15, которое выявило дополнительный сигнал от локуса 12q15.

### 5.3 Хромосомные нарушения с вовлечением локуса 13q14

Методом СЦИ хромосомные нарушения с вовлечением локуса 13q14 были определены в 13 из 77 (16,9%) случаях. Делеция 13q выявлена в 8 из 13 (61,5%), из них изолированно - в 3 из 8 (37,5%), в составе комплексного кариотипа - в 4 из 8 (50,0%) случаях. В кариотипе были определены делеции хромосомы 13 с потерей различных регионов – q12q14, q14q21, q12q22, и в одном случае в кариотипе были определены клоны с делецией 13q и с транслокацией  $(13;18)(q12;p11)$  (Рисунок 23).

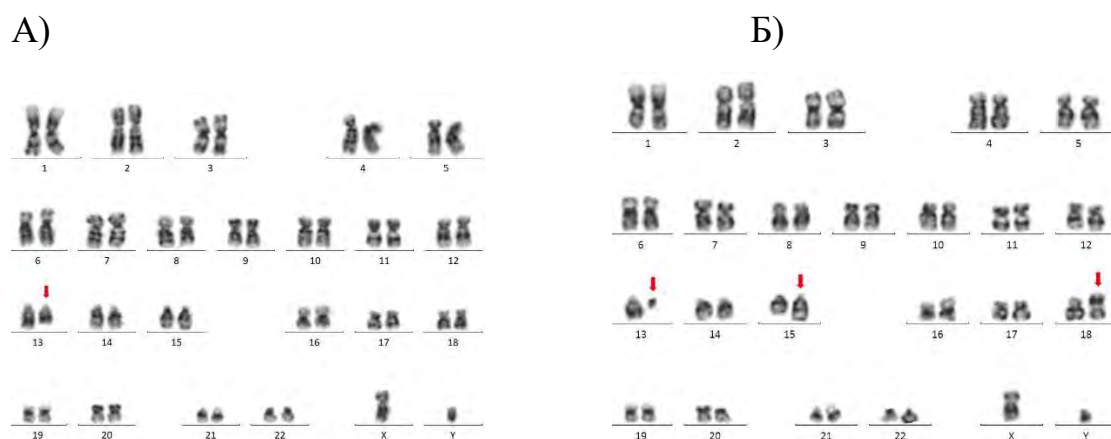


Рисунок 23. Кариограмма больного ХЛЛ с двумя клонами: с делецией длинного плеча хромосомы 13 и с транслокацией с вовлечением локуса 13q14.

А) Кариотип: 46,XY,del(13)(q12q14);

Б) Кариотип: 46,XY,t(13;18)(q12;p11),add(15)(q26).

У 4 из 13 больных (30,8%) хромосома 13 участвовала в сбалансированных и несбалансированных транслокациях (Таблица 15).

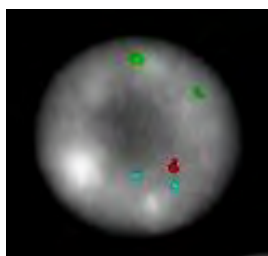
Таблица 15. Результаты СЦИ и FISH-исследования у больных ХЛЛ с транслокациями, затрагивающими локус 13q14.

N	Результаты СЦИ	Результаты FISH (полная панель)
1	46,XY,add(17)(p12-13),del(13)(q12q14)[8]/ 46,XY,add(7)(p21-22),add(17)(p12-13)[2]/ 46,XY, <b>der(13)t(10;13)(q25;q10)</b> ,add(17)(p12-13)[2]/46,XY,add(17)(p12-13),add(22)(p10),+2mar[2]/ 46,XY,add(17)(p12-13),+mar[2]/ 46,XY,del(17)(p11),del(13)(q12q14)[3]/ 46,XY, <b>der(13)t(10;13)(q25;q10)</b> [1]	del 17p13/ <i>TP53</i> в 30%, del 13q14 в 78%, 11q22/ <i>ATM</i> и +12 не ВЫЯВЛЕНЫ.
2	46,XY, <b>der(3)t(3;3)(p14;q14)</b> , <b>der(13)del(13)(q12q14)t(3;13)(p14;?q14)</b> [13]/46,XY[15]	del 13q14 в 80%, del 17p13/ <i>TP53</i> , 11q22/ <i>ATM</i> ,+1 2 не ВЫЯВЛЕНЫ.
3	46,XY, <b>t(6;13)(q26-27;q14)</b> [15]/46,XY[5]	del 13q14 в 97%,

		del 17p13/ <i>TP53</i> , 11q22/ <i>ATM</i> ,+1 2 не выявлены.
4	46,XY,t(11;13)(q14.3;q?11)[16]/46,idem,del(1)(q22)[1] , der(7)[1],del(8)(p11)[1],add(8)(q24)[1][cp3]/ 46,t(4;11;13)(q25;q22;q?13-21)[1]	del 13q14 в 93%, del17p13/ <i>TP53</i> , 11q22/ <i>ATM</i> ,+1 2 не выявлены.

При FISH-исследовании делеция 13q14 была выявлена у 37 из 92 (40,2%) больных. В 2 (5,4%) случаях обнаружены ядра с биаллельной делецией 13q14 и в 5 (13,5%) случаях сочетались ядра с моноаллельной и биаллельной делецией 13q14 (Рисунок 24). В одном случае в одном аллеле обнаружена делеция 13q14, в другом аллеле - делеция всего длинного плеча хромосомы 13. При FISH-анализе делеция 13q14 как единственное нарушение была определена у 21 из 37 (46,8%) пациентов.

А)



Б)

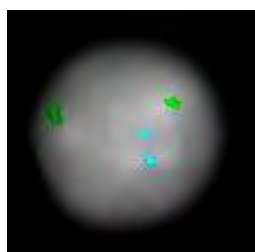


Рисунок 24. Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12 (Abbott “Vysis”, США).

А) Моноаллельная делеция 13q14: один красный сигнал от локуса q14 и 2 голубых сигнала от локуса q34 и 2 зеленых сигнала от центромеры хромосомы 12, увеличение x100.



Б) Биаллельная делеция 13q14: отсутствуют два красных сигнала от локуса q14 и 2 голубых сигнала от локуса q34 и 2 зеленых сигнала от центромеры хромосомы 12, увеличение x100.

Хромосомные нарушения с вовлечением 13q14 одновременно при СЦИ и FISH были выявлены у 13 из 77 (16,9%) пациентов, у 24 из 92 (26,1%) делеция была обнаружена только при FISH-анализе. В данных 24 исследованиях в кариотипе отсутствовали митозы у 10 из 92 (10,9%), нормальный кариотип выявлен у 4 (4,1%) и хромосомные aberrации обнаружены у 10 (10,9%) больных, у 5 из них выявлен комплексный кариотип. У 5 (6,5%) больных в кариотипе были определены сбалансированные и несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 13q14. У 2 (2,6%) были определены сбалансированные  $t(6;13)(q26-q27;q14)$  и  $t(11;13)(q14.3;q?14)$  в виде единственного нарушения и у 3 (3,9%) пациентов несбалансированные перестройки. Примечательно, что у одного пациента в разных клонах были обнаружены делеция  $13(q12q14)$  и сбалансированная  $t(13;18)(q14;p11)$  и у одного несбалансированная транслокация с делецией  $13q12q14 - der(13)del(13)(q12q14)t(3;13)(p14;?q14)$ .

#### **5.4 Хромосомные нарушения с вовлечением короткого плеча хромосомы 17**

При культивировании у 16 из 77 (20,8%) больных были обнаружены численные и структурные хромосомные нарушения с участием короткого плеча хромосомы 17 (моносомия 17, делеция 17p и несбалансированные транслокации с вовлечением 17p11-p13). Делеция 17p при кариотипировании выявлена в 2 из 16 (12,5%), сочетание клонов с делецией 17p и несбалансированной транслокацией с вовлечением 17p – 4 из 16 (25,0%), сочетание клонов с делецией 17p, несбалансированной транслокацией с участием 17p и моносомией 17 – в одном (6,3%) случае. Моносомия по хромосоме 17 определена у 4 и 16 (25,0%) больных.

У 5 из 16 (31,3%) больных выявлены только несбалансированные транслокации с вовлечением 17p как в составе комплексного кариотипа (у 3 больных), так и в сочетании с одним хромосомным нарушением (у 2 больных). На рисунке 25 представлен случаи выявления делеции 17p и несбалансированной перестройки с вовлечением 17p. Во всех 16 случаях делеция 17p13 была подтверждена методом FISH. У двух больных (2,2%) делеция 17p13 была обнаружена только FISH-исследовании: в одном случае отсутствия митозов при СЦИ и в одном случае наличия aberrантного кариотипа без делеции 17p.

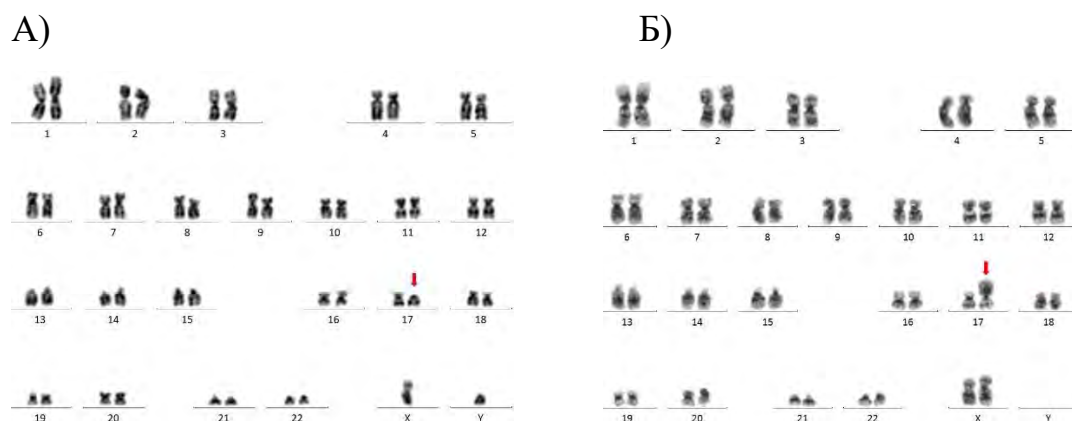


Рисунок 25. Кариограммы больных ХЛЛ с делецией длинного плеча хромосомы 17 и с несбалансированной перестройкой с вовлечением локуса 17p13.

А) Кариотип: 46,XY,del(17)(p11)

Б) Кариотип: 46,XY,add(17)(p11).

При FISH-исследовании делеция 17p13/*TP53* выявлена у 18 из 92 (19,6%) больных (Рисунок 26). Как единственное хромосомное нарушение делеция 17p13/*TP53* была определена в 12 из 18 (66,7%) случаях.

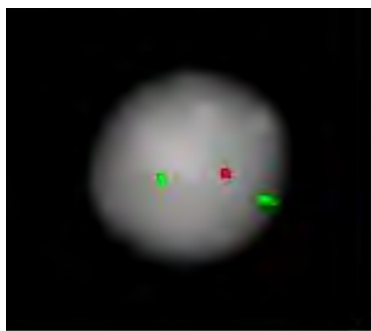


Рисунок 26. Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом LSI p53/LSI ATM (Abbott “Vysis”, США).

Делеция 17p13/*TP53*: один красный сигнал от локуса 17p13 и два зеленых сигнала от локуса 11q22.

### 5.5 Комплексные нарушения кариотипа

Комплексные нарушения кариотипа были выявлены у 33 из 77 (42,6%) больных, из них 5 и более aberrаций обнаружены в 17 из 33 (51,5%). В составе комплексного кариотипа хромосомные нарушения с вовлечением 17p выявлены у 13 из 33 (39,4%) больных (Таблица 16). Несбалансированные перестройки в составе КК, в том числе с вовлечением 11q22, 13q14, 17p, обнаруживались у 28 из 33 (84,8%) пациентов. В кариотипе с КК с  $\geq 5$  aberrациями хромосомные нарушения с вовлечением 17p обнаружены в 11 из 17 (64,7%) случаях.

Таблица 16. Частота выявления хромосомных нарушений в составе комплексного кариотипа с  $\geq 3$  и  $\geq 5$  aberrаций.

Хромосомные нарушения, выявленные при СЦИ	Комплексный кариотип (с $\geq 3$ aberrациями) (N=33), число больных (%)
с вовлечением 11q22	16 (84,2)
трисомия 12	5 (15,2)
с вовлечением 13q14	7 (21,2)

с вовлечением 17p13	13 (39,4)
несбалансированные перестройки*	28 (84,8)
сбалансированные транслокации	4 (12,1)

\* случаи сочетания сбалансированных транслокаций и несбалансированных перестроек учитывались, как несбалансированные аберрации.

В 13 из 20 (65,2%) случаев с комплексными нарушениями без делеции 17p при кариотипировании присутствовали хромосомные нарушения с вовлечением 11q (Рисунок 26).

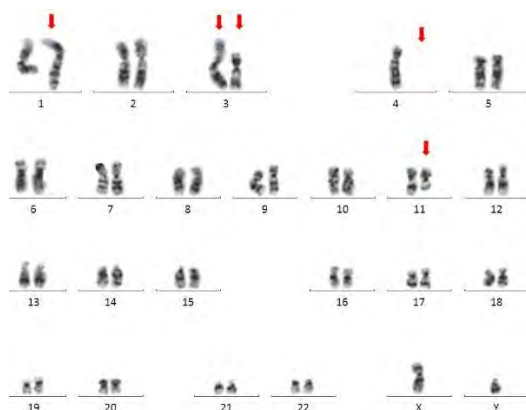
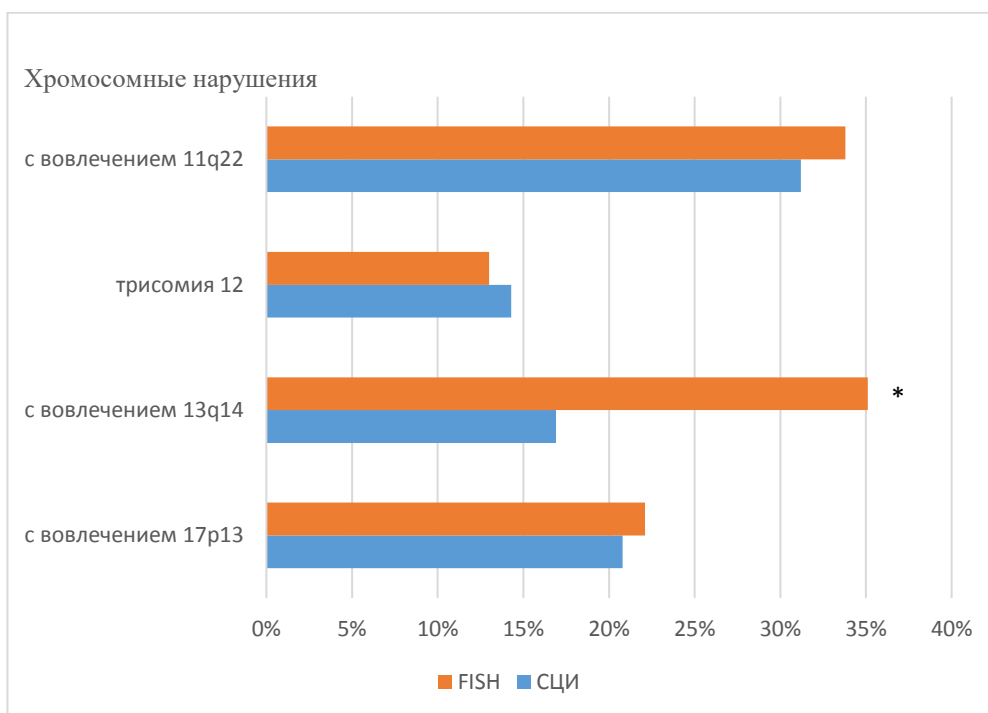


Рисунок 26. Кариограмма больного ХЛЛ с комплексными нарушениями кариотипа.

Кариотип: 45,XY,add(1)(q44),add(3)(q27),del(3)(?p13),-4,del(11)(q22).

### 5.6 Сравнительный анализ частоты детекции характерных хромосомных аберраций методом СЦИ и FISH

При наличии митозов у 77 больных методом 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 27). Комплексные нарушения кариотипа при культивировании были выявлены у 33 из 77 (42,6%), при FISH-исследовании – у 3 из 92 (3,7%) больных.



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

Рисунок 27. Частота характерных хромосомных aberrаций, выявленных при СЦИ и FISH у пациентов с успешными результатами культивирования.

Сравнительный анализ результатов СЦИ с использованием DSP30+IL2 и FISH-исследования показал, что частота выявления делеции 13q14 достоверно различалась и была выше при FISH, чем при СЦИ, 35,1% и 16,9%, соответственно ( $p = 0,021$ ). Однако частота выявления хромосомных aberrаций, затрагивающих локусы 11q22 и 17p13, методом СЦИ и FISH достоверно не различалась. 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 28). У 2 (2,1%) больных с трисомией 12q были выявлены структурные нарушения с вовлечением 12q: у одного больного с трисомией 12, выявленной при FISH-исследовании, одна из хромосом 12 по результатам СЦИ вовлечена в  $t(12;18)(q10;p10)$  и у одного больного при отсутствии трисомии по результатам FISH в культуре с DSP30+IL2 выявлена несбалансированная  $t(12;16)(q14;q23)$  – случай частичной трисомии 12, то есть наличие дополнительного длинного плеча хромосомы 12, подтвержденное при FISH с использованием ДНК-зонда к локусу гена 12q15/*MDM2*.

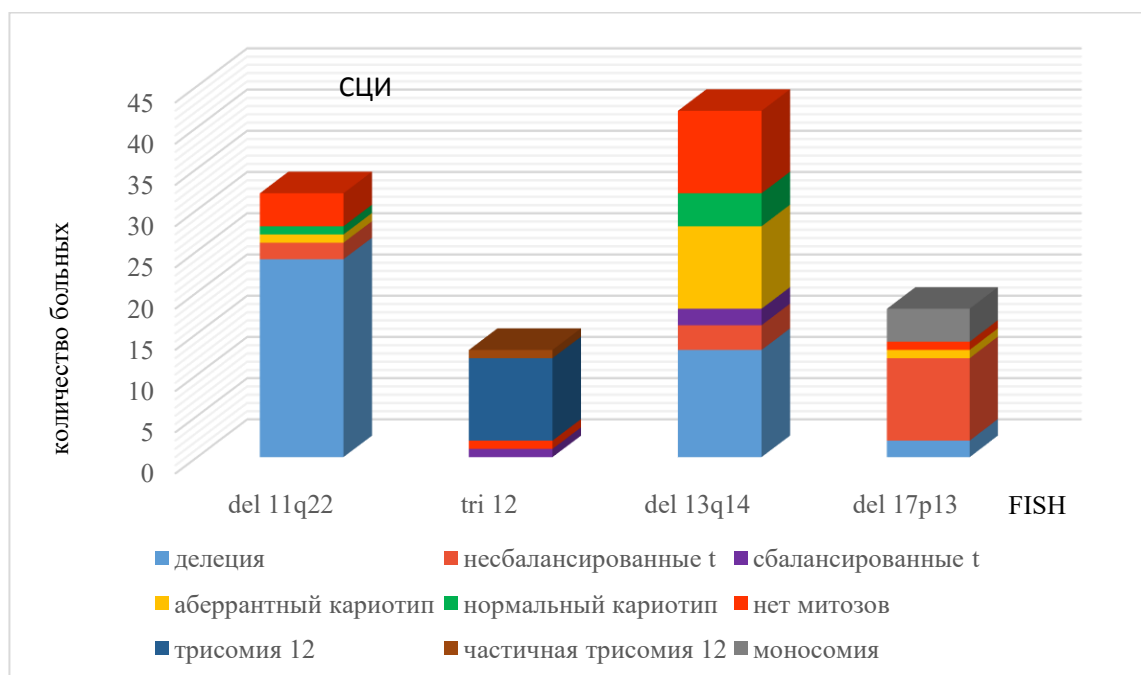


Рисунок 28. Сопоставление результатов СЦИ с использованием DSP30+IL2 и FISH-исследования у больных ХЛЛ.

У 15 больных с отсутствием митозов при СЦИ хромосомные aberrации методом FISH выявлены у 13 из 15 (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 (Таблица 17).

У 12 пациентов с нормальным кариотипом по результатам культивирования с DSP30+IL2 выявлены хромосомные aberrации методом FISH у 5 из 12 (41,7%): делеция 11q22 – 1 случай, делеция 13q14 – 4 случая.

В 17 случаях отсутствия хромосомных нарушений при FISH-исследовании были выявлены хромосомные нарушения в культуре с DSP30+IL2 в 8 из 17 (47,1%) случаях, 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).

Таблица 17. Частотный анализ результатов культивирования с DSP30 в сочетании с IL2 и FISH-исследования у больных ХЛЛ (N=92).

Результаты СЦИ	Выявленные при FISH хромосомные aberrации с вовлечением					Отсутствие aberrаций при FISH N=17
	11q22 N=17	12q N=7	13q14 N=21	17p13 N=12	сочетания aberrаций N=18	
Нет митозов	2	-	8	-	3	2
Нормальный кариотип	1	-	4	-	-	7

Аберрантный кариотип (количество aberrаций):						
1	6	3	4	1	1	4
2	1	1	1	2	3	2
3 (комплексный кариотип)	7	3	2	8	6	2
Отсутствие в аберрантном кариотипе при СЦИ	-	-	2	1	5	-

На рисунке 29 представлен пример комплексного кариотипа, выявленного при культивировании с DSP30+IL2, при FISH-исследовании у данного больного хромосомные aberrации не выявлены. Всего с учетом выполненных СЦИ и FISH-исследования хромосомные aberrации обнаружены у 83 из 92 (90,2%) больных.



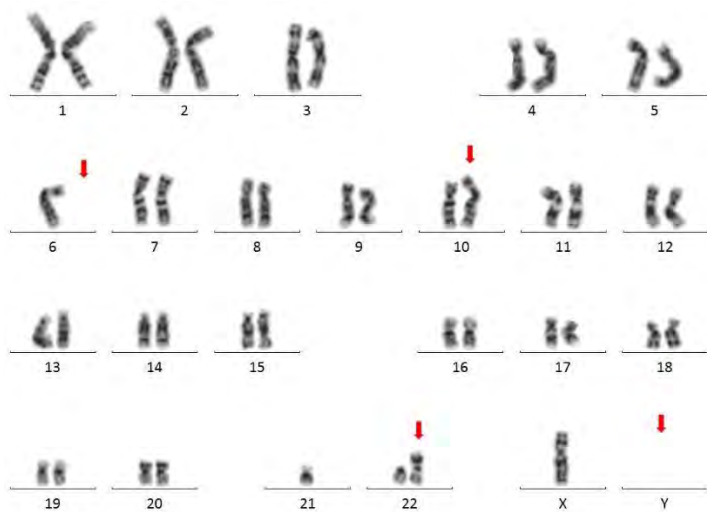


Рисунок 29. СЦИ периферической крови с использованием при культивировании DSP30 и IL2.

Выявлены комплексные нарушения кариотипа: 43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10).

В качестве примера цитогенетической диагностики приведен случай синхронного течения ХЛЛ и МДС с двумя клонами с различными цитогенетическими аномалиями.

### Клинический случай 1.

*Больной Ш.С.В., 1959 года рождения, обратился в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в ноябре 2016 года для верификации диагноза. До момента обращения пациент проходил регулярные обследования по месту жительства. В ноябре 2015 года при прохождении плановой диспансеризации был выявлен лимфоцитоз ( $3,7 \times 10^9/\text{л}$ ) при уровне лейкоцитов  $5,4 \times 10^9/\text{л}$ . Далее в течение года прогрессировал лимфоцитоз ( $15,2 \times 10^9/\text{л}$ ), появился и нарастал лейкоцитоз ( $23,9 \times 10^9/\text{л}$ ) с развитием анемии (93 г/л) и тромбоцитопении ( $92 \times 10^9/\text{л}$ ). При инструментальном и физикальном обследовании были выявлены лимфоаденопатия, спленомегалия. В октябре 2016 было проведено ИФТ костного мозга и периферической крови, по результатам которого выявлены 2 клеточные популяции, соответствующие бластным клеткам миелоидной направленности (12%) и атипичным В-*

лимфоцитам (35%). В миелограмме на момент обследования обнаружено 3% бластных клеток и 71% лимфоидных клеток.

При обследовании в ФГБУ «НМИЦ гематологии» в ноябре 2016 года в гемограмме выявлялась анемия (113 г/л), тромбоцитопения ( $83 \times 10^9/\text{л}$ ), нейтропения ( $0,2 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфоцитоз ( $6,8 \times 10^9/\text{л}$ ). В миелограмме: 14,8% бластных клеток, 48% лимфоидных клеток, редукция эритроидного и гранулоцитарного ростков, отсутствие мегакариоцитов. ИФТ клеток крови и костного мозга подтвердило наличие двух клеточных клонов с фенотипом, характерным для В-клеток ХЛЛ и бластным клеткам миелоидной направленности.

При гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях (ИГХ) трепанобиоптата определялись участки гиперклеточного костного мозга с признаками дисмиелопоэза по трем росткам кроветворения («блок» созревания гранулоцитарного ростка, дизэритропоэз в виде мегалобластоидных форм эритрокариоцитов, сниженное количество диспластичных мегакариоцитов), скопления  $CD34+$  бластных клеток и крупные скопления В-лимфоцитов ( $CD5+CD20+CD23+$ ). Результаты гистологии и ИГХ соответствовали картине комбинированной опухоли миелоидной и лимфоидной природы.

С целью определения мутационного статуса генов вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGHV), имеющего прогностическое значение при ХЛЛ, было выполнено молекулярное исследование крови, по результатам которого выявлен немутированный вариант генов IGHV (неблагоприятный прогноз в случае ХЛЛ).

Учитывая синхронное течение двух заболеваний, СЦИ проводили с использованием нескольких видов культур: 1) краткосрочной (24 часа) культуры без стимуляторов деления клеток; 2) 72-часовой культуры с применением LPS и TPA; 3) 72-часовой культуры с применением олигонуклеотида DSP30 и IL2. При культивировании исследовали клетки костного мозга и периферической крови. При исследовании краткосрочной

культуры костного мозга была выявлена делеция длинного плеча хромосомы 5 - *del(5)(q15q33)*. В культуре с *LPS+TPA* обнаружен дериват хромосомы 16 - предположительно наличие дополнительного участка длинного плеча хромосомы 12 (*12q14→12qter*) на длинном плече хромосомы 16 (частичная трисомия 12). Два клона одновременно выявлялись в периферической крови при культивировании с *DSP30+IL2*: *del(5)(q15q33)* в 45% клеток и дериват хромосомы 16 в 30% клеток (Рисунок 30).

При *FISH*-исследовании мононуклеаров крови с ДНК-зондом (*Vysis CLL FISH Probe Kit, Abbott, США*) характерные для ХЛЛ хромосомные нарушения (делеции *11q22*, *13q14*, *17p13* и трисомия 12) не выявлялись. Для подтверждения частичной трисомии 12 было проведено дополнительное *FISH*-исследование с использованием ДНК-зонда к локусу *12q15* и центромере 12 (*XL MDM2, Metasystems, Германия*), которое выявило дополнительный сигнал от локуса *12q15* в 30% ядер мононуклеаров крови и 21% клеток аспирата костного мозга (Рисунок 31). Дополнительный сигнал от локуса *12q15* и отсутствие сигналов от локусов *5q31* и *5q33* визуализировались в разных клетках; оба хромосомных нарушения – делеция *5q* и трисомия *12q* – ни в одной клетке не обнаружены. Таким образом, сочетанное применение СЦИ и ДНК-зондов к локусам *12q15*, центромере 12 и *5p15*, *5q31*, *5q33* при исследовании клеток культуры с *DSP30+IL2* подтвердило наличие двух неродственных цитогенетических клонов, представляющих в отдельности характерные прогностические маркеры заболевания – МДС с *del(5q)(q15q33)* и ХЛЛ с несбалансированной транслокацией (*12;16)(q14;q23)*, являющейся случаем частичной трисомии 12.

Используя метод позитивной иммуномагнитной селекции (*CD34 MicroBead Kit human, Miltenyi Biotec, Германия*) была выделена клеточная линия гемопоэтических стволовых клеток - ГСК (*CD34+*), и проведено цитогенетическое исследование. Результаты *FISH*-анализа показали наличие только делеции *del(5q)* в 84% *CD34+*клеток и отсутствие трисомии *12q* в *CD34+*клетках. Молекулярное исследование с целью определения мутации

гена TP53 проводилось в двух популяциях клеток – в клетках периферической крови и ГСК, в обеих популяциях мутация гена TP53 не определялась.

На основании полученных данных был сформулирован диагноз, отражающий синхронное течение двух заболеваний: миелодиспластический синдром с избытком бластов-2 (МДС-ИБ2, ВОЗ 2017), промежуточная-2 группа риска (IPSS), высокая группа риска (IPSS-R) и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), стадия В по Binet, промежуточная группа риска (МПИ).

Учитывая отсутствие показаний к началу терапии ХЛЛ было принято решение проводить в 1-й линии терапию МДС по программе DaclidaAra-C (Децитабин, Идарубицин, Цитарабин). После первого курса терапии в миелограмме выявлены 0,8% бластов и выраженная инфильтрация лимфоидными клетками (93%). При СЦИ клеток костного мозга обнаружена несбалансированная транслокация  $der(16)(16pter \rightarrow 16q23::12q13 \rightarrow 12qter)$  в 5% клеток, методом FISH делеция 5q не определялась. На основании полученных результатов констатирована костно-мозговая и цитогенетическая ремиссии МДС. В связи с неблагоприятным вариантом заболевания в тот же период выполнено HLA-типирование костного мозга и начат поиск неродственного HLA-совместимого донора с целью рассмотрения этапом лечения трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Специфическая терапия МДС в этот период времени не проводилась.

Через 3 месяца после окончания первого курса ПХТ сохранялась умеренная трехростковая цитопения (гемоглобин 110 г/л, эритроциты  $3,5 \times 10^{12}/л$ , тромбоциты  $55,0 \times 10^9/л$ , лейкоциты  $5,5 \times 10^9/л$ , лимфоциты – 83%), была выявлена бластемия – 14%. В миелограмме – 29% бластных клеток и 63% лимфоцитов. При FISH-исследовании аспирата костного мозга определена 5q в 40% ядер, частичная трисомия 12 в 30% ядер. Таким образом, диагностирована трансформация МДС в ОМЛ. По данным ИФТ крови бластная популяция составила 18% с характерным для ОМЛ фенотипом:  $CD45^{low}+CD34+CD13+$  и популяция ХЛЛ ( $CD19+CD5+CD20^{low}+$ ) - 17%.

*Проведение ПХТ было продолжено по аналогичной схеме. После достижения полной клинико-гематологической и цитогенетической ремиссии была выполнена разнополая алло-ТГСК от неродственного донора.*

*Через 2,5 месяца после алло-ТГСК отмечено полное донорское кроветворение с полным восстановлением показателей крови. При FISH-исследовании выявлено 2% ядер с мужским кариотипом и 98% ядер с женским кариотипом, делеция 5q не определялась. Проводились сеансы фотофереза и иммуносупрессивной терапии по поводу кожной формы острой реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).*

*Через 4 месяца после алло-ТГСК выявлена тромбоцитопения, требующая заместительных трансфузий. При контрольном обследовании в костном мозге – 17,6% бластных клеток. По данным ИФТ обнаружены популяция 30% бластных клеток миелоидной направленности и остаточная популяция 2,068% клеток ХЛЛ. При СЦИ клеток костного мозга определялся нормальный женский кариотип (донора), при FISH-исследовании в 40% ядер выявлялся мужской кариотип (клетки пациента) и делеция 5q, частичная трисомия 12 определена в 2,5% ядер. По данным проведенных исследований подтвержден рецидив ОМЛ. С целью индукции ремиссии был проведен курс ПХТ по программе «7+3» с митоксантроном, после которого в миелограмме выявлено 0,8% бластных клеток и 2,8% лимфоцитов, зарегистрирована цитогенетическая ремиссия ОМЛ (методом FISH делеция 5q и частичная трисомия 12 не обнаружены) и 100% донорский химеризм. В течение всего периода наблюдения больной получал иммуносупрессивную терапию по поводу РТПХ.*

*Через месяц определялись признаки минимальной остаточной болезни (МОБ) - в костном мозге выявлялись клетки реципиента (5% по результатам FISH), сохранялась тромбоцитопения. В связи с чем было принято решение о проведении курсов с азацитидином. После третьего курса азацитидином у больного был констатирован цитогенетический рецидив заболевания: в 15% клеток определялся мужской кариотип (клетки пациента) и делеция 5q при*

*FISH-исследовании, в 1% ядер определялась частичная трисомия 12, с последующим развитием развернутого рецидива ОМЛ. С целью усиления противоопухолевого воздействия к терапии азациитидином было добавлено введение венетоклакса в постоянном режиме. Несмотря на проводимую сочетанную терапию азациитидином в сочетании с венетоклаксом и последующим курсом «7+3» с митоксантроном больной скончался от рефрактерного рецидива на фоне тяжелых инфекционных осложнений в период миелотоксического агранулоцитоза.*

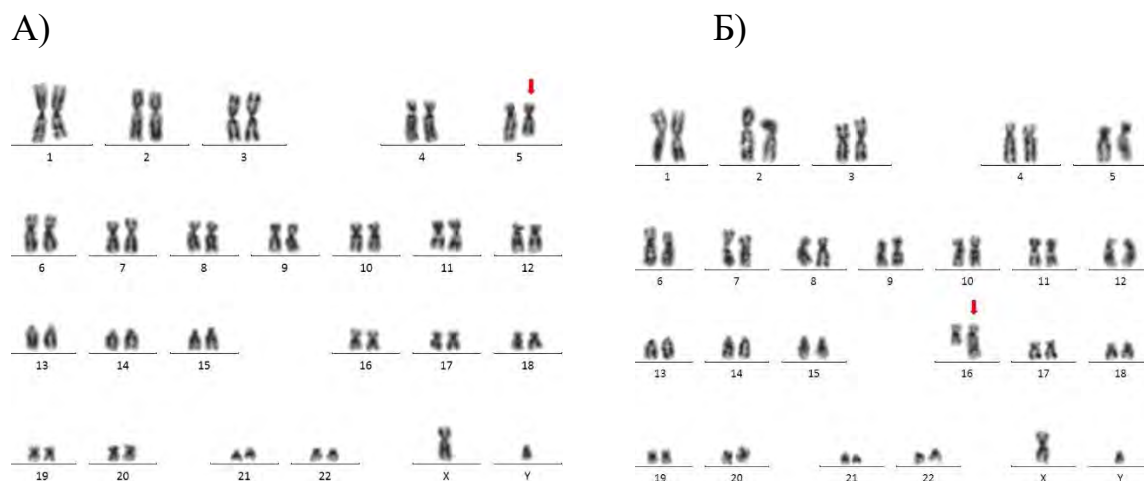
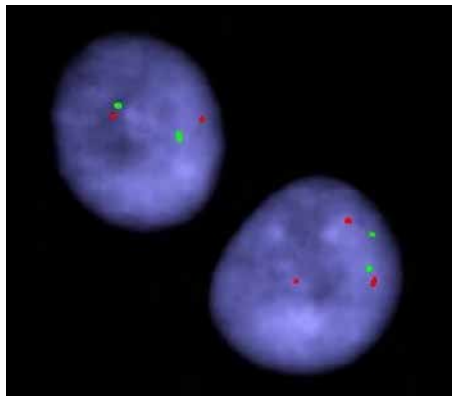


Рисунок 30. Кариограмма больного ХЛЛ с двумя независимыми клонами: с делецией длинного плеча хромосомы 5 и с дериватом хромосомы 16

А) Кариотип: 46,XY,del(5)(q15q33)

Б) Кариотип: 46,XY,der(16)(16pter→16q23::12q13→12qter).

А)



Б)

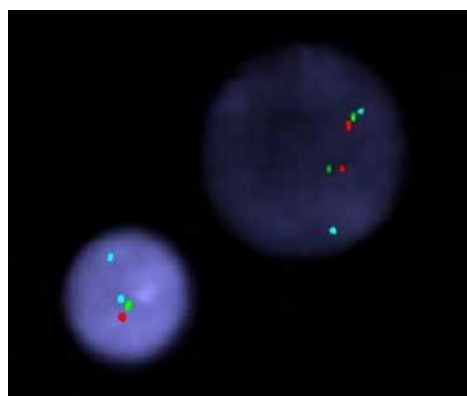


Рисунок 31. FISH-исследование с ДНК-зондом к локусу 12q15/*MDM2* (XL *MDM2*, Metasystems):

А) с ДНК-зондом к локусу 12q15 и центромере хромосомы 12: в нормальном ядре визуализируется два зеленых сигнала от центромеры 12 и два красных сигнала от локуса 12q15; в ядре с частичной трисомией 12q – два сигнала от центромеры и три сигнала от 12q15;

Б) с ДНК-зондом к локусам 5p15, 5q31 и 5q33: в нормальном ядре визуализируется два голубых сигнала от локуса 5p15, два красных сигнала от локуса 5q31 и два зеленых сигнала от локуса 5q33; в ядре с делецией 5q15-q33 – два сигнала от локуса 5p15 и по одному сигналу от локусов 5q31 и 5q33.

Таким образом, в представленном клиническом случае цитогенетическое исследование позволило выявить два независимых опухолевых клон с характерными для ХЛЛ и МДС хромосомными абберациями. Выявленные аномалии кариотипа учитывались при определении прогноза каждого заболевания и выборе тактики терапии, а также являлись цитогенетическими маркерами эффективности проводимого лечения.

## Глава 6 Дополнительные методы исследования (mFISH, mBAND, aCGH)

По результатам СЦИ для подтверждения перестроек локусов генов *IGH/14q32*, *BCL6/3q27* и делеции 5q были проведены дополнительные FISH-исследования с ДНК-зондами к локусам данных генов. В случаях выявления несбалансированных перестроек (несбалансированные транслокации, маркерные, дериватные и дицентрические хромосомы) для детализации их структуры проводились mFISH и mBAND при достаточном количестве биоматериала.

### Транслокации с вовлечением гена *IGH*

В кариотипе у 7 из 77 (9,1%) больных выявлены сбалансированные транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32). Результаты кариотипирования представлены в таблице 18. В 3 из 7 случаев выявлена транслокация t(14;19)(q32;q13), в остальных случаях выявлены следующие локусы разрыва партнерских хромосом: 8q24, 6p11, 9q13, 2p14. Во всех 7 случаях перестройка локуса гена *IGH/14q32* подтверждена методом FISH.

Таблица 18. Результаты кариотипирования больных ХЛЛ с перестройкой генов *IGH*.

№	Кариотип
1	46,XY,t(8;14)(q24;q32),?del(11)(q22-23),add(14)(q32)[4]/46,XY,t(8;14)(q24;q32),der(14)[16]/46,XY,t(2;10)(q10;q26),t(8;14)(q24;q32),add(14)(q32)[1]/46,XY,-3,t(8;14)(q24;q32),del(11)(q22-23),-17,add(17)(q24)[1]
2	46,XX,t(14;19)(q32;q13),add(17)(p13)[6]/46,XX[1]
3	46,XY,t(6;14)(p11;q32)[19]/46,XY[1]
4	47,XX,t(9;14)(q13;q32),+12[5]/46,XX[5]



5	46,XX,t(2;14)(p14-15;q31-32),der(7)(p12->q?36::p13->pter),add(8)(p23),del(11)(q22),-13,+mar or der(13)[9]/46,XX[6]
6	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[18]/46,idem,del(1)(p31)[2]
7	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[11]/46,idem,del(9)(p23)[6]/46,idem,del(9)(p21)[3]

На рисунке 32 представлен пример кариотипа со сбалансированной транслокацией с вовлечением генов *IGH/14q32*.

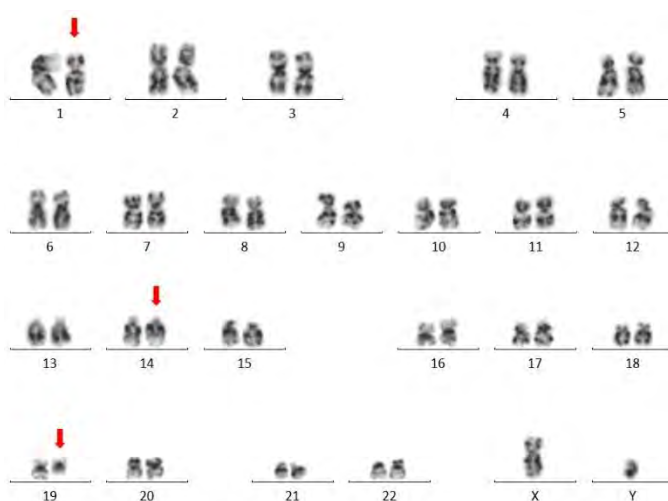


Рисунок 32. Результат культивирования костного мозга больного ХЛЛ со сбалансированной транслокацией с вовлечением генов *IGH/14q32*.

Выявлены транслокация t(14;19)(q32;q13) и делеция короткого плеча хромосомы 1. Кариотип: 46,XY,del(1)(p31),t(14;19)(q32;q13).

### Несбалансированные перестройки

В 18 случаях с выявленными при кариотипировании несбалансированными перестройками проведен mFISH, в 6 случаях из них проведен дополнительно mBAND. 12 больных исследованы до начала терапии, 6 больных - в прогрессии и рецидиве заболевания. В составе КК несбалансированные перестройки исследовались у 12 пациентов.

У 18 пациентов несбалансированные аберрации в известных точках разрывов 6q22, 13q14 и 17p11-p13 выявлены в 6 случаях (33,3%), в предполагаемых локусах 2q37, 7q22, 8p23, 8q24, 11p14, 12q14, 13q34, 15p13 – в 6 случаях (33,3%). Дериваты хромосом X, 3, 7, 9, 11, 12, 13, 14 определены в 8 (44,4%) и маркерные хромосомы - в 4 случаях.

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 делецией: Xq, 8p, 10q, 13q, 16p, 17p; в 3 случаях выявлены дицентрические хромосомы и 2 больных выявлены сбалансированные  $t(6;17)(q22;p13)$  и  $t(11;12)(q14.1;q24)$ . В 5 (27,8%) случаях (№ 1, 7, 8, 10, 12) несбалансированных транслокаций с участием хромосомы 8 при mFISH выявлена дупликация 8q. Данным больным было проведено дополнительное FISH-исследование, которое показало увеличение количества копий гена *MYC*. Все случаи с дупликацией 8q были выявлены у больных до начала терапии. В таблице 19 представлены кариотипы больных ХЛЛ, полученные при СЦИ и с учетом данных mFISH и mBAND.

Таблица 19. Кариотипы больных ХЛЛ, полученные при СЦИ и с учетом данных mFISH и mBAND.

№	Кариотип (СЦИ)	Кариотип (mFISH+mBAND)
1	46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(11)(q22),del(13)(q14q22)[2]/47,XX,idem,+mar[12]/ 47,XX,del(13)(q14q22),+mar[1]/ 46,XX,del(11)(q22),del(13)(q14q22)[1]/46,XX,del(13)(q14q22)[1]/ 46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(13)(q14q22)[1]/ 43,XX,der(2),-4,t(6;13)(q14;q34) or t(2;6;13)(?;q14;q34),-17,-20[1]/46,XX[2]	46,XX,t(2;12)(p10;q10)[2]/ 47,XX,t(2;12)(p10;q10),+der(12)t(2;12)(p10;q10)[3]
2	46,XY,del(17)(p11)[6]/46,XY,add(17)(p11)[4]/ 46,XY,t(14;17)(q10;q10)[1]/45,XY,t(3;7)(q10;p10)[1]/46,XY[10]	46,XY,del(17)(p11)[3]/46,XY,der(17)t(17;20)(p11.1;q12)[2]
3	47,XX,t(9;14)(p13;q32),+12[5]/46,XX[5]	47,XX,t(9;14)(p13;q32),+12[5]
4	44,XY,del(3)(p22),-8,-11,add(11)(p14),add(16)(q24),add(17)(p13),+mar[cp3]/ 45,XY,-11,add(17)(p13)[cp4]/	45,XY,dic(11;17)(p15;p11.1)[2]/45,XY,del(6)(p21.3),-11,dic(11;17)(p15;p11.1),der(16)t(3;16)(?p21;p11.2)/ 44,XY,-8,dic(11;17)(p15;p11.1),der(15)t(4;15)(q31.1;q26)t(8;15)(?q11;p13),der(21)t(8;21)(?q22;p13)[5]

	44~45,XY,add(4)(?q35),-11,-13,-17,+dic(?13;17),add(17)(p13),del(17)(p13),+mar[cp6]/46,XY[2]	
5	45,X,-Y,del(10)(q24),del(11)(q22),add(13)(?q34)[2]/46,XY[28]	46,XY,der(10)t(3;10)(q?23;q23.1),del(11)(q22),der(13)t(2;13)(?;q21.3)[2]
6	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q23)[6]/46,XY,del(5)(q15q33)[9]/46,XY[5]	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q24)[5]
7	46,XX,?t(2;14)(p14-15;q32),der(7)(p12->q?36::p13->pter),add(8)(p23),del(11)(q22),-13,+mar der(13)[9]/46,XX[6] or	46,XX,t(2;14)(p14-15;q32),der(7)(p12->q?36::p13->pter),i(8)(q10) or dup(8)(q11q24),del(11)(q22),del(13)(q?)[5]
8	44,XY,add(2)(q37),add(7)(q22) or dup(7)(q11q36),del(8)(q22),der(13)t(13;?)(q21;?),del(14)(q21) or mar,-17,-18,-21,+mar[18]/44,XY,idem,del(1)(q31)[1]/44,XY,t(11;15)(p15;q22),-15,-20)[1]	44,XY,der(2)(2pter->2q23::7?p11->7?p22::8?q?->8?q?::7?q21->7qter),-7,der(8)t(2;8)(?p?q?;q22.3),der(13)t(?3;13)(?p?q?;p13),del(14)(q21),-17,der(18)(7qter->7?q21::8?p?q?->8?p?q?::7?p22->7p11::18p11->18qter),der(21)t(17;21)(?q21;q22)[5]
9	46,XY,del(6)(q22),add(17)(p13)[13]/46,XY[2]	46,XY, t(6;17)(q22;p13)[10]
10	46,XX,del(11)(q22)[14]/45,XX,-4,add(8)(p23),del(11)(q22),add(15)(p13)[5]/	45,XX,del(11)(q22)[3]/45,XX,i(8)(q10),del(11)(q22),der(15)t(4;15)(q12;p13)[3]

	45,XX,del(3)(q24-25),add(7)(p22) or t(3;7)(q24-25;p22),-10[1]	
11	46,XY,del(11)(q22)[11]/46,XY,del(17)(p11-12) <b>der(17)</b> ,-18[6]/ 45,XY, <b>der(3)</b> ,-4,del(17)(p11-12),-18,+mar ?del(4)(q22)[7]/ 45,XY,add(2)(q37),del(17)(p11-12),-18[2]/ 44,XY,-3,-16,del(17)(p11-12),-18,+dic[1]/ 44,XY,-2,-16,del(17)(p11-12),-18,+dic[1]/46,XY[2]	or 46,XY,del(11)(q22)[2]/45,XY, <b>der(17)t(17;18)(p11.1;?p)</b> ,-18[2]/ or 45,XY, <b>dic(3;4)(p10;p10)</b> [2]/44,XY,dic(3;4)(p10;p10),der(17)t(17;18)(p11.1;?p?q?),-18[2]
12	46,XX, <b>add(8)(q24)</b> ,t(8;10)(q21;p14-15)[10]/ 46,XX,del(4)(p14)[2]/46,XX[8]	46,XX, <b>dup(8)(q21q24)</b> ,t(8;10)(q11;p11)[4]
13	46,XY,t(13;18)(q12;p11), <b>add(15)(q26)</b> [4]/46,XY,del(13)(q12q14)[2]/46,XY[14]	46,XY,t( <b>13;15;18</b> )(q14.1;q11,p10)[6]/46,XY,del(13)(q14.1q21.3)[1]
14	46,X, <b>der(X)</b> [15]/46,X,der(X),del(17)(p10)[7]/ 46,X,der(X),add(17)(p13)[8]	46,X,t( <b>X;7</b> )(q21.1; ?q31), <b>der(17)t(9;17)(?p23;p11.2)</b> [3]
15	46,XY,del(11)(q22-23),del(12)(?q21q24) <b>or</b> <b>t(del(11);12)(q22-23;?q21q24)</b> [13]/ 45,XY,-8,del(11)(q22-23),+12,der(12),-16[3]/ 43,XY,t(1;4)(q31;p15)[1]/46,XY[33]	46,XY,del(11)(q23.3)[5]/47,XY,+12,t( <b>11;12</b> )(q14.1;q24)[2]

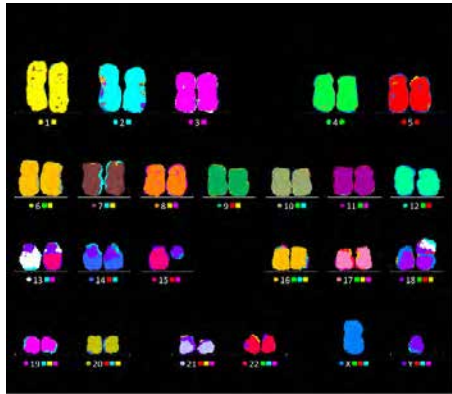
16	45,XY,-12, <b>add(17)(p11)</b> or ?der(17)t(?12;?17)(?q12;?p13)dup(12)(?)[10]/ 45~46,idem,del(3)(p13)[3],del(10)(q23)[1]+mar[1][cp3]/ 45~46,idem,der(7)[8],add(19)(?p?q13)[1],+mar[8][cp5]/4 6,XY[2]	45,XY, <b>dic(12;17)(p13;p13)[5]</b>
17	46,XY,del(13)(q12q14)[1]/46,XY, <b>der(3)t(3;13)(p14;q14)</b> ,der(13)del(13)(q12q14)t(3;13)(p14;?q14)[13]/46,XY[16]	46,XY, <b>der(3)t(3;13)(p14.3;q22)</b> ,der(13)del(13)(q14.1q22)t( 3;13)(p14.3;q22)[20]
18	46,XY,t(11;13)(q14.3;q?11)[16]/46,idem,del(1)(q22)[1],d er(7)[1],del(8)(p11)[1],add(8)(q24)[1][cp3]/46,t(4;11;13)( q25;q22;q?13-21)[1]	46,XY, <b>der(11)t(11;13)(q14.1;q22)</b> , der(13)del(13)(q12q14)t(11;13)(q14.1;q22)[5]

Каждая несбалансированная перестройка рассчитывалась как единичный случай (всего 26 случаев). Две наиболее многочисленные группы были выделены по результатам mFISH и mBAND: 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).

Отмечено, что дополнительные несбалансированные aberrации были выявлены при анализе маркерных хромосом, в результате которого у 3 больных увеличилось количество хромосомных aberrаций до 5 и более (КК). Таким образом, при применении mFISH и mBAND количество пациентов с КК с пятью и более aberrациями возросло с 5 (27,8%) до 8 (44,4%).

С помощью mBAND детализированы точки разрывов на 11, 12 и 13 хромосомах. На рисунке 33 представлен пример выявления сложной транслокации  $t(13;15;18)(q14.1;q11,p10)$  в одном клоне, которая была представлена в кариотипе  $t(13;18)(q12;p11)$  и добавочным материалом на длинном плече хромосомы 15 (#13), и подтверждения делеции 13q14 в другом клоне.

А)



Б)

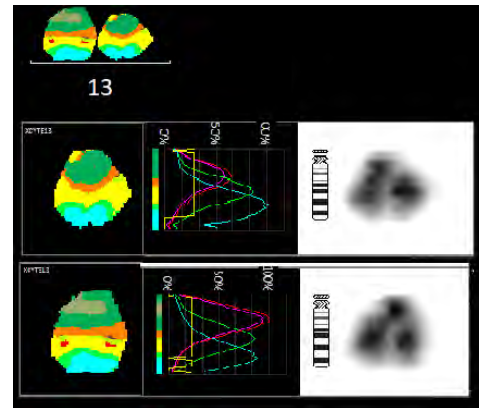


Рисунок 33. Результаты mFISH и mBAND у больного ХЛЛ с выявленной транслокацией  $t(13;18)(q12;p11)$  и добавочным материалом на длинном плече хромосомы 15:

А) Выявлена сложная транслокация  $t(13;15;18)(q14.1;q11;p10)$  методом mFISH

Б) Подтверждена делеция 13q14 методом mBAND

Таким образом, mFISH и mBAND являются дополнительными методами исследования кариотипа DSP30+IL2-стимулированных клеток ХЛЛ, позволяющими идентифицировать сложные структурные нарушения хромосом и выявлять дополнительные aberrации. Уточнение количества аномалий кариотипа позволяет более точно распределять больных по группам риска по наличию комплексных нарушений.

В качестве примера выявления дополнительных хромосомных нарушений с помощью комбинации молекулярно-цитогенетических (СЦИ, FISH) и молекулярных (сравнительная геномная гибридизация, aCGH) методов приведен клинический случай выявления комплексных нарушений кариотипа.

### Клинический случай 2.

*Больной З.Ф.М., 1936 года рождения, наблюдался в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2001 года с диагнозом хронический лимфолейкоз, развернутая стадия. В 1999 году диагноз был установлен на основании результатов гемограммы, по данным которой был выявлен*



лейкоцитоз ( $35,0 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфоцитоз ( $24,5 \times 10^9/\text{л}$ ), и миелограммы - лимфоидная инфильтрация (25,2%). При гистологическом исследовании отмечались мелкие скопления лимфоцитов на фоне сохраненного миелопоэза. Специфической терапии ХЛЛ на тот момент не проводилось.

В октябре 2003 года состояние пациента ухудшилось: появилась темная моча, слабость, одышка. Больной госпитализирован в ФГБУ «НМИЦ гематологии» 22.10.2003 года. При обследовании в анализе крови выявлены лейкоцитоз ( $76,50,2 \times 10^9/\text{л}$ ), лимфоцитоз ( $58,1 \times 10^9/\text{л}$ ), анемия (64 г/л) и ретикулоцитоз (95%), тромбоцитопения ( $69 \times 10^9/\text{л}$ ). В биохимическом анализе крови билирубин – 71 мкмоль/л (свободная фракция). Положительная прямая реакция Кумбса в титре 1:32. По данным ИФТ опухолевые клетки экспрессировали CD19+, CD5+, CD20+/-, CD22+, CD23+, CD43+, CD79a+, монотипическая экспрессия к- или  $\lambda$ -цепей не выявлялась. Полученные данные свидетельствовали о развитии аутоиммунной гемолитической анемии на фоне ХЛЛ.

Учитывая аутоиммунное осложнение ХЛЛ проводили терапию преднизолоном и иммуноглобулином G. Несмотря на проводимую терапию сохранялись лейкоцитоз ( $72,42 \times 10^9/\text{л}$ ), анемия (53 г/л), ретикулоцитоз (176 ‰), гипербилирубинемия (2 мкмоль/л), тромбоциты – в норме ( $305 \times 10^9/\text{л}$ ). Положительная прямая реакция Кумбса в титре 1:128. В ноябре 2003 года проведена спленэктомия в связи с аутоиммунным гемолизом, рефрактерным к терапии преднизолоном и иммуноглобулином. Иммунофенотип клеток селезенки соответствовал ХЛЛ: CD19+, CD5+, CD20+/-, CD22+, CD23+, CD43+, CD79a+, к-,  $\lambda$ -. В анализе крови от 19.11.2003: гемоглобин – 74 г/л, лейкоциты –  $45,0 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $458 \times 10^9/\text{л}$ , билирубин – 17 мкмоль/л.

Состояние пациента сохранялось стабильным. В гемограмме от октября 2005 года – лейкоцитоз ( $20 \times 10^9/\text{л}$ ), уровень гемоглобина и тромбоцитов – в норме. В анализе крови от 07.09.2010 года: гемоглобин – 151 г/л, лейкоциты –  $34,4 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты –  $29,6 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $458 \times 10^9/\text{л}$ . По данным УЗИ: внутрибрюшные лимфоузлы не увеличены.

При обследовании в сентябре 2013 года в анализе крови выявлено нарастание лейкоцитоза ( $91,1 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфоцитоза ( $81,6 \times 10^9/\text{л}$ ), уровень гемоглобина и тромбоцитов оставался в норме. При физикальном осмотре выявлены единичные подчелюстные и подмышечные лимфоузлы, гепатомегалия (+3 см). В гемограмме от 02.09.2014 года: гемоглобин – 114 г/л, лейкоциты –  $167 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты –  $111,0 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $119 \times 10^9/\text{л}$ .

При повторном исследовании в анализе крови в июне 2015: гемоглобин – 131 г/л, лейкоциты –  $167 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты –  $141 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $119 \times 10^9/\text{л}$ . В связи с прогрессией ХЛЛ была проведена терапия хлорамбуцилом с положительным эффектом, который отмечался в снижении лейкоцитоза и лимфоцитоза. По данным гемограммы от октября 2015 года сохранялся положительный ответ на терапию: гемоглобин – 136 г/л, лейкоциты –  $63,7 \times 10^9/\text{л}$ , лимфоциты –  $29,6 \times 10^9/\text{л}$ , тромбоциты –  $234 \times 10^9/\text{л}$ .

В мае 2017 года повторно диагностирована прогрессия заболевания. В анализе крови 04.05.2017 года выявлены лейкоцитоз ( $178 \times 10^9/\text{л}$ ) и лимфоцитоз ( $160,2 \times 10^9/\text{л}$ ), уровень гемоглобина и тромбоцитов оставался в норме. Состояние пациента осложнялось сопутствующей патологией – хронической сердечной недостаточностью, хронической венозной недостаточностью, тромбозом поверхностных вен правого предплечья, синдромом слабости синусового узла, состоянием после тромбэмболии мелких вен легочной артерии.

Учитывая возраст пациента (80 лет), тяжелые сопутствующие заболевания, 15.05.2017 была начата терапия хлорамбуцилом. После первого приема препарата у пациента возникли симптомы острого нарушения мозгового кровообращения – выраженное головокружение, спутанность сознания, дизартрия. В течение дня состояние стабилизировалось. После второго приема препарата усилились симптомы нарушения мозгового кровообращения. Пациент госпитализирован для обследования и стационарного лечения. При обследовании диагностирован ишемический

инсульт в затылочной и теменно-затылочной областях, проводилась антикоагулянтная, гипотензивная и тромболитическая терапия, пациент прекратил прием хлорамбуцила.

В связи со значительным уменьшением неврологической симптоматики было продолжено обследование для выбора тактики терапии. В анализе крови от 22.09.2017: гемоглобин – 142 г/л, лейкоциты –  $121,8 \times 10^9$ /л, лимфоциты –  $112,8 \times 10^9$ /л, тромбоциты –  $286 \times 10^9$ /л. Перед началом терапии проводились дополнительные молекулярные и молекулярно-цитогенетические исследования.

Для определения мутационного статуса генов варибельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGHV) было выполнено молекулярное исследование крови, по результатам которого выявлен немутированный вариант генов IGHV, ассоциированный с неблагоприятным прогнозом при ХЛЛ.

Культивирование (СЦИ) клеток периферической крови проводили с комбинацией DSP30 и IL2 и с применением LPS и TPA. В культуре, стимулированной DSP30 и IL2, выявлен клон с делецией длинного плеча хромосомы 13 – *del(13)(q12q22)* (Рисунок 34). При культивировании с LPS и TPA клональные aberrации не выявлялись – только в одном митозе обнаружена делеция 13q.

При молекулярно-цитогенетическом исследовании (FISH) мононуклеаров крови с ДНК-зондами к локусам 11q22/ATM, 13q14, 13q34, 17p13/TP53 и центромере хромосомы 12 выявлены интерстициальная делеция 13q14 в одном аллеле и протяженная делеция хромосомы 13 в другом аллеле – отсутствовали сигналы от 13q14 и 13q34 (Рисунок 34). Размер делеции 13q, выявленной по результатам FISH-анализа не соответствовал длине делеции 13q по данным СЦИ.

Для определения перестройки гена тяжелой цепи (IGH) выполнено дополнительное FISH-исследование с ДНК-зондом к локусу 14q32/IGH,

которое выявило снижение интенсивности флуоресцентного сигнала от теломерной части гена IGH (Рисунок 34).

С целью уточнения структуры хромосомы 13, было проведено молекулярное кариотипирование – сравнительная геномная гибридизация (aCGH), по результатам которой были выявлены следующие геномные перестройки: дупликация региона 3q26.1q29 (*arr[hg19]3q26.1q29(167400749\_197837069)x3,30,44 Mb*), делеция локуса 13q14 в двух аллелях и делеция региона 13q13.1q34 в одном аллеле (*arr[hg19]13q13.1q34(33529310\_115093115)x1,81.56 Mb*), делеция региона 14q32.33 (*arr[hg19]14q32.33(106167466\_106852183)x1,684.72Kb*), делеция 22q11.22 (*arr[hg19]22q11.22(22781114\_23208001)x1*). По результатам aCGH подтверждены делеция локуса 13q14 в двух аллелях и делеция региона 13q13.1q34 в одном аллеле, делеция локуса гена IGH - 14q32.33, выявлены дополнительно дупликация региона 3q26.1q29 и делеция локуса 22q11.22.

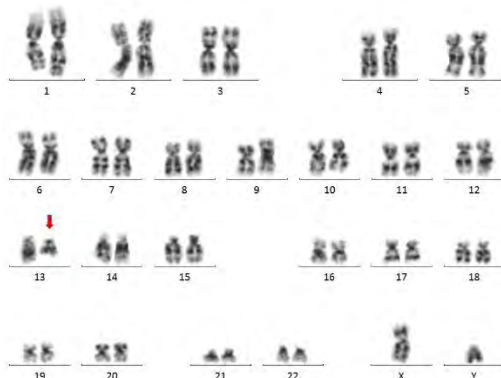
Для подтверждения перестройки с участием региона 3q26.1q29 выполнили FISH-исследование на метафазных пластинках с ДНК-зондом к локусу гена BCL6/3q26.1, которое показало наличие трех сигналов от локуса гена BCL6 в интерфазных ядрах и на метафазных пластинках. На метафазных пластинках флуоресцентные сигналы от локуса гена BCL6 локализовались на двух хромосомах 3 и на деривате хромосомы 13 (Рисунок 34).

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.

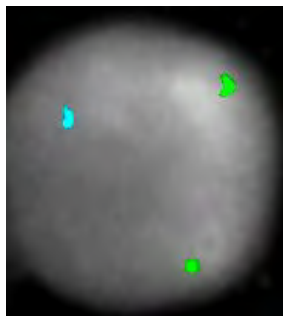
В связи с ухудшением состояния пациента начало курса с применением бендамустина, обинутузумаба и ибрутиниба было отложено. Пациент скончался от повторного ишемического инсульта 18.01.2018 года.

На рисунке 34 представлены результаты СЦИ, FISH (на интерфазных ядрах и метафазных пластинках), aCGH.

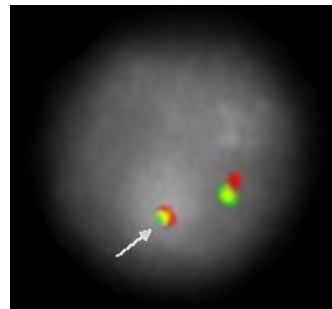
А)



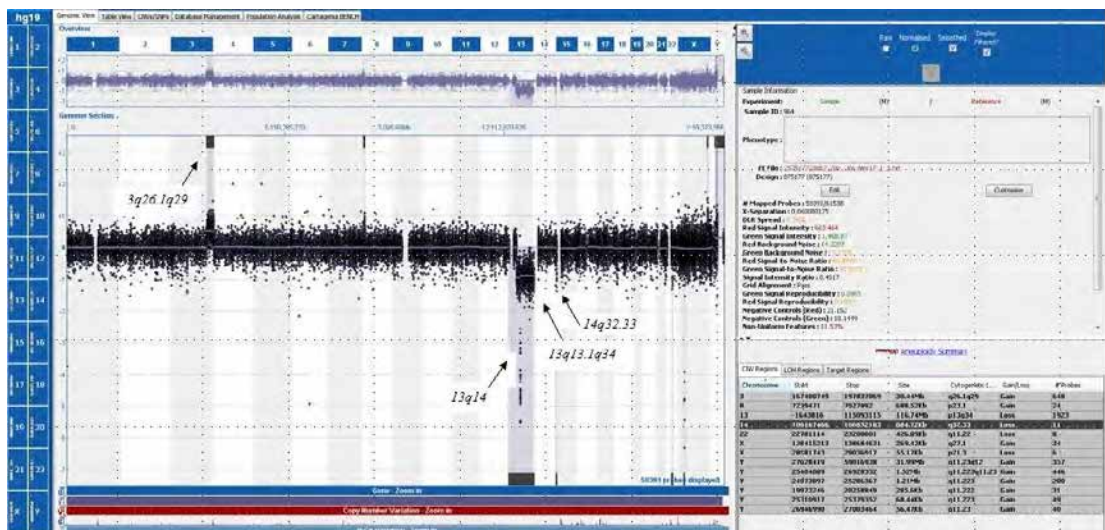
Б)



В)



Г)



Д)

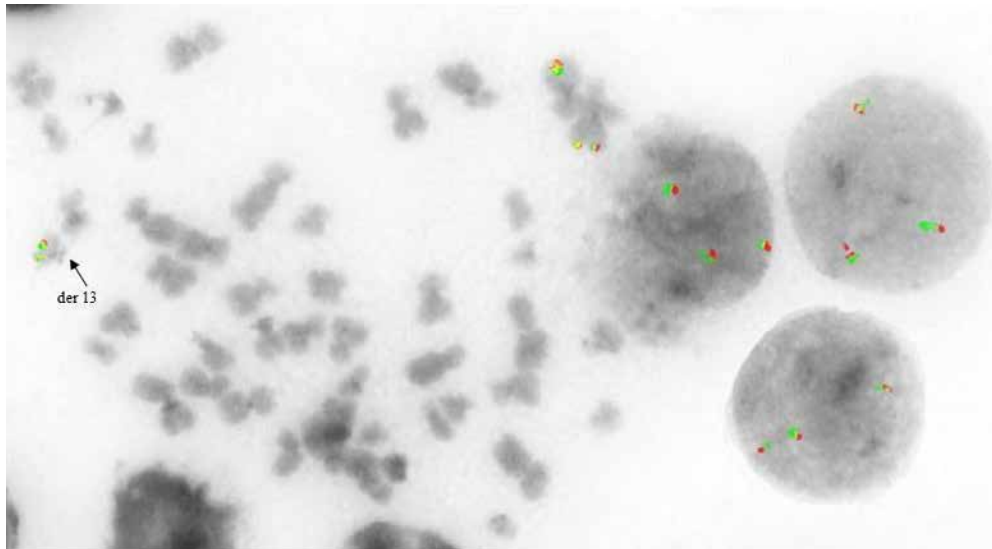


Рисунок 34. Результаты СЦИ, FISH (на интерфазных ядрах и метафазных пластинках), aCGH:

А) Результат культивирования периферической крови больного ХЛЛ с DSP30 и IL2. Выявлена делеция  $del(13)(q12q22)$ .

Б) Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом LSI D13S319/LSI 13q34/CEP12. Выявлены делеция локуса 13q14 в двух аллелях и протяженная делеция хромосомы 13 в другом аллеле – отсутствовали сигналы от 13q14 и 13q34, увеличение  $\times 100$ .

В) Результаты FISH-исследования мононуклеаров крови с ДНК-зондом к локусу генов *IGH/14q32*. Выявлено снижение интенсивности флуоресцентного сигнала от теломерной части гена *IGH*, увеличение  $\times 100$ .

Г) Результаты сравнительной геномной гибридизация (aCGH). Выявлены делеция локуса 13q14 в двух аллелях и делеция 13q13.1q34 в одном аллеле, делеция локуса гена *IGH* - 14q32.33, выявлены дополнительно дупликация региона 3q26.1q29 и делеция локуса 22q11.22.

Д) Результаты FISH-исследования на метафазных пластинках с ДНК-зондом к локусу гена *BCL6/3q26.1*. Дополнительный сигнал от гена *BCL/3q26.1* локализовался на деривате хромосомы 13.

## **Глава 7 Связь отдельных и комплексных нарушений кариотипа с клиническими и биологическими факторами прогноза**

Нами была проанализирована взаимосвязь сбалансированных транслокаций, несбалансированных перестроек и комплексных нарушений кариотипа с клиническими и биологическими факторами прогноза: возраст, стадия по Vinet, мутационный статус генов *IGHV*, концентрация  $\beta$ 2-микроглобулина, наличие CD38-положительных клеток в группе больных с успешными результатами культивирования с DSP30+IL2.

В группе больных, у которых при культивировании с LPS+TPA хромосомные нарушения не определялись, а в культуре с DSP30+IL2 были выявлены хромосомные aberrации, был осуществлен поиск взаимосвязи с клинико-биологическими характеристиками: пол, возраст, стадия по Vinet, концентрация  $\beta$ 2-микроглобулина, наличие антигена CD38 на поверхности опухолевых В-лимфоцитов, мутационный статус генов *IGHV*, группа риска по МПИ, клинический статус на момент исследования (до начала терапии, в прогрессии), наличие сбалансированных транслокаций и несбалансированных перестроек, характерных хромосомных нарушений, выявленных при культивировании с DSP30+IL2 и при FISH-исследовании. При анализе было определено наличие взаимосвязи с делецией 13q14, выявленной при культивировании DSP30+IL2: в тех случаях, в которых хромосомные aberrации не определялись в культуре LPS+TPA, достоверно чаще выявлялась делеция 13q14 в культуре DSP30+IL2 ( $p=0,011$ ). Взаимосвязи с другими клинико-биологическими параметрами не выявлено.

### **Сбалансированные транслокации**

В группе больных со сбалансированными транслокациями достоверной связи с возрастом, со стадией заболевания по Vinet, мутационным статусом генов *IGHV*, уровнем  $\beta$ 2-микроглобулина, наличием CD38-положительных клеток, комплексными нарушениями кариотипа не выявлено. Следует отметить, что из группы больных со сбалансированными транслокациями

были исключены случаи сочетания сбалансированных транслокаций и несбалансированных нарушений. Полученные данные представлены в таблице 20.

Таблица 20. Связь сбалансированных транслокаций с клинико-биологическими параметрами

Клинические и биологические факторы прогноза	Частота изменения значений параметров в группах больных ХЛЛ		p
	со сбалансированным и транслокациями (N=12) число больных (%)	без сбалансированных транслокаций (N=64), число больных (%)	
Возраст:			
≤ 65 лет	7 (58,3)	49 (76,6)	0,9989
> 65 лет	5 (41,7)	15 (23,4)	
Стадия по Binet:			
А	2 (16,7)	15 (23,4)	1,0000
В/С	10 (83,3)	49 (76,6)	
Мутационный статус генов <i>IGHV</i> :			
мутированный вариант	2 (16,7) 5 (41,6)	10 (15,6) 36 (56,3)	0,6500
немутированный вариант	5 (41,7)	18 (28,1)	
нет данных			



β2-микροглобулин: (мг/л):	1 (8,3)	13 (20,3)	0,1848
≤ 3,5	5 (41,7)	12 (18,8)	
> 3,5	6 (50,0)	39 (60,9)	
нет данных			
Иммунофенотипическое исследование крови:			1,0000
наличие CD38	2 (16,6)	16 (25,0)	
отсутствие CD38	5 (41,7)	31 (48,4)	
нет данных	5 (41,7)	17 (26,6)	
Комплексный кариотип:			0,5306
наличие КК	4 (33,3)	30 (46,9)	
отсутствие КК	8 (66,7)	34 (53,1)	

### Несбалансированные перестройки

У пациентов с выявленными в кариотипе несбалансированными перестройками достоверно чаще была установлена стадия В и С согласно системе стадирования по Vinet ( $p = 0,006$ ) и определен немутированный вариант генов *IGHV* ( $p = 0,032$ ). Выявлена статически значимая взаимосвязь несбалансированных перестроек и комплексных нарушений кариотипа: несбалансированные нарушения достоверно чаще обнаруживались в составе КК ( $p < 0,001$ ). Следует отметить, что из группы больных с несбалансированными нарушениями были исключены случаи сочетания несбалансированных перестроек и сбалансированных транслокаций. Результаты анализа представлены в таблице 21.

Таблица 21. Связь несбалансированных нарушений с клинико-биологическими параметрами.

Клинические и биологические факторы прогноза	Частота изменения значений параметров в группах больных ХЛЛ		p
	с несбалансированными нарушениями (N=24), число больных (%)	без несбалансированных нарушений (N=52), число больных (%)	
Возраст: ≤ 65 лет > 65 лет	17 (70,8) 7 (29,2)	39 (75,0) 13 (25,0)	1,000
Стадия по Binet: А В/С	1 (4,2) 23 (95,8)	16 (30,8) 36 (69,2)	<b>0,0086</b>
Мутационный статус генов <i>IGHV</i> : мутированный вариант немутированный вариант нет данных	1 (4,2) 19 (79,2) 4 (16,6)	11 (21,2) 22 (42,3) 19 (36,5)	<b>0,0197</b>
β2-микроглобулин: (мг/л): ≤ 3,5 > 3,5 нет данных	3 (12,5) 4 (16,7) 17 (70,8)	11 (21,2) 13 (25,0) 28 (53,8)	1,0000

Иммунофенотипическое исследование крови:			
наличие CD38	5 (20,8)	13 (25,0)	1,0000
отсутствие CD38	11 (45,8)	25 (48,1)	
нет данных	8 (33,3)	14 (26,9)	
Комплексный кариотип:			
наличие КК	20 (83,3)	14 (26,9)	<0,0001
отсутствие КК	4 (16,7)	38 (73,1)	

### Комплексные нарушения кариотипа

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 и С по Binet ( $p=0,025$ ) и вариант без мутаций генов *IGHV* ( $p=0,045$ ) (Таблица 22). Достоверной связи с возрастом, концентрацией  $\beta 2$ -микроглобулина, наличием CD38-положительных клеток не выявлено.

Таблица 22. Связь комплексных нарушений кариотипа с клинико-биологическими параметрами.

	Частота изменения значений параметров	р
--	---------------------------------------	---

Клинические и биологические факторы прогноза	в группе больных ХЛЛ с комплексным кариотипом (N=33), число больных (%)	группе больных ХЛЛ с без комплексного кариотипа (N=44), число больных (%)	
возраст: ≤ 65 лет > 65 лет	27 (81,8) 9 (27,2)	32 (75,0) 12 (25,0)	0,9790
Стадия по Binet: А В/С	3 (3,3) 30 (96,7)	14 (30,8) 30 (69,2)	<b>0,0252</b>
Мутационный статус генов <i>IGHV</i> : мутированный вариант немутированный вариант нет данных	2 (5,9) 22 (70,6) 8 (23,5)	10 (15,4) 19 (30,8) 15 (53,8)	<b>0,0452</b>
β2-микроглобулин: (мг/л): ≤ 3,5 > 3,5 нет данных	6 (13,3) 8 (23,3) 19 (63,4)	9 (21,2) 9 (23,1) 26 (55,8)	1,0000
Имунофенотипическое исследование крови: наличие CD38 отсутствие CD38 нет данных	7 (16,7) 14 (46,7) 12 (36,6)	14 (28,8) 20 (46,2) 10 (25,0)	0,7757

## Глава 8 Анализ общей выживаемости в зависимости от наличия комплексного кариотипа

Проведен анализ общей выживаемости (ОВ) в группе больных с комплексными нарушениями кариотипа (N=30) и без них (N=40). Выявлены достоверно значимые различия ОВ в двух группах пациентов.

ОВ больных с комплексными нарушениями кариотипа достоверно ниже, 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 данных нарушений медиана не достигнута (Рисунок 34).

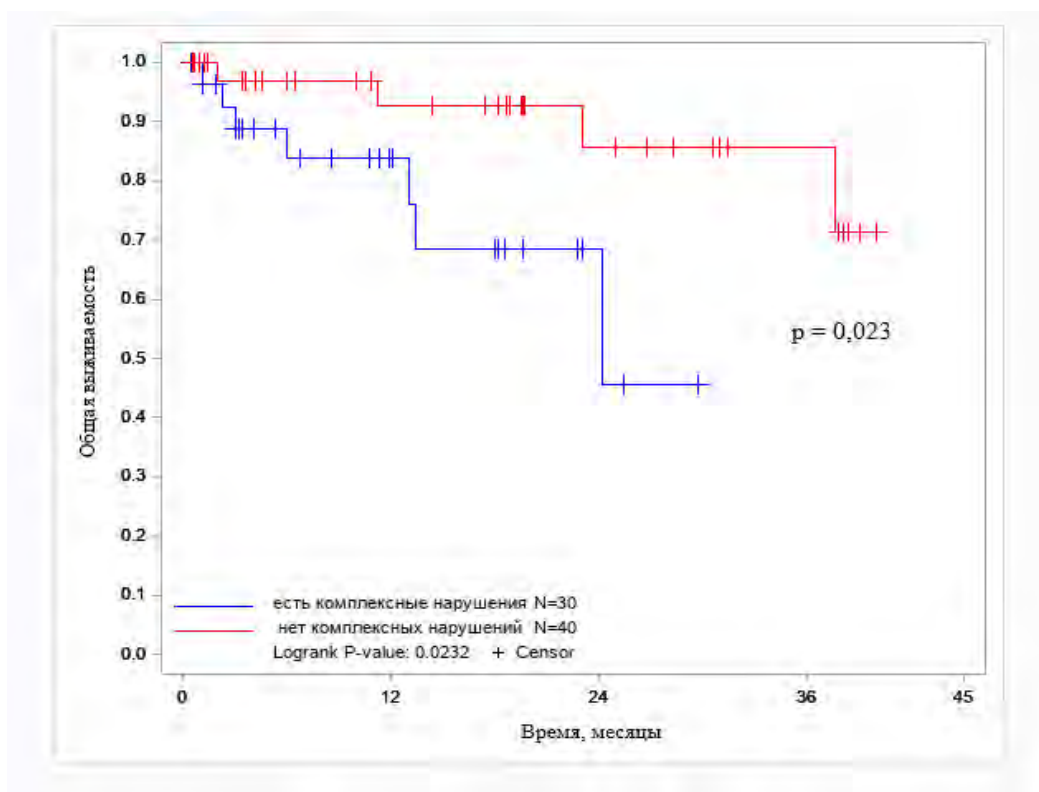


Рисунок 35. ОВ в группе больных ХЛЛ с комплексными нарушениями кариотипа и без них.

В группе больных ХЛЛ с комплексными нарушениями кариотипа с летальным исходом (N=7) у 4 больных были выявлены хромосомные

нарушения с вовлечением 17p13, что было подтверждено методом FISH, и у 4 больных в составе комплексного кариотипа определены 5 и более aberrаций.

## Глава 9 Обсуждение

Хронический лимфолейкоз является самым распространенным видом лейкоза среди взрослого населения. ХЛЛ характеризуется разнообразием клинических проявлений: от вялотекущего до быстро прогрессирующего течения. С целью стратификации пациентов на группы риска используются клинико-биологические параметры, среди которых выделяют генетические нарушения. [37, 70, 107]. Методом FISH с высокой частотой выявляются характерные хромосомные нарушения: делеции 11q22, 13q14, 17p13 и трисомия 12 у больных ХЛЛ [54, 57].

СЦИ является важным диагностическим методом, позволяющим анализировать весь кариотип и предоставляющим к результатам FISH-исследования дополнительную информацию о прогностически значимых хромосомных нарушениях при ХЛЛ [12, 148]. Однако выполнение СЦИ с В-клеточными митогенами (LPS, TPA, PWM) имеет низкую эффективность вследствие того, что зрелые лейкоэмические клетки обладают сниженной пролиферативной активностью [61, 75, 81, 143, 175]. Показано, что CpG-олигонуклеотид DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 является мощным стимулятором деления опухолевых клеток ХЛЛ, преодолевающим точку G<sub>0</sub> клеточного цикла В-клеток ХЛЛ [49, 112].

Результаты проведенного нами исследования показали, что эффективность СЦИ у больных ХЛЛ 1,8 раза выше при культивировании с DSP30 и IL2, чем со стандартными В-клеточными митогенами LPS и TPA: абберантный кариотип выявлен у 51 из 62 (82,3%) и у 29 из 65 (44,6%) больных, соответственно. Полученные данные сопоставимы с данными зарубежных исследований Dicker с соавт. и Haferlach с соавт., в которых частота выявления хромосомных нарушений при СЦИ с использованием DSP30 и IL2 составила 81% и 83%, соответственно [51, 69].

В литературе представлено ограниченное количество исследований, в которых проводились сравнения результатов культивирования с DSP30 с IL2 и В-клеточными митогенами [75, 81, 143, 175, 184]. В работе Wren с соавт.,

анализировавших 26 образцов периферической крови больных ХЛЛ, при культивировании с использованием ТРА абберантный кариотип был обнаружен у 45,8% при наличии митозов у 96% обследованных [175]. В проведенном нами исследовании частота детекции хромосомных нарушений в культуре с LPS и ТРА не отличалась и составила 44,6%.

Напротив, в исследовании Struski с соавт. была показана высокая частота выявления абберантного кариотипа как при культивировании с DSP30 с IL2 - 79% (48 из 71), так и при использовании ТРА - 70% (43 из 71) больных ХЛЛ – результаты достоверно не различались [184]. Однако, достоверные различия были обнаружены в пропорциональном отношении метафаз с выявленными абберациями: при стимулировании с олигонуклеотидом DSP30 и IL2 среднее значение составило 59%, при культивировании с ТРА - 26% метафаз ( $p=0,0265$ ). В нашем исследовании соотношение метафаз с абберациями в культурах DSP30+IL2 и LPS+ТРА составило – 59,3% и 23,0%, соответственно, что согласовалось с литературными данными.

В представленной работе проводился сравнительный анализ культивирования биоматериала разного клеточного состава (периферической крови/костного мозга и мононуклеарных клеток) с использованием двух комбинацией митогенов DSP30+IL2 и LPS+ТРА. Нами показаны достоверно более высокие результаты культивирования клеточной суспензии периферической крови или костного мозга: среднее значение количества делящихся клеток составило 13,6 при сравнении с результатами культивирования мононуклеарных клеток - 8,2 ( $p=0,035$ ). Насколько известно, подобное сравнение не проводилось в других исследованиях. Тем не менее по имеющимся рекомендациям Международной рабочей группы по изучению ХЛЛ (iwCLL) для проведения СЦИ необходимо использовать клетки периферической крови [70].

В данной работе выделена группа дополнительно выявленных хромосомных нарушений в культуре с DSP30+IL2. У 23 из 92 (25,0%) больных хромосомные абберации были обнаружены только при культивировании с



DSP30+IL2, в то время как в культуре с LPS+TPA у 8 больных выявлены неклональные нарушения (хромосомные aberrации обнаружены в одной из 20 метафаз) и у 5 пациентов отсутствовали митозы.

Группа больных с дополнительно выявленными aberrациями характеризовалась высокой частотой выявления комплексного кариотипа (52,2%) и хромосомных нарушений с вовлечением локусов 11q22 (34,8%) и 13q14 (30,4%). Достоверно более высокая частота выявления комплексного кариотипа и хромосомных нарушений 13q при специфической стимуляции DSP30 и IL2 подтверждена в сравнительном анализе, представленном в разделе 3.2. Полученные результаты согласуются данными литературы [143, 154]. В исследовании Shi с соавт. показано, что наиболее часто встречающимся хромосомным нарушением, выявленным только при стимуляции DSP30 и IL2, является делеция 13q – 41,2% (7 из 17) пациентов [154], что также подтверждается в исследовании Put с соавт. [143].

В проведенном исследовании было выполнено сравнение группы с дополнительно выявленными aberrациями при специфической стимуляции (группа 1) с группами с нормальным кариотипом (группа 2) и aberrантным кариотипом, выявленным одновременно как в культуре с DSP30 и IL2, так и в культуре с LPS и TPA (группа 3) в разделе 3.2.1. На сроке наблюдения 32 месяца ОВ в группе 2 составила 100%, в группе 3 – 85,7%, в группе 1 - 76,1%. Несмотря на то, что в трех группах пациентов не выявлено достоверно значимых различий ОВ ( $p = 0,286$ ), замечена тенденция к снижению показателей ОВ в группе 2 и самым низким показателем в группе 1. Это можно объяснить тем, группа 1 имеет определенные клинико-биологические особенности. В данной группе преобладали пациенты без мутаций генов *IGHV* (69,2%) и с комплексными нарушениями кариотипа, из которых 43,5% составили больные в прогрессии и рецидиве заболевания. Как известно, комплексный кариотип и немутированный вариант генов *IGHV* являются неблагоприятными факторами прогноза ХЛЛ. Тем более, что у больных ХЛЛ

в прогрессии и рецидиве заболевания увеличивается частота детекции комплексного кариотипа (КК) [16, 34, 72, 147].

По данным литературы частота выявления комплексных нарушений в группе больных до лечения составляет 9,5 – 28,6% [25, 69, 104, 141, 147]. Частота КК значительно увеличивается до 42-47% при обследовании больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ [13, 23, 27, 80]. В настоящем исследовании частота выявления КК была достоверно выше в культуре DSP30-стимулированных лимфоцитов и составила 40,0% по сравнению с частотой выявления КК в культуре с В-клеточными митогенами – 18,5% ( $p=0,035$ ) случаев. Достоверно значимые различия частоты выявления КК при специфической стимуляции DSP30 и IL2 были обнаружены в группах до начала терапии и в прогрессии/рецидиве заболевания - 30,8% и 55,3% ( $p=0,039$ ), соответственно. Полученные результаты, в целом, согласуются с данными литературы и подтверждают повышение частоты детекции КК при резистентном и рецидивирующем течении ХЛЛ.

Показано, что комплексный кариотип является неблагоприятным фактором прогноза у больных ХЛЛ [34, 82, 104]. Комплексные нарушения кариотипа коррелируют с коротким временем до начала терапии и низкой ОВ у больных ХЛЛ [34, 149]. В крупном чешском исследовании во главе с Kruzova с соавт. оценивалось прогностическое значение КК у 644 больных, обследованных до начала терапии. Медиана 12-летней ОВ в группе КК составила 77 месяцев, в группе без КК – 115 месяцев ( $p<0,0001$ ) [104]. В данном исследовании КК был выявлен у 12,3% (у 79 из 644) пациентов. В нашей работе медиана ОВ больных с КК составила 24 месяца, а медиана ОВ пациентов без КК не достигнута ( $p=0,023$ ). Меньшее значение медианы ОВ больных с КК можно объяснить наличием в обследуемой выборке 47% пациентов с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ. Так, в исследовании Vadoux с соавт., анализировавших 284 пациента с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ на фоне лечения FCR, медиана ОВ в группе с комплексным кариотипом (12,1%) составила 26 месяцев [15].

По данным литературы КК ассоциируется с неблагоприятными прогностическими факторами такими, как делеция 17p и/или мутации *TP53*, немутированный вариант генов *IGHV* и продвинутые стадии по Binet [17, 172, 182]. Также в литературе описана взаимосвязь комплексных нарушений кариотипа с делециями 17p и 11q [16, 50]. По мнению ряда авторов именно с этой корреляцией связано неблагоприятное прогностическое значение КК [16, 69, 79]. Однако Thompson с соавт. и Rigolin с соавт. показали, что комплексный кариотип является неблагоприятным фактором прогноза вне зависимости от наличия делеции 17p [149, 167]. В проведенном нами исследовании хромосомные нарушения с вовлечением 17p были определены только у 39,4% больных с комплексным кариотипом. В 65,2% случаев с комплексными нарушениями без делеции 17p в кариотипе присутствовала делеция 11q. Таким образом, в большинстве случаев выявления КК отсутствовали хромосомные нарушения с вовлечением 17p.

Нами показана достоверная взаимосвязь комплексного кариотипа с неблагоприятными факторами прогноза: со стадией заболевания и мутационным статусом генов *IGHV*. Достоверно чаще в группе больных с комплексным кариотипом диагностировали стадию В и С по Binet ( $p=0,025$ ) и вариант без мутаций генов *IGHV* ( $p=0,045$ ). Таким образом, подтверждается неблагоприятное прогностическое значение КК, включающее менее половины (39,4%) больных с хромосомными aberrациями 17p и более половины (51,5%) больных с пятью и более хромосомными нарушениями.

На сегодняшний день предметом обсуждения является прогностическое значение количества хромосомных нарушений в составе комплексного кариотипа ( $\geq 3$  либо  $\geq 5$  хромосомных нарушений). Baliakas со авт. в своей прогностической модели предложили в зависимости от выявленных количественных и структурных хромосомных aberrаций выделять 3 группы риска больных с КК [17]. Авторы продемонстрировали, что наличие 5 и более aberrаций (группа высокого риска) является неблагоприятным прогностическим маркером независимо от наличия других неблагоприятных

прогностических факторов (немутированного варианта генов *IGHV*, делеции или мутации *TP53*) [17]. В то время как, КК с 3 и более (группа низкого риска) и с 4 и более нарушениями (группа среднего риска) имел прогностическую значимость только при наличии делеции или мутации *TP53*. Однако в недавнем исследовании Kruzova с соавт. показали, что КК с 3 и более абберациями не теряет своего прогностического значения, кроме того количество аномалий (менее 5 или более 5) не влияет на ОВ [104]. В нашем исследовании доказано неблагоприятное прогностическое влияние КК с 3 и более абберациями ( $p=0,023$ ) на ОВ больных ХЛЛ. Таким образом, полученные нами данные имеют свою актуальную значимость.

Более того, структурные хромосомные нарушения, выявленные в составе КК, в частности несбалансированные перестройки (несбалансированные транслокации, маркерные, дериватные, дицентрические хромосомы и др.), имеют неблагоприятное прогностическое значение у больных ХЛЛ [16, 149, 168, 172]. Несбалансированные перестройки выявляются 35-73% больных с КК и ассоциируются с делецией 17p, немутированным вариантом генов *IGHV* [16, 149, 172]. В исследовании Rigolin с соавт. показано, что случаи выявления несбалансированных перестроек в составе КК достоверно связаны с укорочением времени до начала терапии и низкой ОВ по сравнению с КК, в составе которого выявлены сбалансированные транслокации, делеции, моносомии и трисомии хромосом. В выполненном нами исследовании несбалансированные перестройки в составе КК обнаруживались у 23 из 33 (84,8%), что несколько выше данных литературы. Возможно, это связано с высокой частотой выявления КК (42,6%) в данной работе. Выявлена достоверно значимая взаимосвязь несбалансированных перестроек с КК ( $p<0,001$ ), немутированным вариантом *IGHV* ( $p=0,0197$ ) и продвинутыми стадиями по Vinet ( $p=0,0086$ ). Таким образом, наше исследование подтверждает, что несбалансированные перестройки ассоциированы с неблагоприятными факторами прогноза ХЛЛ.

Проведен дополнительный анализ 18 случаев, выявленных при кариотипировании несбалансированных перестроек, с помощью mFISH и mBAND. С высокой частотой определены повторяющиеся хромосомные нарушения, среди которых в 12 случаях выявлен дополнительный хромосомный материал (2q, 3q, 4q, 7q, 8q, 9p, 12p, 12q, 20q) и в 7 случаях несбалансированные транслокации сопровождались делецией: Xq, 8p, 10q, 13q, 16p, 17p. Кроме того, в 5 (27,8%) случаях несбалансированных транслокаций с участием хромосомы 8, определенных при mFISH, подтверждена дупликация 8q24/*MYC* методом FISH. Все случаи с дупликацией 8q были выявлены у больных до начала терапии. В исследовании Blanco с соавт. было продемонстрировано, что делеция 8p (8p-) и дополнительный материал 8q (8q+) оказывают достоверно значимое влияние на ОВ в однофакторном анализе [23], что подтверждалось и другими исследователями [36, 111]. Сообщается, что 8p- и 8q+ достоверно чаще выявляются у больных с КК [23, 111].

Среди сбалансированных транслокаций у 7 из 77 (9,1%) пациентов выявлены транслокации, затрагивающие локус генов *IGH/4q32*: t(2;14)(p14-15;q31-32), t(6;14)(p21;q32), t(8;14)(q24;q32), t(9;14)(p13;q31-32), t(14;19)(q32;q13). Во всех случаях перестройка гена *IGH/14q32* подтверждена методом FISH. С наибольшей частотой определялась транслокация t(14;19)(q32;q13) – у 3 из 7 (42,6%) больных. Выявленные транслокации описаны в литературе, и определены гены-партнеры, участвующие в транслокациях с перестройкой гена *IGH*: *BCL3/19q13*, *PAX-5/9p13*, *CCND3/6p21*, *MYC/8q24* [35, 78, 111, 181]. В одном случае локус 2p14-p15 партнерской хромосомы не соответствовал описанному в литературе: 2p13/*BCL11A* [69, 151]. В недавнем исследовании Socola с соавт. было доказано, что ген *BCL11A* локализуется в локусе 2p16, а не в 2p13, как утверждают многие исследователи [156]. Из представленных данных можно заключить, что, вопрос о локализации гена-кандидата на партнерской хромосоме 2 остается спорным и требует изучения. По данным литературы

известно, что транслокации с вовлечением локуса гена *IGH* встречаются в 5-7% случаев и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом у больных ХЛЛ [35, 69, 151]. Нами не выявлена взаимосвязь сбалансированных транслокаций с факторами неблагоприятного прогноза: немутированным вариантом генов *IGHV*, комплексным кариотипом.

В данной работе показано, что выявляемые при FISH делеции 13q14, 11q22, 17p13 могут в отдельных случаях сопровождаться при СЦИ сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах, что согласуется с данными других авторов [16, 69]. Были выявлены делеция 13q и  $t(13;18)(q14;p11)$  в разных субклонах, несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 11q22 и различные хромосомные aberrации – делеции, сбалансированные или несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 17p13/*TP53*. При исследовании методом mFISH кариотипа больного с  $t(13;18)(q14;p11)$  выявлена сложная транслокация  $t(13;15;18)(q14.1;q11;p10)$ . Возможно, что все случаи объединяет схожее развитие клональной эволюции: возникновение в исходном клоне делеции, затем в ходе опухолевой прогрессии образование субклонов со сбалансированными и несбалансированными транслокациями в известной точке разрыва хромосомы и в целом нарастание геномной нестабильности.

В нашем исследовании у больного с делецией 13q, определяемой при СЦИ и FISH, были выявлены дополнительные хромосомные нарушения с помощью сравнительной геномной гибридизации (aCGH). В культуре, стимулированной DSP30 и IL2, выявлен клон с делецией длинного плеча хромосомы 13 –  $del(13)(q12q22)$ . Методом FISH выявлены интерстициальная делеция 13q14 в одном аллеле и протяженная делеция хромосомы 13 в другом аллеле – отсутствовали сигналы флуоресценции от локусов 13q14 и 13q34. Так размер делеции 13q, выявленной по результатам FISH-анализа, не соответствовал длине делеции 13q при СЦИ. С целью уточнения структуры хромосомы 13 была проведена 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. Как известно, дупликация локуса 3q26 является одной из самых частых aberrаций, выявляемых при aCGH, которое оказывает неблагоприятное прогностическое влияние на ОВ и на время до начала терапии у больных ХЛЛ [28, 77]. Многие исследователи подтверждают тот факт, что использование aCGH позволяет выявлять дополнительные хромосомные aberrации, имеющие прогностическое значение при ХЛЛ [66, 109, 185].

Частичная трисомия хромосомы 12 в виде несбалансированной транслокации t(12;16)(q14;q23) была определена только при культивировании в виду того, что в набор для проведения FISH-исследования включена проба, которая представляет собой ДНК-зонд к центромерному региону хромосомы 12. Для подтверждения частичной трисомии хромосомы 12 мы использовали ДНК-зонд к локусу гена *MDM2*/12q15. В литературе описано, что трисомия хромосомы 12 может быть представлена как в виде полной, так и в виде частичной трисомии [22, 85]. Считается, что нет отличия в прогностическом значении полной и частичной трисомии в виду того, что частичная трисомия происходит за счет дупликации региона q13q22 хромосомы 12 [85]. Таким образом, СЦИ позволяет с более высокой точностью выявлять частичную дупликацию 12q.

В представленном нами клиническом случае показана необходимость выполнения цитогенетического исследования до начала терапии. в случае ХЛЛ, синхронно протекающего с МДС. С помощью двух методов СЦИ и FISH

выявлено два независимых опухолевых клона с характерными для ХЛЛ и МДС хромосомными aberrациями – частичной трисомией 12q и делецией 5q. Выявленные аномалии кариотипа учитывались при определении прогноза каждого заболевания и выборе тактики терапии, а также являлись цитогенетическими маркерами эффективности проводимого лечения. Необходимость выполнения СЦИ со специфической стимуляцией у больных ХЛЛ подтверждается рекомендациями iwCLL [70].

Результаты СЦИ и FISH различаются по частоте выявленных хромосомных аномалий. В настоящем исследовании наиболее часто встречающейся хромосомной aberrацией по результатам FISH-исследования была делеция 13q14, которая выявлена в 37 из 92 (35,1%) случаях. При СЦИ делеция 13q была определена только у 13 из 77 (16,9%) пациентов в культуре с DSP30+IL2. Следовательно, вероятность обнаружения делеции 13q14 при FISH-анализе была в 2 раза выше, чем при СЦИ. Описано, что делеция 13q14 более чем в половине случаев является субмикроскопической и не определяется при СЦИ [51, 86, 154]. Расхождение результатов детекции хромосомных нарушений с вовлечением 13q14, выявленных при FISH и СЦИ, можно объяснить разной разрешающей способностью двух методов. Некоторые хромосомные aberrации являются субмикроскопическими и не обнаруживаются при СЦИ [73]. Так были выявлены единичные случаи отсутствия делеции 11q22 и 17p13 в кариотипе у больных с выявленными делециями 11q22 и 17p13 (2,6% и 1,3%) при FISH-исследовании.

В проведенном исследовании частота выявления делеции 11q в культуре DSP30+IL2 и методом FISH составила 24 из 77 (31,2%) и 30 из 92 (32,6%). Согласно литературным данным, делеция 11q на момент диагностики определяется у 12-19% больных ХЛЛ методом FISH [3, 54, 69]. Можно предположить, что более низкая выявляемость делеции 13q и более высокая частота делеции 11q связана с включением в исследование больных с прогрессирующим и рефрактерным течением заболевания, которое



характерно для больных с делецией 11q. По данным FISH делеция 11q выявлена у 31,6% (12 из 38) больных в прогрессии и рецидиве заболевания.

Так, согласно полученным нами данным при использовании двух методов исследования, СЦИ и FISH, увеличилась частота выявления хромосомных aberrаций до 90,2%. Так при отсутствии митозов (N=15) и хромосомных aberrаций (N=12) при кариотипировании с DSP30+IL2 были определены хромосомные aberrации методом FISH у 18 больных, среди них: делеция 13q14 - в 12, делеция 11q22 - у 3, сочетание делеции 11q22 и трисомии 12 - у одного, сочетание делеций 11q22 и 13q14 - у одного, сочетание делеций 13q14 и 17p13 - у одного. У 17 больных с отсутствием характерных хромосомных aberrаций, детектируемых методом FISH, цитогенетические аномалии были обнаружены методом СЦИ с DSP30+IL2 у 8 из 17 (47,1%) больных: сбалансированные транслокации – у 3 больных, в том числе с перестройкой генов *IGH/14q32* – у 2 больных, делеция длинного плеча хромосомы 6, частичная трисомия по длинному плечу хромосомы 12, комплексные нарушения кариотипа у (3 больных).

Таким образом, СЦИ со специфической стимуляцией DSP30 и IL2 является высокоэффективным методом, позволяющим дополнительно к FISH-исследованию выявлять хромосомные aberrации, имеющие неблагоприятное прогностическое значение при ХЛЛ. Использование методов СЦИ и FISH в сочетании с дополнительными молекулярно-цитогенетическими методами (mFISH, mBAND, aCGH) позволяет детально охарактеризовать кариотип как при диагностическом обследовании больных ХЛЛ, так и в прогрессии и рецидиве заболевания, что имеет важное значение для определения групп риска и адекватной терапевтической тактики.

## Заключение

В работе представлены данные исследований 97 случаев ХЛЛ методами СЦИ и FISH. Проанализированы спектр и частота выявления хромосомных aberrаций двумя методиками культивирования и методом FISH. Оценена связь хромосомных нарушений с неблагоприятными факторами прогноза.

Получены данные сравнительного анализа культивирования с двумя комбинациями митогенов: DSP30 в сочетании с IL2 и LPS с TPA, которые подтверждают и дополняют ранее опубликованные исследования, свидетельствующие о достоверно более высокой эффективности использования DSP30 и IL2 по сравнению с В-клеточными митогенами LPS и TPA для выявления aberrантного кариотипа при СЦИ у больных ХЛЛ.

Показано достоверное различие частоты выявления aberrантного кариотипа, в том числе делеции 17p13 и комплексного кариотипа, несбалансированных перестроек в группах больных до начала терапии и в прогрессии и рецидиве на фоне терапии, что указывает на развитие клональной эволюции при ХЛЛ.

При анализе данных СЦИ и FISH в 9 случаях (9,3%) выявлены структурные хромосомные нарушения – сбалансированные и несбалансированные транслокации, сопровождающиеся делецией характерных для ХЛЛ локусов 11q22, 13q14 и 17p13, а также сбалансированные и несбалансированные транслокации с вовлечением длинного плеча хромосомы 12. В одном случае только при культивировании выявлена частичная трисомия 12q.

Установлена взаимосвязь несбалансированных перестроек, определенных как в составе комплексного кариотипа, так изолированно или в сочетании с одним нарушением, с неблагоприятными факторами прогноза: со стадией В и С по Binet ( $p = 0,0086$ ), немутированным вариантом генов *IGHV* ( $p = 0,032$ ) и комплексными нарушениями кариотипа ( $<0,0001$ ). У

больных с комплексным кариотипом достоверно чаще диагностируется стадия В и С по Binet ( $p = 0,025$ ) и вариант без мутаций генов *IGHV* ( $p = 0,045$ ).

Выявлена неблагоприятная прогностическая значимость влияния комплексных нарушений кариотипа на общую выживаемость больных ХЛЛ.

## 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 ТРА: аберрантный 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 аберрантного 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 момент прогрессии и рецидива для выявления дополнительных параметров для стратификации больных на группы риска и выбора адекватной терапии.

## Список сокращений

- ВБП – выживаемость без прогрессирования
- ГСК – гемопоэтические стволовые клетки
- ДИ – доверительный интервал
- ИФТ – иммунофенотипическое исследование
- КК – комплексный кариотип
- МПИ – международный прогностический индекс
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ОВ – общая выживаемость
- ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
- ОР – отношение рисков
- МОБ – минимальная остаточная болезнь
- СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование
- ХЛЛ – хронический лимфолейкоз
- aCGH – сравнительная геномная гибридизация
- ATM* – ген протеинкиназы АТМ (*ataxia telangiectasia mutated*)
- BCR – В-клеточный рецептор
- CDR – регион, определяющий комплементарность варибельной области иммуноглобулинов
- CNA – абберрации числа копий
- DSP30 – CpG-олигонуклеотид DSP30
- DSP30+IL2 – использование комбинации CpG-олигонуклеотида DSP30 и интерлейкина-2
- FC – флударабин, циклофосфамид
- FCR – флударабин, циклофосфамид, ритуксимаб
- FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*
- Ig – иммуноглобулин
- IGH* – гены тяжелой цепи иммуноглобулинов
- IGHV* – гены варибельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов
- IL2 – интерлейкин – 2

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

U-CLL – немутированный вариант варибельных генов тяжелой цепи иммуноглобулинов

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

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

LSI – локуспецифические пробы (locus specific identifiers)

M-CLL – мутированный вариант варибельных генов тяжелой цепи иммуноглобулинов

MDR – минимальный делетированный регион

*MYC* – протоонкоген myelocytomatosis viral homolog

PWM – В-клеточный стимулятор, получаемый из лаконоса (pokeweed mitogen)

TLR – Toll-подобные рецепторы

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

*TP53* – ген-супрессор опухолевого роста

## Список литературы

1. Атлас. Опухоли лимфатической системы // под ред. А.И. Воробьева, А.М. Кременецкой. – М : НЬЮДИАМЕД, 2007. – 294с.
2. Бидерман Б.В. Репертуар генов тяжелой цепи иммуноглобулинов при В-клеточном хроническом лимфолейкозе в России и Беларуси / Б. В. Бидерман, Е. А. Никитин, Т. Ф. Сергиенко, А. В. Бакун, И. Б. Тарас, А. И. Свирновский, А. Б. Судариков // Онкогематология – 2012. – Т. 7 – № 3 – 38–42с.
3. Захарова А.И. Цитогенетические нарушения при хроническом В-клеточном лимфолейкозе и их связь с клинико-биологическими особенностями и прогнозом заболевания / А. И. Захарова, Т. Н. Обухова, Ю. Ю. Лорие, Е. А. Никитин, Р. С. Самойлова, Б. В. Зингерман, Е. В. Домрачева // Тер архив – 2006. – Т. 78 – № 7 – 57–62с.
4. Злокачественные новообразования в России в 2018 (заболеваемость и смертность) // под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. – М: МНИМОИ им.А.П. Герцена - филиал ФГБУ “НМИРЦ” Минздрава России, 2018.– 250с.
5. Карселадзе А.И. Реакция флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH - реакция) в диагностике онкологических заболеваний / А. И. Карселадзе – М : Медицина, 2009.– 2–12с.
6. Ольшанская Ю.В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах / Ю. В. Ольшанская, Е. В. Домрачева – М : МЕДпресс-информ, 2006.– 7–12с.
7. Рубцов Н.Б. Методы работы с хромосомами млекопитающих: учебное пособие / Н. Б. Рубцов – Новосибирск: Федеральное агентство по образованию, Новосибирский государственный университет, Институт цитологии и генетики СО РАН, 2006.– 12–54с.
8. Рабсон А. Основы медицинской иммунологии. Пер. с англ / А. Рабсон, А. Ройт, П. Делвз – М : МИР, 2006.– 42–47с.
9. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний под редакцией академика И.В.



Поддубной, академика В.Г. Савченко. – М : Национальное гематологическое общество, 2018. – 179–200с.

10. Ярилин А.А. Иммунология : учебное пособие / А. А. Ярилин – М: ГЕОТАР-МЕД, 2010.– 302–310с.

11. Altekruise S. SEER cancer statistics review, 1975-2007 [Электронный ресурс]. URL: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:CANCER+STATISTICS+REVIEW+1975-2007#0>.

12. Juliusson G. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. / G. Juliusson, K. H. Robèrt, A. Ost, K. Friberg, P. Biberfeld, B. Nilsson, L. Zech, G. Gahrton // Blood – 1985. – Т. 65 – № 1 – 134–141с.

13. Anderson M.A. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. / M. A. Anderson, C. Tam, T. E. Lew, S. Juneja, M. Juneja, D. Westerman, M. Wall, S. Lade, A. Gorelik, D. C. S. Huang, J. F. Seymour, A. W. Roberts // Blood – 2017. – Т. 129 – № 25 – 3362–3370с.

14. Arvaniti E. Toll-like receptor signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia: distinct gene expression profiles of potential pathogenic significance in specific subsets of patients. / E. Arvaniti, S. Ntoufa, N. Papakonstantinou, T. Touloumenidou, N. Laoutaris, A. Anagnostopoulos, K. Lamnissou, F. Caligaris-Cappio, K. Stamatopoulos, P. Ghia, M. Muzio, C. Belessi // Haematologica – 2011. – Т. 96 – № 11 – 1644–1652с.

15. Badoux X.C. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab chemoimmunotherapy is highly effective treatment for relapsed patients with CLL. / X. C. Badoux, M. J. Keating, X. Wang, S. M. O'Brien, A. Ferrajoli, S. Faderl, J. Burger, C. Koller, S. Lerner, H. Kantarjian, W. G. Wierda // Blood – 2011. – Т. 117 – № 11 – 3016–3024с.

16. Baliakas P. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. / P. Baliakas, M. Iskas, A. Gardiner, Z. Davis, K. Plevova, F. Nguyen-Khac, J.

Malcikova, A. Anagnostopoulos, S. Glide, S. Mould, K. Stepanovska, M. Brejcha, C. Belessi, F. Davi, S. Pospisilova, A. Athanasiadou, K. Stamatopoulos, D. Oscier // *Am. J. Hematol.* – 2014. – T. 89 – № 3 – 249–255c.

17. Baliakas P. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. / P. Baliakas, S. Jeromin, M. Iskas, A. Puiggros, K. Plevova, F. Nguyen-Khac, Z. Davis, G. M. Rigolin, A. Visentin, A. Xochelli, J. Delgado, F. Baran-Marszak, E. Stalika, P. Abrisqueta, K. Durechova, G. Papaioannou, V. Eclache, M. Dimou, T. Iliakis, R. Collado, M. Doubek, M. J. Calasanz, N. Ruiz-Xiville, C. Moreno, M. Jarosova, A. C. Leeksa, P. Panayiotidis, H. Podgornik, F. Cymbalista, A. Anagnostopoulos, L. Trentin, N. Stavroyianni, F. Davi, P. Ghia, A. P. Kater, A. Cuneo, S. Pospisilova, B. Espinet, A. Athanasiadou, D. Oscier, C. Haferlach, K. Stamatopoulos // *Blood* – 2019. – T. 133 – № 11 – 1205–1216c.

18. Baliakas P. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. // *Haematologica.* – 2016. – T. 101. – № 7. – e299-302c.

19. Baskar S. Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. / S. Baskar, K. Y. Kwong, T. Hofer, J. M. Levy, M. G. Kennedy, E. Lee, L. M. Staudt, W. H. Wilson, A. Wiestner, C. Rader // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – T. 14 – № 2 – 396–404c.

20. Bauer S. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition / S. Bauer, C. J. Kirschning, H. Hacker, V. Redecke, S. Hausmann, S. Akira, H. Wagner, G. B. Lipford // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2001. – T. 98 – № 16 – 9237–9242c.

21. Binet J.L. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J. L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguët, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes, F. Gremy // *Cancer* – 1981. – T. 48 – № 1 – 198–206c.

22. Bird M.L. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic

leukemia and their clinical correlations. / M. L. Bird, Y. Ueshima, J. D. Rowley, J. M. Haren, J. W. Vardiman // *Leukemia* – 1989. – T. 3 – № 3 – 182–191c.

23. Blanco G. Karyotypic complexity rather than chromosome 8 abnormalities aggravates the outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 aberrations. / G. Blanco, A. Puiggros, P. Baliakas, A. Athanasiadou, M. García-Malo, R. Collado, A. Xochelli, M. Rodríguez-Rivera, M. Ortega, M. J. Calasanz, E. Luño, M. Vargas, J. Grau, C. Martínez-Laperche, A. Valiente, J. Cervera, A. Anagnostopoulos, E. Gimeno, E. Abella, E. Stalika, J. M. Hernández-Rivas, F. J. Ortuño, D. Robles, A. Ferrer, D. Ivars, M. González, F. Bosch, P. Abrisqueta, K. Stamatopoulos, B. Espinet // *Oncotarget* – 2016. – T. 7 – № 49 – 80916–80924c.

24. Braekeleer M. DE Immunoglobulin gene translocations in chronic lymphocytic leukemia: A report of 35 patients and review of the literature. / M. DE Braekeleer, C. Tous, N. Gueganic, M.-J. LE Bris, A. Basinko, F. Morel, N. Douet-Guilbert // *Mol. Clin. Oncol.* – 2016. – T. 4 – № 5 – 682–694c.

25. Brejcha M. Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia detected by fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetics after stimulation with CpG oligonucleotides and interleukin-2: a prospective analysis. / M. Brejcha, M. Stoklasová, Y. Brychtová, A. Panovská, K. Štěpanovská, G. Vaňková, K. Plevová, A. Oltová, K. Horká, Š. Pospíšilová, J. Mayer, M. Doubek // *Leuk. Res.* – 2014. – T. 38 – № 2 – 170–175c.

26. Brezinschek H.P. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. / H. P. Brezinschek, S. J. Foster, R. I. Brezinschek, T. Dörner, R. Domiati-Saad, P. E. Lipsky // *J. Clin. Invest.* – 1997. – T. 99 – № 10 – 2488–2501c.

27. Bris Y. Le Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia / Y. Le Bris, S. Struski, R. Guièze, C. Rouvellat, N. Prade, X. Troussard, O. Tournilhac, M. C. Béné, E. Delabesse, L. Ysebaert // *Hematol. Oncol.* – 2017. – T. 35 – № 4 – 664–

670c.

28. Brown J.R. Integrative genomic analysis implicates gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in chronic lymphocytic leukemia. / J. R. Brown, M. Hanna, B. Tesar, L. Werner, N. Pochet, J. M. Asara, Y. E. Wang, P. Dal Cin, S. M. Fernandes, C. Thompson, L. Macconail, C. J. Wu, Y. Van de Peer, M. Correll, A. Regev, D. Neuberger, A. S. Freedman // *Clin. Cancer Res.* – 2012. – T. 18 – № 14 – 3791–3802c.

29. Brown J.R. Extended follow-up and impact of high-risk prognostic factors from the phase 3 RESONATE study in patients with previously treated CLL/SLL. / J. R. Brown, P. Hillmen, S. O'Brien, J. C. Barrientos, N. M. Reddy, S. E. Coutre, C. S. Tam, S. P. Mulligan, U. Jaeger, P. M. Barr, R. R. Furman, T. J. Kipps, F. Cymbalista, P. Thornton, F. Caligaris-Cappio, J. Delgado, M. Montillo, S. DeVos, C. Moreno, J. M. Pagel, T. Munir, J. A. Burger, D. Chung, J. Lin, L. Gau, B. Chang, G. Cole, E. Hsu, D. F. James, J. C. Byrd // *Leukemia* – 2018. – T. 32 – № 1 – 83–91c.

30. Buggins A.G.S. Evidence for a macromolecular complex in poor prognosis CLL that contains CD38, CD49d, CD44 and MMP-9. / A. G. S. Buggins, A. Levi, S. Gohil, K. Fishlock, P. E. M. Patten, Y. Calle, D. Yallop, S. Devereux // *Br. J. Haematol.* – 2011. – T. 154 – № 2 – 216–222c.

31. Burger J.A. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. / J. A. Burger, N. Tsukada, M. Burger, N. J. Zvaifler, M. Dell'Aquila, T. J. Kipps // *Blood* – 2000. – T. 96 – № 8 – 2655–2663c.

32. Byrd J.C. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. / J. C. Byrd, J. R. Brown, S. O'Brien, J. C. Barrientos, N. E. Kay, N. M. Reddy, S. Coutre, C. S. Tam, S. P. Mulligan, U. Jaeger, S. Devereux, P. M. Barr, R. R. Furman, T. J. Kipps, F. Cymbalista, C. Pocock, P. Thornton, F. Caligaris-Cappio, T. Robak, J. Delgado, S. J. Schuster, M. Montillo, A. Schuh, S. de Vos, D. Gill, A. Bloor, C. Dearden, C. Moreno, J. J. Jones, A. D. Chu, M. Fardis, J. McGreivy, F. Clow, D. F. James, P. Hillmen // *N. Engl. J. Med.* – 2014. – T. 371

– № 3 – 213–223c.

33. Catovsky D. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. / D. Catovsky, J. Fooks, S. Richards // *Br. J. Haematol.* – 1989. – T. 72 – № 2 – 141–149c.

34. Cavallari M. Biological significance and prognostic/predictive impact of complex karyotype in chronic lymphocytic leukemia. / M. Cavallari, F. Cavazzini, A. Bardi, E. Volta, A. Melandri, E. Tammiso, E. Saccenti, E. Lista, F. M. Quaglia, A. Urso, M. Laudisi, E. Menotti, L. Formigaro, M. Dabusti, M. Ciccone, P. Tomasi, M. Negrini, A. Cuneo, G. M. Rigolin // *Oncotarget* – 2018. – T. 9 – № 76 – 34398–34412c.

35. Cavazzini F. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis / F. Cavazzini, J. A. Hernandez, A. Gozzetti, A. Russo Rossi, C. De Angeli, R. Tiseo, A. Bardi, E. Tammiso, R. Crupi, M. P. Lenoci, F. Forconi, F. Lauria, R. Marasca, R. Maffei, G. Torelli, M. Gonzalez, P. Martin-Jimenez, J. Maria Hernandez, G. M. Rigolin, A. Cuneo // *Br. J. Haematol.* – 2008. – T. 142 – № 4 – 529–537c.

36. Chapiro E. “Double-hit” chronic lymphocytic leukemia: An aggressive subgroup with 17p deletion and 8q24 gain. / E. Chapiro, C. Lesty, C. Gabillaud, E. Durot, S. Bouzy, M. Armand, M. Le Garff-Tavernier, N. Bougacha, S. Struski, A. Bidet, E. Laharanne, C. Barin, L. Veronese, N. Prie, V. Eclache, B. Gaillard, L. Michaux, C. Lefebvre, J.-B. Gaillard, C. Terre, D. Penther, C. Bastard, N. Nadal, S. Fert-Ferrer, N. Auger, C. Godon, L. Sutton, O. Tournilhac, S. A. Susin, F. Nguyen-Khac // *Am. J. Hematol.* – 2018. – T. 93 – № 3 – 375–382c.

37. Chen C. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. / C. Chen, S. Puvvada // *Curr. Hematol. Malig. Rep.* – 2016. – T. 11 – № 1 – 37–42c.

38. Chiorazzi N. B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. / N. Chiorazzi, M. Ferrarini // *Annu. Rev. Immunol.* – 2003. – T. 21 – 841–894c.

39. Chiorazzi N. Mechanisms of disease. Chronic lymphocytic leukemia. / N. Chiorazzi, K. R. Rai, M. Ferrarini // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – T. 352 – № 8 – 804–815c.

40. Choi M.Y. The chronic lymphocytic leukemia microenvironment: Beyond the B-cell receptor. / M. Y. Choi, M. K. Kashyap, D. Kumar // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* – 2016. – T. 29 – № 1 – 40–53c.

41. Coley W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. / W. B. Coley // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1991. – № 262 – 3–11c.

42. Constantinides I.P. Serum beta 2 microglobulin in malignant lymphoproliferative disorders. / I. P. Constantinides, C. Pathouli, G. Karvountzis, P. Papadopoulos, M. Varvoutsi-Constantinides, P. Eliakis, S. Hadziyannis, Z. Komninos // *Cancer* – 1985. – T. 55 – № 10 – 2384–2389c.

43. Cosson A. 14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. / A. Cosson, E. Chapiro, N. Belhouachi, H.-A. Cung, B. Keren, F. Damm, C. Algrin, C. Lefebvre, S. Fert-Ferrer, I. Luquet, N. Gachard, F. Mugneret, C. Terre, M.-A. Collonge-Rame, L. Michaux, I. Rafdord-Weiss, P. Talmant, L. Veronese, N. Nadal, S. Struski, C. Barin, C. Helias, M. Lafage, E. Lippert, N. Auger, V. Eclache, D. Roos-Weil, V. Leblond, C. Settegrana, K. Maloum, F. Davi, H. Merle-Beral, C. Lesty, F. Nguyen-Khac // *Genes. Chromosomes Cancer* – 2014. – T. 53 – № 8 – 657–666c.

44. Dal Bo M. 13q14 Deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia / M. Dal Bo, F. M. Rossi, D. Rossi, C. Deambrogi, F. Bertoni, I. Del Giudice, G. Palumbo, M. Nanni, A. Rinaldi, I. Kwee, E. Tissino, G. Corradini, A. Gozzetti, E. Cencini, M. Ladetto, A. M. Coletta, F. Luciano, P. Bulian, G. Pozzato, L. Laurenti, F. Forconi, F. Di Raimondo, R. Marasca, G. Del Poeta, G. Gaidano, R. Foà, A. Guarini, V. Gattei // *Genes Chromosom. Cancer* – 2011. – T. 50 – № 8 – 633–643c.

45. Damle R.N. CD38 expression labels an activated subset within chronic

lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. / R. N. Damle, S. Temburni, C. Calissano, S. Yancopoulos, T. Banapour, C. Sison, S. L. Allen, K. R. Rai, N. Chiorazzi // *Blood* – 2007. – T. 110 – № 9 – 3352–3359c.

46. Damle R.N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. / R. N. Damle, T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini, N. Chiorazzi // *Blood* – 1999. – T. 94 – № 6 – 1840–1847c.

47. Damm F. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. / F. Damm, E. Mylonas, A. Cosson, K. Yoshida, V. Della Valle, E. Mouly, M. Diop, L. Scourzic, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, Y. Kikushige, F. Davi, J. Lambert, D. Gautheret, H. Merle-Béral, L. Sutton, P. Dessen, E. Solary, K. Akashi, W. Vainchenker, T. Mercher, N. Droin, S. Ogawa, F. Nguyen-Khac, O. A. Bernard // *Cancer Discov.* – 2014. – T. 4 – № 9 – 1088–1101c.

48. Deaglio S. CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival. / S. Deaglio, T. Vaisitti, L. Bergui, L. Bonello, A. L. Horenstein, L. Tamagnone, L. Boumsell, F. Malavasi // *Blood* – 2005. – T. 105 – № 8 – 3042–3050c.

49. Decker T. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype / T. Decker, F. Schneller, M. Kronschnabl, T. Dechow, G. B. Lipford, H. Wagner, C. Peschel // *Exp. Hematol.* – 2000. – T. 28 – № 5 – 558–568c.

50. Dicker F. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype / F. Dicker, H. Herholz, S. Schnittger, A. Nakao, N. Patten, L. Wu, W. Kern, T. Haferlach, C. Haferlach // *Leukemia* – 2009. – T. 23 – № 1 – 117–124c.

51. Dicker F. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: A study of

132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression / F. Dicker, S. Schnittger, T. Haferlach, W. Kern, C. Schoch // *Blood* – 2006. – T. 108 – № 9 – 3152–3160c.

52. Döhner H. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias / H. Döhner, K. Fischer, M. Bentz, K. Hansen, A. Benner, G. Cabot, D. Diehl, R. Schlenk, J. Coy, S. Stilgenbauer, M. Volkmann, P. R. Galle, A. Poustka, W. Hunstein, P. Lichter // *Blood* – 1995. – T. 85 – № 6 – 1580–1589c.

53. Dohner H. Trisomy 12 in chronic lymphoid leukemias--a metaphase and interphase cytogenetic analysis. / H. Dohner, S. Pohl, M. Bulgay-Morschel, S. Stilgenbauer, M. Bentz, P. Lichter // *Leukemia* – 1993. – T. 7 – № 4 – 516–520c.

54. Dohner H. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. / H. Dohner, S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz, P. Lichter // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – T. 343 – № 26 – 1910–1916c.

55. Döhner H. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. / H. Döhner, S. Stilgenbauer, M. R. James, A. Benner, T. Weilguni, M. Bentz, K. Fischer, W. Hunstein, P. Lichter // *Blood* – 1997. – T. 89 – № 7 – 2516–22c.

56. Dores G.M. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: Overview of the descriptive epidemiology / G. M. Dores, W. F. Anderson, R. E. Curtis, O. Landgren, E. Ostroumova, E. C. Bluhm, C. S. Rabkin, S. S. Devesa, M. S. Linet // *Br. J. Haematol.* – 2007. – T. 139 – № 5 – 809–819c.

57. Dyke D.L. Van The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. / D. L. Van Dyke, L. Werner, L. Z. Rassenti, D. Neuberg, E. Ghia, N. A. Heerema, P. Dal Cin, M. Dell Aquila, C. Sreekantaiah, A. W. Greaves, T. J. Kipps, N. E. Kay // *Br. J. Haematol.* – 2016. – T. 173 – № 1 – 105–113c.



58. Fais F. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. / F. Fais, F. Ghiotto, S. Hashimoto, B. Sellars, A. Valetto, S. L. Allen, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. Rai, L. Z. Rassenti, T. J. Kipps, G. Dighiero, H. W. J. Schroeder, M. Ferrarini, N. Chiorazzi // *J. Clin. Invest.* – 1998. – T. 102 – № 8 – 1515–1525c.

59. Gahrton, KH Robert, K Friberg, L Zech A.B. Nonrandom Leukemia Chromosomal Aberrations Revealed by Polyclonal in Chronic B-Cell-Mitogen Lymphocytic Stimulation / A. B. Gahrton, KH Robert, K Friberg, L Zech // *Blood* – 1980. – T. 56 – № 4 – 640–647c.

60. Gahn B. Detection of trisomy 12 and Rb-deletion in CD34+ cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. / B. Gahn, C. Schafer, J. Neef, C. Troff, M. Feuring-Buske, W. Hiddemann, B. Wormann // *Blood* – 1997. – T. 89 – № 12 – 4275–4281c.

61. Gahrton G. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. / G. Gahrton, K. H. Robert, K. Friberg, L. Zech, A. G. Bird // *Blood* – 1980. – T. 56 – № 4 – 640–647c.

62. Gentile M. Italian external and multicentric validation of the MD Anderson Cancer Center nomogram and prognostic index for chronic lymphocytic leukaemia patients: analysis of 1502 cases. / M. Gentile, F. R. Mauro, D. Rossi, I. Vincelli, G. Tripepi, A. G. Recchia, L. De Stefano, M. Campanelli, D. Giannarelli, S. Bossio, L. Morabito, E. Vigna, G. Gaidano, R. Foà, F. Morabito // *Br. J. Haematol.* – 2014. – T. 167 – № 2 – 224–232c.

63. Ghia P. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. / P. Ghia, G. Guida, S. Stella, D. Gottardi, M. Geuna, G. Strola, C. Scielzo, F. Caligaris-Cappio // *Blood* – 2003. – T. 101 – № 4 – 1262–1269c.

64. Giudice I. Del NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. / I. Del Giudice, D. Rossi, S. Chiaretti, M. Marinelli, S. Tavolaro, S. Gabrielli, L. Laurenti, R. Marasca, S. Rasi,

M. Fangazio, A. Guarini, G. Gaidano, R. Foa // *Haematologica* – 2012. – T. 97 – № 3 – 437–441c.

65. Grubor V. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). / V. Grubor, A. Krasnitz, J. E. Troge, J. L. Meth, B. Lakshmi, J. T. Kendall, B. Yamrom, G. Alex, D. Pai, N. Navin, L. A. Hufnagel, Y.-H. Lee, K. Cook, S. L. Allen, K. R. Rai, R. N. Damle, C. Calissano, N. Chiorazzi, M. Wigler, D. Esposito // *Blood* – 2009. – T. 113 – № 6 – 1294–1303c.

66. Grygalewicz B. Monoallelic and biallelic deletions of 13q14 in a group of CLL/SLL patients investigated by CGH Haematological Cancer and SNP array (8x60K). / B. Grygalewicz, R. Woroniecka, J. Rygier, K. Borkowska, I. Rzepecka, M. Lukasik, A. Budzilowska, G. Rymkiewicz, K. Blachnio, B. Nowakowska, M. Bartnik, M. Gos, B. Pienkowska-Grela // *Mol. Cytogenet.* – 2016. – T. 9 – 1c.

67. Gunn S.R. Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia / S. R. Gunn, M. K. Hibbard, S. H. Ismail, M. Lowery-Nordberg, C. H. M. Mellink, D. W. Bahler, L. V. Abruzzo, E. L. Enriquez, M. E. Gorre, M. S. Mohammed, R. S. Robetorye // *Leukemia* – 2009. – T. 23 – № 5 – 1011–1017c.

68. Gunn S.R. Whole-genome scanning by array comparative genomic hybridization as a clinical tool for risk assessment in chronic lymphocytic leukemia. / S. R. Gunn, M. S. Mohammed, M. E. Gorre, P. D. Cotter, J. Kim, D. W. Bahler, S. N. Preobrazhensky, R. A. Higgins, A. R. Bolla, S. H. Ismail, D. de Jong, E. Eldering, M. H. J. van Oers, C. H. M. Mellink, M. J. Keating, E. J. Schlette, L. V Abruzzo, R. S. Robetorye // *J. Mol. Diagn.* – 2008. – T. 10 – № 5 – 442–451c.

69. Haferlach C. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVHstatus and immunophenotyping / C. Haferlach, F. Dicker, S. Schnittger, W. Kern, T. Haferlach // *Leukemia* – 2007. – T. 21 – № 12 – 2442–2451c.

70. Hallek M. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. / M. Hallek, B. D.

Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M. Keating, E. Montserrat, N. Chiorazzi, S. Stilgenbauer, K. R. Rai, J. C. Byrd, B. Eichhorst, S. O'Brien, T. Robak, J. F. Seymour, T. J. Kipps // *Blood* – 2018. – T. 131 – № 25 – 2745–2760c.

71. Hallek M. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. / M. Hallek, K. Fischer, G. Fingerle-Rowson, A. M. Fink, R. Busch, J. Mayer, M. Hensel, G. Hopfinger, G. Hess, U. von Grünhagen, M. Bergmann, J. Catalano, P. L. Zinzani, F. Caligaris-Cappio, J. F. Seymour, A. Berrebi, U. Jäger, B. Cazin, M. Trneny, A. Westermann, C. M. Wendtner, B. F. Eichhorst, P. Staib, A. Bühler, D. Winkler, T. Zenz, S. Böttcher, M. Ritgen, M. Mendila, M. Kneba, H. Döhner, S. Stilgenbauer // *Lancet* (London, England) – 2010. – T. 376 – № 9747 – 1164–1174c.

72. Hamblin T.J. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. / T. J. Hamblin, Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier, F. K. Stevenson // *Blood* – 1999. – T. 94 – № 6 – 1848–1854c.

73. Herholz H. Translocations as a mechanism for homozygous deletion of 13q14 and loss of the ATM gene in a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia / H. Herholz, W. Kern, S. Schnittger, T. Haferlach, F. Dicker, C. Haferlach // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2007. – T. 174 – 57–60c.

74. Herling C.D. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy / C. D. Herling, M. Klaumünzer, C. K. Rocha, J. Altmüller, H. Thiele, J. Bahlo, S. Kluth, G. Crispatzu, M. Herling, J. Schiller, A. Engelke, E. Tausch, H. Döhner, K. Fischer, V. Goede, P. Nürnberg, H. C. Reinhardt, S. Stilgenbauer, M. Hallek, K. A. Kreuzer // *Blood* – 2016. – T. 128 – № 3 – 395–404c.

75. Holmes P.J. Efficacy of DSP30-IL2/TPA for detection of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma. / P. J. Holmes, S. C. Peiper, G. K. Uppal, J. Z. Gong, Z.-X. Wang, R. Bajaj // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2016. – T. 38 – № 5 – 483–489c.

76. Honda K. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. / K. Honda, T. Taniguchi // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – T. 6 – № 9 – 644–658c.

77. Houldsworth J. Genomic imbalance defines three prognostic groups for risk stratification of patients with chronic lymphocytic leukemia. / J. Houldsworth, A. Guttapalli, V. Thodima, X. J. Yan, G. Mendiratta, T. Zielonka, G. Nanjangud, W. Chen, S. Patil, A. Mato, J. R. Brown, K. Rai, N. Chiorazzi, R. S. K. Chaganti // *Leuk. Lymphoma* – 2014. – T. 55 – № 4 – 920–928c.

78. Huh Y.O. Chronic lymphocytic leukemia with t(14;19)(q32;q13) is characterized by atypical morphologic and immunophenotypic features and distinctive genetic features. / Y. O. Huh, C. D. Schweighofer, R. P. Ketterling, R. A. Knudson, F. Vega, J. E. Kim, R. Luthra, M. J. Keating, L. J. Medeiros, L. V Abruzzo // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2011. – T. 135 – № 5 – 686–696c.

79. Jaglowski S.M. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. / S. M. Jaglowski, A. S. Ruppert, N. A. Heerema, A. Bingman, J. M. Flynn, M. R. Grever, J. A. Jones, P. Elder, S. M. Devine, J. C. Byrd, L. A. Andritsos // *Br. J. Haematol.* – 2012. – T. 159 – № 1 – 82–87c.

80. Jarošová M. The importance of complex karyotype in prognostication and treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL): a comprehensive review of the literature. / M. Jarošová, K. Plevová, J. Kotašková, M. Doubek, Š. Pospíšilová // *Leuk. Lymphoma* – 2019. – T. 60 – № 10 – 2348–2355c.

81. Jenderny J. Detection of clonal aberrations by cytogenetic analysis after different culture methods and by FISH in 129 patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. / J. Jenderny, C. Goldmann, R. Thede, M. Ebrecht, F. Koriath // *Cytogenet. Genome Res.* – 2014. – T. 144 – № 3 – 163–168c.

82. Jondreville L. The complex karyotype and chronic lymphocytic leukemia: prognostic value and diagnostic recommendations. / L. Jondreville, D. Krzisch, E. Chapiro, F. Nguyen-Khac // *Am. J. Hematol.* – 2020. – T. 95 – № 11 – 1361–1367c.

83. Juliusson G. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic

leukemia. Pathogenetic and clinical implications / G. Juliusson, G. Gahrton // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 1990. – T. 45 – № 2 – 143–160c.

84. Juliusson G. Cytogenetic findings and survival in b-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCCLL compilation of data on 662 patients / G. Juliusson, D. Oscier, G. Juliusson, G. Gahrton, D. Oscier, M. Fitchett, F. Ross, V. Brito-Babapulle, D. Catovsky, S. Knuutila, E. Elonen, M. Lechleitner, J. Tanzer, M. Schoenwald, G. L. Castoldi, A. Cuneo, P. Nowell, L. Peterson, N. Kay // *Leuk. Lymphoma* – 1991. – T. 5 – № S1 – 21–25c.

85. Juliusson G. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities / G. Juliusson, D. G. Oscier, M. Fitchett, F. M. Ross, G. Stockdill, M. J. Mackie, A. C. Parker, G. L. Castoldi, A. Cuneo, S. Knuutila, E. Elonen, G. Gahrton // *N. Engl. J. Med.* – 1990. – T. 323 – № 11 – 720–724c.

86. Karakosta M. The parallel application of karyotype interphase and metaphase FISH after DSP-30/IL-2 stimulation is necessary for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. / M. Karakosta, K. N. Manola // *Hematology* – 2016. – T. 21 – № 9 – 526–535c.

87. Kastan M.B. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. / M. B. Kastan, Q. Zhan, W. S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W. V Walsh, B. S. Plunkett, B. Vogelstein, A. J. J. Fornace // *Cell* – 1992. – T. 71 – № 4 – 587–597c.

88. Kelsoe G. B cell diversification and differentiation in the periphery. / G. Kelsoe // *J. Exp. Med.* – 1994. – T. 180 – № 1 – 5–6c.

89. Kienle D.L. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes / D. L. Kienle, C. Korz, B. Hosch, A. Benner, D. Mertens, A. Habermann, A. Kr??ber, U. J??ger, P. Lichter, H. D??hner, S. Stilgenbauer // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – T. 23 – № 16 – 3780–3792c.

90. Kikushige Y. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. / Y. Kikushige, F.

Ishikawa, T. Miyamoto, T. Shima, S. Urata, G. Yoshimoto, Y. Mori, T. Iino, T. Yamauchi, T. Eto, H. Niuro, H. Iwasaki, K. Takenaka, K. Akashi // *Cancer Cell* – 2011. – T. 20 – № 2 – 246–259c.

91. Kikushige Y. Hematopoietic stem cell aging and chronic lymphocytic leukemia pathogenesis. / Y. Kikushige, T. Miyamoto // *Int. J. Hematol.* – 2014. – T. 100 – № 4 – 335–340c.

92. Kim Y.-M. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. / Y.-M. Kim, M. M. Brinkmann, M.-E. Paquet, H. L. Ploegh // *Nature* – 2008. – T. 452 – № 7184 – 234–238c.

93. Kipps T.J. Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia. / T. J. Kipps // *Blood Cells* – 1993. – T. 19 – № 3 – 612–615c.

94. Kitada S. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. / S. Kitada, J. Andersen, S. Akar, J. M. Zapata, S. Takayama, S. Krajewski, H. G. Wang, X. Zhang, F. Bullrich, C. M. Croce, K. Rai, J. Hines, J. C. Reed // *Blood* – 1998. – T. 91 – № 9 – 3379–3389c.

95. Klein U. The DLEU2/miR-15a/16-1 Cluster Controls B Cell Proliferation and Its Deletion Leads to Chronic Lymphocytic Leukemia / U. Klein, M. Lia, M. Crespo, R. Siegel, Q. Shen, T. Mo, A. Ambesi-Impiombato, A. Califano, A. Migliazza, G. Bhagat, R. Dalla-Favera // *Cancer Cell* – 2010. – T. 17 – № 1 – 28–40c.

96. Klein U. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. / U. Klein, Y. Tu, G. A. Stolovitzky, M. Mattioli, G. Cattoretti, H. Husson, A. Freedman, G. Inghirami, L. Cro, L. Baldini, A. Neri, A. Califano, R. Dalla-Favera // *J. Exp. Med.* – 2001. – T. 194 – № 11 – 1625–1638c.

97. Klinman D.M. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. / D. M. Klinman, A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, A. M. Krieg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1996. – T. 93 – № 7 – 2879–2883c.

98. Knittel G. Targeting ATM-deficient CLL through interference with DNA repair pathways. / G. Knittel, P. Liedgens, H. C. Reinhardt // *Front. Genet.* – 2015. – T. 6 – 1–9c.

99. Kobayashi H. Immunostimulatory DNA prepriming: A novel approach for prolonged Th1- biased immunity / H. Kobayashi, A. A. Horner, K. Takabayashi, M. D. Nguyen, E. Huang, N. Cinman, E. Raz // *Cell. Immunol.* – 1999. – T. 198 – № 1 – 69–75c.

100. Koníková E. Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies / E. Koníková, J. Kusenda // *Neoplasma* – 2003. – T. 50 – № 1 – 31–40c.

101. Kreuzer K.-A. The impact of complex karyotype on the overall survival of patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia treated with idelalisib plus rituximab. // *Leukemia.* – 2020. – T. 34. – № 1. – 296–300c.

102. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. / A. M. Krieg // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – T. 20 – 709–760c.

103. Krieg A.M. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. / A. M. Krieg, A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky, D. M. Klinman // *Nature* – 1995. – T. 374 – № 6522 – 546–549c.

104. Kruzova L. Complex karyotype as a predictor of high-risk chronic lymphocytic leukemia: A single center experience over 12 years. / L. Kruzova, P. Schneiderova, M. Holzerova, M. Vatalikova, M. Divoka, P. Turcsanyi, R. Urbanova, M. Kudelka, M. Radvansky, E. Kriegova, T. Papajik, H. Urbankova // *Leuk. Res.* – 2019. – T. 85 – 106218c.

105. Landau D.A. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. / D. A. Landau, S. L. Carter, P. Stojanov, A. McKenna, K. Stevenson, M. S. Lawrence, C. Sougnez, C. Stewart, A. Sivachenko, L. Wang, Y. Wan, W. Zhang, S. A. Shukla, A. Vartanov, S. M. Fernandes, G. Saksena, K. Cibulskis, B. Tesar, S. Gabriel, N. Hacohen, M. Meyerson, E. S. Lander, D. Neuberger, J. R. Brown, G. Getz, C. J. Wu // *Cell* – 2013. – T. 152 – № 4 – 714–726c.

106. Landau D.A. Mutations driving CLL and their evolution in progression

and relapse. / D. A. Landau, E. Tausch, A. N. Taylor-Weiner, C. Stewart, J. G. Reiter, J. Bahlo, S. Kluth, I. Bozic, M. Lawrence, S. Bottcher, S. L. Carter, K. Cibulskis, D. Mertens, C. L. Sougnez, M. Rosenberg, J. M. Hess, J. Edelman, S. Kless, M. Kneba, M. Ritgen, A. Fink, K. Fischer, S. Gabriel, E. S. Lander, M. A. Nowak, H. Dohner, M. Hallek, D. Neuberg, G. Getz, S. Stilgenbauer, C. J. Wu // Nature – 2015. – T. 526 – № 7574 – 525–530c.

107. Lazarian G. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. / G. Lazarian, R. Guieze, C. J. Wu // J. Clin. Oncol. – 2017. – T. 35 – № 9 – 984–993c.

108. Lazarian G. TP53 mutations are early events in chronic lymphocytic leukemia disease progression and precede evolution to complex karyotypes. / G. Lazarian, E. Tausch, V. Eclache, A. Sebaa, V. Bianchi, R. Letestu, J.-F. Collon, V. Lefebvre, L. Gardano, N. Varin-Blank, T. Soussi, S. Stilgenbauer, F. Cymbalista, F. Baran-Marszak // Int. J. cancer – 2016. – T. 139 – № 8 – 1759–1763c.

109. Leeksma A.C. Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multi-center study. / A. C. Leeksma, P. Baliakas, T. Moysiadis, A. Puiggros, K. Plevova, A.-M. van der Kevie-Kersemaekers, H. Posthuma, A. E. Rodriguez-Vicente, A. N. Tran, G. Barbany, L. Mansouri, R. Gunnarsson, H. Parker, E. van den Berg, M. Bellido, Z. Davis, M. Wall, I. Scarpelli, A. Osterborg, L. Hansson, M. Jarosova, P. Ghia, P. Poddighe, B. Espinet, S. Pospisilova, C. Tam, L. Ysebaert, F. Nguyen-Khac, D. Oscier, C. Haferlach, J. Schoumans, M. Stevens-Kroef, E. Eldering, K. Stamatopoulos, R. Rosenquist, J. C. Strefford, C. Mellink, A. P. Kater // Haematologica – 2020. – T. 106 – № 1 – 87–97c.

110. Levine A.J. The P53 pathway: what questions remain to be explored? / A. J. Levine, W. Hu, Z. Feng // Cell Death Differ. – 2006. – T. 13 – № 6 – 1027–1036c.

111. Li Y. The clinical significance of 8q24/MYC rearrangement in chronic lymphocytic leukemia. / Y. Li, S. Hu, S. A. Wang, S. Li, Y. O. Huh, Z. Tang, L. J. Medeiros, G. Tang // Mod. Pathol. – 2016. – T. 29 – № 5 – 444–451c.



112. Liang H. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. / H. Liang, Y. Nishioka, C. F. Reich, D. S. Pisetsky, P. E. Lipsky // *J. Clin. Invest.* – 1996. – T. 98 – № 5 – 1119–1129c.

113. Liehr T. FISH banding methods: applications in research and diagnostics. / T. Liehr, A. Heller, H. Starke, U. Claussen // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2002. – T. 2 – № 3 – 217–225c.

114. Liehr T. Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. / T. Liehr, H. Starke, A. Heller, N. Kosyakova, K. Mrasek, M. Gross, C. Karst, U. Steinhäuser, F. Hunstig, I. Fickelscher, A. Kuechler, V. Trifonov, S. A. Romanenko, A. Weise // *Cytogenet. Genome Res.* – 2006. – T. 114 – № 3–4 – 240–244c.

115. Linet M.S. Chronic lymphocytic leukaemia: An overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis / M. S. Linet, M. K. Schubauer-Berigan, D. D. Weisenburger, D. B. Richardson, O. Landgren, A. Blair, S. Silver, R. W. Field, G. Caldwell, M. Hatch, G. M. Dores // *Br. J. Haematol.* – 2007. – T. 139 – № 5 – 672–686c.

116. Malavasi F. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: a decade later. / F. Malavasi, S. Deaglio, R. Damle, G. Cutrona, M. Ferrarini, N. Chiorazzi // *Blood* – 2011. – T. 118 – № 13 – 3470–3478c.

117. Malcikova J. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia : selection , impact on survival , and response to DNA damage / J. Malcikova, J. Smardova, L. Rocnova, B. Tichy, P. Kuglik, V. Vranova, S. Cejkova, M. Svitakova, H. S. Francova, Y. Brychtova, M. Doubek, M. Brejcha, M. Klabusay, J. Mayer, S. Pospisilova, M. Trbusek, J. Malcikova, J. Smardova, L. Rocnova, B. Tichy, P. Kuglik, V. Vranova, S. Cejkova, M. Svitakova, H. S. Francova, Y. Brychtova, M. Doubek, M. Brejcha, M. Klabusay, J. Mayer, S. Pospisilova, M. Trbusek – 2009. – T. 114 – № 26 – 5307–5314c.

118. Mandelli F. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. / F. Mandelli, G. De Rossi, P. Mancini, A. Alberti, A. Cajozzo, F. Grignani, P. Leoni, V. Liso, M. Martelli, A. Neri // *J. Clin.*

Oncol. – 1987. – T. 5 – № 3 – 398–406c.

119. Marasca R. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. / R. Marasca, R. Maffei, S. Martinelli, S. Fiorcari, J. Bulgarelli, G. Debbia, D. Rossi, F. M. Rossi, G. M. Rigolin, S. Martinelli, V. Gattei, G. Del Poeta, L. Laurenti, F. Forconi, M. Montillo, G. Gaidano, M. Luppi // Hematol. Oncol. – 2013. – T. 31 – № 2 – 88–95c.

120. Matutes E. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. / E. Matutes, K. Owusu-Ankomah, R. Morilla, J. Garcia Marco, A. Houlihan, T. H. Que, D. Catovsky // Leukemia – 1994. – T. 8 – № 10 – 1640–1645c.

121. Mayr C. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. / C. Mayr, M. R. Speicher, D. M. Kofler, R. Buhmann, J. Strehl, R. Busch, M. Hallek, C.-M. Wendtner // Blood – 2006. – T. 107 – № 2 – 742–751c.

122. Messina J.P. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. / J. P. Messina, G. S. Gilkeson, D. S. Pisetsky // J. Immunol. – 1991. – T. 147 – № 6 – 1759–1764c.

123. Meyn M.S. Ataxia-telangiectasia and cellular responses to DNA damage. / M. S. Meyn // Cancer Res. – 1995. – T. 55 – № 24 – 5991–6001c.

124. Mian M. Del(13q14.3) length matters: an integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. // Hematol. Oncol. – 2012. – T. 30. – № 1. – 46–49c.

125. Mohr J. DNAdamage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing / J. Mohr, H. Helfrich, M. Fuge, E. Eldering, A. Bu, D. Winkler, M. Volden, A. P. Kater, D. Mertens, D. Te Raa, H. Do, S. Stilgenbauer, T. Zenz // Blood – 2011. – T. 117 – № 5 – 1622–1632c.

126. Molica S. Sex differences in incidence and outcome of chronic

lymphocytic leukemia patients / S. Molica // *Leuk. Lymphoma* – 2006. – T. 47 – № 8 – 1477–1480c.

127. Molica S. A gender-based score system predicts the clinical outcome of patients with early B-cell chronic lymphocytic leukemia. / S. Molica, F. R. Mauro, V. Callea, M. Gentile, D. Giannarelli, M. Lopez, F. Lauria, B. Rotoli, M. Montanaro, A. Cortelezzi, V. Liso, F. Mandelli, R. Foa // *Leuk. Lymphoma* – 2005. – T. 46 – № 4 – 553–560c.

128. Morton L.M. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. / L. M. Morton, S. S. Wang, S. S. Devesa, P. Hartge, D. D. Weisenburger, M. S. Linet // *Blood* – 2006. – T. 107 – № 1 – 265–276c.

129. Muzio M. Toll-like Receptors in Chronic Lymphocytic Leukemia. / M. Muzio, E. Fonte, F. Caligaris-Cappio // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* – 2012. – T. 4 – № 1 – e2012055c.

130. Muzio M. Expression and function of toll like receptors in chronic lymphocytic leukaemia cells. / M. Muzio, C. Scielzo, M. T. S. Bertilaccio, M. Frenquelli, P. Ghia, F. Caligaris-Cappio // *Br. J. Haematol.* – 2009. – T. 144 – № 4 – 507–516c.

131. Nadeu F. Genomic and Epigenomic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. / F. Nadeu, A. Diaz-Navarro, J. Delgado, X. S. Puente, E. Campo // *Annu. Rev. Pathol.* – 2020. – T. 15 – 149–177c.

132. Nauts H.C. A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man; a critical analysis of 30 inoperable cases treated by Coley's mixed toxins, in which diagnosis was confirmed by microscopic examination / H. C. Nauts, G. A. Fowler, F. H. Bogatko // *Acta Med. Scand. Suppl.* – 1953. – T. 276 – 1–103c.

133. Ouillette P. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. / P. Ouillette, R. Collins, S. Shakhan, J. Li, C. Li, K. Shedden, S. N. Malek // *Clin. Cancer Res.* – 2011. – T. 17 – № 21 – 6778–6790c.

134. Ouillette P. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14 / P. Ouillette, H. Erba, L. Kujawski,

M. Kaminski, K. Shedden, S. N. Malek // *Cancer Res.* – 2008. – T. 68 – № 4 – 1012–1021c.

135. Ouillette P. Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia. / P. Ouillette, J. Li, R. Shaknovich, Y. Li, A. Melnick, K. Shedden, S. N. Malek // *Genes. Chromosomes Cancer* – 2012. – T. 51 – № 12 – 1125–1132c.

136. Pekarsky Y. Role of miR-15/16 in CLL // *Cell Death Differ.* – 2015. – T. 22. – № 1. – 6–11c.

137. Peterson P.A. Highly purified papain-solubilized HL-A antigens contain beta2-microglobulin. / P. A. Peterson, L. Rask, J. B. Lindblom // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1974. – T. 71 – № 1 – 35–39c.

138. Pflug N. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. / N. Pflug, J. Bahlo, T. D. Shanafelt, B. F. Eichhorst, M. A. Bergmann, T. Elter, K. Bauer, G. Malchau, K. G. Rabe, S. Stilgenbauer, H. Döhner, U. Jäger, M. J. Eckart, G. Hopfinger, R. Busch, A.-M. Fink, C.-M. Wendtner, K. Fischer, N. E. Kay, M. Hallek // *Blood* – 2014. – T. 124 – № 1 – 49–62c.

139. Poeta G. Del Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. / G. Del Poeta, L. Maurillo, A. Venditti, F. Buccisano, A. M. Epiceno, G. Capelli, A. Tamburini, G. Suppo, A. Battaglia, M. I. Del Principe, B. Del Moro, M. Masi, S. Amadori // *Blood* – 2001. – T. 98 – № 9 – 2633–2639c.

140. Pratt G. Evaluation of serum markers in the LRF CLL4 trial:  $\beta$ 2-microglobulin but not serum free light chains, is an independent marker of overall survival. / G. Pratt, P. Thomas, N. Marden, D. Alexander, Z. Davis, D. Hussey, H. Parry, S. Harding, D. Catovsky, J. Begley, D. Oscier // *Leuk. Lymphoma* – 2016. – T. 57 – № 10 – 2342–2350c.

141. Puiggros A. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. / A. Puiggros, R. Collado, M. J. Calasanz, M. Ortega, N. Ruiz-Xivillé, A. Rivas-Delgado, E. Luño, T. González, B. Navarro, M. García-Malo, A. Valiente, J. Á.

Hernández, M. T. Ardanaz, M. Á. Piñan, M. L. Blanco, M. Hernández-Sánchez, A. Batlle-López, R. Salgado, M. Salido, A. Ferrer, P. Abrisqueta, E. Gimeno, E. Abella, C. Ferrá, M. J. Terol, F. Ortuño, D. Costa, C. Moreno, F. Carbonell, F. Bosch, J. Delgado, B. Espinet // *Oncotarget* – 2017. – T. 8 – № 33 – 54297–54303c.

142. Puiggros A. Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome. / A. Puiggros, M. Venturas, M. Salido, G. Blanco, C. Fernandez-Rodriguez, R. Collado, A. Valiente, N. Ruiz-Xivillé, A. Carrió, F. J. Ortuño, E. Luño, M. J. Calasanz, M. T. Ardanaz, M. Á. Piñán, E. Talavera, M. T. González, M. Ortega, I. Marugán, A. Ferrer, E. Gimeno, B. Bellosillo, J. Delgado, J. Á. Hernández, J. M. Hernández-Rivas, B. Espinet // *Genes. Chromosomes Cancer* – 2014. – T. 53 – № 9 – 788–797c.

143. Put N. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. / N. Put, P. Konings, K. Rack, M. Jamar, N. Van Roy, J.-M. Libouton, P. Vannuffel, D. Sartenaer, G. Ameye, F. Speleman, C. Herens, H. A. Poiriel, Y. Moreau, A. Hagemeijer, P. Vandenberghe, L. Michaux // *Genes. Chromosomes Cancer* – 2009. – T. 48 – № 10 – 843–853c.

144. Rack K.A. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. / K. A. Rack, E. van den Berg, C. Haferlach, H. B. Beverloo, D. Costa, B. Espinet, N. Foot, S. Jeffries, K. Martin, S. O'Connor, J. Schoumans, P. Talley, N. Telford, S. Stioui, Z. Zemanova, R. J. Hastings // *Leukemia* – 2019. – T. 33 – № 8 – 1851–1867c.

145. Rafei H. Treatment of Del17p and/or aberrant TP53 chronic lymphocytic leukemia in the era of novel therapies. / H. Rafei, M. A. Kharfan-Dabaja // *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* – 2018. – T. 11 – № 1 – 1–12c.

146. Rai K.R. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. / K. R. Rai, A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy, B. S. Pasternack // *Blood* – 1975. – T. 46 – № 2 – 219–234c.

147. Rigolin G.M. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are

associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. // *Blood*. – 2017. – T. 129. – № 26. – 3495–3498c.

148. Rigolin G.M. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. / G. M. Rigolin, F. Cibien, S. Martinelli, L. Formigaro, L. Rizzotto, E. Tammiso, E. Saccenti, A. Bardi, F. Cavazzini, M. Ciccone, I. Nichele, G. Pizzolo, F. Zaja, R. Fanin, P. Galieni, A. Dalsass, F. Mestichelli, N. Testa, M. Negrini, A. Cuneo // *Blood* – 2012. – T. 119 – № 10 – 2310–2313c.

149. Rigolin G.M. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. / G. M. Rigolin, E. Saccenti, E. Guardalben, M. Cavallari, L. Formigaro, B. Zagatti, A. Visentin, F. R. Mauro, E. Lista, C. Bassi, L. Lupini, F. M. Quaglia, A. Urso, M. A. Bardi, L. Bonaldi, E. Volta, E. Tammiso, C. Ilari, L. Cafforio, A. Melandri, F. Cavazzini, M. Negrini, G. Semenzato, L. Trentin, R. Foa, A. Cuneo // *Br. J. Haematol.* – 2018. – T. 181 – № 2 – 229–233c.

150. Rodriguez A.E. Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. / A. E. Rodriguez, J. A. Hernandez, R. Benito, N. C. Gutierrez, J. L. Garcia, M. Hernandez-Sanchez, A. Risueno, M. E. Sarasquete, E. Ferminan, R. Fisac, A. G. de Coca, G. Martin-Nunez, N. de Las Heras, I. Recio, O. Gutierrez, J. De Las Rivas, M. Gonzalez, J. M. Hernandez-Rivas // *PLoS One* – 2012. – T. 7 – № 11 – e48485c.

151. Satterwhite E. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. / E. Satterwhite, T. Sonoki, T. G. Willis, L. Harder, R. Nowak, E. L. Arriola, H. Liu, H. P. Price, S. Gesk, D. Steinemann, B. Schlegelberger, D. G. Oscier, R. Siebert, P. W. Tucker, M. J. Dyer // *Blood* – 2001. – T. 98 – № 12 – 3413–3420c.

152. Seifert M. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. / M. Seifert, L. Sellmann, J. Bloehdorn, F. Wein, S. Stilgenbauer, J. Dürig,

R. Küppers // *J. Exp. Med.* – 2012. – T. 209 – № 12 – 2183–2198c.

153. Seiler T. Risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. / T. Seiler, H. Dohner, S. Stilgenbauer // *Semin. Oncol.* – 2006. – T. 33 – № 2 – 186–194c.

154. Shi M. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation / M. Shi, M. J. Cipollini, P. A. Crowley-Bish, A. W. Higgins, H. Yu, P. M. Miron // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2013. – T. 139 – № 5 – 662–669c.

155. Simonsson B. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukaemia. / B. Simonsson, L. Wibell, K. Nilsson // *Scand. J. Haematol.* – 1980. – T. 24 – № 2 – 174–180c.

156. Socola F. Chronic Lymphocytic Leukemia with Translocation (2;14)(p16;q32): A Case Report and Review of the Literature. / F. Socola, G. Insuasti-Beltran, R. Henrich Lobo, S. Atrash, A. Sasapu // *Case Rep. Oncol. Med.* – 2016. – T. 2016 – 9037436c.

157. Speedy H.E. Insight into genetic predisposition to chronic lymphocytic leukemia from integrative epigenomics. / H. E. Speedy, R. Beekman, V. Chapaprieta, G. Orlando, P. J. Law, D. Martín-García, J. Gutiérrez-Abril, D. Catovsky, S. Beà, G. Clot, M. Puiggròs, D. Torrents, X. S. Puente, J. M. Allan, C. López-Otín, E. Campo, R. S. Houlston, J. I. Martín-Subero // *Nat. Commun.* – 2019. – T. 10 – № 1 – 3615c.

158. Speedy H.E. Germ line mutations in shelterin complex genes are associated with familial chronic lymphocytic leukemia. / H. E. Speedy, B. Kinnersley, D. Chubb, P. Broderick, P. J. Law, K. Litchfield, S. Jayne, M. J. S. Dyer, C. Dearden, G. A. Follows, D. Catovsky, R. S. Houlston // *Blood* – 2016. – T. 128 – № 19 – 2319–2326c.

159. Speicher M.R. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. / M. R. Speicher, S. Gwyn Ballard, D. C. Ward // *Nat. Genet.* – 1996. – T. 12 – № 4 – 368–375c.

160. Stamatopoulos K. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic

leukemia. / K. Stamatopoulos, A. Agathangelidis, R. Rosenquist, P. Ghia // *Leukemia* – 2017. – T. 31 – № 2 – 282–291c.

161. Stankovic T. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. / T. Stankovic, A. Skowronska // *Leuk. Lymphoma* – 2014. – T. 55 – № 6 – 1227–1239c.

162. Stilgenbauer S. Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia / S. Stilgenbauer // *Rev. Clin. Exp. Hematol.* – 2000. – T. 4 – № 1 – 48–72c.

163. Stilgenbauer S. Molecular genetics and its clinical relevance. / S. Stilgenbauer, H. Dohner // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* – 2004. – T. 18 – № 4 – 827–48c.

164. Sutton L.-A. Immunoglobulin genes in chronic lymphocytic leukemia: key to understanding the disease and improving risk stratification / L.-A. Sutton, A. Hadzidimitriou, P. Baliakas, A. Agathangelidis, A. W. Langerak, S. Stilgenbauer, S. Pospisilova, Z. Davis, F. Forconi, F. Davi, P. Ghia, R. Rosenquist, K. Stamatopoulos, European Research Initiative on CLL (ERIC) // *Haematologica* – 2017. – T. 102 – № 6 – 968–971c.

165. Swerdlow S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition) / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele, D. A. Arber, R. P. Hasserjian, M. M. Le Beau, A. Orazi, R. Siebert – Lion: IARC, 2017.– 216–221c.

166. The International CLL-IPI working group An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. / The International CLL-IPI working group // *Lancet. Oncol.* – 2016. – T. 17 – № 6 – 779–790c.

167. Thompson P.A. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens / P. A. Thompson, S. M. O'Brien, W. G. Wierda, A. Ferrajoli, F. Stingo, S. C. Smith, J. A. Burger, Z. Estrov, N. Jain, H. M. Kantarjian, M. J. Keating // *Cancer* – 2015. – T. 121 – № 20 – 3612–3621c.

168. Travella A. Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia.



Cytogenetic and FISH analysis. / A. Travella, L. Ripollés, A. Aventin, A. Rodríguez, R. F. Bezares, M. R. Caballín, I. Slavutsky // *Hematol. Oncol.* – 2013. – T. 31 – № 2 – 79–87c.

169. Trbusek M. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. // *Leukemia.* – 2006. – T. 20. – № 6. – 1159–1161c.

170. Tsimberidou A.-M. Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. / A.-M. Tsimberidou, C. Tam, L. V Abruzzo, S. O'Brien, W. G. Wierda, S. Lerner, H. M. Kantarjian, M. J. Keating // *Cancer* – 2009. – T. 115 – № 2 – 373–380c.

171. Vinuesa C.G. de Germinal centers without T cells. / C. G. de Vinuesa, M. C. Cook, J. Ball, M. Drew, Y. Sunners, M. Cascalho, M. Wabl, G. G. Klaus, I. C. MacLennan // *J. Exp. Med.* – 2000. – T. 191 – № 3 – 485–494c.

172. Visentin A. The combination of complex karyotype subtypes and IGHV mutational status identifies new prognostic and predictive groups in chronic lymphocytic leukaemia. / A. Visentin, L. Bonaldi, G. M. Rigolin, F. R. Mauro, A. Martines, F. Frezzato, S. Imbergamo, E. Scomazzon, S. Pravato, M. A. Bardi, M. Cavallari, E. Volta, F. Cavazzini, M. Nanni, I. Del Giudice, M. Facco, A. Guarini, G. Semenzato, R. Foà, A. Cuneo, L. Trentin // *Br. J. Cancer* – 2019. – T. 121 – № 2 – 150–156c.

173. Wierda W.G. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia / W. G. Wierda, S. O'Brien, X. Wang, S. Faderl, A. Ferrajoli, K. A. Do, G. Garcia-Manero, J. Cortes, D. Thomas, C. A. Koller, J. A. Burger, S. Lerner, E. Schlette, L. Abruzzo, H. M. Kantarjian, M. J. Keating // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – T. 29 – № 31 – 4088–4095c.

174. Winkler D. Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL) / D. Winkler, C. Schneider, A. Kröber, L. Pasqualucci, P. Lichter, H. Döhner, S. Stilgenbauer // *Leukemia* – 2005. – T. 19 – № 7 – 1211–1215c.

175. Wren C. Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. / C. Wren, H. Moriarty, K. Marsden, E. Tegg // *Cancer Genet. Cytogenet.* – 2010. – T. 198 – № 2 – 155–161c.

176. Yuan D. Regulation of IgM and IgD synthesis in B lymphocytes. II. Translational and post-translational events. / D. Yuan // *J. Immunol.* – 1984. – T. 132 – № 3 – 1566–1570c.

177. Zenz T. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. / T. Zenz, S. Habe, T. Denzel, J. Mohr, D. Winkler, A. Buhler, A. Sarno, S. Groner, D. Mertens, R. Busch, M. Hallek, H. Dohner, S. Stilgenbauer // *Blood* – 2009. – T. 114 – № 13 – 2589–2597c.

178. Zhang S. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. / S. Zhang, T. J. Kipps // *Annu. Rev. Pathol.* – 2014. – T. 9 – 103–118c.

179. Zhang S. Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. / S. Zhang, C. C. N. Wu, J.-F. Fecteau, B. Cui, L. Chen, L. Zhang, R. Wu, L. Rassenti, F. Lao, S. Weigand, T. J. Kipps // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2013. – T. 110 – № 15 – 6127–6132c.

180. ISCN (2020). An International System for Human Cytogenomic Nomenclature. McGowan-Jordan J, Hastings RJ, Moore S, (eds) / – , 2020.

181. Iida S. Chromosomal Rearrangement of the PAX-5 Locus in Lymphoplasmacytic Lymphoma with t(9; 14) (p13; q32) / S. Iida, P. H. Rao, R. Ueda, R. S. K. Chaganti, R. Dalla-Favera // *Leuk. Lymphoma* – 1999. – T. 34 – № 42006 – 25–33c.

182. Puiggros A. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ ATM FISH deletions / A. Puiggros, R. Collado, M. J. Calasanz, M. Ortega, N. Ruiz-Xivillé, A. Rivas-Delgado, E. Luño, T. González, B. Navarro, M. García-Malo, A. Valiente, J. Á. Hernández, M. T. Ardanaz, M. Á. Piñan, M. L. Blanco, M. Hernández-Sánchez, A. Batlle-López, R. Salgado, M. Salido, A. Ferrer, P. Abrisqueta, E. Gimeno, E. Abella,

C. Ferrá, M. J. Terol, F. Ortuño, D. Costa, C. Moreno, F. Carbonell, F. Bosch, J. Delgado, B. Espinet // *Oncotarget* – 2017. – T. 8 – № 33 – 54297–54303c.

183. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes // *Lancet*. – 1971. – T. 298. – № 7731. – 971–972c.

184. Struski S. Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities / S. Struski, C. Gervais, C. Helias, R. Herbrecht, B. Audhuy, L. Mauvieux // *Leukemia* – 2009. – T. 23 – № 3 – 617–619c.

185. Vetro C. Identification of prognostic parameters in CLL with no abnormalities detected by chromosome banding and FISH analyses / C. Vetro, T. Haferlach, S. Jeromin, A. Stengel, M. Zenger, N. Nadarajah, C. Baer, S. Weissmann, W. Kern, M. Meggendorfer, C. Haferlach – 2018. – T. 183 – 47–59c.

186. Wawrzyniak E. Clonal evolution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance / E. Wawrzyniak, A. Kotkowska, J. Z. Blonski, M. Siemieniuk-Rys, E. Ziolkowska, K. Giannopoulos, T. Robak, A. Korycka-Wolowiec // *Eur. J. Haematol.* – 2014. – T. 92 – № 2 – 91–101c.

187. Wu X. Cytogenetic Analysis of Normal Human B Cells Following CpG Stimulation: Implications for Interpretation of CpG Induced CLL Metaphase Analysis / X. Wu, G. S. Nowakowski, S. A. Smoley, B. Arendt, M. A. Peterson, D. L. Van Dyke, N. E. Kay, D. F. Jelinek // *Blood* – 2008. – T. 112 – № 11 – 3124c.

188. Zenz T. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia : results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up / T. Zenz, A. Kro, K. Scherer, S. Ha, A. Bu, A. Benner, T. Denzel, D. Winkler, J. Edelmann, C. Schwa // *October* – 2008. – T. 112 – № 8 – 3322–3329c.

189. Zneimer S.M. Cytogenetic abnormalities : chromosomal, FISH, and microarray-based clinical reporting / S. M. Zneimer – Moorpark, California: Wiley Blackwell, 2014. – 245–253c.


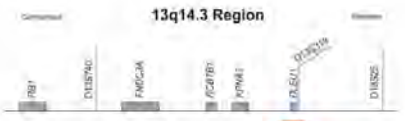
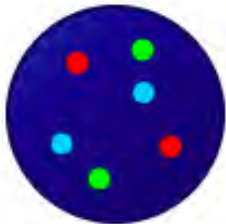


## Приложение

Приложение 1. Схема строения ДНК-зондов и результаты гибридизации, представленные в каталоге фирмы производителя Abbott (США) и Metasystems (Германия).

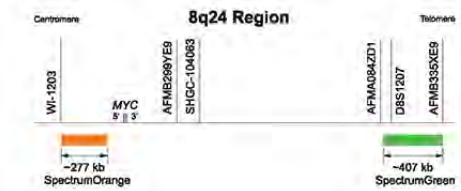
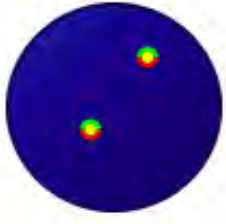
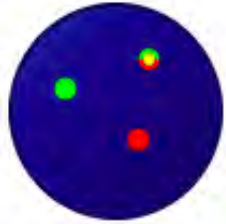
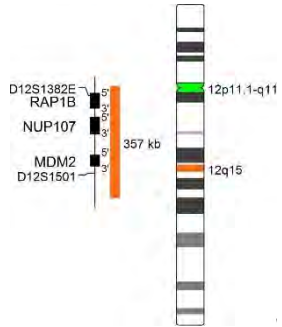
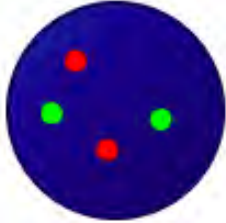
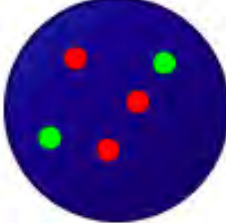
[Metasystems Available at: <https://metasystems-international.com>. Accessed June 13, 2020

Abbott Molecular Available at: <https://www.molecular.abbott/int/de/vysis-fish-chromosome-search>. Accessed June 13, 2020].

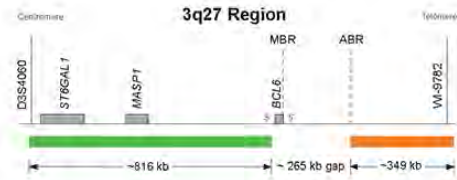
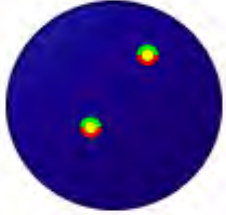
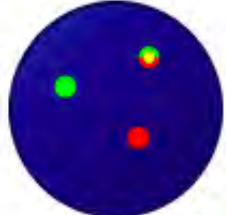
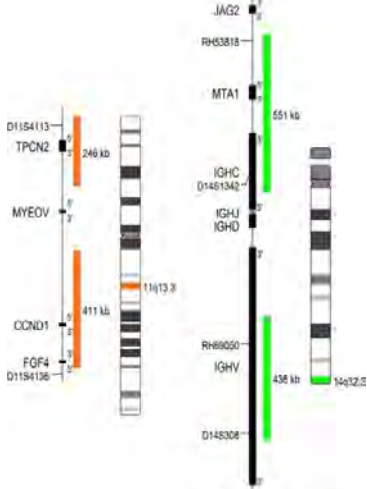
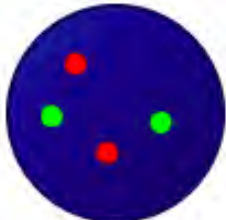

№	Название пробы	Исследуемые локусы/гены	Схема ДНК-зонда	Норма	Патология
1	Vysis CLL FISH Probe Kit (Vysis LSI TP53/LSI ATM+LSI D13S319/D12Z3) (Abbott)	17p13.1/p53 11q22.3/ <i>ATM</i> 12p11.1-q11 13q14.3 13q34	<p>17p13.1 Region</p> <p>LSI TP53 SpectrumOrange Probe</p> <p>11q22.3 Region</p> <p>LSI ATM SpectrumGreen Probe</p>	<p>2R2G</p>	<p>1R2G: выявлена делеция 17p13.1/p53</p> <p>2R1G: выявлена делеция 11q22.3/ATM</p>

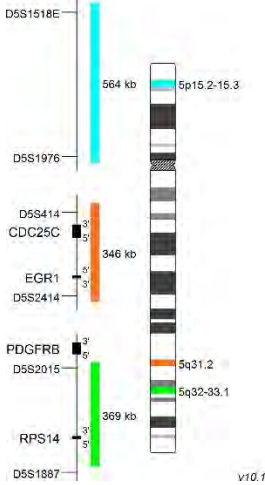
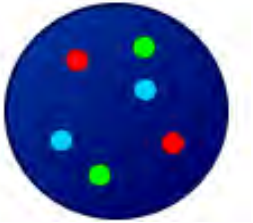

			 <p>12p 12q</p>  <p>13q14.3 Region</p> <p>LSI D13S319 SpectrumOrange Probe</p>	 <p>2R2G2A</p>	 <p>2R3G2A: выявлена трисомия 12</p>  <p>1R2G2A: выявлена делеция локуса 13q14</p>
--	--	--	---	---	--

			<p>13q34 Region</p> <p>Centromere      Telomere</p> <p>SHGC-146516    PRO2    CUL4A    LAMP1    D13S1030    WI-9415</p> <p>612 kb</p> <p>LSI 13q34 SpectrumAqua Probe</p>		
2	<p>XL IGH BA</p> <p>Break Apart</p> <p>Probe</p> <p>(MetaSystems)</p>	14q32.3/ <i>IGH</i>	<p>RH53618</p> <p>MTA1</p> <p>551 kb</p> <p>IGHC</p> <p>D14S1342</p> <p>IGHJ</p> <p>IGHQ</p> <p>RH65064</p> <p>IGHY</p> <p>593 kb</p> <p>D14S308</p> <p>RH37641</p> <p>14q32.3</p>	<p>2F</p>	<p>1F1R1G: выявлена транслокация с вовлечением локуса 14q32.3/<i>IGH</i></p>

3	LSI MYC Break Apart FISH Probe Kit (Abbott)	8q24/ <i>MYC</i>		 <p>2F</p>	 <p>1F1R1G: выявлена транслокация с вовлечением локуса 8q24/<i>MYC</i></p>
4	XL MDM2 Amplification Probe (MetaSystems)	12q15/ <i>MDM2</i>		 <p>2R2G</p>	 <p>3R2G</p>



5	LSI BCL6 (ABR) Dual Color Break Apart rearrangement Probe (Abbott)	3q27/ <i>BCL6</i>		 <p>2F</p>	 <p>1F1R1G: выявлена транслокация с вовлечением локуса 3q27/<i>BCL6</i></p>
6	XL t(11;14) Translocation/D ual Fusion Probe (MetaSystems)	t(11;14)(q13;q32)		 <p>2R2G</p>	 <p>2F1R1G: выявлена транслокация t(11;14)(q13;q32)</p>

7	XL 5q31/5q33/5p15 (MetaSystems)	5q31/5q33/5p15		 <p data-bbox="1469 395 1608 432">2R2G2A</p>	 <p data-bbox="1798 405 2101 767">1R1G2A: делеция длинного плеча хромосомы 5, включающая локусы 5q31 и 5q33</p>
---	---------------------------------------	----------------	---	---	--