ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-
БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

Клеина Елизавета Вячеславовна

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРАТИФИКАЦИЯ И ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ МАНТИЙНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
3.1.28 Гематология и переливание крови

Научные руководители
доктор биологических наук
Мартынкевич Ирина Степановна
кандидат медицинских наук
Волошин Сергей Владимирович

Санкт-Петербург – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ….....…….....4

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В УСТАНОВЛЕНИИ ДИАГНОЗА, ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ МКЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ).....12

1.1. МКЛ. Общие сведения……...…….....12

1.2. Патогенез МКЛ……...…….…….....15

1.3. Молекулярная биология и общая характеристика гена *MYC*…….27

1.4. Роль гена *MYC* в патогенезе МКЛ…….....33

1.5. Цитогенетические особенности МКЛ……..43

1.6. Международный прогностический индекс и дополнительные факторы оценки прогноза в клиническом течении МКЛ……..48

1.7. Иммунофенотипические характеристики МКЛ……...52

1.8. Индекс пролиферативной активности Ki-67…….53

ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ…..55

2.1. Характеристика исследуемой группы больных МКЛ……..55

2.2. Стандартное цитогенетическое исследование.....58

2.3. Флуоресцентная in situ гибридизация …… 61

2.4. Статистическая обработка полученных данных.....69

ГЛАВА 3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ МКЛ……70

3.1. Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC*……70

3.2. Клинико-лабораторная характеристика больных «double-hit» МКЛ…….73

3.3. Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53*……78

3.4. Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от результатов кариотипирования……81

3.5. Сравнительный анализ клинико-лабораторных характеристик больных МКЛ в зависимости от хромосомных и молекулярно-цитогенетических аберраций……..86

3.5.1. Поиск прогностически значимых клинических и лабораторных характеристик, влияющих на общую выживаемость больных МКЛ……..87

3.5.2. Поиск прогностически значимых параметров, влияющих на безрецидивную выживаемость больных МКЛ……..89

3.5.3. Результаты многопараметрического регрессионного анализа для молекулярно-цитогенетических и клинико-лабораторных факторов риска…….90

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БОЛЬНЫХ МКЛ……..92

4.1. Частота встречаемости и прогностические особенности хромосомных аберраций у больных с МКЛ.....92

4.2. Частота встречаемости и прогностические особенности молекулярно-цитогенетических аберраций у больных с МКЛ……..108

4.2.1. Частота встречаемости транслокации t(11;14)(q13;q32)……108

4.2.2. Роль аберраций гена *TP53* у пациентов с МКЛ……...109

4.2.3. Исследование группы больных МКЛ с изменениями гена *MYC*...116

ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….....140

ВЫВОДЫ.....153

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....155

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ……..156

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....157

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ…….....160

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Мантийноклеточная лимфома (МКЛ) – неходжкинская В-клеточная лимфома с транслокацией, вовлекающей ген *CCND1* и гиперэкспрессией белка циклина D1, гетерогенная по клинической симптоматике, морфологической картине, биологическим и молекулярным характеристикам. Заболевание у большинства пациентов отличается прогрессирующим клиническим течением с низкой чувствительностью к стандартным курсам химиотерапии, кратковременным ответом на проводимое лечение и частым ранним рецидивированием [43, 56, 67, 82, 85, 128].

У больных МКЛ отмечается выраженная клиническая гетерогенность: наряду с быстропрогрессирующими в течение нескольких месяцев, несмотря на получение высокодозной химиотерапии, вариантами заболевания, примерно в 10-15% случаев встречаются индолентные клинические формы МКЛ (иМКЛ), характеризующиеся продолжительной выживаемостью и возможностью применения тактики «watch and wait» («наблюдай и жди») [39, 112, 116] .

Преимущественно при МКЛ выявляется транслокация t(11;14)(q13;q32). Вместе с этим, примерно у 1% больных обнаруживаются ее редкие варианты, t(2;11)(p11;q13) и t(11;22)(q13;q11), которые приводят к гиперэкспрессии белка циклина D1 и являются важнейшей диагностической характеристикой данной опухоли [67, 128, 137].

Показано, что из всех В-клеточных лимфом МКЛ является лимфомой, при которой определяется самая высокая частота встречаемости нестабильности генома, и, наряду с высокоспецифической транслокацией t(11;14)(q13;q32) у подавляющего числа пациентов обнаруживаются вторичные хромосомные и молекулярно-цитогенетические аберрации, вовлекающие в лимфомогенез гены, регулирующие клеточный цикл, репарацию поврежденной ДНК и апоптоз. Наличие дополнительных хромосомных аберраций высоко ассоциировано с неблагоприятным клиническим течением заболевания и снижением продолжительности общей и безрецидивной выживаемости [116, 130, 133].

В последние годы все большее внимание в литературе стало уделяться высоко агрессивной подгруппе МКЛ, «double-hit» МКЛ, которая характеризуется сочетанием транслокаций генов *CCND1* и *MYC*, плеоморфным/бластоидным морфологическим вариантами опухоли и рефрактерным течением заболевания. Поскольку при «double-hit» МКЛ прогноз крайне неблагоприятный, для верификации данной группы пациентов с целью выбора оптимальной терапевтической тактики необходима разработка алгоритма диагностики, включающего скрининг на определение изменений гена *MYC*, в особенности для пациентов с бластоидным и плеоморфным вариантами МКЛ, а также при подозрении на прогрессирование или трансформацию опухоли [17, 41, 95, 133, 139].

Важно отметить, что детальный анализ хромосомных аберраций в опухолевом материале (периферическая кровь, лимфатические узлы, пораженные опухолью органы, костный мозг) является одним из основных дифференциально-диагностических критериев МКЛ. Выявленные хромосомные нарушения помогают не только в диагностике МКЛ, но и в определении характера течения опухолевого процесса [66, 67, 100]. Особая роль отводится комплексным изменениям кариотипа (наличие трех и более хромосомных аберраций), являющимся неблагоприятным фактором прогноза. Пациенты с множественными хромосомными изменениями имеют низкую выживаемость и резистентность к проводимой химиотерапии [66, 111]. Выявление кариотипа с комплексными хромосомными аберрациями возможно только при стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ), позволяющим детально оценить хромосомной набор каждой клетки, обнаружить как структурные перестройки, так и аномалии числа хромосом. В случаях, когда есть подозрение на наличие криптических перестроек (микроделеции или микроинсерции), которые не выявляются при СЦИ, маркерной хромосомы или для определения точного расположения химерного гена в случае вариантной транслокации используется исследование интерфазных ядер методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) [19]. Оценка совокупности цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик генома, а также

повышение выявляемости патологического клона возможны только при использовании комплексного подхода в генетической диагностике МКЛ [31].

Для определения прогноза течения МКЛ в настоящее время используют шкалу Международного прогностического индекса (MIPI) и её модификации – упрощенный индекс (MIPI-c), а также комбинированный биологический индекс (MIPI-b), в расчете которого учитывается количество клеток экспрессирующих Ki-67. Однако данные шкалы не включают хромосомные и молекулярно-цитогенетические особенности опухолевого клона, существенно влияющие на течение и прогноз заболевания [1, 36, 67].

В планируемой научно-исследовательской работе при помощи стандартного цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследований будет изучена биологическая гетерогенность МКЛ и проанализированы особенности и прогноз течения заболевания у пациентов с различными генетическими повреждениями. По результатам исследования будут выделены прогностически однородные группы пациентов по комплексу цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик. Особый интерес представляет детальное изучение высоко агрессивной подгруппы МКЛ, «double-hit» МКЛ, ее хромосомных, молекулярно-цитогенетических и клинических характеристик, поскольку на настоящее время практически нет данных о многоцентровых исследованиях, посвященных данной нозологии, как в отечественной, так и в иностранной литературе. Так как пациенты с «double-hit» МКЛ характеризуются быстропрогрессирующим клиническим течением, неблагоприятным прогнозом, низкими показателями выживаемости и необходимостью незамедлительного проведения высокодозной химиотерапии необходимо разработать и оптимизировать генетическую диагностику «double-hit» МКЛ для правильной постановки диагноза таким больным в максимально короткие сроки.

Таким образом, необходимы дополнительные исследования и новые данные по генетическому профилю МКЛ, определяющему свойства опухолевого клона и вариабельность клинического течения заболевания, а планируемое

диссертационное исследование является актуальным и представляет научный и практический интерес.

Степень разработанности темы

Большое количество работ посвящено изучению распространенности и роли генетических аберраций у пациентов с МКЛ. Однако практически отсутствуют данные о частоте встречаемости и комплексном влиянии цитогенетических и молекулярно-цитогенетических характеристик опухолевого клона на клиническое течение и прогноз МКЛ. Это указывает на необходимость сочетанного исследования молекулярно-цитогенетического и цитогенетического профиля больных МКЛ. Стратификация пациентов с учетом выявленных аномалий генома на группы риска позволит оптимизировать алгоритм генетической диагностики с целью выбора оптимальной терапевтической тактики, оценить результаты лечения, а также спрогнозировать течение заболевания.

Цель исследования

Разработать генетическую стратификацию больных мантийноклеточной лимфомой на основе прогностически значимых генетических маркеров и их взаимосвязи с клиническими особенностями заболевания.

Задачи исследования

1. Изучить частоту обнаружения хромосомных аберраций методом кариотипирования при параллельном культивировании костного мозга и периферической крови у больных мантийноклеточной лимфомой.

2. Провести сравнительный анализ частоты выявления генетических аберраций методами стандартного цитогенетического исследования и флуоресцентной *in situ* гибридизации у пациентов с мантийноклеточной лимфомой.

3. Выявить частоту встречаемости транслокации t(11;14)(q13;q32), комплексных изменений кариотипа, аберраций гена *MYC* и хромосомы 17 у больных мантийноклеточной лимфомой.

4. Установить взаимосвязь между генетическими аномалиями и клинико-лабораторными характеристиками опухолевых клеток, определить их влияние на течение и прогноз заболевания и выявить группу пациентов высокого риска неблагоприятного течения мантийноклеточной лимфомы с учетом цитогенетических и молекулярно-генетических данных.

5. Оптимизировать алгоритм диагностики и определения прогноза течения заболевания у больных мантийноклеточной лимфомой с учетом результатов молекулярно-генетических и цитогенетического исследований.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые:

- получены новые данные о частоте встречаемости и прогностической значимости транслокации t(11;14)(q13;q32), комплексных изменений кариотипа, нарушений гена *MYC*, делеции гена *TP53* или моносомии хромосомы 17 у пациентов с мантийноклеточной лимфомой;

- изучена взаимосвязь выявленных генетических изменений с клиническими характеристиками МКЛ (показателями периферической крови и костного мозга, наличием гепато- и спленомегалии, выраженностью лимфаденопатии, симптомами опухолевой интоксикации);

- определена целесообразность выделения «double-hit» МКЛ как особо неблагоприятной высоко агрессивной подгруппы;

- показана важность включения хромосомных аберраций (цито- и молекулярно-цитогенетических) в алгоритм лабораторной диагностики мантийноклеточной лимфомы для оценки прогноза течения заболевания.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты исследований позволят создать и оптимизировать алгоритм генетической диагностики пациентов с МКЛ, основанный на данных стандартного цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследований, принимая во внимание особенности генома клеток патологического клона и дополнить представления о характеристике, частоте выявляемости и прогностической значимости хромосомных аберраций. Это повысит качество диагностики, определения стратегии выбора терапии и мониторинга величины опухолевого клона у больных МКЛ.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинико-лабораторные, цитогенетические, молекулярно-цитогенетические, гистологический и иммуногистохимический методы исследования, многоцветная проточная цитофлуориметрия, рентгенологические и статистические методы анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Наличие у больных МКЛ комплексных изменений кариотипа, а также нарушений генов *TP53* и *MYC* значимо снижает продолжительность общей и безрецидивной выживаемости и позволяет отнести таких пациентов к группе высокого риска неблагоприятного течения заболевания.

2. Аберрации гена *MYC* являются независимым прогностически значимым фактором, определяющим неблагоприятное клиническое течение МКЛ.

3. Нарушения генов *TP53* и *MYC* высоко ассоциированы с нестабильностью генома и обнаружением при СЦИ комплексных числовых и структурных изменений кариотипа.

4. Достоверное влияние на прогноз заболевания хромосомных нарушений и аберраций в генах *TP53, MYC* позволяет включить проведение СЦИ и FISH-исследования для обнаружения наличия изменений в кариотипе и в данных генах всем больным с МКЛ.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности обусловлена проведением цитогенетических и молекулярно-генетических исследований у большой группы больных (117 пациентов с МКЛ), использованием достоверных методов исследования, качеством проведения лабораторных анализов и статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации представлены на VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2021), XVIII Российской конференции с международным участием «Злокачественные лимфомы» (Москва, 2021), II-й научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021), 27th Congress of the European Hematology Association (Вена, 2022), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2023), III-й научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2023).

По теме диссертации опубликованы 9 печатных работ, из них – 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови. Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, а именно: п. 6 и п. 13.

Внедрение результатов работы

Цитогенетические и молекулярно-цитогенетические методы диагностики, а также мониторинга больных МКЛ внедрены и применяются в практической и

научно-исследовательской деятельности Научно-исследовательского центра клеточной и молекулярной патологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства». Результаты исследований используются в работе гематологических отделений лечебно-профилактических учреждений Санкт-Петербурга – Городской больницы №15, ГБУЗ Ленинградской областной клинической больницы, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России.

Личное участие автора в исследовании

Автором лично выполнялись: планирование исследований; оптимизация методики и выполнение FISH-анализа для выявления транслокации t(11;14)(q13;q32), изменений гена *MYC*, делеции гена *TP53* или моносомии хромосомы 17; сбор информации из историй болезни; анализ полученных данных; статистическая обработка и обобщение результатов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив разработки темы и библиографического списка. Работа изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 63 рисунка. Библиографический список включает 24 источника на русском языке и 118 на иностранном языке.

ГЛАВА 1 СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В УСТАНОВЛЕНИИ ДИАГНОЗА, ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ МКЛ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ)

1.1 Мантийноклеточная лимфома. Общие сведения

Мантийноклеточная лимфома (МКЛ) – В-клеточная неходжкинская лимфома (НХЛ), гетерогенная по клинической симптоматике, морфологической картине, биологическим и молекулярным характеристикам [3, 23, 35, 62, 76]. Заболевание в большинстве случаев отличается прогрессирующим клиническим течением, медиана общей выживаемости (ОВ) составляет от 30 до 43 месяцев [60].

Среди всех НХЛ МКЛ встречается примерно в 6-10% случаев [101]. Чаще всего болеют мужчины (соотношение мужчины/женщины 3:1). Медиана возраста на момент диагностики - 68 лет [35].

МКЛ развивается из клеток пре-герминативного центра первичных фолликулов или мантийной зоны вторичных фолликулов [64]. Выделяют нодулярный, мантийный и диффузный типы роста. В ряде случаев может наблюдаться их сочетание.

Согласно классификации ВОЗ 2008 г., для МКЛ характерны следующие морфологические варианты: маргинально-клеточный, напоминающий лимфому маргинальной зоны (ЛМЗ), в большинстве случаев сопровождающийся выраженной спленомегалией; мелкоклеточный, сходный с лимфомой из малых лимфоцитов (ЛМЛ), плеоморфный и бластоидный, встречающийся примерно у 20% больных, характеризующийся циркуляцией бластов среднего размера, часто с невыраженными нуклеолами и очень высоким пролиферативным индексом за счет высокой скорости деления клеток. Важно отметить, что бластоидный вариант ассоциирован с крайне агрессивным клиническим течением, более частым

поражением центральной нервной системы (ЦНС), низкой ОВ и множественными генетическими изменениями [2, 6, 15, 42, 121, 125].

Преимущественно на момент диагностики у большей части больных определяется зрелоклеточная опухоль с генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, поражением костного мозга (КМ), периферической крови (ПК) и слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). В редких случаях происходит изолированное поражение селезенки и КМ или слизистых оболочек, чаще всего вовлекается ЖКТ [6, 18].

Более 80% больных на момент первичного обращения находятся в III или IV стадии и имеют В-симптомы, включающие в себя: ночные поты, внезапную потерю веса (более чем на 10% от общей массы тела), повышение температуры (особенно в вечернее время), кожный зуд, как правило, без сыпи, необычно сильную усталость [3, 5]. Заболевание у большинства пациентов протекает агрессивно, с низкой чувствительностью к стандартным курсам химиотерапии (ХТ), кратковременным ответом на проводимое лечение и частыми рецидивами. Примерно у 10-15% пациентов выявляются иМКЛ, отличающиеся длительной выживаемостью и возможностью применения тактики «watch and wait» («наблюдай и жди») [2, 25, 35, 67, 84, 124, 131, 134]. Преимущественно у таких больных наблюдается общесоматический статус, соответствующий низким баллам по шкале ECOG, нормальный уровень ЛДГ в сыворотке крови и низкая группа риска по шкале MIPI [64]. Также особенностями иМКЛ являются отсутствие экспрессии или низкий уровень экспрессии гена *SOX11*, соматическая гипермутация генов *IGVH*, низкий индекс пролиферации опухоли (Ki-67 менее 30%), преобладание классического морфологического варианта и умеренный лейкоцитоз. У пациентов не выявляются поражения экстранодальных органов и тканей и выраженная лимфаденопатия. Генетически иМКЛ характеризуется стабильностью генома и отсутствием инактивации генов *TP53*, *CDKNA2* и *ATM*, что является важным фактором, определяющим ее индолентное клиническое течение [2, 100, 108].

Диагностика МКЛ, как правило, базируется на патогномоничных гистологических характеристиках опухоли, но в ряде случаев наблюдается

схожесть морфологической картины с другими лимфоидными опухолями, что затрудняет постановку правильного диагноза. Дифференциальную диагностику МКЛ проводят с хроническим лимфолейкозом/лимфомой из малых лимфоцитов (ХЛЛ/ЛМЛ), фолликулярной лимфомой (ФЛ) и ЛМЗ.

Выявление высокоспецифической для МКЛ транслокации t(11;14) помогло более точно осуществлять диагностику данной опухоли, а также проводить дифференциальную диагностику как с другими лимфомами, так и выделять отдельные морфологические варианты МКЛ.

До недавнего времени МКЛ считалось заболеванием с неблагоприятным прогнозом. Клинические исследования, проводимые в последние десятилетия, показали высокую гетерогенность МКЛ и позволили существенно продвинуться в понимании молекулярно-биологических особенностей патогенеза МКЛ, а также максимально персонализировать и оптимизировать терапевтическую тактику ведения пациентов учитывая генетические характеристики опухоли и стратификацию на группы риска [35, 64, 67, 88, 122].

Несмотря на значительное улучшение показателей беспрогрессивной выживаемости (БПВ) (примерно 2 года после первой линии стандартной дозовой интенсивности и более 5 лет после высокодозной ХТ с применением высоких доз цитарабина), продолжает встречаться вариабельность в клиническом течении опухоли, и помимо МКЛ с первично-рефрактерным течением выявляются случаи, при которых БПВ составляет более 7 лет [38].

Исследования показали важность применения высокодозной ХТ, риски аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК), терапии высокими дозами цитарабина у молодых пациентов и преимущества от поддерживающей терапии ритуксимабом и бенамустином у пожилых пациентов. Благодаря пониманию молекулярных аспектов патофизологии МКЛ стало возможным применение в качестве таргетной терапии новых эффективных веществ (протеосомный ингибитор бортезомиб, иммуномодулятор леналидомид, ингибитор тирозинкиназы Брутона ибрутиниб).

Увеличивающееся количество таргетных препаратов, действующих непосредственно на молекулярные механизмы, лежащих в основе лимфомогенеза, открывает новые перспективы для пациентов с МКЛ [35, 67, 77, 94, 109].

Развитие молекулярных и цитогенетических методов диагностики МКЛ, внедрение которых в рутинную лабораторную практику получило значительное развитие в последнее десятилетие, помогает выявить патогенетические аспекты клинического течения опухолевого процесса, в особенности случаев опухолевой прогрессии, значительно расширить возможности прогнозирования течения МКЛ и ответа на проводимую терапию, а также обнаружить гены-мишени для развития таргетной терапии МКЛ [64].

1.2. Патогенез МКЛ

Реципрокные хромосомные транслокации, вовлекающие гены иммуноглобулина, являются наиболее распространенным генетическим механизмом в патогенезе лимфоидных опухолей [67]. Преимущественно у больных МКЛ обнаруживается транслокация t(11;14)(q13;q32) [1, 97], гораздо реже встречаются транслокации t(2;11)(p11;q13) [101, 108] и t(11;22)(q13;q11), приводящие к гиперэкспрессии белка циклина D1, и являющиеся важнейшим диагностическим признаком данной опухоли (рисунок 1) [75, 101, 108].

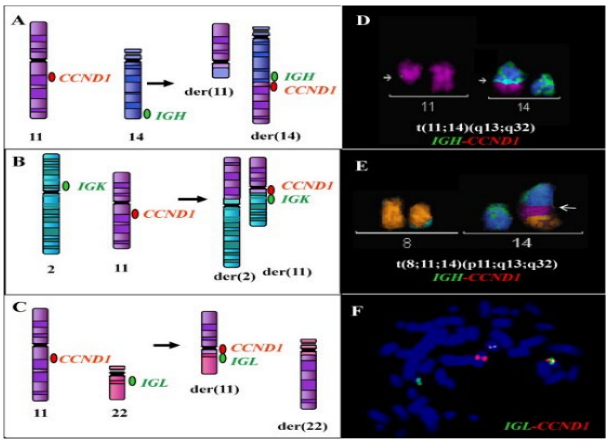


Рисунок 1 - Транслокации t(11;14)(q13;q32), t(2;11)(p11;q13) и t(11;22)(q13;q11) [108]:

(A) Схематическое изображение классической транслокации гена *CCND1* (локус 11q13) (красный цвет) и *IGH* (локус 14q32) (зеленый цвет). Также на схеме представлены хромосомы,

не вступившие в транслокацию; окрашенные точки обозначают регионы, анализируемые FISH-методом. После транслокации обе дериватные хромосомы обозначены сливным сигналом (слияние зеленого и красного сигналов) на деривате хромосомы 14. (B) Транслокация t(2;11)(p11;q13) с участием генов легкой цепи иммуноглобулина kappa/2p11. Сливной сигнал локализуется на деривате хромосомы 11. (C) Вариантная транслокация t(11;22)(q13;q11) с вовлечением генов легкой цепи иммуноглобулина lambda/22q11. Сливной сигнал определяется на деривате 11 хромосомы. (D) Транслокация t(11;14)(q13;q32), выявляемая M-FISH. Розовым цветом обозначена хромосома 11, 14 – зеленым. Локализация сливного сигнала на 14 хромосоме обозначена стрелкой. (E) Часть кариограммы M-FISH комплексной транслокации с вовлечением 8 хромосомы (оранжевый цвет). Сливной сигнал на деривате 14 хромосомы указан стрелкой. (F) FISH-исследование, выполненное на метафазной пластинке с использованием ДНК-проб к локусам генам *IGλ* (локус 22q11) и *CCND1*. Сливной сигнал определяется на дериватной хромосоме.

Royo и соавт. обобщили результаты исследований и пришли к выводу, что в 99,0% случаев МКЛ обнаруживается транслокация t(11;14)(q13;q32), в то время как у 1% пациентов при диагностике МКЛ определяются вариантные транслокации с участием гена *CCND1* (локус 11q13) и легких цепей гена иммуноглобулина (*IGL*) (каппа *IGк* и лямбда *IGλ*), а также с вовлечением генов *CCND2* (локус 12p13), *CCND3* (локус 6p21) (рисунок 2) [108].

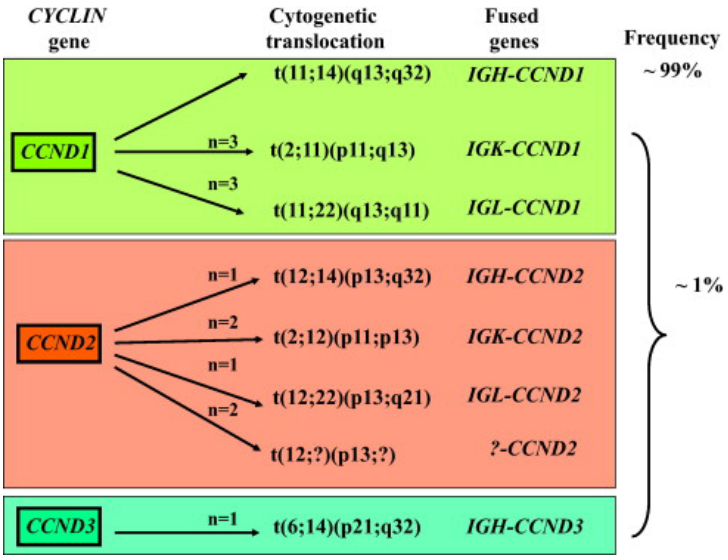


Рисунок 2 - Варианты хромосомных транслокаций в дебюте МКЛ [108]

Транслокация t(11;14) при кариотипировании детектируется примерно в 65% случаев. Выявляемость транслокации t(11;14) FISH-исследованием с

использованием ДНК-проб к генам *IGH* и *CCND1* составляет 99%. M-FISH или СЦИ в комбинации с FISH-методом помогают обнаруживать комплексные транслокации с вовлечением генов *IGH*, *CCND1* и других хромосом, таких как 3, 6, 8, 10 и 17. Отмечено, что более чем у 15% пациентов с МКЛ, которым выполнялось FISH-исследование на определение транслокации t(11;14), выявлялось атипичное распределение сигналов, в том числе дополнительные копии сливных сигналов от транслокации t(11;14) [64, 66, 108]. Предполагается, что увеличение копийности сливных сигналов подразумевает два сопутствующих генетических пути дерегуляции циклина D1, транслокацию и амплификацию, действуя одновременно на одну и ту же аллель [54, 64, 65, 66, 108].

Менее чем в 5% случаев МКЛ выявляется лимфома, с морфологической картиной, иммунофенотипом и клиническими проявлениями классической МКЛ. Однако, у таких пациентов не определяются аберрантная экспрессия циклина D1 и транслокации t(11;14), но при этом детектируется гиперэкспрессия циклина D2 или D3 [67, 100, 108, 110]. Quintanilla-Martinez с соавт. описали 4 больных МКЛ с экспрессией циклина D2 и транслокацией, вовлекающей ген *CCND2*. Диагноз МКЛ подтверждался иммуногистохимическим методом исследования (ИГХ), ПЦР и FISH-анализом. Пациенты с МКЛ, у которых выявлялась экспрессия циклина D2, характеризовались наличием транслокации с участием гена *CCND2,* приводящей к гиперэкспрессии циклина D2, и генов *IGH* или *IGK* в качестве партнеров. Исследованием методом FISH у больных обнаружены транслокации t(2;12)(p12;p13)/*IGK-CCND2* и t(12;14)(p13;q32)/*CCND2-IGH* [59, 102]. Shiller с соавт. представили случай CD5 позитивной и *CCND1* негативной МКЛ с транслокацией, обнаруженной при FISH-анализе, вовлекающей гены *CCND2* и *IGλ* [117]. Wlodarska и соавт. провели дополнительное исследование 8 больным с МКЛ, у которых не определялись транслокация t(11;14) и перестройка гена *CCND1*. У двоих таких пациентов выявлялась экспрессия циклина D1, еще у двоих - экспрессия циклина D2, у троих пациентов - экспрессия циклина D3, у одного больного экспрессия белка семейства циклинов группы D не обнаруживалась. Выполнение FISH – анализа помогло детектировать транслокацию

t(2;12)(p11;p13)/*IGK-CCND2* у 1 из двух пациентов с экспрессией циклина D2 и t(6;14)(p21;q32)/*CCND3-IGH* у 1 из циклин D3 положительных пациентов. Кроме того, выявлена криптическая транслокация t(2;14)(p24;q32) с участием гена *MYCN* (локус 2p24) у двоих больных с бластоидным морфологическим вариантом МКЛ (один пациент циклин D негативный, у другого выявлялась экспрессия циклина D3). В обоих случаях определялась экспрессия циклина E. Исследование выявило аберрантную экспрессию циклина D2 и D3 у больных с отсутствием транслокации t(11;14) и показало t(11;14) – независимую экспрессию циклина D1 в 25% случаев. Обнаружение экспрессии циклина E у двух пациентов с отсутствием транслокации t(11;14) характеризовалось криптической транслокацией t(2;14)(p24;q32) и выявлением гена *MYCN* в качестве онкогена, кодирующего белок N-MYC, ассоциированного с лимфомогенезом бластоидного варианта МКЛ, клинически важного признака, определяющего вовлечение ЦНС у пациентов с МКЛ без t(11;14). Белок N-MYC относится к семейству факторов транскрипции MYC, играющих важную роль в онкогенезе за счет нарушения большинства клеточных функций, включая регуляцию клеточного цикла, апоптоз, метаболизм, клеточную адгезию и дифференцировку. Таким образом, показано, что отсутствие экспрессии *CCND1* у пациентов с МКЛ не противоречит диагнозу МКЛ, и, кроме того, предположено, что аберрантно экспрессированные циклины D2 и D3, входящие в семейство циклинов группы D, функционально могут проявлять себя в патогенезе МКЛ как циклин D1 [136].

В исследованиях, использующих данные сравнительной геномной гибридизации (CGH) и SNP (однонуклеотидного полиморфизма), показано, что в случаях МКЛ без экспрессии циклина D1 выявлялись изменения генома подобные классическому варианту МКЛ с экспрессией циклина D1, что позволило предположить, что оба варианта МКЛ, как с экспрессией, так и с отсутствием экспрессии циклина D1 могут быть действительно биологическими вариантами МКЛ. Однако, роль транслокаций с вовлечением *CCND2* и *D3* как альтернативных патогенетических механизмов перестройки *CCND1* до конца не известны [58, 108, 111].

Также в некоторых случаях у пациентов с агрессивным течением МКЛ и отсутствием гиперэкспрессии циклинов D1, D2 и D3 выявляется нарушение регуляции циклина группы E [74]. Циклины группы E, связываясь с циклинзависимой киназой Cdk2, регулируют переход клетки из G1 в S-период клеточного цикла и запускают синтез ДНК [63].

По результатам проведенных исследований обнаружен ядерный белок SOX11 (Sry-related high-mobility-group box), являющийся диагностическим и прогностическим маркером, выявленным в равной степени как у пациентов с экспрессией, так и без экспрессии циклина D1, что определяет важность его использования в диагностике МКЛ [45, 52, 64, 80, 93, 96, 100]. У больных МКЛ ядерная экспрессия белка SOX11 обнаруживается примерно в 90% случаев. Также белок SOX 11 выявляется у пациентов с лимфобластной лимфомой, лимфомой Беркитта (ЛБ), Т-пролимфоцитарной лимфомой, волосатоклеточным лейкозом [13, 87]. Транскрипционный фактор SOX11 играет важную роль в развитии нервной ткани и необходим для тканевого ремоделирования в эмбриогенезе. Трансактивация транскрипционного фактора PAX5, опосредованная SOX11, приводит к блокировке плазмоцитарной дифференцировки В-клеток через супрессию PR/SET домена 1 (PRDM1), также известного как BLIMP1 (B-lymphocyte maturation-induced protein 1), являющегося репрессором транскрипции и кодирующий белок, который индуцирует созревание лимфоцитов [5, 74]. Гиперэкспрессия SOX11 в клетках трансгенных мышей (Eμ-SOX11-EGFP) приводит к усилению сигнального пути В-клеточного рецептора (BCR) в В-клетках мыши и индуцирует олигоклональную гиперплазию В-клеток в селезенке с иммунофенотипом (CD5+CD19+CD23-), идентичным МКЛ у человека. В клетках МКЛ ген *SOX11* регулирует миграцию клеток, инвазию, рост, ангиогенез [5].

Экспрессия белка SOX11 также является важным маркером минимальной остаточной болезни, используется для мониторинга ответа на проведенную терапию и прогноза рецидива МКЛ [64].

Транслокация t(11;14) вызывает конституциональную гиперэкспрессию *CCND1*, которая не выявляется в нормальных В-лимфоцитах, и дерегуляцию

клеточного цикла. Это событие считается первичным онкогенным механизмом в развитии МКЛ [3, 30, 34, 100, 104].

Показано, что МКЛ - одна из В-клеточных лимфом с самой высокой частотой встречаемости генетической нестабильности клеток опухолевого клона и значительным количеством вторичных генетических аберраций и хромосомных нарушений. Вторичные генетические события увеличивают онкогенный потенциал циклина D1 и наиболее часто инактивируют пути репарации поврежденной ДНК (ATM/CHK2/p53). В сочетании эти изменения способствуют увеличению пролиферации клеток, усиливают генетическую нестабильность и ведут к прогрессированию заболевания. В патогенез МКЛ вовлекаются несколько сигнальных путей, включая часто конститутивно активированный PI3K/AKT/mTOR путь (PI3K - фосфатидилинозитол-3 киназа, Akt – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, m-TOR – mammalian target of rapamycin), который запускает пролиферацию и сохранение опухолевого клона. Каскад WNT, Hedgehog и сигнальные пути NF-kB также вносят свой вклад в лимфомогенез МКЛ [66, 100, 106, 133].

В результате транслокации ген *CCND1*, расположенный на длинном плече 11 хромосомы (локус 11q13) переносится в область энхансера конституционально гиперэкспрессированных в В-лимфоцитах генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGH) (локус 14q32), что приводит к гиперэкспрессии гена *CCND1* и повышенной продукции белка циклина D1 [8, 62, 67, 136]. Экспрессия *CCND1* происходит в опухолевых В-клетках с генетическими изменениями локуса 11q13, возникшими либо в результате транслокации или увеличения копийности 11q13 [30].

Семейство циклинов группы D относятся к циклинам фазы G1 клеточного цикла и состоит из белков D1, D2, D3, основная роль которых - регуляция перехода клетки из фазы G1 в S-фазу за счет связывания внеклеточных сигналов с механизмами клеточного цикла. В лимфоцитах в норме выявляется экспрессия циклина D3, в то время как в опухолевых клетках при МКЛ определяется аберрантная экспрессия циклина D1, которая характерна для мезенхимальных и эпителиальных клеток, а также низкая экспрессия циклина D3. Выявление

повышенной экспрессии циклина D1 является важнейшим критерием диагностики, а также дифференциальной диагностики МКЛ [8, 18, 30, 50].

В состав гена *CCND1* входит 5 экзонов, кодирующих изоформы белка CCND1, D1a и D1b. Наиболее часто происходит коэкспрессия матричных РНК циклинов D1a и D1b. Хотя изоформа циклина D1b, вероятно, обладает высоким потенциалом к трансформаци в культивированных клетках, ее онкогенный механизм в лимфомогенезе МКЛ до конца не понятен [67].

В результате анализа точек разрыва локусов 11q13 и 14q32 выявлено, что что транслокация t(11;14) происходит на стадии первичной перестройки генов иммуноглобулинов в костномозговой клетке-предшественнице В-лимфопоэза (пре-В стадия дифференцировки) между одним из D- и J-сегментов генов иммуноглобулинов [66, 67].

Большинство перестроек локуса 11q13 возникает в области, называемой главный кластер транслокации (major translocation cluster-MTC) [8, 66].

Циклин D1 связывается с циклинзависимыми киназами 4 (CDK4) или 6 типов (CDK6), и формирует комплекс, который за счет фосфорилирования блокирует белок ретинобластомы (RB). Белок RB является инактиватором транскрипционного фактора E2F. В покоящихся клетках он образует комплекс с E2F-DP (белок транскрипционного фактора и димеризованный партнер белка), который препятствует репликации ДНК. Блок RB приводит к инактивация супрессорного эффекта RB на рост и пролиферацию клеток за счет высвобождения транскрипционного фактора E2F из цитоплазмы в ядро клетки, регулирующего экспрессию генов, которые кодируют белки, необходимые для последующего перехода клетки из G1 (пресинтетического периода) в S фазу клеточного цикла (циклины A и E, ДНК-полимераза, CDK2, тимидинкиназа) (рисунок 3) [28].

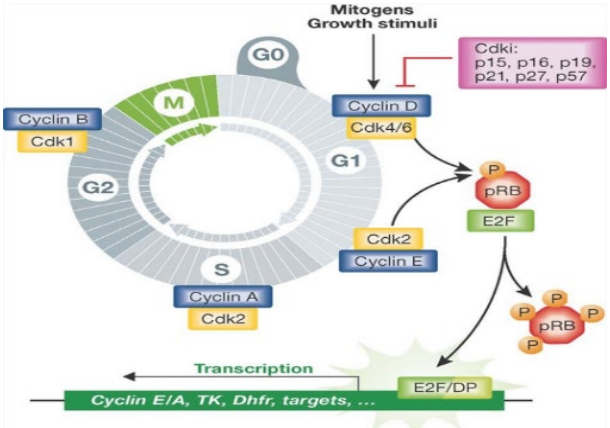


Рисунок 3 – Молекулярная регуляция клеточного цикла [28]:

Циклины группы D образуют комплекс с CDK4 и CDK6, который за счет фосфорилирования белка RB способствует поступлению транскрипционного фактора E2F из цитоплазмы в ядро клетки и инициации экспресии генов, необходимых для вступления клетки в синтетическую фазу.

Нарушение регуляции комплекса, который циклин D1 образует с CDK4 или CDK6 (амплификация, гиперэкспрессия), приводит к повышенной экспрессии пролиферативных сигнальных путей и потере контроля над регуляцией нормального клеточного цикла при лимфомогенезе МКЛ. Гиперэкспрессия циклина D1 инициирует многократное вступление клетки в S-фазу клеточного цикла, что является причиной высокой генетической нестабильности МКЛ. За счет повышения экспрессии циклина D1 клетки с цитогенетическими дефектами пропускают контрольную точку апоптоза в G1 фазе клеточного цикла (chekpoint) и получают пролиферативное преимущество перед нормальными клетками, что способствует неконтролируемой пролиферации и накоплению опухолевого клона, а также трансформации нормальной клетки в патологическую [28, 30, 66, 67].

Нарушение регуляции циклина D1 может обладать онкогенетическим потенциалом независимо от его регуляции клеточного цикла с циклинзависимыми киназами. Например, циклин D1 участвует в регуляции нескольких транскрипционных факторов и транскрипционных корегуляторов, включая STAT3 (сигнальный белок и активатор транскрипции 3), CEBPβ (CCAAT/энхансер-связывающий белок β), *BMYB* (ген, относящийся к семейству генов транскрипционных факторов *MYB*) и представителей суперсемейства ядерных

рецепторов (таких как андрогенный рецептор, прогестероновый рецептор и рецептор тиреоидных гормонов), независимо от его активности в комплексе с CDK4. Однако до конца неизвестно, реализуется ли эта транскрипционная регуляторная функция в патогенезе МКЛ [67].

Выделяют два молекулярных подтипа МКЛ, различных в зависимости от профиля экспрессии генов. Классический вариант МКЛ, характеризующийся генетической нестабильностью, немутированными генами тяжелой цепи вариабельного региона иммуноглобулинов (*IGHV*), высоким уровнем экспрессии *SOX11*, и способностью трансформироваться в бластоидный вариант МКЛ после генетической прогрессии. При индолентной ненодальной МКЛ выявляется соматическая гипермутация генов *IGHV*, чаще всего нормальный кариотип (НК), низкий уровень экспрессии или отсутствие экспрессии *SOX11*. В отдельных случаях *SOX11* – негативные МКЛ быстро прогрессируют. Как правило, у таких пациентов выявляются мутации гена *TP53* [52].

Эволюция патогенеза МКЛ происходит за счет накопления критических мутаций с момента раннего возникновения транслокации t(11;14), экспрессии de novo *SOX11* до заболевания, протекающего агрессивно, с комплексными молекулярно-цитогенетическими изменениями (рисунок 4) [74].

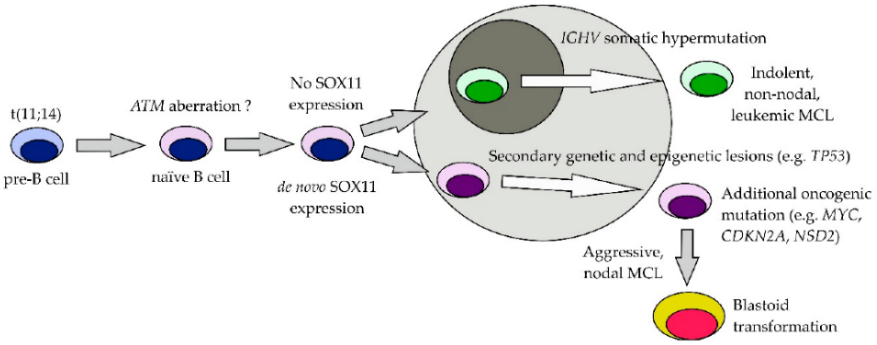


Рисунок 4 - Патогенез МКЛ в модификации P. Klener [74]:

На рисунке показано пошаговое накопление критических мутаций с момента раннего возникновения транслокации t(11;14), делеции гена *ATM*, экспрессии de novo *SOX11* до агрессивного заболевания с нарушениями гена *TP53*, комплексными молекулярно-цитогенетическими изменениями.

Патогенез МКЛ комплексный и включает молекулярные изменения на разных уровнях регуляции. Таргетные гены и сигнальные пути включают регуляторные элементы механизма клеточного цикла и физиологического старения (ARF/BMI1/CDK4/INK4/RB1), сигнальный каскад ответа на повреждение ДНК (ATM/CHK2/p53), молекулярные сигналы контроля выживания клеток. Кроме того, в патогенез вовлекаются гены других сигнальных путей регуляции, такие как *BTK, AKT, mTOR, WNT, NF-κB, TNF*, и *NOTCH*, играющий ключевую роль в патогенезе МКЛ [64].

Мантийноклеточная лимфома, характеризующаяся высоким пролиферативным потенциалом и агрессивным клиническим течением, несет онкогенетические изменения в двух главных регуляторных путях, INK4a/CDK4/RB1 и ARF/MDM2/p53, которые вовлечены в контроль клеточного цикла (рисунок 5) [66].

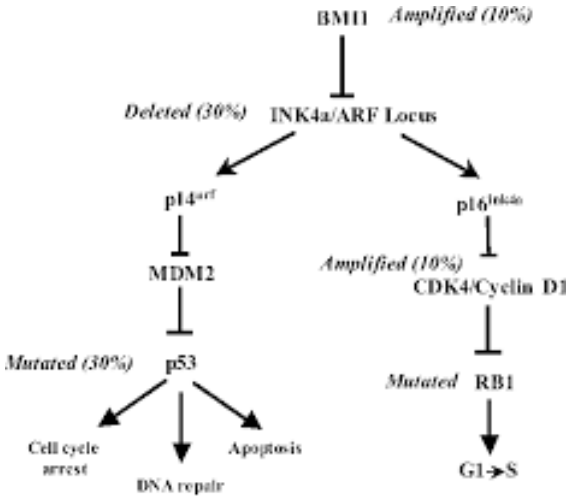


Рисунок 5 – Схема дерегуляции ключевых генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла при МКЛ в модификации P. Jares и соавт. [66]:

Транслокация t(11;14)(q13;q32) приводит к конститутивной гиперэкспрессии циклина D1. Дерегуляция циклина D1, а также случайная амплификация и гиперэкспрессия CDK4 активизирует гиперфосфорилирование и, как следствие, инактивацию RB1. Гомозиготная делеция локуса INK4a/ARF, кодирующего для циклин-зависимых киназ ингибитор $p16^{INK4a}$, обеспечивает высокий уровень активности комплекса циклин D1/CDK4. В качестве альтернативы потери $p16^{INK4a}$ BMI1 амплифицирован или высоко экспрессирован в некоторых случаях МКЛ. Инактивация RB1 также может встречаться при агрессивных вариантах МКЛ.

INK4a/ARF локус также кодирует $p14^{ARF}$, осуществляющий негативную регуляцию MDM2, который способствует инактивации p53. Эти изменения и мутация *TP53* ведут к частой дерегуляции сигнального пути p53.

Гомозиготная делеция *CNKN2A*, находящегося в локусе 9p21, выявляется в 20-30% случаев бластоидного варианта МКЛ, и менее чем в 5% при классическом течении МКЛ. Этот локус кодирует два ключевых регуляторных элемента: INK4a, являющимся ингибитором CDK4, и регулятор MDM2-зависимого разрушения p53 белок ARF. Наличие делеции INK4a в опухолевом субстрате МКЛ может сочетаться с дерегуляцией циклина D1, способствующей переходу клеток из G1 в S фазу клеточного цикла за счет увеличивающегося количества комплекса циклин D1/CDK4. Альтернативным патогенетическим механизмом делеции INK4a может быть амплификация или гиперэкспрессия BMI1, транскрипционного репрессора *CNKN2A*. Инактивация других элементов семейства INK4, таких как *CDKN2B* и *CDKN2C*, происходит за счет гомозиготной делеции в клеточных линиях, что встречается редко при МКЛ.

Обнаружение амплификации CDK4 в ряде случаев агрессивных бластоидных вариантов МКЛ способствует нарушению регуляции перехода клетки из G1 в S фазу клеточного цикла при прогрессии МКЛ. Эта амплификация гена встречается практически только в случаях МКЛ с диким типом локуса *CNKN2A*, что предполагает наличие альтернативного механизма, нарушающего RB1 – зависимый контроль G1/S фазы клеточного цикла. В случаях МКЛ с высокой пролиферативной активностью встречаются микроделеции, инактивирующие тумор супрессорный ген ретинобластомы *RB1*. Подобно амплификации CDK4 эти изменения встречаются в случаях с диким типом локуса *CNKN2A*, позволяя предположить, что онкогенетические изменения более чем одного элемента INK4a/CDK4/RB1 регуляторного пути не являются достаточными для перехода опухоли в более продвинутую стадию.

Гомозиготная делеция *CNKN2A* у пациентов с МКЛ обычно вовлекает ARF, главная функция которого - регулирование стабильности белка P53 за счет предотвращения его MDM2-опосредованной деградации. Гомозиготная делеция

CNKN2A определяет одновременную дерегуляцию клеточного цикла и путь регуляции p53. У пациентов с МКЛ часто детектируются изменения гена *TP53*. В классических случаях МКЛ с низкой пролиферативной активностью опухолевых клеток мутации в гене *TP53* обнаруживаются редко в отличие от бластоидного варианта МКЛ, при котором они выявляются примерно у 30% пациентов и часто ассоциированы с делецией 17(p). Альтернативным механизмом инативации p53 может быть гиперэкспрессия MDM2, которая определяется у малого количества пациентов с МКЛ. Однако, механизм, запускающий повышение экспрессии, не известен. Хотя инактивация *TP53* встречается в опухолях с диким типом *CNKN2A*, она ассоциирована с амплификацией CDK4 или делецией *RB1*, что свидетельствует о способности опухолевых клеток приобретать селективное преимущество за счет инактивации обоих путей регуляции: INK4a/CDK4/RB1 и ARF/MDM2/p53. Одновременная инактивация этих путей регуляции может происходить за счет гомозиготной делеции *CNKN2A* и амплификации *BMI1*. Ген *BMI1*, локализованный на коротком плече 10 хромосомы (10p11), кодирует белок, относящийся к семейству Polycomb, который участвует в регуляции клеточного цикла в качестве репрессора транскрипции *CNKN2A*, или за счет мутации *TP53* с сопутствующей амплификацией CDK4 или делецией *RB1* [24, 66, 67]. Таким образом, выраженность пролиферации генов является лучшим прогностическим признаком продолжительности жизни пациентов, подчеркивает важность нарушения регуляции клеточного цикла, определяющую течение МКЛ [4, 68].

Одним из важнейших этапов патогенеза МКЛ является дерегуляция апоптоза. Белки семейства BCL2 - ключевые регуляторы апоптоза, определяющие клеточную гибель в ответ на множество воздействий. При МКЛ происходит нарушение регуляции сигнального пути BCL2. Часто определяется высокий уровень копийности гена *BCL2*, расположенного на длинном плече хромосомы 18 в регионе 21.3. Молекулярный механизм гиперэкспрессии *BCL2* комплексный и включает амплификацию *BCL2* (24%) и гиперэкспрессию мРНК, кодирующую белок BCL2, как результат аберрантной активации путей регуляции, направленных на выживание клеток (нуклеарный фактор каппа B (NFkB)) или как результат

потери их негативных регуляторов (в том числе, *miR-15/16* за счет делеции 13q). Высокий уровень экспрессии MCL1 характерен для более агрессивных опухолей и может быть увеличен за счет AKT/mTOR сигнального пути. Гиперэкспрессия BCL-X_L связана с конститутивной активацией NF-kB пути. Кроме того, проапоптотический BH3-only белок BIM часто инактивируется за счет геномной делеции гена *BCL2L11*, гомозиготная делеция которого обнаруживается в клеточных линиях МКЛ (Jeko,Z138,SP53, UPN1, SP-49) [4,74].

Несмотря на развитие лекарственных препаратов для лечения МКЛ, терапия таких пациентов остается непростой задачей из-за сложного патогенеза и частых рецидивов, ассоциированных с течением МКЛ. Объединение стандартных и новых диагностических подходов, таких как геномное секвенирование, помогает улучшить понимание патогенеза МКЛ, что, в свою очередь, необходимо для разработки препаратов, оказывающих таргетное действие на сигнальные пути регуляции, вовлекаемые при МКЛ, в особенности в группах пациентов рефрактерных к проводимой терапии и частыми рецидивами [64, 126].

1.3. Молекулярная биология и общая характеристика гена *MYC*

Расположенный на длинном плече хромосомы 8 в локусе 8q24, ген *MYC* является самым часто вовлекаемым в канцерогенез протоонкогеном [14, 30, 142]. Также установлено, что *MYC* – важнейший транскрипционный фактор, регулирующий 10-15% всех генов человека. Под контролем гена *MYC* находится множество клеточных функций: клеточный цикл, рост клеток, метаболизм и биосинтез, адгезия, энергетический обмен и апоптоз [133].

Ген *MYC* первоначально был идентифицирован как клеточный гомолог онкогена *v-myc* вируса миелоцитоматоза птиц (MC29) в 1978 году. Прямое доказательство вовлечения гена *MYC* в онкогенез человека появилось после открытия и идентификации *MYC* на локусе 8q24, и, в последующем, его

транслокации в область генов *IGH* при лимфоме Беркитта. Дальнейшие исследования показали, что *MYC*, связанный с энхансером иммуноглобулина μ или κ у трансгенных мышей, обладал высоким потенциалом к лейкемогенезу, что приводило к развитию В – клеточных лимфом [14, 27, 30].

Ген *MYC* состоит из трех экзонов: некодирующего 1 экзона, имеющего два промотора, экзона 2 и экзона 3, кодирующих белок MYC путем инициации трансляции с нуклеотида 16 второго экзона. Четыре транскрипционных промотора *MYC* с промотором P2 способствуют синтезу примерно 80-90% РНК MYC в нормальных клетках. Рибонуклеиновая кислота-мессенджер (мРНК), передающая информацию от ДНК к клеточному механизму, синтезирующему белок MYC, а также непосредственно сам белок MYC имеют очень короткий период полураспада в нормальных клетках. Без соответствующих направленных регуляторных сигналов уровень белка MYC низкий и недостаточный для поддержания клеточной пролиферации. Степень трансформирующей активности *MYC* также противодействует его способность вызывать апоптоз при минимальной степени нарушения нормальных физиологических условий, обеспечивающих жизнедеятельность клетки [95]. В опухолях, вызванных изменениями гена *MYC*, этот нестабильный баланс регуляции *MYC* теряется, что может индуцировать лимфомагенез [95, 133].

Регуляция многих генов напрямую осуществляется *MYC*, в том числе *LDH-A* и *TERT*. Кроме того, *MYC* вовлекается в регуляцию экспрессии микро-РНК (miRNA), оказывая опосредованное влияние на функционирование ряда генов-мишеней онкогененеза [30].

Белок MYC, кодируемый геном *MYC*, реализует свои транскрипционные функции за счет демиризации с белком MAX, для которого характерен высокий уровень экспрессии в клетках. Показано, что гиперэкспрессия белка MAX не вызывает опухолевую трансформацию клеток. В результате демиризации происходит образование MYC/MAX гетеродимеров за счет ионных взаимодействий между α-спиралями в LZ-районах, которые специфически связываются с энхансерной последовательностью CACGTG (E-бокс) в MYC –

регулируемых промоторах. Гетеродимер MYC/MAX вызывает активацию ацетилирования гистонов за счет взаимодействия с ацетилтрансферазами GCN5, TIP60, p300/CBP, таким образом изменяя компактизацию ДНК в хроматине. Также, гетеродимер MYC/MAX взаимодействуя с E-боксом, оказывает активирующее влияние на элонгацию транскрипции, которая осуществляется РНК-полимеразами типами RNAP I, II, III. Если происходит подавление транскрипции, то гетеродимер MYC/MAX образует комплекс как с белком MIZ1, ингибитором клеточного роста, так и с рядом других транскрипционных факторов, таким образом опосредуя экспрессию генов [14, 30, 133].

Ген *MYC* инициирует трансформацию клеток с помощью нерегулируемой гиперэкспрессии неизмененного белка MYC через три главных механизма: инсерционного мутагенеза, амплификации гена и хромосомной транслокации. Инсерционный мутагенез выявлен при опухолях, вызванных ретровирусами, таких как вирус лейкоза птиц (AVL), который запускает развитие опухолей гемопоэтической ткани, при которых провирусный энхансер встраивается в ДНК клеток выше локализации гена *MYC* и приводит к гиперэкспрессии белка MYC. Амплификация гена *MYC* определяется при гемопоэтических и негемопоэтических опухолях, таких как рак легкого, молочной железы и толстой кишки [95].

Однако, в отличие от других протоонкогенов активация *MYC* не происходит за счет онкогенетических мутаций в кодирующей последовательности или формирования химерных белков, а за счет потери строгого контроля за неизменным белком на уровнях транскрипции и трансляции [95, 133].

Дерегуляция *MYC* играет существенную роль в патогенезе В-клеточных лимфом, и также может определяться при Т-клеточных лимфомах, но частота встречаемости значительно меньше [52, 95, 116]. Например, редкая, но повторяющаяся транслокация t(8;14)(q24;q11), затрагивающая локус, кодирующий Т-клеточный рецептор α/δ, была обнаружена при Т-клеточном остром лимфобластном лейкозе и считается первичным событием, запускающим патогенез Т-ОЛЛ [31].

Нарушение регуляции *MYC* при лимфомагенезе приводит к гиперэкспрессии неизмененного белка MYC и наиболее часто происходит в результате хромосомных транслокаций, лежащих в основе патогенеза лимфом. Вторичные изменения гена *MYC* включают транслокацию или амплификацию, выявляющиеся у пациентов с комплексными изменениями кариотипа (КК), что наиболее часто определяет агрессивное клиническое течение [52, 95, 116].

Транслокация t(8;14)(q24;q32)/*MYC-IGH* стала первой транслокацией с повторяющимися точками разрывов, выявленной при лимфомах [133]. Первые упоминания о транслокации t(8;14)(q24;q32) при ЛБ относятся к 1972 году, когда Manolov и Manolova после внедрения техники бэндирования описали наличие дополнительного бэнда на конце длинного плеча 14 хромосомы у пациентов с ЛБ. В 1976 г. Zech и соавт. определили, что дополнительный материал на q-плече 14 хромосомы является частью длинного плеча хромосомы 8 и его получение связано с транслокацией t(8;14)(q24;q32). Manolova и соавт. показали, что эта транслокация реципрокная, а Zhang и соавт., в свою очередь, сопоставили локализацию точек разрывов и определили их как 8q24.1 и 14q32. Параллельно были открыты вариантные транслокации при ЛБ: t(8;22)(q24;q11) (Berger и соавт. в 1979 г.) и t(2;8)(p12;q24) (Miyoshi, van den Berghe и соавт. в 1979 г.). В 1983 г. Dalla-Favera и соавт. показали, что локус гена *MYC* постоянно перестраивался в «недифференцированных В-клеточных лимфомах», и, что в реарранжировку вовлекается 5’ участок, по всей видимости, неизмененного гена. Кроме того, авторы установили, что в реарранжировку постоянно вовлекаются гены *IGH*, находящиеся на q-плече 14 хромосомы. Также изучение гена *MYC* сопровождалось значительным развитием молекулярно-генетических методов исследований, что способствовало внедрению в лабораторную практику FISH-анализа [31].

Несмотря на выявление и строгую ассоциацию с ЛБ, в 1980 годах было показано, что аберрации, затрагивающие локус 8q24 и локализующийся в нем ген *MYC*, могут встречаться при многих видах В-клеточных лимфом, таких как диффузная В-крупноклеточная лимфома, В-клеточная лимфома неклассифицируемая с промежуточными признаками между диффузной В-

крупноклеточной лимфомой и ЛБ, и реже при других В-клеточных лимфомах, включая ФЛ, ХЛЛ и МКЛ. Однако, по сравнению с ЛБ большинство изменений встречаются гораздо чаще в течение прогрессии заболевания чем на первичном этапе лимфомагенеза [31, 33, 133]. При низкодифференцированных В-клеточных лимфомах выявление перестройки *MYC*, как правило, вызывает трансформацию в высоко агрессивные лимфомы с низкой выживаемостью больных. В связи с основной ролью гена *MYC* в клеточной пролиферации и метаболизме, «double-hit» лимфомы и другие агрессивные В-клеточные лимфомы с перестройкой гена *MYC* характеризуются высокой скоростью пролиферации в опухолевых клетках. Мантийноклеточная лимфома с изменениями локуса 8q24 встречается в небольшом проценте случаев и часто ассоциируется с бластоидной морфологией и плохим прогнозом [52, 95, 116].

Аберрации *MYC* у большинства таких пациентов обнаруживаются в составе КК и часто в дополнении к хромосомной аберрации, являющейся первичным событием, инициирующим лимфомагенез, гетерогенным в зависимости от нозологической формы лимфомы, в результате которого происходит *IG*-транслокация, вовлекающая онкогены, геномный дисбаланс, мутации или, наиболее вероятно, комбинация этих событий [31].

Кроме того, было показано, что в транслокацию с геном *MYC* могут вовлекаться как гены *IGH* (14q32), *IGL* (22q11, 2p12), так и не-*IG* локусы [31, 52, 107, 133]. В результате транслокаций t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q12) *MYC* попадает под влияние энхансера генов иммуноглобулина, и это приводит к высокой экспрессии белка MYC, которая влияет на прогрессирование клеточного цикла, пролиферацию, дифференцировку, метаболизм, апоптоз и поддержание длины теломер [41, 125, 132].

Молекулярно-цитогенетические исследования выявили несколько основных различий между транслокацией с вовлечением *MYC* при ЛБ и других лимфомах. При ЛБ один из трех *IG*-локусов является партнером гена *MYC* и перемещение *MYC* в область энхансера *IG*- локуса считается первичным событием в лимфомагенезе, в ряде случаев с наличием дополнительных хромосомных аберраций (ДХА).

Секвенирование последнего поколения показало, что помимо *IG-MYC* транслокации при ЛБ выявляются мутации, повреждающие регуляторные пути, позволяющие клеткам с транслокацией *IG-MYC* трансформироваться и не подвергаться апоптозу [31].

В отличие от ЛБ при других лимфомах транслокация *MYC* может вовлекать множество партнеров, считается вторичным событием, происходящим в уже злокачественном клоне в результате прогрессии заболевания или трансформации в лимфому высокой степени злокачественности и, как правило, характеризуется агрессивным клиническим течением [31, 133].

Развитие молекулярных цитогенетических методов исследований впоследствии показало, что онкоген *MYC* является таргетным за счет его вовлечения в различные механизмы (включая хромосомные транслокации) канцерогенеза, за счет консервативных «хрупких» участков генома, в которых определяется высокая частота разрыва двух цепей ДНК и наличия сайтов интерграции вирусного генома. Полиморфные сайты на разном расстоянии к локусу гена *MYC* также ассоциированы с герминальной предрасположенностью к разным типам опухолей. Механизмы, за счет которых осуществляется таргетное вовлечение *MYC,* вызывающее его экспрессию, нуждаются в дополнительном изучении.

Первоначальным методом диагностики аберраций локуса 8q24, содержащего ген *MYC,* являлся анализ кариотипа G-бэндированных метафазных хромосом. До настоящего времени кариотипирование рекомендовано, если для выполнения анализа возможно получение материала на культивирование. Очень важным преимуществом СЦИ является оценка всего генома пациента, в том числе как первичных, так и вторичных хромосомных изменений [31].

Тем не менее, метод хромосомного анализа невозможно применить в случае наличия фиксированных образцов (отпечатков, срезов с парафинового блока опухоли, мазков ПК или КМ) [7, 31]. Кроме того, при выявлении КК из-за невысокой разрешающей способности СЦИ и не всегда удовлетворительного качества исследуемого материала есть вероятность пропустить аберрацию,

затрагивающую локус 8q24 или не определить партнера в транслокации с геном *MYC.* Также СЦИ не позволяет диагностировать криптические инсерции *IG*-последовательностей в локус *MYC* или малую инсерционную последовательность *MYC* в любом участке генома. Таким образом, для более точного выявления изменений с вовлечением гена *MYC* и правильной постановки диагноза необходим комплексный подход с применением как СЦИ, так и FISH - метода [31, 129].

1.4. Роль гена *MYC* в патогенезе МКЛ

Несмотря на важность роли транслокации t(11;14) и гиперэкспрессии циклина D1 в развитии МКЛ результаты ряда исследований позволили предположить, что этих механизмов может быть недостаточно для полной трансформации клеток и агрессивного течения опухоли. Исследования, проведенные на культивированных клетках крыс, показали, что циклин D1 может функционировать как онкоген, но его онкогенные и трансформирующие свойства менее эффективны чем у других онкогенов. У трансгенных мышей, у которых циклин D1 был сопряжен с регуляторными элементами гена *IG*, не развивались спонтанные лимфомы и для лимфомогенеза в этих моделях необходимо взаимодействие с другими онкогенами, такими как *MYC* [29, 67, 95, 116, 139].

Среди большого количества генов, вовлекаемых в лимфомагенез МКЛ, *MYC* играет важную роль в трансформации первичных клеточных клонов с транслокацией t(11;14). Исследования с трансгенными мышами показали прямую взаимосвязь между геном *MYC* и гиперэкспрессией гена циклин D1 в онкогенетической трансформации В-клеточных лимфом [32, 81,116].

При МКЛ циклин D1 индуцирует вступление клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. Перестройка гена *MYC,* являющаяся вторичным событием при МКЛ, приводит к гиперэкспрессии *MYC,* инициируя переход клетки в стадию высокой пролиферативной активности, способствующей клеточной прогрессии в течение клеточного цикла, отличной от механизма первичного онкогенного

события при ЛБ. Кроме того, *MYC* усиливает метаболизм клетки за счет активации аэробного гликолиза, важным звеном которого является лактатдегидрогеназа А, что ассоциировано с неблагоприятным прогнозом, большей способностью опухолевых клеток к инвазии и метастазированию, а также агрессивным иммунофенотипом. Такие изменения в регуляции клеточного цикла позволяют сделать предположение, что комбинация *CCND1* и *MYC* оказывает синергетическое действие в этой группе пациентов МКЛ с агрессивным течением заболевания. Высокая скорость пролиферации способствует возможности возникновения дополнительных генетических аберраций, а также увеличению вероятности приобретения опухолевыми клетками с существенной активацией *MYC* мутации, инактивирующей ген *TP53*, а также запуску других механизмов, препятствующих апоптозу и репарации ДНК, что также оказывает неблагоприятное влияние на патогенез МКЛ. [9, 30, 41, 52, 55, 62, 139, 142].

Взаимодействие генов *CCND1* и *MYC,* а также вклад других генов, оказывающих влияние на развитие опухолевого процесса, способствуют прогрессированию опухолевого клона, в том числе и изменению морфологической картины, приобретающей черты бластной или беркиттоподобной [30, 41].

Транслокация *MYC,* как вторичная аберрация, часто ассоциирована с нестабильностью генома и КК. Помимо вовлечения в патогенез гена *MYC* многие другие факторы способствуют прогрессии и трансформации МКЛ, такие как инактивация генов *CDKN2A* и *TP53*, увеличение копийности или делеции других хромосом, а также генетические мутации. Wang, Hu с соавт. показали, что у пациентов с МКЛ с реарранжировкой *MYC* выявлялся КК. Проведенное таким больных ИГХ-исследование для выявления экспрессии P53 определило его гиперэкспрессию у части пациентов. Несмотря на то, что проанализировано малое количество пациентов с прогрессией или трансформацией МКЛ, у которых выявлялась транслокация *MYC*, можно сделать вывод, что есть ассоциация между реарранжировкой *MYC* и переходом заболевания в прогрессирующую стадию [62, 133].

Подгруппа МКЛ, характеризующаяся сочетанием транслокации генов *CCND1* и *MYC* выделены в группу «double-hit» МКЛ [41]. По данным Setoodeh и соавт., к «double-hit» МКЛ относят случаи с сочетанием не только транслокации *MYC*, но и амплификации гена *MYC* с транслокацией *CCND1* [48].

Общая концепция о «double-hit» лимфомах была представлена Aukema и соавт., согласно которой, к данной группе относятся пациенты с В-клеточной лимфомой с транслокацией, вовлекающей *MYC* в комбинации с перестройкой другого онкогена. Большинство случаев «double-hit» лимфом имеют морфологическое сходство с ДВККЛ или опухолями серой зоны с беркиттоподобными чертами. Наиболее часто встречается сочетание реарранжировки генов *MYC* и *BCL2*, что составляет примерно 65%. В 15% случаев наблюдается перестройка *MYC* в комбинации с транслокацией *BCL6*. Гораздо реже обнаруживается перестройка *MYC* в сочетании с реарранжировкой *BCL3.* Примерно 20% случаев составляют группу «triple-hit» лимфомы, которая характеризуется перестройкой *MYC* в комбинации с транслокацией, вовлекающей гены *BCL2* и *BCL6.* Очень редко встречается 4-hit лимфома с реарранжировкой генов *MYC, BCL2, BCL6* и *CCND1* [62, 139, 142]. Секвенированием с высокой пропускной способностью помимо транслокаций с вовлечением *MYC, BCL6* и *BCL2* выявлено большое количество генов с повторяющимися мутациями в высоком проценте случаев, что позволяет предположить, что патологический процесс при «double-hit» лимфомах гораздо более сложный, чем изначально предполагалось [31]. Aukema и соавт. определяют пациентов с перестройкой генов *MYC* и *CCND1* в группу «double-hit» лимфом. Однако, согласно классификации ВОЗ, таких больных следует относить к МКЛ. Определение «double-hit» МКЛ может быть важным для использования в клинической практике, поскольку данные о наличии перестройки *MYC* дополняют информацию о морфологической картине, особенно в случае с бластоидным вариантом МКЛ, позволяя предположить, что в основе бластоидной трансформации лежит сложный молекулярный механизм [30, 31, 62, 139, 142].

У большинства пациентов с «double-hit» МКЛ обнаруживается агрессивная опухоль с высокой группой риска по шкале MIPI, III/IV стадия заболевания по Ann-Arbor с частым вовлечением помимо лимфатических узлов КМ и ПК [48]. К клиническим и прогностическим характеристикам «double-hit» МКЛ также относятся высокий уровень ЛДГ, В-симптомы, частое поражение КМ и ЦНС. Морфологическая картина гетерогенна: встречаются как клетки среднего размера, напоминающих опухолевые клетки при ЛБ, так и крупные клетки с видимой нуклеолой и неправильной формой ядра [41].

Перестройка гена *MYC* происходит на начальной стадии заболевания при постановке диагноза или приобретается при прогрессии опухоли. Гистологически, при «double-hit» МКЛ практически всегда определяется бластоидный вариант с высокой экспрессией Ki-67, P53, а также MYC в большинстве клеток при ИГХ. Также наиболее часто встречается аберрантная экспрессия CD10. Бластоидная морфология ядер коррелирует с перестройкой гена *MYC,* в то время как МКЛ без реарранжировки *MYC* соответствует классическому морфологическому варианту МКЛ. Примерно в половине случаев «double-hit» МКЛ с перестройкой *MYC* обнаруживается транслокация с вовлечением локусов генов *IGH* или *IGL*, у остальных пациентов выявляются не-*IG* партнеры транслокации с *MYC.* Больные МКЛ, у которых детектируется амплификация *MYC*, имеют сходные клиникопатологические характеристики с «double-hit» МКЛ с перестройкой *MYC* [116].

Ряд авторов описали 26 случаев МКЛ в сочетании с транслокацией гена *MYC* или его амплификацией. У всех пациентов определялась продвинутая IV стадия заболевания с высоким показателем смертности, в большинстве случаев в течение двух лет после постановки диагноза несмотря на применение агрессивных курсов ХТ. Преимущественно у больных выявлялись бластоидный или плеоморфный варианты опухоли, только у троих пациентов обнаруживался классический вариант. При СЦИ у всех пациентов транслокация t(11;14) обнаруживалась в сочетании с ДХА. При FISH – исследовании у 15 больных выявлена транслокация *MYC*, у 11 – детектировалась амплификация *MYC*. Из 15 пациентов с перестройкой

MYC у 5 больных выявлялась транслокация с вовлечением гена *IGH*, у 4 пациентов определялась транслокация с генами *IGL* (3- *IGк*, 1 – *IGλ*), 6 случаев - не-*IG* транслокации с *MYC*. Случаи, представленные группой авторов, составляют особую категорию высоко агрессивной МКЛ со схожими клиническими и патологическими характеристиками [29, 48, 57, 90, 92, 98, 99, 105, 115, 116, 123, 125].

Li и соавт. провели обзор литературы случаев МКЛ с наличием транслокации t(11;14)(q13;q32) в сочетании с перестройкой *MYC* с *IG*-партнерами. У всех пациентов определялся КК в дополнении к t(11;14)(q13;q32) и t(8;14)(q24;q32) (7 случаев), t(2;8)(p12;q24) (4 случая) или t(8;22)(q24;q11) (2 случая). У 12 больных опухолевые клетки выявлялись в ПК, в 1 случае наблюдалось изолированное поражение ЦНС. У пациентов обнаруживался иммунофенотип, характерный для классического варианта МКЛ, либо его сочетание с иммунофенотипом ЛБ. Хотя больные получали химио- или радиотерапию, прогноз был неблагоприятный, медиана выживаемости составляла 5 месяцев (от 1 до 28 месяцев) после постановки диагноза. Все бластоидные варианты МКЛ с транслокацией t(11;14) и изменениями локуса 8q24 (включая транслокацию или амплификацию) характеризовались КК с более чем тремя дополнительными цитогенетическими аберрациями и агрессивным клиническим течением. Эти случаи показывают наличие особой подгруппы больных МКЛ с неблагоприятным прогнозом. Кроме того, особенностью таких пациентов являлось то, что две популяции опухолевых клеток с морфологическими, иммунофенотипическими и цитогенетическими особенностями, характерными для типичных МКЛ и ЛБ, были выявлены одновременно в ПК и КМ на момент дебюта и происходили из одного В-клеточного клона.

Большинство бластоидных вариантов МКЛ с перестройкой *MYC* возникают в В – клетках мантийной зоны, экспрессирующих *SOX11*, накапливающих множественные генетические изменения, включая нарушение регуляции *MYC* и прогрессии в бластоидный вариант МКЛ. В ряде случаев опухолевый клон с агрессивным течением происходит из *SOX11*-негативных В – клеток. Li и соавт.

описали пациента, у которого клетки-предшественницы CD5+ популяции были SOX11-, при этом выявлялись два клона: индолентный ненодальный и популяция клеток, которая в результате прогрессии приобрела характеристики опухоли с агрессивным течением и беркиттоподобной морфологией опухолевого субстрата за счет транслокации t(8;14)/*IGH-MYC* (рисунок 6) [52].

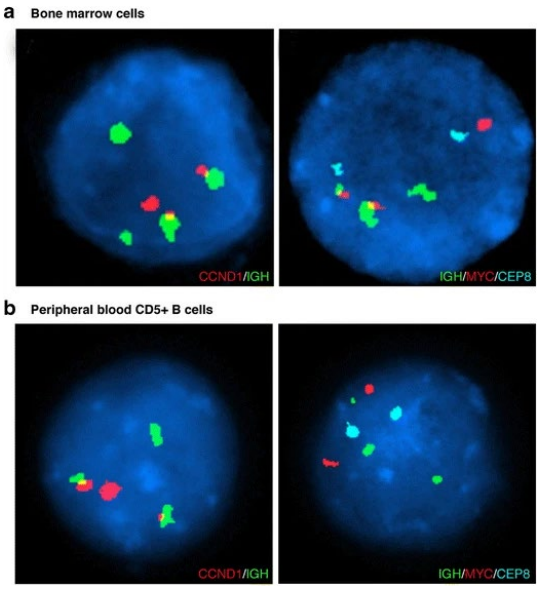


Рисунок 6 – Результаты гибридизации пациента, представленного Li и соавт. [52]:

FISH – исследование, выполненное на клетках КМ (a) и CD 5+ популяции В-клеток ПК (b). Транслокация t(11;14)(q13;q32) *IGH-CCND1* выявлена как в CD10+ В-клетках КМ, так и в CD5+ В-клетках ПК. Транслокация t(8;14) *IGH-MYC* определялась в интерфазных ядрах КМ, в CD5+ В-клетках ПК t(8;14) *IGH-MYC* не обнаружена.

Также в литературе показаны случаи с наличием двух популяций опухолевых клеток. У одного пациента выявлялись два различных клона: CD5+/CD10- и CD5-/CD10+. Исследование методом FISH обнаружило транслокацию t(11;14) в обоих клонах [52, 91]. Во втором случае в лимфатическом узле выявлялся участок опухолевых клеток с морфологией МКЛ и беркиттоподобный регион с транслокацией t(11;14) и перестройкой гена *MYC*. Лимфоидные клетки слабо экспрессировали CD5, CD10, циклин D1, экспрессия BCL2 не выявлялась. Несмотря на то, что у больных не было данных об экспрессии SOX11 и кариотипе, эти случаи показывают трансформацию иМКЛ в агрессивную опухоль за счет накопления дополнительных генетических аберраций.

Описаны случаи трансформации МКЛ в беркиттоподобную лимфому, с наличием транслокаций t(11;14)(q13;q32), t(8;14)(q24;q32) и выявлением двух опухолевых клонов, имеющих характеристики МКЛ и ЛБ в лейкемической стадии. Эти случаи послужили доказательством наличия двух различных взаимодополняющих путей лимфомагенеза МКЛ. Выявление взаимосвязи агрессивного клинического течения МКЛ с перестройкой гена *MYC*, а также данные проточной цитометрии, ИГХ, СЦИ и FISH – исследования необходимы для правильной диагностики и выбора оптимальной терапевтической тактики у таких пациентов [52].

Кроме того, Zhou и соавт. описали пациента с МКЛ с двумя популяциями опухолевых клеток в КМ: первая – CD19+CD10+, с беркиттоподобной мофологической картиной, вторая - CD19+CD10-, с морфологией МКЛ. Анализ методом FISH показал наличие транслокации t(11;14) в 28% интерфазных ядер, а также реарранжировку *MYC/IGH* в 29% клеток. Кроме того, FISH-анализом выявлена амплификация *BCL2* и *BCL6.* При кариотипирование клеток КМ обнаружен КК: 47,XX,der(1),del(1)(p36.1),ins(1;1)(q21;p22p36),del(3)(q21),t(11;14)(q13;q32),add(16)(p13),add(18)(p11),+mar[cp9]/46,XX[8]. После терапии популяция клеток с иммунофенотипом CD19+CD10+ выявлена не была, и у пациента диагностирован синдром лизиса опухоли. Методом NGS у больного в клетках CD19+CD10- определялась реарранжировка *CCND1/IGH,* а в популяции CD19+CD10+ помимо перестройки *MYC/IGH* обнаружена мутация *NOTCH2,* которая дополнительно способствовала трансформации заболевания в более агрессивную форму с клинической симптоматикой подобной ЛБ. Мутации *NOTCH,* встречающиеся примерно в 5-10% случаев первичных пациентов с МКЛ, могут усиливать активацию регуляторного пути NOTCH, который способствует пролиферации клеток, продолжительности жизни клеток и миграции. Таким образом, на основании данных о пораженных органах, и молекулярных механизмов дополнительного вовлечения в патологический процесс реарранжировки *MYC,* а также мутации *NOTCH2,* авторы предполагают, что в данном случае популяция

CD19+/CD10- трансформировалась из клеток с иммунофенотипом CD19+/CD10+ [142].

Hu и соавт. проанализировали группу пациентов из 17 человек с перестройкой *MYC* в сочетании с реарранжировкой *CCND1* (у 10 пациентов транслокация *MYC* выявлена на момент первичной диагностики заболевания, у 7 больных – в процессе клинического течения). У 14 больных, которым удалось провести СЦИ, обнаружен КК. В 8 случаях партнерской хромосомой для реаранжировки *MYC* был *IG* – локус (7 пациентов – t(8;14)(q24;q32), 1 пациент – t(8;22)(q24;q11)). На момент выявления перестройки *MYC* у больных определялась группа высокого риска по шкалам MIPI, MIPIb, а опухолевые клетки имели морфологические черты агрессивной опухоли (бластоидный/плеоморфный варианты). Иммунофенотипирование (ИФТ) показало, что у большинства пациентов выявлена выраженная экспрессия циклина D1 (16/16), MYC (9/11) и P53 (9/9). Индекс Ki-67 у 10 из 11 пациентов больше или равен 60%. Несмотря на проведение агрессивной терапии медиана выживаемости составляла 31,3 месяца. Все пациенты характеризовались продвинутой стадией заболевания, агрессивной морфологической картиной, высокой скоростью пролиферации опухолевых клеток, рефрактерным течением заболевания, экспрессией P53, КК и неблагоприятным прогнозом [62].

Исследователями показано, что реарранжировка *MYC,* в ряде случаев в сочетании с мутацией *TP53*, появляется при прогрессировании или трансформациии МКЛ, в том числе и у пациентов с лейкемической ненодальной МКЛ, ассоциированной с индолентным течением, и значительно ухудшает прогноз [29, 62, 133, 142]. Опухоль приобретает бластодную/плеоморфную или беркиттоподобную морфологию, характеризуется агрессивным течением и выживаемостью, составляющей в среднем только 8 месяцев [31].

Wang и соавт. оценили прогностическую значимость и влияние на общую выживаемость разных групп пациентов с МКЛ: с выявлением транслокации *MYC*, наличием дополнительных копий *MYC* и отсутствием изменений *MYC*. В исследование были включены 88 больных с МКЛ, которым выполнены FISH -

исследование с ДНК-пробой к гену *MYC* и СЦИ. У пациентов преимущественно обнаруживались бластоидный и плеоморфный варианты МКЛ. По результатам FISH - исследования получены данные: 27 больных - с транслокацией *MYC* и *CCND1* (52,0% - МКЛ de novo, 48,0% - в результате прогрессирования или трансформации заболевания из классического варианта МКЛ в бластоидный/плеоморфный варианты), у 21 пациента - дополнительные копии *MYC* (от 3 до 6 копий), 40 - изменения *MYC* не обнаружены. Больные с транслокацией *MYC* характеризовались бластоидной/плеоморфной морфологической картиной, значительным лейкоцитозом, повышенным содержанием ЛДГ, высокой частотой встречаемости CD10, выраженной экспрессией MYC, либо коэкспрессией MYC и BCL2, а также более высокими процентом индекса пролиферации ($p<0.05$) и группой риска по шкале MIPI, чем у пациентов без транслокации *MYC*. Хотя пациенты с *MYC* более часто получали курсы интенсивной ХТ ($p=0.001$) их ОВ была значительно короче по сравнению с группой больных, у которых не выявлялась реарранжировка *MYC*. По сравнению с пациентами *MYC/BCL2* «double hit» лимфомой больные с перестройкой *MYC* имели сходные показатели ОВ, но более частое вовлечение в опухолевый процесс КМ и выявление IV стадии заболевания. У пациентов с амплификацией *MYC* определялись промежуточные показатели ОВ между группами с перестройкой *MYC* и без изменений гена *MYC*. Мультивариативный анализ показал, что транслокация *MYC*, но не обнаружение дополнительных копий *MYC* оказывало независимое прогностическое неблагоприятное влияние на ОВ. Кроме того, больные с реарранжировкой *MYC*, но не с амплификацией гена *MYC* характеризовались более выраженной экспрессией MYC, что также является фактором, ассоциированным с неблагоприятным клиническим течением МКЛ [133].

Yi и соавт. описали 50 пациентов с МКЛ с вовлечением КМ. У всех больных методом FISH выявлена транслокация t(11;14). В 8% случаев (4 пациента) выявлялась реарранжировка *MYC,* у 18 больных (36%) определялось увеличение копийности *MYC.* В случаях перестройки *MYC* транслокация t(8;14)(q24;q32)

выявлена не была. Помимо исследования на обнаружение аберраций гена *MYC* также проводилась оценка наличия изменений *BCL2.* У 12 пациентов (24%) детектировались дополнительные копии *BCL2,* транслокации с вовлечением гена *BCL2* обнаружено не было. Кроме того, наряду с транслокацией t(11;14), изменениями *MYC* и *BCL2* у части пациентов определялись дополнительные цитогенетические аберрации: делеция 13q (36,0%), делеция генов *ATM* (18,0%) и *TP53* (34,0%). У 11 больных одновременно обнаруживались изменения *MYC* и делеция *TP53*. Пациенты с аберрациями *MYC* характеризовались промежуточной/высокой группами риска по шкале MIPI и нестабильностью генома, высокими показателями лейкоцитоза, Ki-67 и β-2 микроглобулина по сравнению с больными без изменений *MYC.* Также показано, что группа больных с нарушениями *MYC* отличалась более короткой БПВ (9,0 *vs* 48,0 месяцев, соответственно) и ОВ (12,0 *vs* 94,5 месяцев, соответственно). Изменения *BCL2* не оказывали существенного влияния на БПВ и ОВ. По результатам мультивариативного анализа нарушения *MYC,* но не *BCL2* являлись независимым неблагоприятным фактором, влияющим на ОВ и БПВ, несмотря на проведение интенсивной ХТ (HyperCVAD/MA ± R). Проведенный унивариативный анализ показал, что делеция 17p также достоверно прогностически неблагоприятно влияет как на ОВ, так и на БПВ пациентов с МКЛ (рисунок 7) [139].

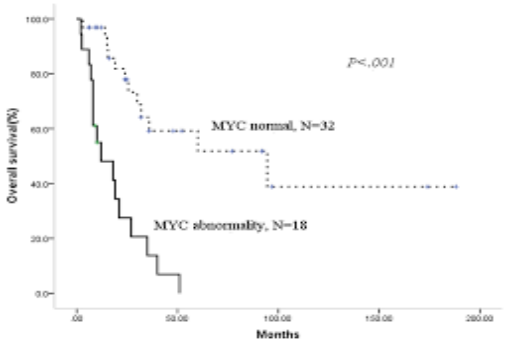


Рисунок 7 - Влияние изменений *MYC* на ОВ пациентов в исследовании Yi и соавт. [139]

Ген *MYC*, как ключевой транскрипционный фактор, вызывает трансформацию клеток путем нерегулируемой экспрессии гораздо чаще за счет онкогенетических мутаций. Генетические изменения *MYC* при лимфомах затрагивают преимущественно В-клеточные лимфомы, и включают прежде всего

перестройку гена, а также его амплификацию [95]. Результаты проведенных исследований показали, что изменения гена *MYC* являются неблагоприятным прогностическим фактором, влияющим на выживаемость больных МКЛ [139]. При оценке прогноза на клиническое течение заболевания необходимо учитывать не только наличие перестройки гена *MYC,* но и кариотип пациента. Показано, что больные с перестройкой *MYC* в сочетании с НК лучше отвечали на ХТ, в то время как у пациентов с перестройкой *MYC* в сочетании с КК определялось тяжелое течение заболевания с рефрактерностью к стандартным курсам ХТ и к трансплантации стволовых клеток КМ [95].

По мнению Lee, Zhang и соавт., *MYC* оказывает ключевое влияние на формирование резистентности к ибрутинибу у больных МКЛ, возможно, за счет репрессии miR15a и miR16-1, двух генов - супрессоров опухолей microRNA, вовлеченных в патогенез МКЛ. Эти механизмы могут объяснить роль реарранжировки *MYC* при прогрессии или трансформации МКЛ [79, 141].

Таким образом, необходимо более детальное изучение опухоли, ее биологических и клинических характеристик [31]. Кроме того, важным является правильная диагностика «double-hit» лимфом, в частности «double-hit» МКЛ с изменениями *MYC*, так как эта группа пациентов нуждается в применении высокодозной ХТ и участии в клинических исследованиях для разработки таргетных препаратов с целью формирования и оптимизации новой стратегии в терапевтической тактике, учитывая их неблагоприятное влияние на прогноз и показатели выживаемости [31, 95, 139].

1.5. Цитогенетические особенности МКЛ

Мантийноклеточная лимфома – зрелая В-клеточная опухоль с характерными морфологическими и иммунофенотипическими особенностями, первичным патогенетическим событием при которой является высокоспецифическая хромосомная транслокация, ведущая к перемещению гена *CCND1*,

расположенного в локусе 11q13 в J-регион генов *IGH* (локус 14q32), приводящего к гиперэкспрессии циклина D1. Кариограмма пациента с транслокацией t(11;14)(q13;q32) представлена на рисунке 8.

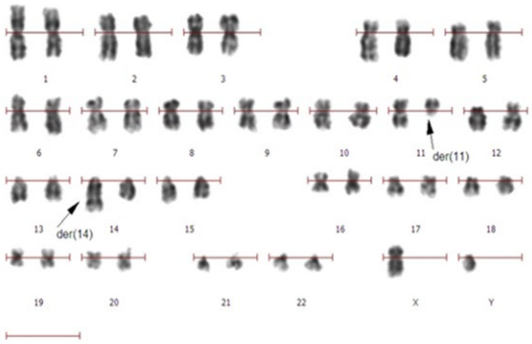


Рисунок 8 – Кариограмма пациента с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

Важно отметить, что МКЛ является заболеванием, протекающим гетерогенно: от доброкачественных иМКЛ, встречающихся примерно в 15% случаев, до высоко агрессивных бластоидного или плеоморфного вариантов. Агрессивное клиническое течение опухоли ассоциировано со вторичными генетическими аберрациями, определяющимися у большинства пациентов с МКЛ, которые затрагивают гены, участвующие в путях клеточной регуляции, и, таким образом, дополнительно индуцируя прогрессию злокачественных клонов. Бластоидная МКЛ часто образуется de novo и реже может трансформироваться из классического варианта МКЛ. Преимущественно у больных МКЛ обнаруживается опухоль с быстрым прогрессированием и продвинутой стадией заболевания. Морфологически субстрат представлен клетками малого, среднего размеров, в случае с плеоморфным типом МКЛ преобладают лимфоидные клетки с выраженной анаплазией. Для опухолевых клеток характерна аберрантная экспрессия CD5 и отсутствие экспрессии CD23 [2, 46, 52, 62, 116].

Необходимость дополнительных онкогенетических событий в прогрессии МКЛ также была показана клиническими исследованиями. Подобно другим хромосомным транслокациям, определяющим патогенез лимфом, таких как t(14;18)(q32;q21) при ФЛ, малое количество клеток с транслокацией

t(11;14)(q13;q32) обнаруживается в ПК у 1-2% здоровых доноров без каких-либо клинических проявлений заболевания [26, 68, 78, 139].

Хотя у большинства пациентов с МКЛ опухолевый процесс характеризуется агрессивным клиническим течением, последние исследования выявили больных с индолентной лимфоидной пролиферацией и выживаемостью 5-12 лет без необходимости проведения специфической терапии. Несмотря на наличие транслокации t(11;14) и гиперэкспрессии циклина D1, у таких пациентов патологический процесс затрагивает одну лимфоидную зону, в частности, мантийную зону фолликулов, или ПК. Это состояние может быть подобно так называемой ФЛ «in situ», при которой опухолевые клетки с транслокацией t(14;18)(q32;q2) и гиперэкспрессией гена *BCL2* накапливаются только внутри герминального центра лимфоидных фолликулов без распространения заболевания [44, 68, 70].

Показано, что МКЛ – лимфома с большим количеством цитогенетических и молекулярных аберраций, выявляемых уже на этапе постановки диагноза. Delfau-Larue и соавт. выявили, что у 20% пациентов помимо транслокации t(11;14) не выявлялись дополнительные аберрации, в то время как в 80% случаев определялись одна или более ДХА, включающие делецию генов *TP53* (супрессор опухолевого роста), *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated – мутантный ген атаксии-телеангитэктазии), *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A – ингибитор циклинзависимой киназы 2A) и гена ретинобластомы *RB1* (retinoblastoma gene - *RB1*), или амплификацию регулятора апоптоза *BCL2* (apoptosis regulator *BCL2*), протоонкогена *MYC*, циклин зависимых киназ CDK2, CDK4 и онкогена *MDM2* (mouse double minute chromosome amplified oncogene) [74].

Потеря контроля за путями регуляции клеточного цикла на разных уровнях способствует пролиферации опухолевых клонов при МКЛ. Таким образом, необходимо верифицировать группу прогностически неблагоприятных больных и как можно раньше начинать применять лечебную тактику до накопления вторичных генетических аберраций [29].

Исследования цитогенетических особенностей МКЛ, целью которых было обнаружение вторичных генетических изменений, вовлекающихся при прогрессии МКЛ, показали, что МКЛ - злокачественная опухоль с наибольшим уровнем нестабильности генома и высокой частотой встречаемости хромосомных нарушений, соотносящихся с дерегуляцией в сигнальном каскаде ответа на повреждение ДНК [68].

Наличие цитогенетических изменений у пациентов с МКЛ может коррелировать с клинической картиной и морфологической группой. В то время как для иМКЛ характерна стабильность генома и частое выявление НК, при бластоидном и плеоморфном вариантах МКЛ у преобладающего количества пациентов встречается КК с крайне нестабильным геномом и большим количеством ДХА.

Вторичные генетические и эпигенетические повреждения, например увеличение копийности или делеции локусов хромосом, содержащих гены, необходимые для обеспечения стабильности генома, пролиферации и апоптоза, приводят к нарушению регуляции ключевых сигнальных путей, запуская патогенез МКЛ [74, 95].

Изменения кариотипа, вовлекающие определенные хромосомные регионы, оказывают важное влияние на развитие патогенеза МКЛ, обуславливая клиническое течение и биологические характеристики опухоли. Onciu и соавт. провели кариотипирование у 30 больных с лейкемической и 19 пациентов с нодальной формами МКЛ. В исследование включались больные с наличием транслокации t(11;14). В 94% случаев помимо транслокации t(11;14) в кариотипе выявлялись ДХА. Наиболее частой аберрацией было вовлечение 13 хромосомы (26 случаев (53%)), а также других хромосом 1, 3, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 21 (11-18 случаев (22%-37%)). Различий в количественном соотношении выявленных ДХА между лейкемической и нодальной формами не обнаружено. Показано, что у пациентов с лейкемической МКЛ определялись дополнительные аберрации, наиболее часто вовлекающие хромосомы 17, 21, 22. Кроме того, отмечено, что только в группе больных с лейкемической формой в кариотипе выявлялись нарушения,

затрагивающие локусы 8q24, 9p22-24 и 16q24. Структурные аномалии хромосомы 17 (17p13, 17p11.2, 17q) обнаруживались при лейкемической МКЛ, в то время как при нодальной МКЛ выявлялись числовые изменения хромосомы 17. Результаты исследования показали, что изменения кариотипа, как количественные, так и структурные определяют клиническую картину, а также нозологическую форму МКЛ [99].

Показано, что варианты МКЛ, протекающие агрессивно и имеющие высокий пролиферативный индекс, характеризуются КК, при котором помимо транслокации t(11;14) выявляются частое увеличение копийности 3q, 12q, делецией 9p, 9q и 17p. Изменения локуса 8q24, включающие транслокацию t(8;14)(q24;q32), активирующую ген *MYC*, детектируются у пациентов с МКЛ с очень быстрым развитием клинической картины заболевания. В дополнении к хромосомному дисбалансу часто определяются тетраплоидные клоны, наиболее характерные для плеоморфноклеточного (80%) и бластоидного вариантов (36%), по сравнению с классическим морфологическим вариантом (8%) [67].

Таким образом, важным преимуществом СЦИ является проведение подробного анализа генома пациента, которое позволяет выявить структурные и числовые нарушения кариотипа, детектировать как высокоспецифические хромосомные аберрации для МКЛ, а также ДХА, ассоциированные с неблагоприятным клиническим течением заболевания. Только благодаря кариотипированию представляется возможным обнаружение КК, важнейшего прогностического фактора, ассоциированного с низкой чувствительностью опухолевого клона к проводимому лечению и значительно увеличивающего риск развития рецидивов.

Полученные результаты играют важную роль в вопросах диагностики, понимания лимфомогенеза, процессов малигнизации, опухолевой прогрессии, являются важнейшими факторами прогноза и мониторинга, помогают стратифицировать больных на прогностические группы и определить выбор терапии [10-12, 19, 120, 127].

1.6. Международный прогностический индекс и дополнительные факторы оценки прогноза в клиническом течении МКЛ

Важными критериями в представлении биологического потенциала опухоли, а также ее прогноза служат такие характеристики как степень злокачественности и MIPI [21]. В настоящее время разработанная для пациентов с МКЛ шкала MIPI наиболее широко используется для определения прогноза течения МКЛ. В его основе совокупность параметров: возраст старше 60 лет, повышение уровня ЛДГ в сыворотке крови (в два раза и более), лейкоцитоз, общее состояние больного (II-IV степени по шкале ECOG), стадия заболевания по классификации Ann-Arbor (III и IV стадии), наличие более одного экстранодального очага поражения. В зависимости от количества баллов больные определяются в одну из трех групп: низкого, среднего и высокого риска [40, 51, 118]. К модификациям MIPI относятся упрощенный индекс (MIPI-c), а также комбинированный биологический индекс (MIPIb), при расчете которого учитывается количество клеток экспрессирующих Ki-67 [8]. Помимо шкалы MIPI необходимо также уделять особое внимание влиянию определенных генетических и биологических факторов, которые существенно влияют на прогноз МКЛ [40].

Вторичные мутации и перестройки генов способствуют лимфомагенезу, что приводит к развитию более злокачественных подтипов МКЛ, таких как бластоидный вариант МКЛ в результате трансформации опухолевого клона [38, 40]. Описаны несколько групп повторяющихся мутаций, вовлекающихся в патогенез МКЛ: затрагивающие гены, участвующие в репарации ДНК и регуляции клеточного цикла (*TP53, ATM, CCND1*), генов эпигенетической регуляции (*KMT2D, WHSC1*) и генов, регулирующих клеточные сигнальные пути (*NOTCH1-2, BIRC3, TRAF2*) [49]. Однако, среди большого количества аберраций, вовлекаемых в патофизиологию МКЛ, не все имеют прогностическую значимость [38, 40].

Ген *CDKN2A,* расположенный в локусе 9p21, кодирующий для CDK4/6 ингибитор INK4a (p16) и *TP53*-регулятор ARF (p14), - ген, делеция которого является частым прогностически неблагоприятным событием при лимфомогенезе НХЛ. Делеция *CDKN2A* (p16) повреждает два сигнальных пути при МКЛ: регулирующий клеточный цикл (p16) и ответ на повреждение ДНК. Аберрации генов, регулирующих клеточный цикл, *CDKN1B/CDK2/CDK4/RB1*, и *ATM/MDM2/TP53*, генов, участвующих в сигнальном каскаде ответа на повреждение ДНК, по данным Delfau-Larue имеют меньшую прогностическую значимость. Также встречаются изменения локуса 8q24 (*MYC*), которые могут выявляться в случаях с бластоидным вариантом МКЛ. Ассоциация гиперэкспрессии циклина D1, первичного события в лимфомагенезе МКЛ, и вторичных аберраций, затрагивающих гены, регулирующих клеточный цикл, приводит к высокому уровню клеточной пролиферации и короткой выживаемости.

Вместе с тем, при прогнозировании клинического течения МКЛ также важно учитывать индекс пролиферативной активности Ki-67, добавляющий прогностическую точность MIPI [38, 72].

Делеция *CDKN2A* и *TP53* ассоциированы с неблагоприятным течением заболевания. Пациентам, относящимся к группе высокого риска по биологическим характеристикам, например, с мутацией *TP53*, несмотря на применение высокодозной ХТ не удается существенно улучшить показатели ОВ и уменьшить частоту возникновения рецидивов. В исследованиях Nordic MCL2 и MCL3 у 27% больных с мутацией или делецией *TP53* медиана ОВ составляла год и 8 месяцев, при этом у 50% пациентов рецидив заболевания развивался через год [40].

Сходные данные низких показателей ОВ были получены Delfau-Larue и соавт. в исследовании группы больных с сочетанными аберрациями *CDKN2A* и *TP53*. В исследование вошли 135 пациентов с МКЛ младше 66 лет, получившие первую линию иммунохимиотерапии и АТГСК с высокими дозами цитарабина или без его применения. Аддитивный эффект выявлен для делеций *CDKN2A* (25%) и *TP53* (22%), при одновременном обнаружении которых наблюдалась короткая ОВ (медиана ОВ составляла 1,8 года) по сравнению с делецией одного гена (4,3 и 5,1

года) или без делеций данных генов (7 лет). Показано, что аддитивный неблагоприятный прогностический эффект делеций *CDKN2A* и *TP53* определялся вне зависимости от степени экспрессии Ki- 67. Независимо от вида проводимой иммунохимиотерапии, высоких доз цитарабина, АТГСК молодые пациенты с делецией *CDKN2A* и *TP53* отнесены в группу неблагоприятного прогноза и являются кандидатами для разработки альтернативных терапевтических стратегий [38].

Scott и соавт. опубликовали данные исследования профиля экспрессии 35 генов для обнаружения прогностически неблагоприятной группы больных, у которых получение интенсивной ХТ не увеличивало продолжительность выживаемости. Было показано, что выявление мутаций в гене *NOTCH1* высоко ассоциировано с прогностически неблагоприятным течением МКЛ. Сигнальный путь Notch осуществляет регуляцию клеточной пролиферации, апоптоза и дифференцировки клеток. Из 121 пациентов с МКЛ мутация *NOTCH1* выявлена у 14. Общая выживаемость больных с *NOTCH1* мутацией была ниже, чем у группы пациентов с диким типом *NOTCH1* (1,4 и 3,9 года). По данным Kridel и соавт., *NOTCH1/2* мутации встречаются примерно от 5% до 10% больных с МКЛ [25, 40]. Ferrero и соавт. показали, что мутация *NOTCH1* не являлась независимым прогностическим фактором, влияющим на выживаемость, и в большинстве случаев обнаруживалась в сочетании с мутацией *TP53* [49].

Внедрение в клиническую практику иммунохимиотерапии с цитарабин-содержащими режимами и АТГСК значительно улучшило показатели выживаемости в группе молодых пациентов с МКЛ. Однако, у 20-25% больных наблюдалась недостаточная эффективность проводимой высокодозной иммунохимиотерапии с развитием первичной рефрактерности или рецидива в течение двух лет после проведения АТГСК. Для выявления прогностически неблагоприятных генетических маркеров у такой группы пациентов Ferrero и соавт. провели исследование, в котором показали, что мутация *KMT2D* или изменения гена *TP53* в результате делеции или мутации ассоциированы с увеличивающимся риском прогрессии или смерти, как в унивариативном, так и в мультивариативном

анализах. Вместе с тем, изменения, затрагивающие один из генов *TP53* или *KMT2D,* наблюдались в группе больных высокого риска с низкой чувствительностью к стандартной или высокодозной ХТ.

Ген *KMT2D* (лизин-метилтрансфераза 2D) (*MLL2*) – тумор-супрессорный ген, мутации которого выявляются при В-клеточных лимфомах, в том числе, в 10-15% МКЛ. Беспрогрессивная четырехлетняя выживаемость пациентов с мутацией *KMT2D* по сравнению с диким типом была короче (33,2% и 63,7%), также отмечалось ухудшение показателей общей выживаемости – 62,3% и 86,8%. Однако, несмотря на высокую группу риска по шкале MIPI-c, не выявлено ассоциации наличия мутации *KMT2D* с экспрессией Ki-67 или бластоидной морфологией, но, при этом выявлялись В-симптомы и массивное поражение («bulky disease»). Мутация и делеция *TP53* была ассоциирована с короткой БПВ и ОВ. Кроме того, пациенты с изменениями *TP53* имели характеристики МКЛ высокого риска: Ki-67 ≥30% (48,3%), средняя или высокая группа риска по шкале MIPI-c (37,9%), бластоидная морфология (22,6%), но, несмотря на эту ассоциацию аберрации *TP53* являлись независимыми прогностическими факторами, влияющими на выживаемость.

Клинические и патологические шкалы, в том числе MIPI, Ki-67 и их комбинация, шкала MIPI-c, помогают стратифицировать больных МКЛ на группы различного риска возникновения рецидива. Однако, не одна из этих шкал не достаточна для оценки прогноза у группы пациентов высокого риска. Основываясь на данных проведенного исследования, для выделения подгруппы больных с минимальным эффектом или его отсутствием после проведенной интенсивной иммунохимиотерапии, авторы дополнили информацию существующей шкалы MIPI-c, добавив данные о мутации *KMT2D* и изменениях *TP53,* имеющих независимое неблагоприятное прогностическое влияние на выживаемость, таким образом, разработав новый прогностический генетический индекс (MIPI-g), подразделив больных на группы низкого, среднего и высокого риска. Необходимо учитывать ассоциацию данных генетических аберраций с неблагоприятным прогнозом для выявления пациентов группы высокого риска с целью разработки

новых терапевтических подходов, которые помогут максимально минимизировать роль данных генов в патогенезе МКЛ. Несмотря на апробированные препараты леналидомид и ибрутиниб, новые действующие вещества, такие как ингибитор *BCL 2* венетоклакс, необходим для пациентов с рефрактерностью к ХТ, особенно с мутацией или делецией *TP53*. Поскольку часть больных с мутацией *KMT2D* и изменениями *TP53* могут достигать непродолжительного ответа после проведения трансплантации КМ необходима разработка альтернативных подходов в консолидации ремиссии и аллогенной трансплантации [49].

Учет генетических маркеров необходим для стратификации пациентов, улучшения диагностики и оценки их прогностического влияния на клиническое течение МКЛ, и вносит существенный вклад в разработку будущих терапевтических стандартов. Комбинация препаратов, уже применяемых в ХТ, и новых лекарственных веществ, разработанных для таргетной специфической дерегуляции сигнальных путей регуляции, помогает в выработке терапевтических подходов ведения больных с рефрактерным течением МКЛ и рецидивами [64].

Поскольку с каждым годом накапливается все больше данных, расширяющих представление о биологии МКЛ, и появляется множество новых таргетных препаратов, возникает необходимость в новой системе стадирования с учетом прогностического влияния генетических маркеров [40].

1.7. Иммунофенотипические характеристики МКЛ

Выявление специфических кластеров дифференцировки (CD) антигенов клеточной поверхности лимфоцитов позволяет диагностировать различные типы острых лейкозов и лимфом. Мантийноклеточная лимфома, относящаяся к В-клеточным лимфомам, характеризуется наличием характерной иммунологической картины с высокой (> 90%) степенью экспрессии CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD43, CD79a, sIg и cIg, и низкой (< 10%) экспрессией CD10 и CD23. В некоторых случаях встречается CD5-негативная, CD23-позитивная экспрессия, а также

комбинации вариантов экспрессии: CD5-/CD23+, CD10+/FMC7- и CD23+/FMC7-. МКЛ с экспрессией CD5-/CD23+ ассоциирована с наиболее индолентным клиническим течением и более благоприятным прогнозом по сравнению с «классическими» вариантами МКЛ с экспрессией CD5+/ CD23-. Как правило, при МКЛ не наблюдается экспрессия маркера герминативного центра CD10, но, в редких случаях, таких как плеоморфный или бластоидный варианты могут определяться клетки с экспрессией CD10+.

Кластер дифференцировки CD20 является таргетным в терапии МКЛ моноклональными антителами, обладающими специфичностью к CD20 антигену (Ритуксимаб), которые вызывают клеточную гибель опухолевых клеток за счет действия молекулярных механизмов в В-клетках, таких как антипролиферативный и проапоптотический. Аналогичный принцип действия у радиоиммунотерапии с применением анти- CD20 монолклональных антител, которая также применяется для лечения пациентов с МКЛ [64].

1.8. Индекс пролиферативной активности Ki-67

Индекс пролиферативной активности Ki-67, определяемый как процент опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67 в ИГХ исследовании, один из наиболее значительных и признанных прогностических биомаркеров оценки общей выживаемости пациентов МКЛ. При высоком проценте индекса Ki-67 в биоптате лимфатического узла на этапе первичной диагностики выявляется высоко пролиферативную опухоль, как правило, прогностически неблагоприятную.

Индекс Ki-67 включен в протокол клинического обследования многих опухолей, в особенности рака молочной железы и других лимфоидных опухолей. Несмотря на то, что Ki-67 показывает прямую корреляцию с выживаемостью, не выявлено существенной ассоциации между процентом клеток, экспрессирующих Ki-67 и клиникопатологических параметров, таких как уровень ЛДГ в сыворотке крови, В-симптомов, стадией опухоли, экстранодального поражения и

общесоматического статуса. Индекс Ki-67 является важным прогностическим параметром для пациентов с МКЛ, получающих иммунохимиотерапию в комбинации с ритуксимабом или первую линию терапии [61, 64, 73].

Таким образом, за последние десятилетия произошел значительный прорыв в понимании патогенеза и особенностей клинического течения МКЛ, ключевое значение при которых отводится генам, инициирующим развитие и злокачественную трансформацию опухолевого процесса. Широкое применение в диагностике и мониторинге минимальной резидуальной болезни МКЛ получили такие методы исследования как кариотипирование и FISH-анализ. Комплексный подход в практической гематологии с использованием совокупности исследований в генетической диагностике МКЛ позволяет не только повысить выявляемость патологического клона, но и корректно подобрать терапию, оценить результаты лечения, а также спрогнозировать течение заболевания.

Кроме того, все большее внимание в литературе стало уделяться высоко агрессивной подгруппе МКЛ, «double-hit» МКЛ, однако, для получения максимально полной картины заболевания и разработки оптимального подхода в терапии пациентов с «double-hit» МКЛ необходимы дополнительные исследования. Обзор литературных данных показал, что большинство исследований представлены на небольшой выборке больных или описаны единичные случаи. Также в проанализированных литературных источниках мало информации о влиянии аберраций *MYC* на показатели ОВ и безрецидивной выживаемости (БРВ) больных МКЛ. Нет однозначной точки зрения относительно прогностической значимости амплификации *MYC* у пациентов с МКЛ. Кроме того, не разработаны четкие критерии выделения группы больных с МКЛ, которым необходимо проводить исследование на выявление изменений гена *MYC*. Поскольку «double-hit» МКЛ перестает считаться редким событием в клиническом течении МКЛ, скрининг на определение нарушений гена *MYC* необходимо внести в список рутинных исследований, в особенности для пациентов с бластоидным и плеоморфным вариантами МКЛ, а также при подозрении на прогрессирование или трансформацию опухоли в более подвинутую стадию.

ГЛАВА 2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ

2.1 Характеристика исследуемой группы больных МКЛ

Нами было обследовано 117 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом МКЛ, проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА», гематологических отделениях лечебных учреждений Санкт-Петербурга, Ленинградской области, а также других регионов РФ с 2013 по 2022 год. В исследование было включено 79/117 (67,5%) мужчин и 38/117 (32,5%) женщин (соотношение по полу 2:1). Медиана возраста пациентов составила 60 лет (26–83 года). У 87/117 пациентов (74,4%) верифицирован дебют МКЛ, 10/117 (8,5%) – рецидив, 8/117 (6,8%) – прогрессия, 12/117 (10,3%) – ремиссия заболевания. Медиана срока наблюдения после установления диагноза составляла 30 месяцев (0–102 месяца). На момент окончания исследования количество выживших больных было 77/117 (65,8%), умерших – 40/117 (34,2%). Стадирование пациентов проводилось в соответствии с классификацией Ann-Arbor (1972 г. в модификации Cotswold, 1989): I стадия – 1/117 (0,9%), II стадия – 2/117 (1,7%), III стадия – 6/117 (5,1%), IV стадия – 108/117 (92,3%) (рисунок 9).

Рисунок 9 - Распределение больных МКЛ по стадиям в соответствии с классификацией Ann-Arbor

Согласно шкале оценки соматического статуса ECOG пациенты разделялись на четыре группы: 25/117 (21,4%) – 0 баллов, 67/117 (57,3%) – 1 балл, 19/117 (16,2%) – 2 балла и 6/117 (5,1%) – 3 балла (рисунок 10).

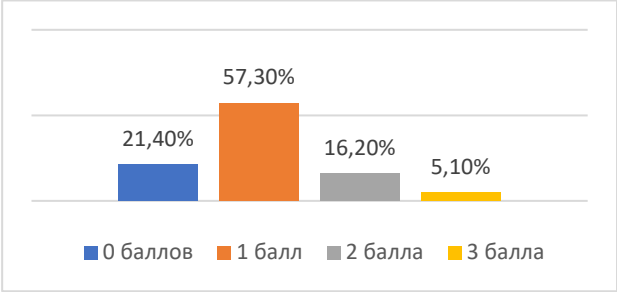


Рисунок 10 - Распределение пациентов с МКЛ в зависимости от соматического статуса по шкале ECOG

У 87/117 (74,4%) пациентов выявлено поражение более 1 экстранодальной области. Вовлечение КМ наблюдалось у 93/117 (79,5%) больных. У 62/117 (53,0%) пациентов обнаруживались В-симптомы. Повышение активности ЛДГ сыворотки крови определялось у 84/117 (71,8%) больных.

Распределение пациентов по шкале MIPI было следующим: низкий риск - 17/117 (14,5%), промежуточный риск – 33/117 (28,2%), высокий риск – 67/117 (57,3%) (рисунок 11).

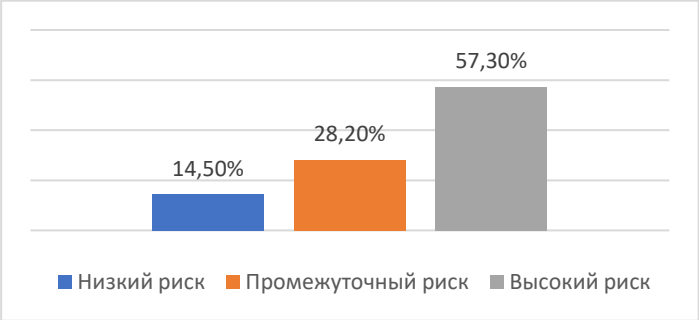


Рисунок 11 - Классификация пациентов с МКЛ в соответствие со шкалой MIPI

Проанализировать кариотип методом СЦИ удалось 80 больным. Нормальный кариотип обнаруживался у 44/80 (55,0%) больных. Патологический кариотип с 1-2 хромосомными аномалиями определялся у 15/80 (18,75%) пациентов, в 26,25% (21/80) случаев выявлялись комплексные изменения кариотипа (3 и более хромосомных аберраций) (рисунок 12).

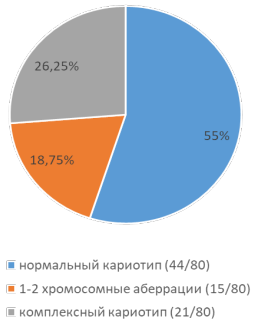
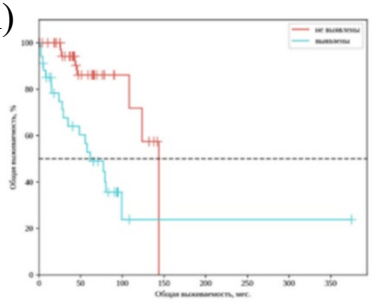


Рисунок 12 - Частота выявления генетических аберраций при исследовании кариотипа пациентов с МКЛ

Из 36 пациентов с патологическим кариотипом диагностическая транслокация t(11;14)(q13;q32) выявлялась в 88,9% (32/36) случаев. У 4/36 больных (11,1%) обнаруживались различные аберрации хромосом: трисомия хромосомы 12, делеция del(11)(q32), дополнительная маркерная хромосома, КК.

Анализ ОВ пациентов в зависимости от наличия хромосомных аберраций в кариотипе показал, что у пациентов с хромосомными изменениями медиана ОВ значимо ниже, чем у больных с НК и составила 62 месяца по сравнению со 144 (p=0,002) (рисунок 13).

А)



Б)

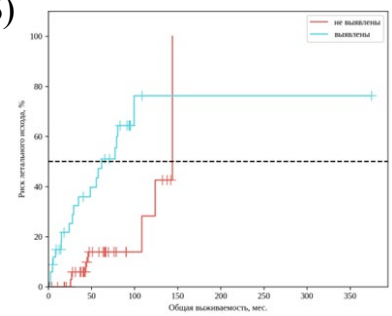


Рисунок 13 – Кривые ОВ и риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа (p=0,002)

А) Кривая ОВ у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа

При оценке БРВ у больных с патологическим кариотипом обнаружена тенденция к снижению медианы БРВ по сравнению с пациентами, у которых выявлялся НК (48 *vs* 120 месяцев, соответственно, p = 0,070) (рисунок 14).

А) Б)

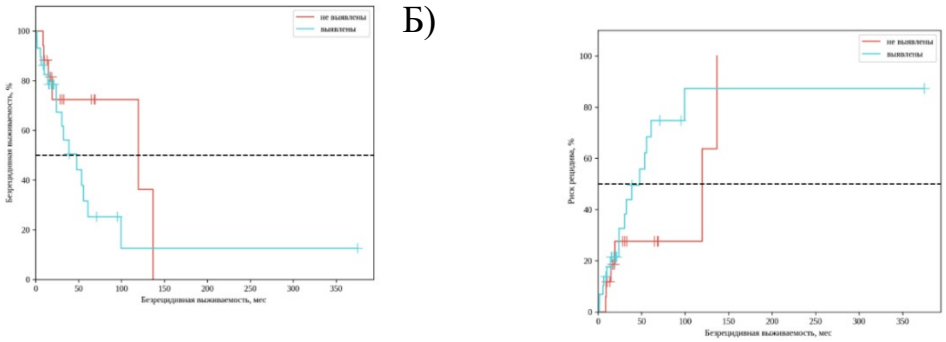


Рисунок 14 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления патологического кариотипа

2.2 Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ)

Материалом для исследования у пациентов с МКЛ являлись ПК 53/88 (60,2%) или КМ 21/88 (23,9%). У 14/88 (15,9%) больных выполнялось параллельное культивирование КМ и митоген-стимулированных В-лимфоцитов ПК.

Приготовление препаратов ПК и КМ для СЦИ проводили в соответствии с приведенной ниже методикой.

А. СЦИ на клетках ПК.

Периферическую кровь в объеме 10-12 мл забирали в 15 мл вакуумные пробирки, содержащие 100-500 ед. гепарина лития, перемешивали.

1. После подсчета количества лейкоцитов ПК разделяли на две или более культур из расчета оптимальной концентрации – 3-5x10^9/мл клеток на 1 мл среды RPMI 1640 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотика, L-глутамина в конечной концентрации 292,3 мг/л и митогенов (липополисахарида и ТРА) в соотношении 1:1.

2. Для культивирования клеточную суспензию помещали в термостат и инкубировали 72 часа при температуре +37°С, последние 24 часа с добавлением колцемида (в концентрации, рекомендованной производителем).
3. После окончания срока культивирования полученный материал разделяли на две пробирки, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 минут при 1000 об/мин, супернатант удаляли пипеткой Пастера, оставляя 0,3-0,5 мл жидкости над осадком.
4. В оставшуюся часть суспензии добавляли 8-10 мл гипотонического раствора (0,55% раствор KCl), перемешивали пипетированием и выдерживали в термостате при температуре +37ºС в течение 30 мин.
5. Затем за счет добавления 5% уксусной кислоты (5 капель) проводили остановку действия гипотонического раствора KCl с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин.
6. После удаления надосадочной жидкости материал подвергали 3-4 кратной фиксации смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 (фиксатора) при комнатной температуре. Для этого к осадку добавляли 8-10 мл фиксатора, интенсивно перемешивали пипетированием и центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин., затем удаляли надосадочную жидкость и повторяли процедуру фиксации. Затем фиксатор меняли 2-3 раза, добавляя порции по 5-7 мл.
7. Полученную суспензию клеток (30–50 мкл) раскапывали с высоты 30-50 см на обезжиренные предметные стекла (5-10 штук), охлажденные в морозильной камере или в холодной воде. Затем стекла обжигали над пламенем спиртовки и высушивали при комнатной температуре в течение суток.
8. Далее выполняли дифференциальную окраску с применением трипсина (GTG-техника) по методу Seabright (Seabright, 1971) [114].

   Обрабатывали стекло в 0,25% растворе трипсина (время подбиралось эмпирически в интервале 10-60 сек.) с последующей окраской в течение 1 минуты в растворе красителя Гимза, разведенном на фосфатном буфере (pH =

6,8). Смывали краситель проточной водой и высушивали препараты при комнатной температуре.

9. Оценка качества окраски хромосом и анализ кариотипа пациента проводились под световым микроскопом.

Б. СЦИ на клетках КМ.

Костный мозг в объеме 2-3 мл забирали в вакуумную пробирку объемом 15 мл, содержащую 100–500 ед. гепарина лития, перемешивали.

1. В 15 мл пробирке смешивали: 4,0 мл среды RPMI (с антибиотиком и L - глутамином), 1 мл эмбриональной сыворотки, расчетную дозу аспирата КМ (оптимальная концентрация составляла 2×10^9 клеток на 1 мл среды RPMI), колцемид (в концентрации, рекомендованной производителем). Культивировали 24 часа при температуре +37ºС.
2. После культивирования клетки осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли пипеткой Пастера, оставляя 0,3-0,5 мл жидкости над осадком.

Дальнейшая обработка материала проводилась аналогично п. 4-9 методики СЦИ на клетках ПК.

Для каждого больного анализировали не менее 20 метафазных пластин. Одни и те же структурные изменения кариотипа считались клональными в случае их обнаружения в двух и более клетках. Если дополнительные хромосомы обнаруживались в двух и более клетках, а потери хромосом – в трех, то также констатировалось наличие патологического клона. Согласно Европейским рекомендациям по цитогеномному анализу гематологических новообразований комплексный кариотип определялся при наличии 3 и более хромосомных аберраций [103].

После завершения анализа всех метафазных пластин в случае обнаружения клональных хромосомных нарушений устанавливалось процентное соотношение между нормальными и измененными клетками. Интерпретация патологии производилась в соответствии с Международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2021 [86].

Для цитогенетического анализа и архивирования полученных данных, использовали компьютерную систему анализа изображений «ВидеоТесТ».

На рисунке представлен результат СЦИ пациента с МКЛ (рисунок 15).

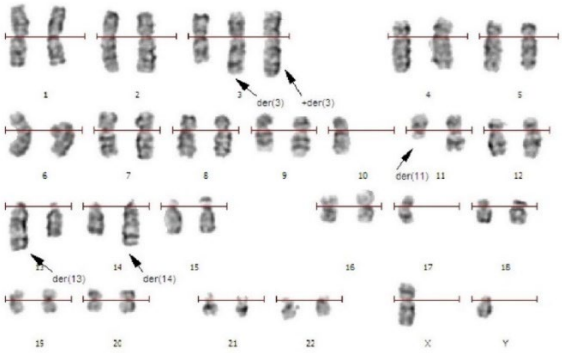


Рисунок 15 – Кариограмма больного МКЛ с комплексными изменениями кариотипа (46,XY,der(3),+der(3),-8,-10,t(11;14)(q13;q32),der(13)t(11;13)(q13;q34) с вариациями[6]/46,XY[14])

2.3 Флуоресцентная in situ гибридизация (FISH)

Для FISH-исследования использовались суспензия клеток, приготовленная для СЦИ, а также мазки ПК или КМ на предметном стекле. При отсутствии нативного материала для проведения СЦИ или FISH-исследования на суспензии опухолевых клеток в ряде случаев FISH-анализ выполнялся на гистологических срезах парафиновых блоков.

Описание методик FISH-исследования, которые проводились у наших пациентов представлено ниже.

А. FISH на суспензии клеток ПК или КМ. Подготовка материала проводилась в 2 этапа.

1 этап (1 день)

1. Центрифугировали эппендорф с суспензией в микроцентрифуге 5 минут/1000 оборотов.
2. В отдельном эппендорфе осадок разбавили несколькими каплями фиксатора.
3. Нанесли осадок пипеткой Пастера на предварительно обезжиренные, охлажденные и смоченные в дистиллированной воде предметные стекла.

4. Положили стекло на термоплату, нагретую до 37 °С и высушивали в течение 10 минут.
5. Разметили под световым микроскопом с опущенным конденсором участок с отдельно расположенными ядрами (не менее 200 в поле зрения).
6. Нанесли на размеченный участок 1,5 мкл ДНК-пробы, положили сверху покровное стекло (10 мм), заклеили резиновым клеем для герметизации.
7. Предметные стекла поместили в прибор для денатурации и гибридизации – ThermoBrite ™ Slide Hybridization/Denaturation System (Abbott Molecular) на 16-24 часа.
8. Денатурацию проводили при температуре 75 °С в течение 12 минут, температурный режим гибридизации +37°С.

2 этап (2 день)

1. Предварительно нагрели термобаню до +72-73°С.
2. Приготовили раствор 0,4xSSC (1 мл 20 SSC/49 мл дистиллированной воды – на 1 сосуд Коплина). Поместили в термобаню.
3. Подготовили раствор 2xSSC-TWEEN 0,005% (5 мл 20xSSC, 45 мл дистиллированной воды, 25 мкл TWEEN-20 – на 1 сосуд Коплина).
4. Сняли клей, покровное стекло, поместили в сосуд Коплина с 0,4xSSC в баню на 2 минуты.
5. Продолжили отмывку во втором сосуде Коплина с 2xSSC-TWEEN 0,005% при комнатной температуре 2 минуты.
6. Высушивали стекла в темноте 30 минут.
7. Выполнили контрастирующую окраску интерфазных ядер раствором DAPI/Antifade (1,5 мкл).
8. Накрыли покровным стеклом размером 24x24 мм.

Б. FISH на мазках ПК или КМ. Исследование выполнялось в 2 этапа (2 дня).

1 этап (1 день)

1. Мазки поместили на 20 минут в фиксатор, приготовленный из этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1.
2. Высушивали на воздухе в течение 20-30 минут.

Дальнейшая подготовка материала в первый день проводилась аналогично п. 5–8 методики FISH-исследования на суспензии клеток ПК или КМ. Второй день полностью соответствовал описанной выше методики.

В. FISH – исследование на гистологических срезах парафиновых блоков (гистоFISH). Исследование проводилось в 3 этапа (3 дня).

Предварительно с парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 3 мкм и монтировали на предметные стекла, покрытые полилизином.

Первый день

1. Срезы с парафиновых блоков положили в термостат (t=56 ºC) на 16 часов.

Второй день

1. Для депарафинизации приготовили 3 сосуда Коплина с ксилолом.

2. Инкубировали срезы в ксилоле три смены по 10 минут.

3. Поместили срезы в 96ºC этиловый спирт - 2 смены по 5 минут.

5. Высушивали стекла в термостате (t=56 ºC) в течение 5 минут.

6. Поместили срезы с сосуд Коплина с 0,2N раствором HCl на 20 минут.

7. Промыли стекла дистиллированной водой 3 минуты.

8. Поместили препараты в раствор 2xSSC (pH=7,0) на 3 минуты.

9. Инкубировали срезы в 1 М растворе тиоционата натрия в термобане при температуре +80ºC 30 минут.

10. Промыли предметные стекла дистиллированной водой в течение 1 минуты.

11. Поместили препараты в раствор 2xSSC (pH=7,0) – 2 смены по 5 минут.

12. Подготовили раствор в сосуде Коплина: в 50 мл дистиллированной воды добавили 0,5 мл 1N HCl. После того как раствор нагрелся в термобане до +37ºC добавили 50 мг пепсина.

13. Инкубировали стекла в растворе пепсина, активированного HCl в течение 2 часов (водяная баня, температура +37ºС).

13. Поместили препараты в раствор 2xSSC (pH=7,0) – 2 смены по 5 минут.

14. Высушивали срезы в термостате при температуре +37ºС в течение 10 минут.

15. Поместили стекла в 10% раствор забуференного формалина на 10 мин.

16. Поместили препараты в раствор 2xSSC (pH=7,0) – 2 смены по 5 минут.

17. Высушивали срезы в термостате при температуре +37ºС в течение 10 минут.

18. Для дегидратации поместили стекла в охлажденные спирты: 70% – 3 минуты, в 85% – 1 минута, в 95% – 1 минута.

19. Высушивали препараты на воздухе до полного испарения спирта (5 минут).

Последующая подготовка препарата выполнялась аналогично п. 5–7 (1 день) методики FISH-исследования на суспензии клеток ПК или КМ.

Третий день

Отмывка препарата.

1. Предварительно нагрели в термобане сосуд Коплина с раствором 0,4xSSC до +71-72°С.

2. Подготовили два сосуда Коплина с раствором 2xSSC*0,1 TWEEN и оставили при комнатной температуре.

3. Открыли Termobrite, удалили пинцетом клей вместе с покровным стеклом и поместили препарат в сосуд Коплина с раствором 2xSSC*0,1 TWEEN на 1 минуту при комнатной температуре.

4. Поместили стекло в раствор 0,4xSSC в водяной бане. Оставили на 2 минуты.

5. Извлекли препарат из раствора 0,4xSSC и опустили в раствор 2xSSC*0,1 TWEEN. Отмывку производили при комнатной температуре в течение 1 минуты.

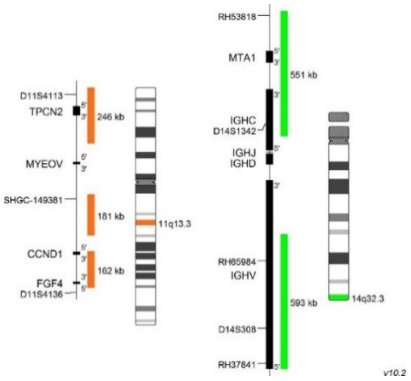
7. Высушивали препараты в темноте в течение 30 минут.

8. Для визуализации гибридизации нанесли на размеченный участок 2 мкл контркрасителя DAPI/Antifade, закрыли покровным стеклом 24x24 мм.

Анализ препаратов проводился на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss Axio Imager 2 с системой видеоанализа ISIS (Carl Zeiss Microscopy GmbH и MetaSystems Hard & Software GmbH, Германия) с использованием тройного фильтра DAPI/FITC/Spectrum Orange и отдельно фильтров FITC, Spectrum Orange. Для каждого ДНК-зонда оценивали не менее 200 интерфазных ядер с четкими сигналами. Результаты FISH-анализа описывали в соответствии с международной цитогеномной номенклатурой ISCN, 2021 [86].

В исследовании использовались следующие ДНК-зонды: XL t(11;14) MYEOV/IGH DF Translocation/Dual Fusion Probe, XL TP53/17cen Deletion Probe, XL MYC BA Break Apart Probe (MetaSystems, Германия).

В состав ДНК-зонда для выявления транслокации t(11;14)(q13.3;q32.3) входят две локусспецифические пробы: *MYEOV* в регионе 11q13.3 (красный флуорохром) и *IGH*, соответствующая региону 14q32.3 (зеленый флуорохром). Ядра с двумя красными и двумя зелеными сигналами, а также одним красным, одним зеленым и одним желтым (сливным) сигналами (до 10,0%) считали негативными (без транслокации). Ядра с одним красным и одним зеленым сигналами от неизмененных локусов генов *MYEOV* и *IGH* и двумя желтыми (сливными) сигналами от дериватов 11-й и 14-й хромосом считали позитивными, с наличием транслокации t(11;14)(q13;q32). Схема строения ДНК-зонда и результаты гибридизации представлены на рисунке (рисунок 16).



А) Норма

Б) Транслокация t(11;14)(q13.3;q32.3)

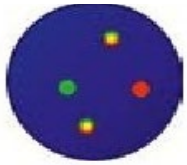
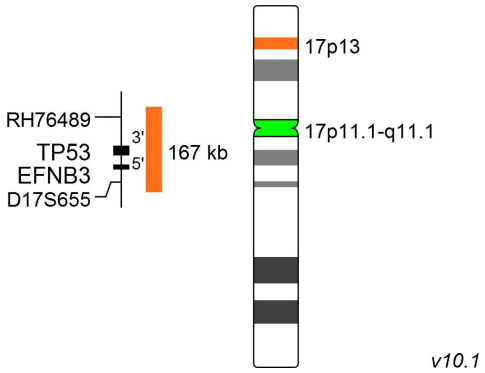


Рисунок 16 - Схема строения ДНК-зонда для выявления транслокации t(11;14)(q13.3;q32.3) и результаты гибридизации, представленные в каталоге производителя Metasystems (Германия) [Metasystems Available at: https://metasystems-probes.com/]

ДНК-проба для обнаружения делеции локуса 17p13/*TP53* или моносомии хромосомы 17 окрашена флуорохромами красного (регион 17p13) и зеленого цвета (регион 17p11.1-q11.1). Ядра с двумя красными и зелеными сигналами от локусов 17p13 и 17p11.1-q11.1 (центромера хромосомы 17) относили к нормальным. Интерфазные ядра с одним красным сигналом от гена *TP53* и двумя зелеными сигналами от центромеры хромосомы 17 оценивались как делеция *TP53*. Схема строения ДНК-зонда и результаты гибридизации указаны на рисунке 17.



А) Норма

Б) Делеция 17p13/*TP53*

Рисунок 17 - Схема строения ДНК-зонда для выявления аберраций хромосомы 17 и результаты гибридизации, представленные в каталоге производителя Metasystems (Германия) [Metasystems Available at: https://metasystems-probes.com/]

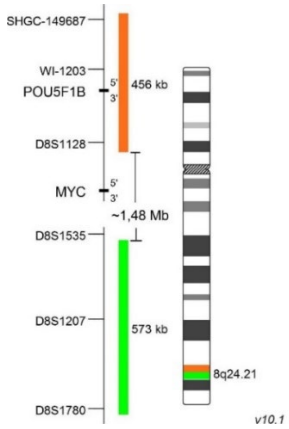
Дополнительно мы выявляли моносомию хромосомы 17, при которой в интерфазных ядрах визуализировались один красный сигнал от гена *TP53* и один

зеленый сигнал от локуса 17p11.1-q11.1. Результат гибридизации при данной патологии указан на рисунке 18.

Моносомия хромосомы 17

Рисунок 18 - Схема строения ДНК-зонда для выявления моносомии хромосомы 17

ДНК-проба для выявления аберраций гена *MYC* (break-apart) состоит из двух участков: центромерного, меченого красным флуорохромом, и теломерного, окрашенного зеленым флуорохромом. Интерфазные ядра с двумя сливными сигналами от гена *MYC* считались нормальными. В случае транслокации с вовлечением *MYC* в интерфазных ядрах определялся один сливной сигнал от неизмененного аллеля гена *MYC* и отдельно лежащие красный сигнал (от центромерного участка *MYC*) и зеленый сигнал (от теломерного участка *MYC*. Схема строения ДНК-зонда и результаты гибридизации представлены на рисунке 19.



А) Норма

Б) Перестройка гена *MYC*

Рисунок 19 - Схема строения ДНК-зонда для выявления изменений гена *MYC* и результаты гибридизации, представленные в каталоге производителя Metasystems (Германия) [Metasystems Available at: https://metasystems-probes.com/]

Дополнительно при исследовании с ДНК-пробой к гену *MYC* мы выявляли интерфазные ядра с амплификацией *MYC*. В таких клетках определялись дополнительные сливные сигналы (рисунок 20).

Амплификация *MYC*

Рисунок 20 - Схема строения ДНК-зонда для выявления амплификации гена *MYC*

Кроме того, при анализе пациентов методом FISH обнаруживались ядра с амплификацией гена *MYC* в сочетании с делецией центромерного (5’-регион) участка. В интерфазных ядрах визуализировались два сливных сигнала от гена *MYC* и зеленый сигнал от теломерного (3’-региона) *MYC*. Также у больных определялись интерфазные ядра с дополнительной копией *MYC* и делецией теломерного (3’-регион) участка гена *MYC*. В таких ядрах детектировались два сливных сигнала от гена *MYC* и красный сигнал от теломерного (5’-региона) *MYC*. (рисунки 21,22).

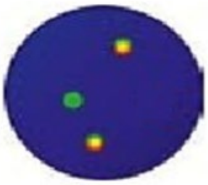


Рисунок 21 - Амплификация *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*

Рисунок 22 - Амплификация *MYC* с делецией теломерного учаска *MYC*

Для определения границ нормальных значений анализировали 1000 ядер периферической крови от 10 здоровых доноров для каждой пробы.

Границы нормальных значений:

- для перестройки с вовлечением гена *MYC*≤ 1,0%;
- для амплификации гена *MYC* ≤ 2,0%;
- для амплификации гена *MYC* в сочетании с делецией центромерного участка *MYC* ≤ 2,0%;
- для амплификации гена *MYC* в сочетании с делецией теломерного участка *MYC* ≤ 2,0%;
- для транслокации t(11;14)(q13;q32) ≤1,0%;
- для делеции гена *TP53* ≤7,0%;
- для моносомии хромосомы 17 ≤4,0%.

2.4 Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы StatTech v. 3.0.6 (разработчик - ООО "Статтех", Россия). Оценка функции выживаемости больных проводилась по методу Каплана-Мейера, при помощи которого выполнялся анализ цензурированных данных. В качестве точки отсчета для вычисления общей выживаемости выбирали дату постановки диагноза МКЛ. Безрецидивная выживаемость рассчитывалась от момента наступления ремиссии до момента возникновения рецидива.

Для анализа выживаемости больных использовался метод регрессии Кокса, подразумевающий прогнозирование риска наступления события для рассматриваемого объекта и оценку влияния заранее определенных независимых переменных (предикторов) на этот риск.

Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка (при числе исследуемых менее 50) или критерия Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3).

Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей.

Сравнение двух групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью U-критерия Манна-Уитни.

Сравнение процентных долей при анализе четырехпольных таблиц сопряженности выполнялось с помощью, критерия хи-квадрат Пирсона (при значениях ожидаемого явления более 10).

Для статистического изучения связи между явлениями использовался непараметрический метод корреляции Спирмена, при котором определялась фактическая степень параллелизма между двумя количественными рядами изучаемых признаков и давалась оценка тесноты установленной связи с помощью количественно выраженного коэффициента.

Статистически значимыми считали различия при $p<0,05$ [16, 20, 22].

ГЛАВА 3 КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БОЛЬНЫХ МКЛ

3.1 Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC*

При сравнении клинических параметров в группах больных с наличием аберраций, вовлекающих ген *MYC* или их отсутствием обнаруживались статистически значимые отличия в частоте встречаемости гепатомегалии ($p=0,002$), спленомегалии ($p=0,023$) и поражении КМ ($p=0,027$). Также выявлено, что у больных с нарушениями *MYC* достоверно чаще определялся соматический статус, соответствующий 2 и 3 баллам по шкале ECOG (37,9% *vs* 9,1% и 6,9% *vs* 4,5%, соответственно, $p<0,001$), в то время как у большинства пациентов без аберраций *MYC* обнаруживался ECOG 0 и 1 балл (28,4% *vs* 0% и 58,0% *vs* 55,2%, соответственно, $p<0,001$).

Симптомы опухолевой интоксикации чаще регистрировали у больных с изменениями *MYC* по сравнению с группой без нарушений *MYC* (65,2% *vs* 49,3%,

соответственно), однако статистическая значимость не была достигнута (p=0,184). Также для пациентов с нарушениями *MYC* детектировалась статистическая тенденция к более частой выявляемости прогностической группы высокого риска по шкале MIPI (73,9% *vs* 50,8%, соответственно, p=0,110), тогда как больные с отрицательным FISH-статусом *MYC* преимущественно относились к группам промежуточного и низкого риска (30,2% *vs* 21,7% и 19,0 *vs* 4,3% соответственно, p=0,110).

Поражение более одной экстранодальной области у пациентов как с нарушениями *MYC,* так и с отсутствием аберраций *MYC* выявлялось с одинаковой частотой (63,4% в каждой группе, p=0,980).

Клинические параметры больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC* представлены в таблице (таблица 1).

Таблица 1 – Клиническая характеристика больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC*

Исследуемый показатель	Группа *MYC*- n=88	Группа *MYC*+ n=29	p
М, случаев (%)	59 (67,0%)	20 (69,0%)	0,848
Ж, случаев (%)	29 (33,0%)	9 (31,0%)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	60 (54-65)	63 (55-70)	0,201
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,849
Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	1 (1,4%)	0 (0,0%)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	4 (5,7%)	1 (4,2%)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	64 (91,4%)	23 (95,8%)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	12 (19,0%)	1 (4,3%)	0,110
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	19 (30,2%)	5 (21,7%)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	32 (50,8%)	17 (73,9%)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	25 (28,4%)	0 (0,0%)	**< 0,001**

Продолжение таблицы 1

Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	51 (58,0%)	16 (55,2%)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	8 (9,1%)	11 (37,9%)	
Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	4 (4,5%)	2 (6,9%)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	52 (63,4%)	18 (64,3%)	0,980
B-симптомы, случаев (%)	34 (49,3%)	15 (65,2%)	0,184
Гепатомегалия, случаев (%)	26 (41,35%)	18 (78,3%)	**0,002**
Спленомегалия, случаев (%)	47 (72,3%)	21 (95,5%)	**0,023**
Поражение КМ, случаев (%)	54 (75,0%)	23 (95,8%)	**0,027**

Сравнение данных лабораторных методов исследования обнаружило статистически достоверные различия в уровне тромбоцитов (p=0,013), лейкоцитов в ПК (p<0,001) и частоте встречаемости тромбоцитопении (p=0,002), а также анемии (p=0,002).

Стоит также отметить отчетливую статистическую тенденцию в группе пациентов с изменениями гена *MYC* к снижению медианы уровня гемоглобина у мужчин и женщин (130,2 против 114,7 г/л (мужчины), соответственно, p=0,078 и 116 против 113 г/л (женщины), соответственно, p=0,063).

Несмотря на различия медиан уровня ЛДГ в сыворотке крови в выделенных подгруппах статистической значимости при попарном сравнении они не достигали (67,9% против 82,4%, соответственно, p=0,252).

Также не было выявлено статистически значимых отличий у больных с различным FISH-статусом гена *MYC* по процентному содержанию клеток, экспрессирующих маркер пролиферативной активности опухолевой клетки Ki-67 (p=0,728).

Результаты лабораторных методов исследования МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC* представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика результатов лабораторных методов исследования МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC*

Исследуемый показатель	Группа *MYC*– n=88	Группа *MYC*+ n=29	p
Тромбоциты, 10^9/л медиана (диапазон)	204 (150-250)	144 (113-194)	**0,013**
Тромбоцитопения, случаев (%)	23 (34,8%)	16 (72,7%)	**0,002**
Гемоглобин (мужчины), г/л медиана (диапазон)	130,2 (104-145)	114,7 (86-138)	0,078
Гемоглобин (женщины), г/л медиана (диапазон)	116 (85-132)	113 (92-123)	0,063
Анемия, случаев (%)	26 (39,4%)	17 (77,3%)	**0,002**
Лейкоциты, 10^9/л медиана (диапазон)	8 (6-15)	24 (13-36)	**< 0,001**
Активность ЛДГ выше нормы, случаев (%)	36 (67,9%)	14 (82,4%)	0,252
Ki-67, % медиана (диапазон)	25 (12-40)	25 (15-39)	0,728

3.2 Клинико-лабораторная характеристика больных «double-hit» МКЛ

Прицельное внимание в исследовании уделено изучению подгруппы больных «double-hit» МКЛ, которые характеризовались наличием изменений гена *MYC* с транслокацией t(11;14)(q13;q32) (22 из 117 пациентов (18,8%)). Для оценки степени неблагоприятного влияния сочетания молекулярно-цитогенетических изменений, выявляемых у пациентов с «double-hit» МКЛ на клинико-лабораторные параметры, мы провели сравнительный анализ данной группы пациентов с отдельными группами больных МКЛ, такими как пациентами, у которых определялись аберрации только гена *MYC* и больными с транслокацией t(11;14)(q13;q32).

В таблице 3 представлены результаты клинико-лабораторных данных пациентов группы «double-hit» МКЛ и больных с аберрациями гена *MYC*.

Таблица 3 – Сравнение клинико-гематологических характеристик больных с «double-hit» МКЛ и группы пациентов с изменениями гена *MYC*

Исследуемый показатель	Группа «double-hit» МКЛ (*MYC*+ t(11;14)+) (n=22)	Группа *MYC*+ (n=7)	p
ж, случаев (%)	7 (31,8)	2 (28,6)	1,000
м, случаев (%)	15 (68,2)	5 (71,4)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	62 (58-66)	64 (50-79)	0,607
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000
Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	1 (5,3)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	18 (94,7)	5 (100,0)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	0 (0,0)	1 (25,0)	0,055
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	5 (26,3)	0 (0,0)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	14 (73,7)	3 (75,0)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,704
Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	12 (54,5)	4 (57,1)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	8 (36,4)	3 (42,9)	

Продолжение таблицы 3

Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	2 (9,1)	0 (0,0)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	14 (77,8)	4 (80,0)	1,000
В-симптомы, случаев (%)	12 (66,7)	3 (60,0)	1,000
Гепатомегалия, случаев (%)	15 (78,9)	3 (75,0)	1,000
Спленомегалия, случаев (%)	18 (94,7)	3 (75,0)	0,078
Поражение КМ, случаев (%)	19 (100,0)	4 (80,0)	0,208
Тромбоциты, 10^9/л, медиана (диапазон)	158 (122-193)	16 (44-275)	0,961
Тромбоцитопения, медиана (диапазон)	13 (76,5)	3 (60,0)	0,585
Гемоглобин (женщины), г/л медиана (диапазон)	111 (97-120)	120 (119-135)	0,078
Гемоглобин (мужчины), г/л медиана (диапазон)	116 (87-123)	122 (118-138)	0,082
Анемия, случаев (%)	15 (88,2)	2 (40,0)	0,055
Лейкоциты, 10^9/л медиана (диапазон)	26 (14-37)	13 (11-32)	0,455
Активность ЛДГ выше нормы, случаев (%)	11 (84,6)	3 (75,0)	1,000
Ki-67, % медиана (диапазон)	19 (11-26)	40 (35-45)	**0,026**

Между исследуемой группой больных с «double-hit» МКЛ и группой сравнения, в которую были включены пациенты с изменениями гена *MYC*, не выявлено достоверных различий по основным клиническим и лабораторным характеристикам, за исключением медианы уровня экспрессии индекса пролиферативной активности Ki-67. Медиана количества опухолевых клеток,

экспрессирующих Ki-67 в группе сравнения была достоверно выше 40% против 19% (p = 0,026).

Также мы сопоставили клинические параметры и результаты лабораторных исследований пациентов группы «double-hit» МКЛ с больными, у которых выявлялась транслокация t(11;14)(q13;q32) (таблица 4).

Таблица 4 – Сравнение клинико-гематологических показателей пациентов с «double-hit» МКЛ и группы больных с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

Исследуемый показатель	Группа «double-hit» МКЛ (*MYC*+ t(11;14)+) n=22	Пациенты с транслокацией t(11;14)(q13;q32) n=60	p
ж, случаев (%)	7 (31,8)	15 (25,0)	0,537
м, случаев (%)	15 (68,2)	45 (75,0)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	62 (58-66)	61 (58-64)	0,613
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	0 (0,0)	1 (2,2)	0,660
Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	1 (5,3)	1 (2,2)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	18 (94,7)	44 (95,7)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	0 (0,0)	1 (2,2)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	0 (0,0)	5 (11,6)	0,248
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	5 (26,3)	13 (30,2)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	14 (73,7)	25 (58,1)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	0 (0,0)	12 (20,0)	**0,018**
Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	12 (54,5)	37 (61,7)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	8 (36,4)	7 (11,7)	

Продолжение таблицы 4

Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	2 (9,1)	4 (6,7)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	14 (77,8)	38 (82,6)	0,726
В-симптомы, случаев (%)	12 (66,7)	24 (53,3)	0,334
Гепатомегалия, случаев (%)	15 (78,9)	19 (46,3)	**0,018**
Спленомегалия, случаев (%)	18 (94,7)	34 (79,1)	0,175
Поражение КМ, случаев (%)	19 (100,0)	40 (87,0)	0,169
Тромбоциты, 10^9/л медиана (диапазон)	145 (117-175)	192 (128-239)	0,132
Тромбоцитопения, случаев (%)	13 (76,5)	17 (40,5)	**0,020**
Гемоглобин (мужчины), г/л медиана (диапазон)	109 (97-120)	127 (108-139)	**0,016**
Гемоглобин (женщины), г/л медиана (диапазон)	112 (87-123)	116 (105-129)	**0,024**
Анемия, случаев (%)	15 (88,2)	20 (47,6)	**0,004**
Лейкоциты, 109/л медиана (диапазон)	26 (14-37)	9 (6-25)	**0,008**
Активность ЛДГ выше нормы	11 (84,6)	29 (76,3)	0,706
Ki-67, %	19 (11-26)	25 (14-42)	0,265

Сравнительный анализ данных лабораторных исследований и клинических характеристик у больных группы «double-hit» МКЛ и пациентов с транслокацией t(11;14)(q13;q32) обнаружил существенные различия по таким показателям как частота встречаемости гепатомегалии (78,9% против 46,3%, соответственно, p=0,018), тромбоцитопении (76,5% против 40,5%, соответственно, p=0,020), анемии (88,2% *vs* 47,6%, соответственно, p=0,004). Кроме того, у пациентов с «double-hit» МКЛ достоверно чаще определялся соматический статус 2 и 3 балла по шкале ECOG (36,4% против 11,7% и 9,1% против 6,7%, соответственно,

p=0,018), тогда как общее состояние больных с наличием транслокации t(11;14)(q13;q32) в большинстве случаев соответствовало 0 и 1 баллам (20,0% против 0% и 61,7% против 54,5%, соответственно, p=0,018). Также в группе больных с «double-hit» МКЛ по сравнению с пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32) медиана уровня содержания гемоглобина как у мужчин (109 *vs* 127 г/л, соответственно, p=0,016), так и у женщин (112 против 116 г/л, соответственно, p=0,024) была значимо ниже. Статистически чаще пациенты с «double-hit» МКЛ характеризовались также более высокими показателями содержания лейкоцитов в ПК (медианы 26 x10^9/л против 9 x10^9/л, соответственно, p=0,008).

3.3 Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53*

Сравнение клинических параметров в группах пациентов в зависимости от обнаружения аберраций гена *TP53* показало, что у больных с нарушениями *TP53* достоверно чаще выявлялась спленомегалия (100% *vs* 72,9%, соответственно, p=0,015). Кроме того, у пациентов с изменениями *TP53* значимо чаще определялся соматический статус 2 и 3 балла по шкале ECOG (29,6% против 12,2%, 11,1% против 3,3%, соответственно, p=0,036), тогда как в группе без аномалий *TP53* у больных преимущественно детектировался соматический статус соответствующий 0-1 баллам шкалы ECOG (24,4% против 11,1%, 60,0% против 48,1%, соответственно, p=0,036).

Также у больных с нарушениями гена *TP53* наблюдалась статистическая тенденция к более частому обнаружению гепатомегалии (72,2% против 45,6%, соответственно, p=0,063) и группы высокого риска в соответствии с MIPI стратификацией (73,3% против 52,2%, соответственно, p=0,086).

Достоверных отличий по таким клиническим характеристикам как вовлечение в патологический процесс более одной экстранодальной области и

наличие В-симптомов у больных в зависимости от аберраций, вовлекающих *TP53*, не выявлено (p=0,348, p=0,797, соответственно).

Частота выявляемости IV стадии по классификации Ann-Arbor у пациентов с различным FISH-статусом гена *TP53* отличалась незначимо (90,7% против 100,0%, p=0,590).

Характеристика клинических параметров больных МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53* приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Клиническая характеристика пациентов МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53*

Исследуемый показатель	Группа *TP53*– n=90	Группа *TP53*+ n=27	p
м, случаев (%)	59 (65,6%)	20 (74,1%)	0,407
ж, случаев (%)	31 (34,4%)	7 (25,9%)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	59 (57-62)	60 (56-65)	0,615
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	0,590
Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	5 (6,7%)	0 (0,0%)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	68 (90,7%)	19 (100,0%)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	13 (19,4%)	0 (0,0%)	0,086
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	19 (28,4%)	5 (26,3%)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	35 (52,2%)	14 (73,7%)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	22 (24,4%)	3 (11,1%)	**0,036**
Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	54 (60,0%)	13 (48,1%)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	11 (12,2%)	8 (29,6%)	
Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	3 (3,3%)	3 (11,1%)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	57 (64,8%)	13 (59,1%)	0,348
В-симптомы, случаев (%)	40 (54,1%)	9 (50,0%)	0,797

Продолжение таблицы 5

Гепатомегалия, случаев (%)	31 (45,6%)	13 (72,2%)	0,063
Спленомегалия, случаев (%)	51 (72,9%)	17 (100,0%)	**0,015**

Анализ данных лабораторных исследований у пациентов, разделенных на подгруппы в соответствии с обнаруженными аберрациями гена *TP53* или их отсутствием, выявил ряд особенностей (таблица 6).

Таблица 6 - Характеристика данных лабораторных исследований у пациентов МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53*

Исследуемый показатель	Группа TP53– n=90	Группа TP53+ n=27	p
Поражение костного мозга, случаев (%)	57 (75,0%)	20 (100,0%)	**0,013**
Тромбоциты, х 10^9/л медиана (диапазон)	193 (144-240)	164 (114-270)	0,435
Тромбоцитопения, случаев (%)	29 (42,0%)	10 (52,6%)	0,410
Гемоглобин (мужчины), г/л медиана (диапазон)	128,1 (114-139)	114,7 (106-136)	0,133
Гемоглобин (женщины), г/л медиана (диапазон)	116,7 (105-133)	114 (92-128)	0,125
Анемия, случаев (%)	31 (44,9%)	12 (63,2%)	0,199
Лейкоциты, 10^9/л медиана (диапазон)	8 (6-18)	24 (11-39)	**0,004**
Активность ЛДГ выше нормы, случаев (%)	37 (67,3%)	13 (86,7%)	0,141
Ki-67, % медиана (диапазон)	25 (13-39)	27 (10-40)	0,686

Поражение КМ достоверно чаще наблюдали у больных с изменениями *TP53* (100,0% против 75,0%, соответственно, p=0,013). Кроме того, у пациентов с нарушениями *TP53* выявлялся значимо более высокий уровень лейкоцитов в ПК чем в группе без аберраций *TP53* (p=0,004).

Для больных с аномалиями *TP53* прослеживалась статистическая тенденция к повышению уровня ЛДГ в сыворотке ПК (86,7% против 67,3%, соответственно, p=0,141), снижению содержания гемоглобина в ПК у мужчин (медианы 114,7 против 128,1 г/л, соответственно, p=0,133) и у женщин (медианы 114 против 116,7

г/л, соответственно, p=0,125), а также тромбоцитов (медианы 164 против $193x10^9$/л, соответственно, p=0,435).

Различия в частоте встречаемости тромбоцитопении и анемии между группами не достигали статистической значимости (p=0,410 и p=0,199, соответственно).

При сравнении уровня экспрессии Ki-67 у пациентов в зависимости от статуса гена *TP53* значимые отличия не обнаруживались (25% и 27%, соответственно, p=0,686).

3.4 Клинико-лабораторная характеристика больных МКЛ в зависимости от результатов кариотипирования

По данным кариологического исследования, выполненного 80 пациентам, НК определялся в 55,0% (44/80) случаев, хромосомные аберрации детектировались у 36/80 (45,0%) больных. Кариотип с 1-2 хромосомными аберрациями выявлялся в 18,75% (15/80) случаев, КК с множественными структурными и числовыми изменениями обнаруживались у 21/80 (26,25%) пациентов.

Сравнительный анализ клинико-лабораторных данных больных МКЛ с патологическим кариотипом и нормальным кариотипом представлен в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика клинических параметров и данных лабораторных исследований у больных МКЛ с нормальным и патологическим кариотипом

Исследуемый показатель	Нормальный кариотип n=44	Патологический кариотип n=36	p
ж, случаев (%)	12 (27,3)	14 (38,9)	0,270
м, случаев (%)	32 (72,7)	22 (61,1)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	56 (53-60)	60 (55-64)	0,242
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	1 (2,3)	0 (0,0)	0,481

Продолжение таблицы 7

Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	1 (2,3)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	1 (2,3)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	40 (93,0)	34 (100,0)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	10 (25,6)	1 (3,2)	**0,034**
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	8 (20,5)	10 (32,3)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	21 (53,8)	20 (64,5)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	13 (29,5)	5 (13,9)	**0,018**
Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	27 (61,4)	19 (52,8)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	4 (9,1)	7 (19,4)	
Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	0 (0,0)	5 (13,9)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	33 (78,6)	24 (80,0)	1,000
Наличие В-симптомов, случаев (%)	22 (51,2)	18 (58,1)	0,557
Гепатомегалия, случаев (%)	18 (48,6)	19 (65,5)	0,171
Спленомегалия, случаев (%)	30 (75,0)	23 (76,7)	0,291
Поражение КМ, случаев (%)	32 (74,4)	28 (90,3)	0,132
Тромбоциты, 10^9/л, медиана (диапазон)	222 (168-280)	150 (102-227)	**0,012**
Тромбоцитопения, случаев (%)	13 (33,3)	18 (60,0)	**0,027**
Спленомегалия, случаев (%)	30 (75,0)	23 (76,7)	0,291
Поражение КМ, случаев (%)	32 (74,4)	28 (90,3)	0,132
Гемоглобин	126	116	**0,015**

Продолжение таблицы 7

(мужчины), г/л медиана (диапазон)	(120-136)	(106-133)	
Гемоглобин (женщины), г/л медиана (диапазон)	122 (116-132)	111 (99-121)	0,055
Анемия, случаев (%)	17 (43,6)	20 (66,7)	0,057
Лейкоциты, 10^9/л, медиана (диапазон)	10 (6-15)	11 (7-34)	0,275
Активность ЛДГ выше нормы, случаев (%)	24 (72,7)	21 (80,8)	0,548
Ki-67, % медиана (диапазон)	25 (18-39)	24 (10-40)	0,641

Сопоставление клинико-лабораторных параметров пациентов МКЛ с НК и патологическим кариотипом выявлена статистическая ассоциация кариотипа с хромосомными изменениями и снижением медианы уровней тромбоцитов (150 и 222 х 10^9/л, соответственно, p=0,012), а также гемоглобина, при этом, только у мужчин (116 и 126 г/л, соответственно, p=0,015). Кроме того, у больных с хромосомными аберрациями достоверно чаще отмечалась тромбоцитопения (60,0% и 33,3%, соответственно, p=0,027). Частота выявления групп промежуточного и высокого риска по шкале MIPI была значимо выше при выявлении патологического кариотипа (32,3% и 20,5%, соответственно и 64,5% и 53,8%, соответственно, p=0,034). Вместе с тем, в случае обнаружения НК пациенты достоверно чаще соответствовали группе низкого прогностического риска (25,6% и 3,2%, соответственно, p=0,034). В группе больных с хромосомными аберрациями было значимо больше пациентов с общесоматическим статусом 2 и 3 балла по шкале ECOG (19,4% и 9,1%, соответственно и 13,9% и 0%, соответственно, p=0,018), в то время как выявление НК статистически ассоциировалось с общим состоянием, соответствующим 0 и 1 баллам (29,5% и 13,9%, соответственно, 61,4% и 52,8%, соответственно, p=0,018).

Сравнение пациентов проводилось в том числе с учетом типа аберрантного кариотипа (1-2 хромосомные перестройки, КК). Результаты исследования приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Характеристика клинических параметров и данных лабораторных исследований у больных МКЛ в зависимости от типа патологического кариотипа

Исследуемый показатель	Кариотип с 1-2 хромосомными аберрациями n=15	Комплексный кариотип n=21	p
ж, случаев (%)	7 (46,7)	7 (33,3)	0,499
м, случаев (%)	8 (53,3)	14 (66,7)	
Возраст, лет медиана (диапазон)	56 (48-65)	62 (57-67)	0,245
Стадия заболевания по Ann-Arbor I, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	–
Стадия заболевания по Ann-Arbor II, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor III, случаев (%)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Стадия заболевания по Ann-Arbor IV, случаев (%)	14 (100,0)	20 (100,0)	
MIPI низкий риск, случаев (%)	1 (8,3)	0 (0,0)	0,252
MIPI промежуточный риск, случаев (%)	5 (41,7)	5 (26,3)	
MIPI высокий риск, случаев (%)	6 (50,0)	14 (73,7)	
Общесоматический статус ECOG 0 баллов, случаев (%)	4 (26,7)	1 (4,8)	0,295
Общесоматический статус ECOG 1 балл, случаев (%)	7 (46,7)	12 (57,1)	
Общесоматический статус ECOG 2 балла, случаев (%)	2 (13,3)	5 (23,8)	

Продолжение таблицы 8

Общесоматический статус ECOG 3 балла, случаев (%)	2 (13,3)	3 (14,3)	
Поражение >1 экстранодальной области, случаев (%)	10 (83,3)	14 (77,8)	1,000
В-симптомы, случаев (%)	5 (41,7)	13 (68,4)	0,262
Гепатомегалия, случаев (%)	5 (45,5)	14 (77,8)	0,114
Спленомегалия, случаев (%)	6 (54,5)	17 (89,5)	**0,018**
Поражение КМ, случаев (%)	10 (83,3)	18 (94,7)	0,543
Тромбоциты, 10^9/л, медиана (диапазон)	149 (114-222)	151 (93-218)	0,846
Тромбоцитопения, случаев (%)	6 (54,5)	12 (63,2)	0,712
Гемоглобин (мужчины), г/л медиана (диапазон)	116 (105-126)	118 (101-129)	0,791
Анемия, случаев (%)	8 (72,7)	12 (63,2)	0,702
Лейкоциты, 10^9/л, медиана (диапазон)	8 (6-14)	20 (8-47)	0,107
Активность ЛДГ выше нормы, случаев (%)	6 (66,7)	15 (88,2)	0,302
Ki-67, % медиана (диапазон)	15 (10-40)	30 (11-46)	0,469

Сравнительный анализ больных МКЛ в зависимости от характеристики аберрантного кариотипа выявил достоверные различия в частоте встречаемости спленомегалии, которая была более характерна для пациентов с КК (89,5% и 54,5%, соответственно, p=0,018).

3.5 Сравнительный анализ клинико-лабораторных характеристик больных МКЛ в зависимости от хромосомных и молекулярно-цитогенетических аберраций

В зависимости от выявленных нарушений кариотипа и изменений, вовлекающих гены *TP53*, *MYC*, больные исследуемой группы были разделены на 5 подгрупп, которые, как показал корреляционный анализ, были сопоставимы по всем клиническим и лабораторным характеристикам (таблицы 9, 10).

Таблица 9 – Сравнительный анализ клинических характеристик больных МКЛ в зависимости от выявленных хромосомных и молекулярно-генетических аберраций

Исследуемый показатель	Комплексный кариотип (3 и более аберрации) n=21	1-2 хромосомные аберрации n=15	Транслокация t(11;14)(q13;q32) n=82	Аберрации гена *TP53* n=27	Изменения гена *MYC* n=29	p
Возраст, среднее значение (диапазон)	61,0 (55,0-69,0)	59,0 (56,0-62,0)	61,0 (58,0-64,0)	62,5 (55-68,5)	63,0 (54,5-70,5)	0,613
MIPI, баллы, среднее значение (диапазон)	3 (2-3)	2 (2-3)	3 (2-3)	3 (2-3)	3 (3-3)	0,248
Общесоматический статус ECOG, среднее значение (диапазон)	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	0,091
Поражение более 1 экстранодальной области, случаев (%)	14 66,7%	9 60,0%	38 46,0%	13 48,2%	18 62,1%	0,112
Тромбоцитопения, случаев (%)	12 57,1%	6 40,0%	17 20,7%	6 22,2%	6 20,7%	0,078
В-симптомы, случаев (%)	13 61,9%	5 33,3%	24 29,3%	6 22,2%	7 24,1%	0,334
Спленомегалия, случаев (%)	2 9,5%	6 40,0%	34 41,5%	2 7,4%	0 0%	0,271
Гепатомегалия, случаев (%)	14 66,7%	5 33,3%	19 23,2%	10 37,0%	7 24,1%	0,175

Таблица 10 – Сравнительный анализ лабораторных характеристик больных МКЛ в зависимости от выявленных хромосомных и молекулярно-генетических аберраций

Исследуемый показатель	Комплексный кариотип (3 и более аберрации) n=21	1-2 хромосомные аберрации n=15	Транслокация t(11;14)(q13;q32) n=82	Аберрации гена *TP53* n=27	Изменения гена *MYC* n=29	p
Гемоглобин, г/л, среднее значение (диапазон)	117 (98 – 130)	112 (108 – 124)	119 (114-125)	119 (106 – 129)	115 (104 – 121)	0,992
Гемоглобин (мужчины/женщины), г/л, среднее значение (диапазон)	116/104 (98 – 130)/ (92-124)	116/112 (108 – 124)/ (109-116)	124/110 (111-139) / (103-116)	114/117 (106 – 129) / (102-124)	111/114 (104 – 121) / (109-119)	0,917/ 0,975
Лейкоциты, $x10^9$/л, среднее значение (диапазон)	20 (8-47)	8 (6 – 14)	12 (7 – 28)	22 (11-40)	24 (13 – 36)	0,215
Тромбоциты, $x10^9$/л, среднее значение (диапазон)	151 (93 – 218)	149 (114 – 222)	173 (123 – 234)	164 (118 – 274)	144 (113 – 194)	0,941
ЛДГ, мккат/л, среднее значение (диапазон)	6 (4 – 8)	4 (3 – 5)	5 (4 – 7)	7 (4 – 13)	6 (4 – 8)	0,345
Ki-67, %, среднее значение (диапазон)	30 (11 – 46)	15 (10 – 40)	25 (12 – 40)	26 (10 – 38)	25 (15 – 39)	0,925

3.5.1 Поиск прогностически значимых клинических и лабораторных характеристик, влияющих на общую выживаемость больных МКЛ

Наряду с цитогенетическими и молекулярно-цитогенетическими характеристиками опухолевого клона у больных МКЛ также были проанализированы клинические и лабораторные показатели. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Клинические и лабораторные характеристики, влияющие на ОВ больных МКЛ

Исследуемый показатель	p	Отношение рисков (ОР) (95% ДИ)
Изменения гена *MYC*	**0,013**	2,722; 1,237 – 5,990
Аберрации гена *TP53*	**< 0,001**	4,452 (2,361 – 8,393)
Комплексные изменения кариотипа	**< 0,001**	4,727; 2,132 – 10,478
Патологический кариотип	**0,002**	4,093; 1,700 – 9,854
MIPI промежуточный	0,703	1,255; 0,391 – 4,032
MIPI высокий	0,437	1,544; 0,516 – 4,624
Общесоматический статус ECOG 1 балл	0,069	6,489; 0,865 – 48,659
Общесоматический статус ECOG 2 балла	**0,011**	14,784; 1,841 – 118,709
Общесоматический статус ECOG 3 балла	**0,001**	34,267; 3,990 – 294,264
Активность ЛДГ выше нормы	0,833	1,106; 0,433 – 2,822
Анемия	0,107	1,870; 0,874 – 4,004
Тромбоцитопения	0,087	1,924; 0,908 – 4,075
Симптомы опухолевой интоксикации	0,678	1,168; 0,561 – 2,431
Лейкоцитоз в ПК	0,230	1,564; 0,753 – 3,250
Спленомегалия	0,966	1,022; 0,382 – 2,736
Гепатомегалия	0,123	1,872; 0,844 – 4,153
Ki-67	**0,013**	1,021; 1,005 – 1,038

Проведенный статистический анализ показал значимое неблагоприятное влияние на ОВ изменений, вовлекающих генов *MYC* (p=0,013), *TP53* (p<0,001), патологического кариотипа (p=0,002), КК (p<0,001), общесоматического статуса, соответствующего 2 и 3 баллам по шкале ECOG (p=0,011 и p=0,001, соответственно), а также индекса пролиферативной активности Ki-67 (p=0,013).

3.5.2 Поиск прогностически значимых параметров, влияющих на безрецидивную выживаемость больных МКЛ

Анализ БРВ проводился с учетом цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и клинико-гематологических характеристик. Результаты исследования приведены в таблице (таблица 12).

Таблица 12 – Клинико-лабораторные характеристики, влияющие на БРВ пациентов с МКЛ

Фактор риска	p	Отношение рисков (ОР) (95% ДИ)
Изменения гена *MYC*	0,213	1,725; 0,731 – 4,070
Аберрации гена *TP53*	**0,005**	**2,871; 1,386 – 5,948**
Патологический кариотип	0,184	1,902; 0,737 – 4,909
Комплексные изменения кариотипа	**0,019**	**2,944; 1,192 – 7,270**
MIPI промежуточный риск	0,368	0,533; 0,136 – 2,097
MIPI высокий риск	0,385	0,572; 0,162 – 2,020
Ki-67	0,075	1,016; 0,998 – 1,034
Общесоматический статус ECOG 1 балл	0,702	1,492; 0,192 – 11,591
Общесоматический статус ECOG 2 балла	0,634	1,690; 0,195 – 14,649

Продолжение таблицы 12

Общесоматический статус ECOG 3 балла	0,348	3,010; 0,301 – 30,119
Активность ЛДГ выше нормы	0,761	1,172; 0,421 – 3,260
Анемия	0,825	1,101; 0,468 – 2,592
Тромбоцитопения	0,758	1,142; 0,491 – 2,657
Симптомы опухолевой интоксикации	0,914	0,955; 0,416 – 2,194
Лейкоцитоз в ПК	0,529	1,307; 0,569 – 3,001
Пол (мужской)	0,085	2,118; 0,903 – 4,968

На продолжительность БРВ больных МКЛ достоверно значимое влияние оказывали такие параметры как изменения гена *TP53* (p=0,005) и КК (p=0,019).

3.5.3. Результаты многопараметрического регрессионного анализа для молекулярно-цитогенетических и клинико-лабораторных факторов риска

Дополнительно проведен анализ результатов исследований методом корреляции Спирмена. Статистический анализ, оценивающий влияние на продолжительность ОВ цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и клинико-гематологических параметров, выявил корреляцию для КК (r=-0.25, p<0,05), изменений хромосомы 17 (r=-0.24; r= -0.27, p<0,05) и аберраций, вовлекающих ген *MYC* (r=-0,24, p<0,05). Для нарушений хромосомы 17 определена достоверная значимость делеции *TP53*. Анализ БРВ выявил корреляцию для изменений, вовлекающих ген *MYC* и активности ЛДГ в сыворотке крови выше нормы (таблица 13).

Таблица 13 – Корреляционный анализ параметров, влияющих на ОВ и БРВ

Выживаемость	Комплексный кариотип	Аберрации 17 хромосомы	Делеция *TP53*	Изменения *MYC*	ЛДГ
Общая выживаемость	-0,25*	-0,24*	-0,27*	-0,24*	-0,17
Безрецидивная выживаемость	-0,16	-0,10	-0,06	-0,20*	-0,31*

*- $p<0,05$

Результаты многопараметрического регрессионного анализа, оценивающего такие параметры как КК, ЛДГ, аберрации хромосомы 17, изменения гена *MYC* выявлено, что ключевое негативное влияние на ОВ больных с МКЛ независимо от других параметров оказывали аберрации гена *MYC* (b±SD = -0,21±0,08, p=0,05) (таблица 14).

Таблица 14 – Множественный регрессионный анализ для выявленных корреляций, влияющих на ОВ больных МКЛ

N=57, R=0,25, R^2=0,064, p=0,62			
	b±SD	B±SD	p-value
Intercept		66,2±13,1	0,000006
Комплексный кариотип	-0,05±0,15	-3,5±8,5	0,67
Изменения *MYC*	-0,21±0,08	-11,0±3,4	**0,05**
ЛДГ	-0,01±0,15	-0,02±1,89	0,99
Аберрации 17 хромосомы	0,06±0,16	17,6±46,2	0,70

Анализ БРВ обнаружил наибольшую тенденцию к негативному влиянию для аберраций гена *MYC* (b±SD = -0,20±0,11, p=0,30) (таблица 15).

Таблица 15 – Множественный регрессионный анализ для выявленных корреляций, влияющих на БРВ

N=34, R=0,22, R^2=0,048, p=0,92			
	b±SD	B±SD	p-value
Intercept		51,3±19,7	0,015
Комплексный кариотип	-0,08±0,19	5,1±12,5	0,62
Изменения *MYC*	-0,20±0,11	-10,0±6,7	**0,30**
ЛДГ	-0,06±0,22	-0,07±2,78	0,77
Аберрации 17 хромосомы	0,07±0,22	17,6±53,3	0,76

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БОЛЬНЫХ МКЛ

4.1 Частота встречаемости и прогностические особенности хромосомных аберраций у больных с МКЛ

Кариотипирование проведено 88/117 (75,2%) пациентам, 29/117 (24,8%) больным культивирование исследуемого материала (ПК или КМ) не выполнялось.

В большинстве случаев (60,2% (53/88)) СЦИ у пациентов с МКЛ производилось на митоген-стимулированных В-лимфоцитах. У 21/88 (23,9%) больных инкубировали КМ. У 14/88 (15,9%) пациентов выполнялось культивирование ПК и КМ.

Анализ результатов параллельного исследования КМ и ПК у 14 больных с МКЛ показал, что патологический кариотип обнаруживался достоверно чаще при культивировании митоген-стимулированных В-лимфоцитов (8/14 (57,1%) *vs* 1/14 (7,1%), p<0,05). (таблица 16)

Таблица 16 – Частота выявления патологического кариотипа при параллельном культивировании КМ и ПК у 14 пациентов с МКЛ

Порядковый номер	ФИО	Пол	Кариотип	
			Периферическая кровь	Костный мозг
1	А.С.Б.	муж	46,XY,der(3),+der(3),-8,-10,t(11;14)(q13;q32),der(13) t(11;13)(q13;q34) с вариациями [6]/46,XY [14].	43-46,XY,-4,-8,der(11)t(11;?)(q13;?),-17,-18,+4 mar[5]/46,XY[5].
2	Г.Т.С.	жен	45,XX,t(11;14)(q13;q32),-13,del(17)(p11),-18,-19,-22,+3 mar[13]/46,XX[7].	46,XX[20]
3	Щ.А.Ф.	муж	46,XY,add(7)(q36),add(9)(q34),t(11;14)(q13;q32)[12]/46,XY[8]	46,XУ[20]
4	К.В.А.	муж	46,XУ[20]	46,XУ[20]
5	П.Р.И.	муж	46,XY,der(14)t(11;14)(q13;q32),del(13)(q13;q32)[2]/46,XY[18].	46,XУ[20]
6	А.М.Н.	муж	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[4]/46,XY[16]	46,XУ[20]
7	В.Н.В.	муж	46,XУ[20]	46,XУ[20]
8	Д.В.Н.	муж	46,XУ,9ph[20]	46,XУ,9ph[20]
9	М.Н.В.	муж	47,XY,+mar[4]/46,XY[26]	46,XУ[20]
10	У.А.А.	муж	46,XУ[14]/47,XУ,+3,t(11;14)(q13;q32)[6]	46,XУ[20]
11	К.О.В.	жен	46,XX[20]	46,XX[20]
12	В.П.А.	муж	46,XY[20]	46,XY[20]
13.	К.С.П.	муж	46,XY[20]	46,XY[20]

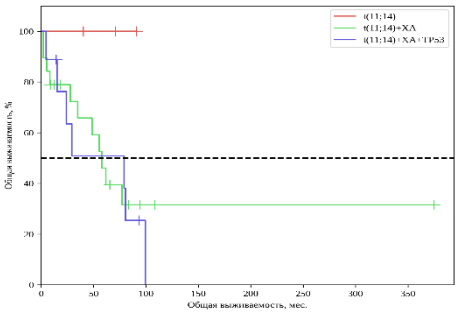
Продолжение таблицы 16

14.	Б.Г.И.	муж	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2].	46,XY[20]

При СЦИ проанализировать кариотип удалось у 80/88 (90,9%) больных (в 9,1% (8/88) случаев не получены метафазные пластинки по причине низкой митотической активности клеток). Хромосомные аберрации выявлялись у 36/80 (45,0%) пациентов, в 55,0% (44/80) случаев определялся НК.

Из 36/80 (45,0%) пациентов с патологическим кариотипом транслокация t(11;14)(q13;q32) обнаруживалась в 88,9% (32/36) случаях. У 4/32 (12,5%) больных t(11;14)(q13;q32) выявлялась как единственное изменение кариотипа. В 87,5% (28/32) случаев помимо t(11;14)(q13;q32) определялись ДХА. Важно отметить, что 10/28 (35,7%) таких пациентов были с нарушениями хромосомы 17, причем все эти изменения обнаруживались в составе КК. Однако, проведенный анализ ОВ больных с изолированной транслокацией t(11;14)(q13;q32) и групп пациентов, у которых данная транслокация сочеталась с ДХА и изменениями 17 хромосомы не показал статистически значимых различий (p = 0,092). Медиана ОВ у пациентов с изолированной транслокацией t(11;14)(q13;q32) не была достигнута. В группе пациентов, у которых t(11;14)(q13;q32) обнаружена в сочетании с ДХА без изменений и с нарушениями хромосомы 17 составила 58 и 79 месяцев, соответственно (рисунок 23).

А)



Б)

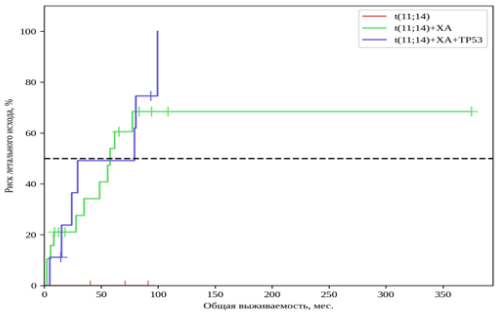


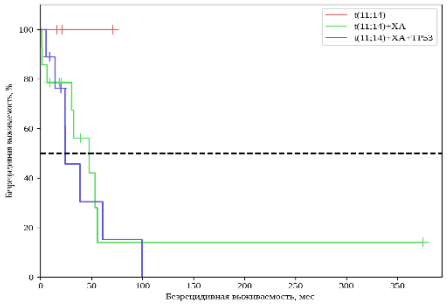
Рисунок 23 – Кривые ОВ и риска летального исхода больных МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений 17 хромосомы (p = 0,092)

А) Кривая ОВ у пациентов с МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений 17 хромосомы

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений 17 хромосомы

Анализ БРВ у таких пациентов также не показал достоверных различий (p=0,122). Медиана БРВ в группе больных с изолированной транслокацией t(11;14)(q13;q32) не была достигнута. Пациенты, у которых помимо транслокации t(11;14)(q13;q32) обнаруживались ДХА (без изменений хромосомы 17) медиана БРВ была 48 месяцев. В случае сочетания транслокации t(11;14)(q13;q32) с ДХА, среди которых выявлялись нарушения хромосомы 17, медиана БРВ составляла 24 месяца (рисунок 24).

А)



Б)

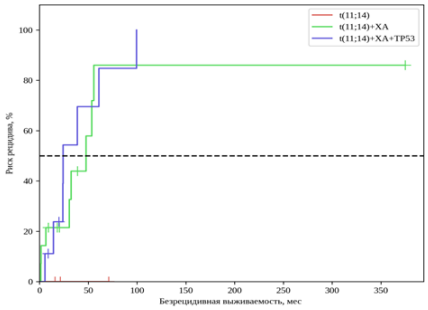


Рисунок 24 – Кривая БРВ и риска развития рецидива больных с МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений хромосомы 17 (p= 0,122)

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений хромосомы 17

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в зависимости от наличия ДХА и изменений хромосомы 17

Патологический кариотип с 1-2 хромосомными изменениями выявлен у 15/80 (18,75%) больных МКЛ (таблица 17).

Таблица 17 – Кариотип больных МКЛ с 1-2 хромосомными аберрациями

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип
Л.В.Б.	муж	65	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[1]/ 46,XY,t(11;14)(q13;q32),del(7)(q31)[1]/46,XY[7]
П.С.А.	жен	71	ПК	47,XX,9ph,+12[14]/46,XX,9ph [6]
П.Р.И.	муж	31	ПК	46,XY,der(14)t(11;14)(q13;q32),del(13)(q13;q32)[2]/ 46,XY[18]

Продолжение таблицы 17

А.М.Н.	муж	48	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[4]/46,XY[16]
М.Н.В.	муж	64	ПК	47,XY,+mar[4]/46,XY[26]
У.А.А.	муж	38	ПК	46,XУ[14]/47,XУ,+3,t(11;14)(q13;q32)[6]
К.А.Г.	муж	52	КМ	46,XY,t(11;14)(q13;q32)[20]
Х.Р.К.	жен	79	ПК	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XX[18]
В.Е.А.	жен	66	КМ	46,XX, del(11)(q32)[2]/46XX[18]
К.Е.А.	жен	31	ПК	47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32)[10]/46,XX[10]
Р.Г.Г.	жен	67	ПК	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XX[28]
И.С.В.	муж	35	КМ	46,XY,der(8)add(p23),t(11;14)(q13;q32)[5]/46,XY[15]
Д.В.И.	жен	62	ПК	46,X,t(X;9)(p22.3;q22),t(11;14)(q13;q32)[20]
Д.А.Ф.	жен	73	ПК	47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XX[18]
С.Ю.В.	муж	65	ПК	47,XY,+3,t(11;14)(q13;q32)[3]/46,XY[17]

Достоверно часто встречающейся ДХА у пациентов в данной группе была трисомия по хромосоме 3 (26,7% (4/15) случаев, $p < 0,05$).

Статистической значимости разницы медиан ОВ и БРВ у пациентов с 1-2 нарушениями кариотипа и больными с НК не отмечено ($p = 0,328$, $p = 0,397$, соответственно).

По литературным данным, наиболее неблагоприятное влияние на продолжительность ОВ больных МКЛ оказывает КК [36, 53, 71, 83].

При проведении СЦИ КК определялся у 21/80 (26,25%) пациента, который был представлен числовыми аномалиями (моносомиями, добавочными хромосомами) и структурными нарушениями: парными фрагментами, маркерными хромосомами, сбалансированными и несбалансированными транслокациями, инсерциями, инверсиями, изохромосомами, дупликациями, интерстициальными и терминальными делециями, добавлением на p- или q- плечо хромосомного

материала неизвестного происхождения. Количество выявляемых аберраций составляло от 3 до 21-25. Пациенты с КК представлены в таблице (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты СЦИ больных МКЛ с комплексными изменениями кариотипа

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип
Н.М.А.	муж	57	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,-10,+mar[7]
П.В.Д.	муж	72	ПК	43-44, add(X)(q28)Y, +3, der(3), add(7)(p22), -8, -8, -11, +14, der(14)t(11;14)(q13;q32), del(16)(p12), add(19)(p13), +mar [2] / 46,XY [15]
И.В.П.	жен	61	ПК	46,XX,del(7)(q22),t(11;14)(q13;q32)[3]/46,XX,t(1;2)(p10;p10)[4]/46,XX[13]
С.Т.А.	жен	73	ПК	45,XX,-4,t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[4]/45,XX,add(1)(p36.3),-4,add(6)(q27),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[3]/46,XX,add(4)(q35),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[3]/45,XX,-4,t(11;14)(q13;q32),-17[2]/с вариациями/46,XX[3]
Е.Е.И.	жен	64	ПК	46-47,X,-X,t(11;14)(q13;q32),+(1-2) mar с вариациями[9]/46,XX[11]
А.С.Б.	муж	64	ПК	46,XY,der(3),+der(3),-8,-10,t(11;14)(q13;q32),der(13) t(11;13)(q13;q34) с вариациями [6]/46,XY [14]
			КМ	43-46,XY,-4,-8,der(11)t(11;?)(q13;?),-17,-18,+4 mar[5]/46,XY[5].
Г.Т.С.	жен	68	ПК	45,XX,t(11;14)(q13;q32),-13,del(17)(p11),-18,-19,-22,+3 mar[13]/46,XX[7]
Щ.А.Ф.	муж	55	ПК	46,XY,add(7)(q36),add(9)(q34),t(11;14)(q13;q32)[12]/46,XY[8]
К.О.Н.	жен	45	ПК	43-44,XX,t(1;5)(p12p33;q35),t(9;13)(p24;q12q21)+der(9),t(11;14)(q13;q32),-15,-17,add(19)(p13),-20,-22 с вариациями[12]/46,XX[8]
С.С.Б.	муж	61	ПК	46,XY,del(1)(q32),t(11;14)(q13;q32),add(15)(q26)[4]/46,XY [16]
Я.А.Г.	муж	51	ПК	37-41,X,-Y,add(3)(p26),-7,-8,add(9)(p24),-11,-12,-13,-14,der(14)t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13),+der(19),-21,+5-8mar,ПФ,dic с вариациями[20]
Б.Н.С.	муж	56	КМ	46-48,XY,t(1;6)(q22;q24),t(11;14)(q12;q32),+1-4 mar,ПФ[cp16]/47,XY[4]

Продолжение таблицы 18

К.В.В.	муж	48	КМ	46,XY,del(1)(p34),i(9)(q10),t(11;14)(q12;q32),add(14)(p13)[9]/46,XY[11]
С.В.К.	муж	76	КМ	45,XY,der(4)add(p15) or t(1;4)(q31;p16),t(8;9)(p22;q10),t(11;14)(q13;q32)[18]/46,XY[2]
Ю.А.Ш.	муж	55	КМ	45,XY,inv(9)(p13q21),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p11),-20[12]/45,XY,dup(3)(q26q28),inv(9)(p13q21),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p11),-20[3]
М.В.С.	муж	83	КМ	46,XY,del(1)(p32),del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32)[8]/46,XY[12]
Б.Г.И.	муж	65	ПК	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2]
К.Г.А.	муж	69	ПК	44-45,XY,-10,del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32),ins(13)(q14),add(17)(p13),add(21)(p13), с вариациями[8]/46,XY[12]
Ш.Н.А.	жен	72	ПК	46-47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,+ПФ с вариациями[17]/46,XX[3].
К.Г.М.	жен	59	ПК	47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),del(9)(q22)[11]/46,XX[9]
А.Т.А.	муж	42	ПК	47,XY,add(2)(p25),+3,t(11;14)(q13;q32),i(17)(10)[3]/42-44,XY,idem,(1-2)dic[3]/46,XY[14]

Помимо транслокации t(11;14)(q13;q32) у пациентов наиболее часто обнаруживались маркерные хромосомы (от 1 до 8), численные и структурные изменения хромосом 7 (del(7q), add(7p), add(7q), -7, t(7;17)(p22;q11.2)), 3 (der(3), add(3p), dup(3q), +3), 17 (del(17p), -17, i(17q), t(7;17)(p22;q11.2)).

Маркерные хромосомы в составе КК выявлялись у 8/21 (38,1%) пациентов.

Изменения хромосомы 7 у больных с КК определялись в 23,8% (5/21) случаев:

- делеция q-плеча хромосомы 7 – 1/5 (20,0%), дополнительный материал на p- и q- плечах хромосомы 7 – 2/5 (40,0%), моносомия хромосомы 7 – 1/5 (20,0%), транслокация с участием 7 хромосомы (t(7;17)(p22;q11.2)) – 1/5 (20,0%) (рисунок 25).

Рисунок 25 – Изменения хромосомы 7 у больных МКЛ в составе КК

Нарушения хромосомы 3 определялись у 7/21 (33,3%) больных:

- дериват хромосомы 3 – 1/7 (14,3%), дополнительный материал на p-плече хромосомы 3 – 1/7 (14,3%), дупликация региона q-плеча хромосомы 3 – 1/7 (14,3%), дополнительная хромосома 3 – 3/7 (42,8%), наличие деривата хромосомы 3 в сочетании с дополнительной копией хромосомы 3 – 1/7 (14,3%) (Рисунок 26).

Рисунок 26 - Аберрации хромосомы 3 у больных МКЛ в составе КК

Статистический анализ ОВ и БРВ у больных с патологическим кариотипом в зависимости от выявления аберраций хромосомы 3 не показал достоверно значимых различий (p=0,280 и p=0,176, соответственно). Медиана ОВ у пациентов без числовых и структурных нарушений хромосомы 3 составила 108,4 месяца от начала наблюдения, в то время как медиана ОВ в группе больных с изменениями хромосомы 3 не была достигнута (рисунок 27).

А) Б)

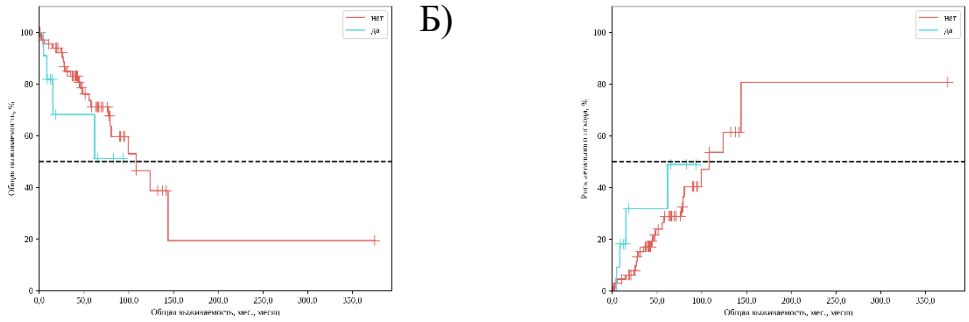


Рисунок 27 - Кривые ОВ и риска летального исхода больных МКЛ в зависимости от выявления аберраций хромосомы 3 (p= 0,280)

А) Кривая ОВ у пациентов МКЛ в зависимости от выявления аберраций хромосомы 3

Б) Кривая риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от выявления аберраций хромосомы 3

Различия БРВ пациентов при наличии и отсутствии нарушений хромосомы 3 значимости не достигали (53,6 месяцев vs 55,7 месяцев, p=0,176) (рисунок 28).

А) Б)

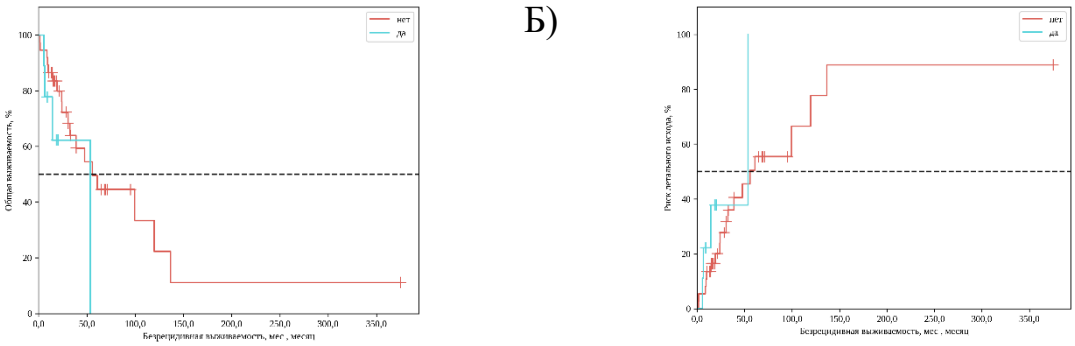


Рисунок 28 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия нарушений хромосомы 3 (p=0,176)

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия изменений хромосомы 3

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия выявления изменений хромосомы 3

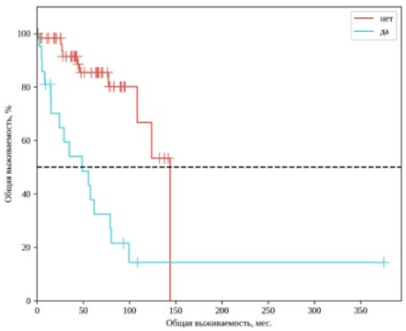
Нарушения хромосомы 17 определялись у 10/21 (47,6%) пациентов: делеция del (17p) – 3/10 (30,0%), моносомия хромосомы 17 – 3/10 (30,0%), изохромосома 17 – 2/10 (20,0%), дополнительный материал на p-плече хромосомы 17 – 1/10 (10,0%),

транслокация с вовлечением q-плеча хромосомы 17 (t(7;17)(p22;q11.2)) – 1/10 (10,0%) (рисунок 29).

Рисунок 29 – Изменения хромосомы 17 у больных МКЛ в составе КК

Анализ ОВ у пациентов с КК показал, что КК достоверно ассоциирован со снижением медианы ОВ, которая составила 49 месяцев по сравнению со 144 месяцами (p<0,001) (рисунок 30).

А)



Б)

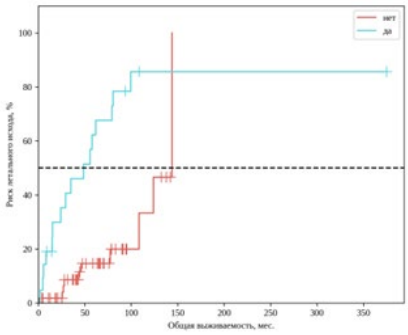


Рисунок 30 - Кривые ОВ и риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от наличия КК (p<0,001)

А) Кривая ОВ у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия КК

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия КК

Оценка БРВ показала, что у больных с КК обнаружено достоверное снижение медианы БРВ (32 месяца против 120 мес) (p=0,015) (рисунок 31).

А) Б)

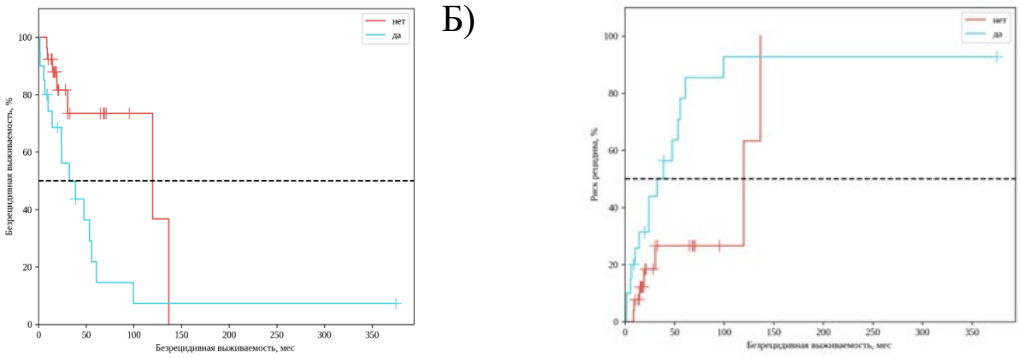


Рисунок 31 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия КК (p=0,015)

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия КК

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия КК

Кроме того, мы проанализировали продолжительность ОВ и БРВ у пациентов с КК в соответствии с количеством выявленных аберраций: группы больных с КК и выявлением трех хромосомных нарушений и пациентов, у которых при оценке кариотипа обнаруживалось четыре и более нарушений. Несмотря на то, что более короткую ОВ и БРВ выживаемость демонстрировали пациенты с четырьмя и более хромосомными аберрациями (29,3 *vs* 48,7 месяцев и 24,2 vs 47,7 месяцев, соответственно), данные отличия были незначимы (p=0,519 и p=0,516, соответственно) (рисунки 32, 33).

А) Б)

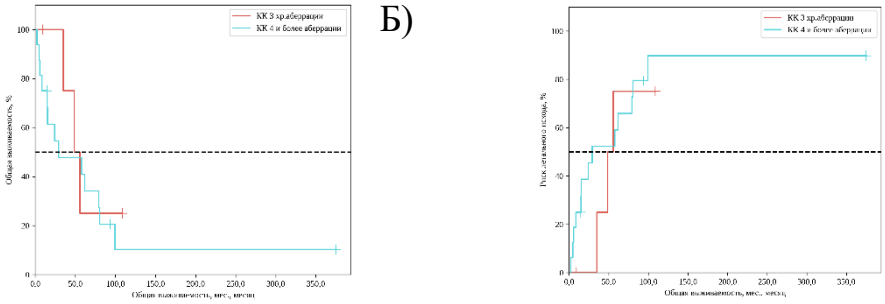
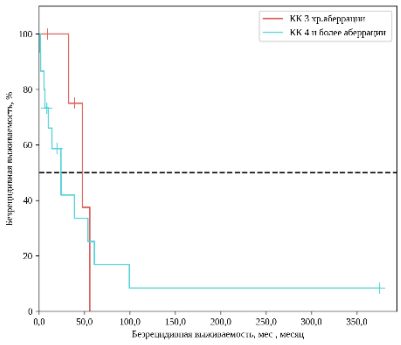


Рисунок 32 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных с МКЛ в зависимости от количества выявленных аберраций в КК (p=0,519)

А) Кривая ОВ у пациентов МКЛ с тремя и четырьмя и более хромосомными изменениями

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ с тремя и четырьмя и более хромосомными изменениями

А)



Б)

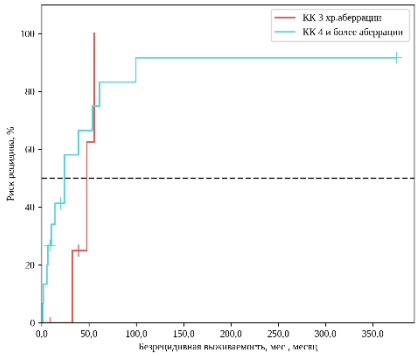


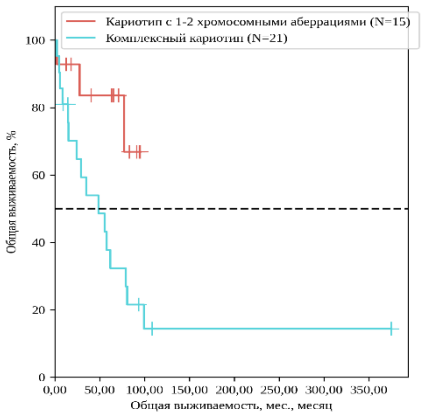
Рисунок 33 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от количества выявленных аберраций в КК (p=0,516)

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ с тремя и четырьмя и более хромосомными изменениями

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ с тремя и четырьмя и более хромосомными изменениями

Сравнительный анализ ОВ пациентов с 1-2 хромосомными аберрациями и КК показал статистически значимые различия (p=0,015). Наиболее короткую выживаемость имели пациенты с КК, которая составляла 48,7 месяцев (p=0,032). Медиана ОВ у больных, относящихся к группе с 1-2 нарушениями кариотипа не была достигнута (рисунок 34).

А)



Б)

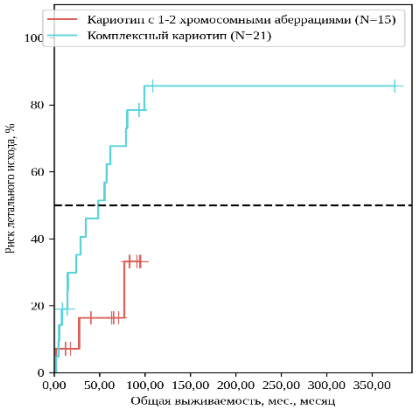


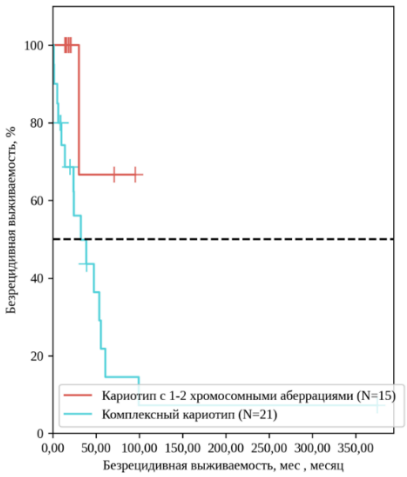
Рисунок 34 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями (p=0,015)

А) Кривые ОВ у пациентов МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями

Кроме того, также выявлены достоверные отличия в продолжительности БРВ при сравнении пациентов с КК и 1-2 нарушениями кариотипа (p=0,021). Медиана БРВ у пациентов с КК составила 32,43 месяца, в то время как в группе больных с 1-2 хромосомными аберрациями медиана не достигнута (рисунок 35).

А)



Б)

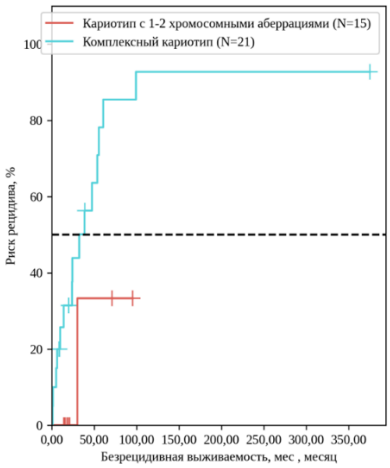


Рисунок 35 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями (p=0,021)

А) Кривые БРВ у пациентов МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями

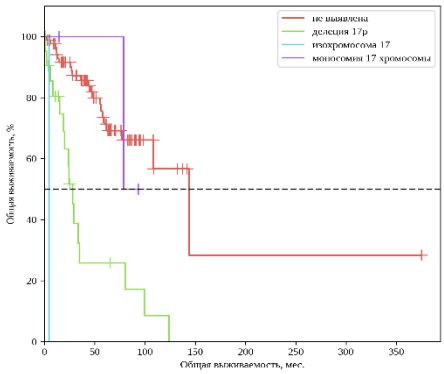
Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов МКЛ с КК и 1-2 хромосомными аберрациями

Аберрации хромосомы 17 при анализе кариотипа пациентов с МКЛ обнаружены в 12,5% (10/80) случаев.

Для наиболее часто встречающихся нарушений хромосомы 17 (делеция 17p, моносомия хромосомы 17, изохромосома 17) проведена оценка их влияния на ОВ и БРВ и сравнительный анализ с пациентами без изменений хромосомы 17.

В результате статистической обработки данных были выявлены значимые различия ОВ у больных в зависимости от наличия и вида аберраций хромосомы 17 (p = 0,001). Медиана ОВ у больных без изменений хромосомы 17 составила 144 месяца, у пациентов с делецией 17p – 28 месяцев, с изохромосомой 17 – 5 месяцев, в группе с моносомией хромосомы 17 – 79 месяцев (рисунок 36).

А)



Б)

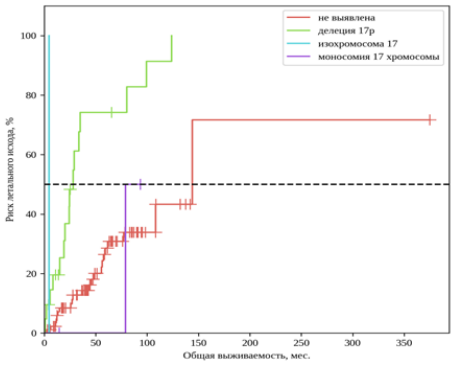


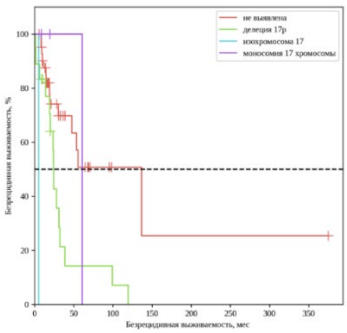
Рисунок 36 – Кривые ОВ и риска летального исхода в зависимости от наличия и типа нарушений хромосомы 17 (p = 0,001)

А) Кривая ОВ у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений хромосомы17

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений хромосомы 17

Однако, различия БРВ у пациентов в зависимости от выявления патологии хромосомы 17 не были статистически значимы (p = 0,089). Медиана БРВ в группе без изменений 17 хромосомы составила 137 месяцев, у пациентов с делецией 17p - 24 месяца, для больных с изохромосомой 17 – 5 месяцев, с моносомией 17 хромосомы – 61 месяц (рисунок 37).

А)



Б)

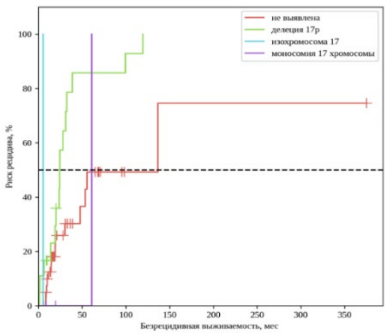


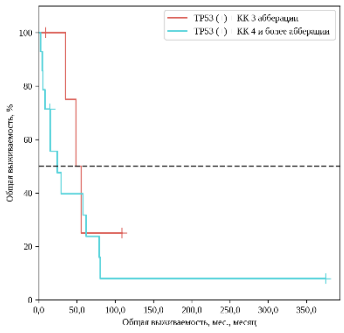
Рисунок 37 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у больных с МКЛ в зависимости от выявления нарушений хромосомы 17 и их типа (p = 0,089)

А) Кривая БРВ у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений хромосомы 17

Б) Кривая риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений хромосомы 17

Мы провели сравнительный анализ ОВ и БРВ больных МКЛ, у которых аберрации хромосомы 17, вовлекающие ген *TP53* обнаруживались в составе КК и посмотрели различия медиан ОВ и БРВ в зависимости от количества хромосомных изменений в КК (три, четыре и более). Медианы ОВ и БРВ в группе пациентов *TP53*$^{+}$ с четырьмя и более нарушениями кариотипа были короче по сравнению с больными, у которых определялись 3 аберрации (24,2 *vs* 48,7 месяцев, соответственно, 23,9 *vs* 47,7 месяцев, соответственно), однако отличия не достигали статистической значимости (p=0,344, p=0,312, соответственно) (рисунки 38,39).

А)



Б)

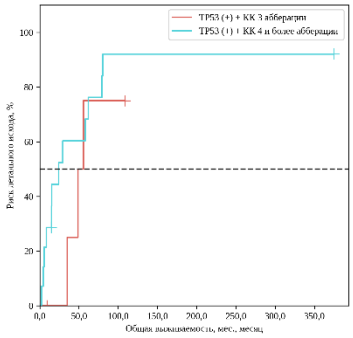
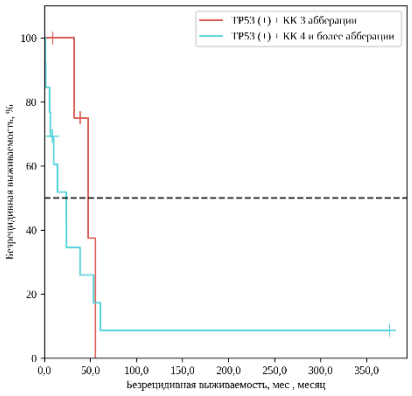


Рисунок 38 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных с изменениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от количества аберраций составе КК (p=0,344)

А) Кривая ОВ у пациентов с МКЛ с изменениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от количества аберраций составе КК

Б) Кривая риска летального исхода у пациентов с МКЛ с изменениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от количества аберраций составе КК

А)



Б)

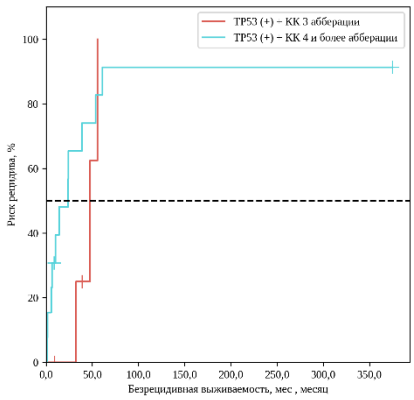


Рисунок 39 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с нарушениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от числа аберраций составе КК (p=0,312)

А) Кривая БРВ у больных с МКЛ с нарушениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от числа аберраций составе КК

Б) Кривая риска летального исхода у больных с МКЛ с нарушениями хромосомы 17, вовлекающими ген *TP53* в зависимости от числа аберраций составе КК

Метод регрессии Кокса показал, что достоверное негативное влияние на ОВ и БРВ оказывали делеция 17p (p=0,001, p=0,020, соответственно), изохромосома 17 (p=0,008, p=0,019, соответственно). В то время как для моносомии хромосомы 17 не установлено статистически значимого влияния на ОВ и БРВ (p=0,836, p=0,925, соответственно).

4.2 Частота встречаемости и прогностические особенности молекулярно-цитогенетических аберраций у больных с МКЛ

FISH-исследование с ДНК-зондами для выявления транслокации t(11;14)(q13;q32), изменений гена *MYC*, делеции *TP53* выполнено 117 пациентам.

4.2.1 Частота встречаемости транслокации t(11;14)(q13;q32)

Диагностическая транслокация t(11;14)(q13;q32) обнаружена у 82/117 (70,1%) пациентов, в том числе у 7/8 (87,5%) с низкой митотической активностью и у 24/44 (54,5%) с НК. Результат гибридизации в интерфазных ядрах с транслокацией t(11;14)(q13;q32) представлен на рисунке (рисунок 40).

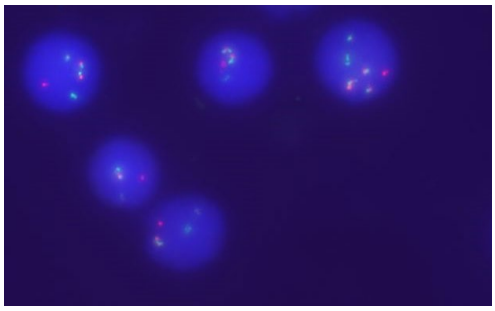


Рисунок 40 – Результат FISH-исследования ПК с ДНК-зондом XL t(11;14) MYEOV/IGH DF Translocation/Dual Fusion Probe (MetaSystems, Германия):

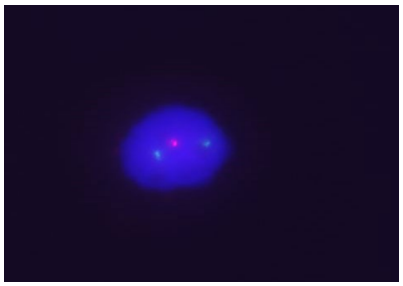
Транслокация t(11;14)(q13;q32): в интерфазных ядрах определяются один красный сигнал от локуса гена *MYEOV*/11q13, один зеленый сигнал от локуса гена *IGH*/14q32, и 2-4 сливных сигналов от химерных генов *MYEOV/IGH* и *IGH/MYEOV*.

Сравнительный анализ частоты выявляемости транслокации t(11;14)(q13;q32) FISH-анализом и кариотипированием показал, что она была достоверно выше при FISH-исследовании (70,1% *vs* 40,0%, соответственно, p<0,001).

4.2.2. Роль аберраций гена *TP53* у пациентов с МКЛ

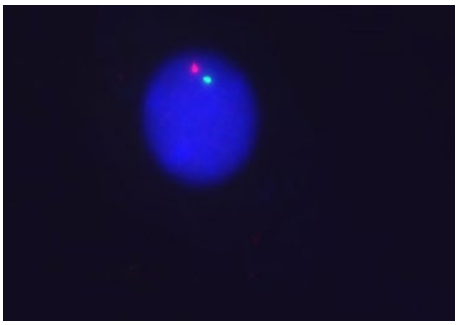
Делеция гена *TP53* и моносомия хромосомы 17 методом FISH выявлены у 27/117 (23,1%) больных: в 88,9% (24/27) случаев обнаруживалась делеция *TP53*, в 11,1% (3/27) – моносомия хромосомы 17. Результат гибридизации с данными аберрациями представлен на рисунке (рисунок 41).

А)



Делеция *TP53*: в интерфазном ядре определяются один красный сигнал от гена *TP53* и два зеленых сигнала от центромеры хромосомы 17

Б)



Моносомия хромосомы 17: в интерфазном ядре выявляются один красный сигнал от гена *TP53* и один зеленый сигнал от центромеры хромосомы 17

Рисунок 41 – Результаты FISH-исследования периферической крови с ДНК-зондом XL TP53/17cen Deletion Probe (MetaSystems, Германия)

У больных с делецией гена *TP53* и моносомией хромосомы 17, выявленными FISH-методом, СЦИ проведено в 74,1% (20/27) случаев (у 7/27 (25,9%) пациентов культивирование не выполнялось). Проанализировать кариотип удалось у 19/20 (95,0%) больных, у 1/20 (5,0%) метафазные пластинки не получены по причине низкой митотической активности клеток. Патологический кариотип детектировался у 15/19 (78,9%) больных, у 4/19 (21,1%) – определялся НК. У 1/15 (6,7%) определен кариотип с 2 хромосомными изменениями, в 93,3% (14/15) случаев у пациентов выявлен КК. Кариотип пациентов и результаты FISH-исследования с ДНК пробой для обнаружения делеции гена *TP53* и моносомии хромосомы 17 представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты СЦИ и FISH-исследования у пациентов с МКЛ с делецией гена *TP53* и моносомией хромосомы 17

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип	Результат FISH – исследования
Н.М.А.	муж	57	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,-10,+mar[7]	del *TP53* - 96,0%
С.Т.А.	жен	73	ПК	45,XX,-4,t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[4]/45,XX,add(1)(p36.3),-4,add(6)(q27),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[3]/46,XX,add(4)(q35),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p13)[3]/45,XX,-4,t(11;14)(q13;q32),-17[2]/с вариациями/46,XX[3]	del *TP53* – 54,0%
А.С.Б.	муж	64	КМ	43-46,XY,-4,-8,der(11)t(11;?)(q13;?),-17,-18,+4 mar[5]/46,XY[5].	-17 – 99,0%
Г.Т.С.	жен	68	ПК	45,XX,t(11;14)(q13;q32),-13,del(17)(p11),-18,-19,-22,+3 mar[13]/46,XX[7]	del *TP53* – 58,0%
К.О.Н.	жен	45	ПК	43-44,XX,t(1;5)(p12p33;q35),t(9;13)(p24;q12q21)+der(9),t(11;14)(q13;q32),-15,-17,add(19)(p13),-20,-22 с вариациями[12]/46,XX[8]	-17 - 61,0%
С.Н.А.	муж	74	КМ	46,XY[20]	del *TP53* – 36,5%
С.С.Б.	муж	61	ПК	46,XY,del(1)(q32),t(11;14)(q13;q32),add(15)(q26)[4]/46,XY[16]	del *TP53* – 65,0%
Я.А.Г.	муж	51	ПК	37-41,X,-Y,add(3)(p26),-7,-8,add(9)(p24),-11,-12,-13,-14,der(14)t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13),+der(19),-21,+5-8mar,ПФ,dic с вариациями[20]	del *TP53* – 92%
К.Е.А.	жен	31	ПК	47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32)[10]/46,XX[10]	del *TP53* – 14%
К.В.В.	муж	48	КМ	46,XY,del(1)(p34),i(9)(q10),t(11;14)(q12;q32),add(14)(p13)[9]/46,XY[11]	del *TP53* – 44%

Продолжение таблицы 19

Ж.Н.И.	жен	67	ПК	46,XX[20]	del *TP53* – 33%
С.В.К.	муж	76	КМ	45,XY,der(4)add(p15) or t(1;4)(q31;p16),t(8;9)(p22;q10),t(11;14)(q13;q32)[18]/46,XY[2]	del *TP53* – 45%
Ю.А.Ш.	муж	55	КМ	45,XY,inv(9)(p13q21),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p11),-20[12]/45,XY,dup(3)(q26q28),inv(9)(p13q21),t(11;14)(q13;q32),del(17)(p11),-20[3]	del *TP53* – 90%
Б.Г.И.	муж	65	ПК	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2]	del *TP53* – 11,0%
К.Г.А.	муж	69	ПК	44-45,XY,-10,del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32),ins(13)(q14),add(17)(p13),add(21)(p13), с вариациями[8]/46,XY[12]	del *TP53* – 85,0%
Ш.Н.А.	жен	72	ПК	46-47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,+ПФ с вариациями[17]/46,XX[3].	-17 - 63,0%
А.Т.А.	муж	42	ПК	47,XY, add(2)(p25),+3,t(11;14)(q13;q32),i(17)(10)[3]/42-44,XY,idem,(1-2)dic[3]/46,XY[14]	del *TP53* – 71,0%
Ж.А.П.	муж	62	ПК	46,XY[20]	del *TP53* – 16,0%
Е.Е.Б.	жен	56	ПК	46,XX[20]	del *TP53* – 13,5%
М.В.А.	муж	50	КМ	нет митозов	del *TP53* – 53,0%

Важно отметить, что выполнение FISH-исследования у пациентов с МКЛ с ДНК-пробой для выявления аберраций, вовлекающих ген *TP53*, наряду со СЦИ позволило дополнительно обнаружить делецию *TP53* у 10/20 (50,0%) больных: в 50,0% (5/10) случаев – у пациентов с патологическим кариотипом, у 4/10 (40,0%) – с НК, у 1/10 (10,0%) – при низкой митотической активности клеток.

Проведенное FISH-исследование с ДНК-пробой к гену *MYC* дополнительно обнаружило аберрации *MYC* у 12/27 (44,4%) больных с изменениями *TP53*: у 10/12 (83,4%) выявлена амплификация *MYC* (от 3 до 16 копий гена *MYC*), 1/12 (8,3%) – амплификация *MYC* (1 дополнительная копия *MYC*) с делецией центромерного участка *MYC*, 1/12 (8,3%) – амплификация *MYC* (1 дополнительная копия *MYC*) с делецией теломерного участка *MYC*. Кариотипирование, выполненное 11/12 (91,7%) пациентам показало следующие результаты: в 27,3% (3/11) случаев определялся НК, 72,7% (8/11) – у всех больных выявлялся КК (Таблица 20).

Таблица 20 – Результаты СЦИ и FISH-исследования у пациентов с МКЛ и сочетанием изменений генов *TP53* и *MYC*

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *TP53*	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *MYC*
Н.М.А.	муж	57	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,-10,+mar[7]	del *TP53* - 96,0%	amp *MYC* (3F) - 26,5%
А.С.Б.	муж	64	КМ	43-46,XY,-4,-8,der(11)t(11;?)(q13;?),-17,-18,+4 mar[5]/46,XY[5].	-17 – 99,0%	amp *MYC* (3-4F) - 95,0%

Продолжение таблицы 20

К.О.Н.	жен	45	ПК	43-44,XX,t(1;5)(p12p33;q35),t(9;13)(p24;q12q21)+der(9),t(11;14)(q13;q32),-15,-17,add(19)(p13),-20,-22 с вариациями[12]/46,XX[8]	-17 - 61,0%	amp *MYC* (3F) - 60,0%
С.Н.А.	муж	74	КМ	46,XY[20]	del *TP53* – 36,5%	amp *MYC* (3F) - 26,0%
Я.А.Г.	муж	51	ПК	37-41,X,-Y,add(3)(p26),-7,-8,add(9)(p24),-11,-12,-13,-14,der(14)t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13),+der(19),-21,+5-8mar,ПФ,dic с вариациями[20]	del *TP53* – 92%	amp *MYC* (8-16F) - 92,0%
К.В.В.	муж	48	КМ	46,XY,del(1)(p34),i(9)(q10),t(11;14)(q12;q32),add(14)(p13)[9]/46,XY[11]	del *TP53* – 44%	amp *MYC* (3F) - 31,0%
Б.Г.И.	муж	65	ПК	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2]	del *TP53* – 11,0%	amp *MYC* + del 5' *MYC* (2F1G) - 80%
К.Г.А.	муж	69	ПК	44-45,XY,-10,del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32),ins(13)(q14),add(17)(p13),add(21)(p13), с вариациями[8]/46,XY[12]	del *TP53* – 85,0%	amp *MYC* (3F) - 12,0%
Ш.Н.А.	жен	72	ПК	46-47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,+ПФ с вариациями[17]/46,XX[3].	-17 - 63,0%	amp *MYC* (3F) - 78,0%
Ж.А.П.	муж	62	ПК	46,XY[20]	del *TP53* – 16,0%	amp *MYC* (3F) - 9,0%
Е.Е.Б.	жен	56	ПК	46,XX[20]	del *TP53* – 13,5%	amp *MYC* (3F) - 77,0%

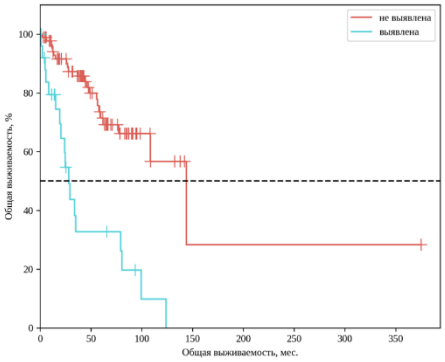
Сравнительный анализ пациентов с МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53* показал, что в группе больных с изменениями гена *TP53* (27/117 (23,1%)) достоверно чаще обнаруживались патологический кариотип (55,6% и 23,3%, соответственно, p<0,001), в особенности КК (51,9% и 7,8%, соответственно, p<0,001) и аберрации гена *MYC* (44,4% и 18,9%, соответственно, p=0,007) (Таблица 21).

Таблица 21 – Сравнительный анализ пациентов с МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *TP53*

Исследуемые параметры	Пациенты с изменениями *TP53* (27/117 **23,1%)**	Пациенты без изменений *TP53* (90/117 **76,9%)**	p
Патологический кариотип	15/27 **55,6%**	21/90 **23,3%**	**< 0,001***
Комплексные изменения кариотипа	14/27 **51,9%**	7/90 **7,8%**	**< 0,001***
Аберрации гена *MYC*	12/27 **44,4%**	17/90 **18,9%**	**0,007***

Мы проанализировали ОВ у больных с МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53*. Оценка ОВ показала, что медиана ОВ пациентов с аберрациями, вовлекающими *TP53*, значимо ниже чем в группе без нарушений *TP53* (28 месяцев против 144) (p < 0,001) (рисунок 42).

А)



Б)

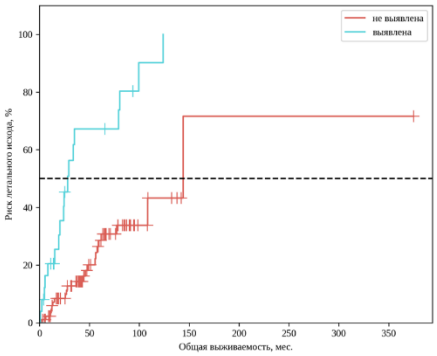


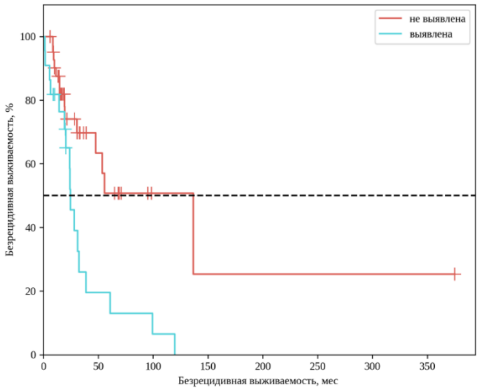
Рисунок 42 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53* (p < 0,001)

А) Кривая ОВ у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53*

Б) Кривая риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53*

Анализ БРВ показал, что медиана БРВ у пациентов с изменениями, вовлекающими ген *TP53,* была достоверно ниже по сравнению с больными без нарушений *TP53* и составила 25 месяцев против 137 месяцев (p=0,005) (рисунок 43).

А)



Б)

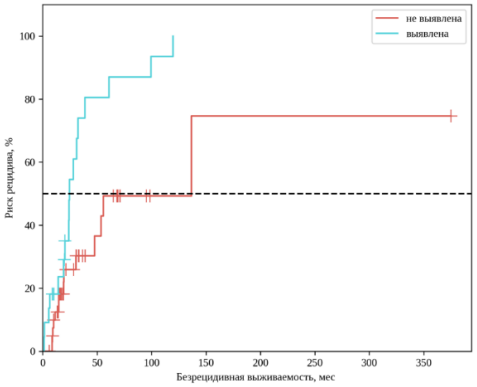


Рисунок 43 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления изменений гена *TP53* (p=0,005)

А) Кривая БРВ у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53*

Б) Кривая риска развития рецидива у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *TP53*

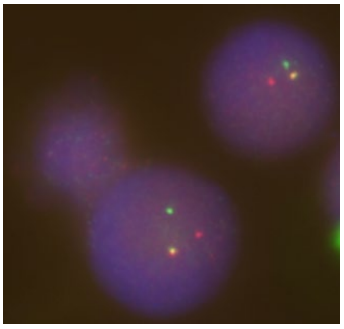
Сравнительный анализ частоты встречаемости аберраций с вовлечением гена *TP53* методом FISH и СЦИ показал более высокую частоту обнаружения нарушений гена *TP53* при FISH-анализе (22,2% vs 11,3%, соответственно, p<0,001).

4.2.3. Исследование группы больных МКЛ с изменениями гена *MYC*

FISH-исследование с ДНК-пробой к гену *MYC* проведено у 117 больных.

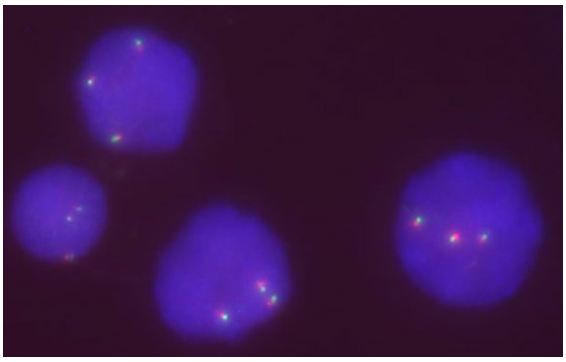
Изменения гена *MYC* выявлены у 29/117 пациентов (24,8%): перестройка с вовлечением *MYC* обнаружена у 2/29 (7,0%) больных, амплификация *MYC* (от 1 до 14 дополнительных копий гена) определяется в 79,3% (23/29) случаев; амплификация *MYC* с делецией теломерного участка *MYC* – у 3/29 (10,3%) пациентов; амплификация *MYC* с делецией центромерного участка *MYC* – у 1/29 (3,4%) больного (рисунок 44).

А)



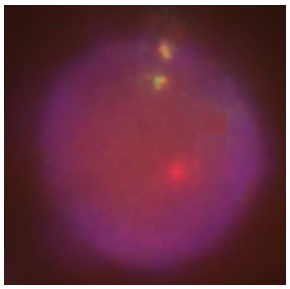
Перестройка с вовлечением *MYC*: в интерфазных ядрах выявлены один сливной сигнал от непатологического аллеля гена *MYC* и отдельно лежащие красный сигнал (от центромерного участка *MYC*) и зеленый сигнал (от теломерного участка *MYC*)

Б)



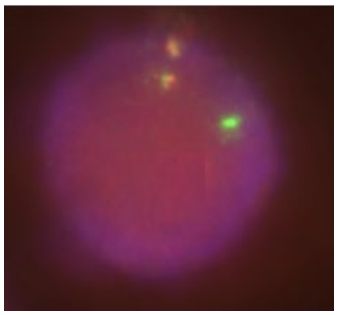
Амплификация гена *MYC*: в интерфазных ядрах определяется дополнительная копия *MYC*

В)



Амплификация гена *MYC* с делецией теломерного участка *MYC*: в интерфазных ядрах обнаружены 2 сливных сигнала от *MYC* и один отдельно лежащий красный сигнал от дополнительной копии *MYC* с делецией 3’региона *MYC*

Г)



Амплификация гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*: в интерфазных ядрах визуализируются 2 сливных сигнала от *MYC* и один отдельно лежащий зеленый сигнал от дополнительной копии *MYC* с делецией 5'региона *MYC*

Рисунок 44 – Результаты FISH-исследования с ДНК-зондом XL MYC Break Apart Probe (MetaSystems, Германия)

Исследование кариотипа выполнено 21/29 (72,4%) больному (у 2/21 (9,5%) не получены метафазные пластинки по причине низкой митотической активности клеток). У 10/19 (52,6%) пациентов обнаружен НК, в 47,4% (9/19) случаев определялся патологический кариотип (1/9 (11,1%) – кариотип с изолированной транслокацией t(11;14)(q13;q32), 8/9 (88,9%) – КК (с 4 и более хромосомными аберрациями). У 11/29 (37,9%) пациентов выявлено сочетание аберраций *MYC* с изменениями хромосомы 17. Результаты СЦИ и FISH – исследования с ДНК-зондами для обнаружения изменений генов *MYC* и *TP53* представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Результаты СЦИ и FISH-исследования с ДНК-пробами к генам *MYC* и *TP53*

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *TP53*/17p13	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *MYC*/8q24
Н.М.А.	муж	57	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,-10,+mar[7]	del *TP53* - 96,0%	amp *MYC* (3F) - 26,5%
А.С.Б.	муж	64	КМ	43-46,XY,-4,-8,der(11)t(11;?)(q13;?),-17,-18,+4 mar[5]/46,XY[5].	-17 – 99,0%	amp *MYC* (3-4F) - 95,0%
К.О.Н.	жен	45	ПК	43-44,XX,t(1;5)(p12p33;q35),t(9;13)(p24;q12q21) +der(9),t(11;14)(q13;q32),-15,-7,add(19)(p13),-20,-22 с вариациями[12]/46,XX[8]	-17 - 61,0%	amp *MYC* (3F) - 60,0%
К.В.А.	муж	57	ПК	46,XY[20]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) - 10,0%
В.Н.В.	муж	66	ПК	46,XY[20]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) - 11,0%
С.Н.А.	муж	74	КМ	46,XY[20]	del *TP53* – 36,5%	amp *MYC* (3F) - 26,0%
Х.Р.К.	жен	79	ПК	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XX[18]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) - 90,0%
Я.А.Г.	муж	51	ПК	37-41,X,-Y,add(3)(p26),-7,-8,add(9)(p24),-11,-12,-13,-14,der(14)t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13), +der(19),-21,+5-8mar,ПФ,dic с вариациями[20]	del *TP53* – 92%	amp *MYC* (8-16F) - 92,0%
Ш.А.В.	муж	68	ПК	нет митозов	*TP53* - 0%	amp *MYC* (4F) - 91,0%
М.В.М.	муж	50	ПК	46,XY[20]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) - 13,0%
У.А.В.	муж	73	ПК	46,XY[20]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) - 34,0%
К.В.В.	муж	48	КМ	46,XY,del(1)(p34),i(9)(q10),t(11;14)(q12;q32),add(14)(p13)[9]/46,XY[11]	del *TP53* – 44%	amp *MYC* (3F) - 31,0%

Продолжение таблицы 22

У.А.Ю.	муж	47	ПК	46,ХУ[20]	*TP53* - 0%	sep *MYC* (1F1R1G) - 56,0%
В.А.А.	муж	53	ПК	нет митозов	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) – 76,5,0%
Б.Г.И.	муж	65	ПК	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11), dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2]	del *TP53* – 11,0%	amp *MYC* + del 5' *MYC* (2F1G) -80%
М.В.Ю.	муж	56	ПК	46,XY[20]	*TP53* - 0%	amp *MYC* (3F) – 10,0%
К.Г.А.	муж	69	ПК	44-45,XY,-10,del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32),ins(13)(q14),add(17)(p13),add(21)(p13), с вариациями[8]/46,XY[12]	del *TP53* – 85,0%	amp *MYC* (3F) - 12,0%
Ш.Н.А.	жен	72	ПК	46-47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,+ПФ с вариациями[17]/46,XX[3].	-17 - 63,0%	amp *MYC* (3F) - 78,0%
С.О.Э.	жен	58	КМ	46,XX[20]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 7,5%
Ж.А.П.	муж	62	ПК	46,XY[20]	del *TP53* – 16,0%	amp *MYC* (3F) - 9,0%
Е.Е.Б.	жен	56	ПК	46,XX[20]	del *TP53* – 13,5%	amp *MYC* (3F) - 77,0%

Сопоставление результатов СЦИ и FISH-исследования с использованием ДНК-пробы к гену *MYC* показало, что изменения гена *MYC* во всех случаях выявлялись только методом FISH.

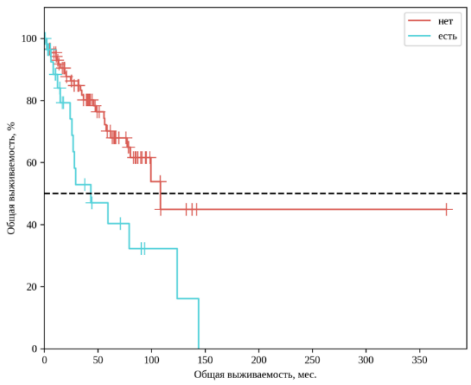
Сравнительный анализ пациентов с МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC* показал, что в группе больных с изменениями гена *MYC* (29/117 (24,8%)) достоверно чаще выявлялись прогностически неблагоприятные ДХА с вовлечением гена *TP53* – 41,4% и 17,0% (p=0,007). Кроме того, у пациентов с аберрациями гена *MYC* прослеживалась статистическая тенденция к более частой встречаемости КК по сравнению с больными без нарушений *MYC* (27,6% *vs* 14,8%, соответственно, p=0,072). При сравнении частоты выявляемости патологического кариотипа в двух группах пациентов значимых отличий не обнаружено (31,0% *vs* 30,7%, соответственно, p=0,812) (таблица 23).

Таблица 23 – Сравнительный анализ пациентов с МКЛ в зависимости от FISH-статуса гена *MYC*

Исследуемые параметры	Пациенты с изменениями *MYC* (29/117 – **24,8%)**	Пациенты без изменений *MYC* (88/117 – **75,2%)**	p
Патологический кариотип	9/29 **31,0%**	27/88 **30,7%**	0,812
Комплексные изменения кариотипа	8/29 **27,6%**	13/88 **14,8%**	0,072
Аберрации гена *TP53* (выявленные FISH)	12/29 **41,4%**	15/88 **17,0%**	**0,007***

Анализ ОВ, проведенный больным МКЛ в зависимости от обнаружения аберраций гена *MYC* показал, что медиана ОВ у пациентов с изменениями *MYC* значимо короче по сравнению с больными без нарушений *MYC* (43 месяца против 108) (p = 0,013) (рисунок 45)

А)



Б)

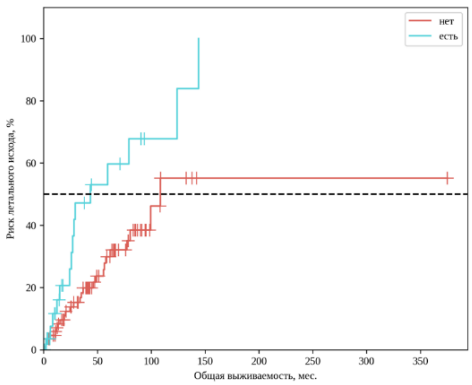


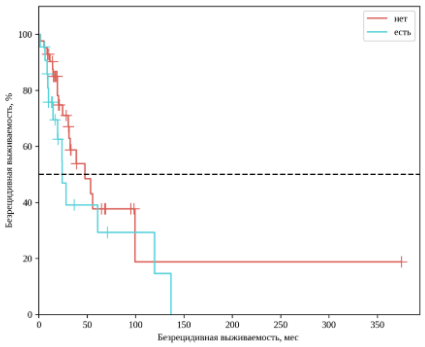
Рисунок 45 – Кривые ОВ и риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления аберраций *MYC* (p = 0,013)

А) Кривая ОВ у больных с МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *MYC*

Б) Кривая риска летального исхода у больных с МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *MYC*

Различия медиан БРВ у больных с изменениями *MYC* и отсутствием аберраций с вовлечением *MYC* не были статистически значимы (p = 0,089). Медиана БРВ у пациентов без нарушений *MYC* составила 48 месяцев, в то время как у больных с аберрациями *MYC* БРВ была 24 месяца (рисунок 46).

А)



Б)

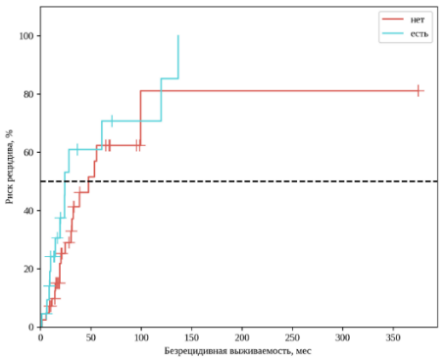


Рисунок 46 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от выявления изменений гена *MYC* (p = 0,089)

А) Кривая БРВ у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *MYC*

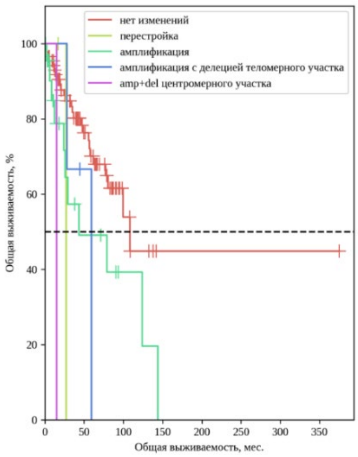
Б) Кривая риска развития рецидива у больных МКЛ в зависимости от наличия изменений гена *MYC*

Для выявленных аберраций гена *MYC* проведен статистический анализ их влияния на ОВ и БРВ и сравнительная оценка с пациентами без изменений *MYC*.

В результате статистической обработки данных были выявлены значимые различия ОВ у больных в зависимости от наличия и вида аберраций, затрагивающих ген *MYC* (p = 0,001).

Анализ показал, что медиана ОВ у пациентов без изменений *MYC* составила 108 месяцев, с перестройкой *MYC* – 27 месяцев, с амплификацией *MYC* – 43 месяца, у больных с дополнительной копией *MYC* и делецией теломерного участка *MYC* была 59 месяцев, а при выявлении амплификации *MYC* в сочетании с делецией центромерного участка *MYC* медиана ОВ соответствовала 15 месяцам (рисунок 47).

А)



Б)

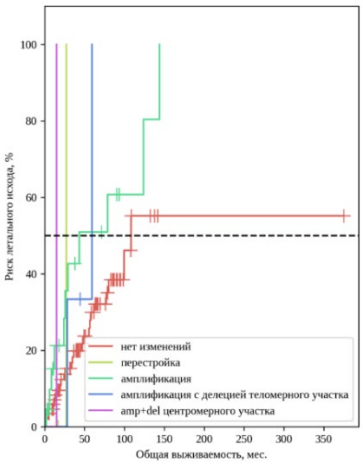


Рисунок 47 – Кривые ОВ и риска летального исхода у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений гена *MYC* (p = 0,001)

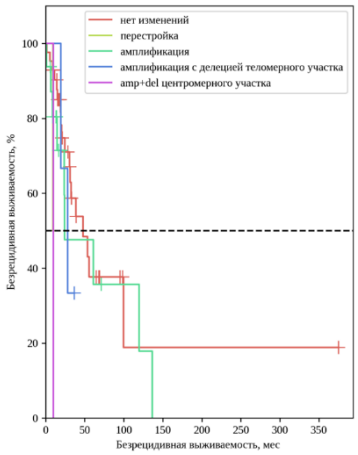
А) Кривая ОВ у больных с МКЛ в зависимости от наличия и вида изменений гена *MYC*

Б) Кривая риска летального исхода у больных с МКЛ в зависимости от наличия и вида изменений гена *MYC*

Метод регрессии Кокса показал, что наиболее неблагоприятное влияние на продолжительность ОВ оказывало сочетание амплификации гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC* (p=0,028).

Анализ БРВ пациентов в зависимости от выявления и вида обнаруженной аберрации не определил статистически значимых различий (p = 0,089). Медиана БРВ у больных без изменений *MYC* соответствовала 48 месяцам, с перестройкой *MYC* - 9 месяцев, с амплификацией *MYC* – 24 месяца, при сочетании амплификации с делецией теломерного участка *MYC* – 28 месяцев, амплификация с делецией центромерного участка *MYC* - 10 месяцев (рисунок 48).

А)



Б)

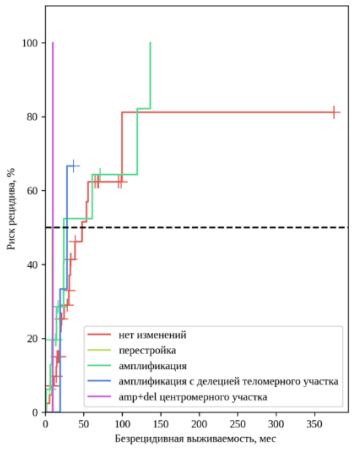


Рисунок 48 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у пациентов с МКЛ в зависимости от наличия и типа нарушений гена *MYC* (p = 0,089)

А) Кривая БРВ у больных МКЛ в зависимости от наличия и вида изменений гена *MYC*

Б) Кривая риска развития рецидива у больных МКЛ в зависимости от наличия и вида изменений гена *MYC*

Мы исследовали группу больных «double-hit» МКЛ, у которых выявлялось сочетание аберраций *MYC* с наличием транслокации t(11;14)(q13;q32) (22/117 (18,8%)). Кариотипирование выполнено 18/22 пациентам (81,8%) (в 18,2% (4/22) случаев СЦИ не проводилось). Кариотип удалось проанализировать у 16/18 (88,9%) больных (у двоих пациентов определялась низкая митотическая активность клеток). Патологический кариотип детектировался у 9/16 (56,3%) пациентов, из которых в 88,9% (8/9) случаев обнаруживался КК (от 4 до 23–25 аберраций).

FISH-исследование с ДНК-пробой для обнаружения изменений гена *MYC* выявило амплификацию *MYC* (от 1 до 14 дополнительных копий гена *MYC*) у 20/22 (90,9%) больных и увеличение копийности *MYC* с делецией теломерного и центромерного участка *MYC* (1/22 (4,5%) для каждого случая).

У пациентов с «double-hit» МКЛ аберрации с вовлечением гена *TP53* методом FISH обнаруживались у 10 из 22 (45,5%) больных (в 70,0% (7/10) случаев - делеция *TP53*, 30,0% (3/10) – моносомия хромосомы 17).

Результаты СЦИ и FISH-исследования с ДНК-пробами к генам *MYC* и *TP53* у пациентов с «double-hit» МКЛ представлены в таблице (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты СЦИ и FISH-исследования с ДНК-пробами к генам *MYC* и *TP53* у пациентов с «double-hit» МКЛ

ФИО	Пол	Возраст	Исследуемый материал	Кариотип	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *TP53*	Результат FISH – исследования с ДНК-пробой к гену *MYC*
Н.М. А.	муж	57	ПК	46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,10,+mar[7]	del *TP53* - 96,0%	amp *MYC* (3F) - 26,5%
К.В. А.	муж	57	ПК	46,ХУ[20]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 90,0%
Х.Р. К.	жен	79	ПК	46,XX,t(11;14)(q13;q32)[2]/46,XX[18]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 90,0%
М.В. М.	муж	50	ПК	46,ХУ[20]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 13,0%
Е.Е. Б.	жен	56	ПК	46,XX[20]	del *TP53* – 13,5%	amp *MYC* (3F) - 77,0%
К.О. Н.	жен	45	ПК	43-44,XX,t(1;5)(p12p33;q35),t(9;13)(p24;q12q21)+der(9),t(11;14)(q13;q32),-15,-	-17 - 61,0%	amp *MYC* (3F) - 60,0%

Продолжение таблицы 24

				17,add(19)(p13),-20,-22 с вариациями[12]/46,XX[8]		
У.А. В.	муж	73	ПК	46,XY[20]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 34,0%
С.Н. А.	муж	74	КМ	46,XY[20]	del *TP53* – 36,5%	amp *MYC* (3F) - 26,0%
Б.Г. И.	муж	65	ПК	44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)del(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3,с вариациями[18]/46,XY[2]	del *TP53* – 11,0%	amp *MYC* + del 5' *MYC* (2F1G) - 80%
А.С. Б.	муж	64	ПК	46,XY,der(3),+der(3),-8,-10,t(11;14)(q13;q32),der(13) t(11;13)(q13;q34) с вариациями [6]/46,XY [14]	-17 – 99,0%	amp *MYC* (3-4F) - 95,0%
К.Г. А.	муж	69	ПК	44-45,XY,-10,del(11)(q23),t(11;14)(q13;q32),ins(13)(q14),add(17)(p13),add(21)(p13), с вариациями[8]/46,XY[12]	del *TP53* – 85,0%	amp *MYC* (3F) - 12,0%
М.В. Ю.	муж	56	ПК	46,XY[20]	del *TP53* – 0%	amp *MYC* (3F) – 10,0%
Я.А. Г.	муж	51	ПК	37-41,X,-Y,add(3)(p26),-7,-8,add(9)(p24),-11,-12,-13,-14,der(14)t(11;14)(q13;q32),add(19)(p13),+der(19),-21,+5-8mar,ПФ,dic с вариациями[20]	del *TP53* – 92%	amp *MYC* (8-16F) - 92,0%
К.В. В.	муж	48	КМ	46,XY,del(1)(p34),i(9)(q10),t(11;14)(q12;q32),add(14)(p13)[9]/46,XY[11]	del *TP53* – 44%	amp *MYC* (3F) - 31,0%
С.О. Э.	жен	58	КМ	46,XX[20]	del *TP53* –0%	amp *MYC* (4F) – 8,0%
Ш.Н. А.	жен	72	ПК	46-47,XX,+3,t(11;14)(q13;q32),-17,+ПФ с вариациями[17]/46,XX[3].	-17 - 63,0%	amp *MYC* (3F) - 78,0%

Проведенный анализ ОВ и БРВ больных с МКЛ в зависимости от выявления аберраций, определяющих пациентов в группу «double-hit» МКЛ показал, что у больных с «double-hit» МКЛ медианы ОВ и БРВ составили 43,40 и 24,23 месяцев,

соответственно, по сравнению с 108,37 и 38,80 месяцами, соответственно. При этом уровень значимости составил лишь p=0,972 и p = 0,904, соответственно (рисунки 49,50).

А) Б)

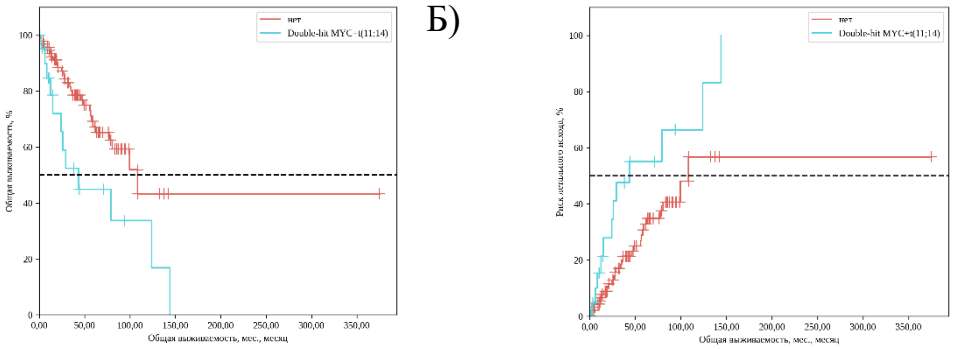


Рисунок 49 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ (p=0,972)

А) Кривая ОВ у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ

Б) Кривая риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ

А) Б)

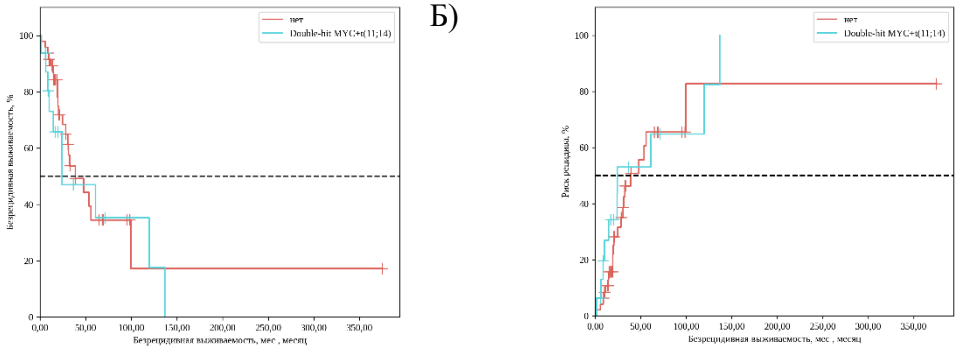


Рисунок 50 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ (p=0,904)

А) Кривая БРВ у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ

Б) Кривая риска летального исхода у больных МКЛ в зависимости от выявления «double-hit» МКЛ

Сравнительная оценка ОВ и БРВ у пациентов в группах «double-hit» МКЛ и больных с транслокацией t(11;14)(q13;q32) обнаружила, что больных «double-hit» МКЛ медианы ОВ и БРВ были короче, чем у пациентов с транслокацией t(11;14)(q13;q32) (43,40 и 80,47 месяцев, соответственно, и 24,23 и 47,67 месяцев, соответственно). Однако данные различия не являлись статистически значимыми (p = 0,117 и p = 0,516, соответственно) (рисунки 51, 52).

А) Б)

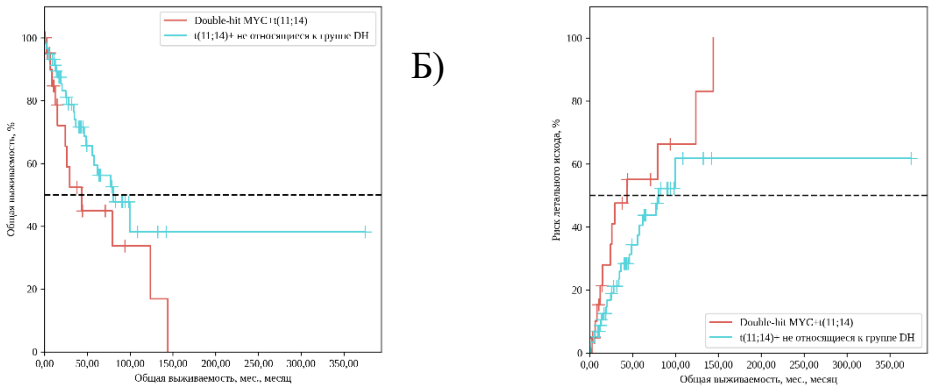


Рисунок 51 – Кривые ОВ и риска летального исхода у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32) (p=0,117)

А) Кривая ОВ у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

Б) Кривая риска летального исхода у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

А) Б)

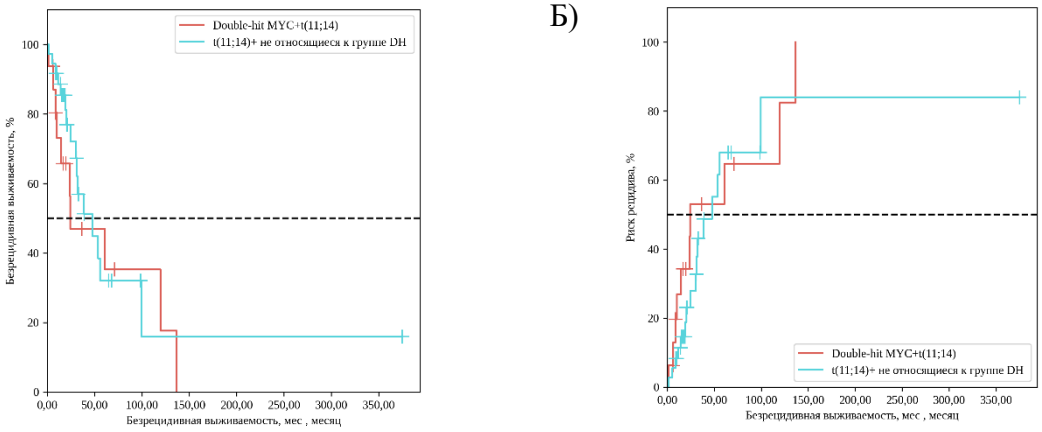


Рисунок 52 – Кривые БРВ и риска развития рецидива у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32) (p=0,516)

А) Кривая БРВ у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

Б) Кривая риска развития рецидива у больных «double-hit» МКЛ и пациентами с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

В качестве примера комплексного подхода к генетической диагностике МКЛ, помогающего вывить хромосомные и молекулярно-цитогенетические аберрации с помощью комбинации СЦИ и FISH-анализа приведены два клинических случая.

Клинический случай 1.

Больной Б.Г.И., 1954 г.р. в сентябре 2019 г. обратился к гематологу в ГБУЗ Ленинградскую областную больницу с жалобой на увеличение шейных, надключичных, подключичных лимфоузлов, умеренную общую слабость, одышку при небольшой физической нагрузке. Кроме того, у пациента выявлялись В-симптомы (лихорадка до 38 ^{0}С, ночные проливные поты, похудение на 10 кг за 3 последних месяца). Общесоматический статус по шкале ECOG соответствовал 1 баллу.

Для постановки диагноза пациенту выполнены клинический анализ крови (КАК), миелограмма, эксцизионная биопсия шейного лимфатического узла с последующим гистологическим и ИГХ исследованием, трепанобиопсия КМ.

КАК от 19.09.2019 г.: эритроциты – 4,4х10^{12}/л, гемоглобин – 120 г/л, тромбоциты - 117х10^{9}/л, лейкоциты – 31,06 х10^{9}/л (атипичные лимфоциты – 10,5%, лимфоциты – 63,5%, бласты – 0%).

Миелограмма от 19.09.2019 г.: миелокариоциты – 240х10^{9}/л, атипичные лимфоциты – 46,6%, бласты – 0%.

По данным КАК у больного выявлены анемия, тромбоцитопения, лейкоцитоз с лимфоцитозом. При оценке миелограммы определялись гиперклеточный КМ с лимфоидной инфильтрацией.

При гистологическом исследовании лимфатического узла отмечался стертый рисунок за счет диффузно-нодулярной инфильтрацей лимфоидными клетками мелкого и среднего размера с небольшой цитоплазмой и с гиперхромным ядром округлой, полигональной или угловатой формы, нечеткими ядрышками. При ИГХ

клеток опухолевого инфильтрата выявлялась экспрессия CD20, BCL2, CD5, CyclinD1. Экпрессия CD23, CD10, CD30, BCL6 отсутствовала. Индекс пролиферативной активности Ki-67 составлял 50-60%. Морфологическая картина и иммунофенотип опухолевых клеток соответствовали МКЛ с диффузно-нодулярным типом роста.

Гистологическое исследование КМ выявило диффузную инфильтрацию атипичными лимфоидными клетками малых и средних размеров со зрелой морфологией ядра (CD20+ /CD23- /слабо CyclinDI + /CD5+ /CD10-). Общее содержание опухолевых лимфоидных клеток составляло 80% от всех ядросодержащих клеток (ЯСК). Полученные результаты исследований свидетельствовали в пользу поражения КМ мантийноклеточной лимфомой с диффузным типом роста.

Для определения степени распространенности патологического процесса пациенту выполнена компьютерная томография (КТ), которая обнаружила множественную лимфаденопатию периферических, внутригрудных, внутрибрюшных, тазовых лимфоузлов (отдельные группы лимфатических узлов образуют цепочки, конгломераты и пакеты), гепатомегалию (ККР – 192 мм), спленомегалию (11,2х17,8х19,6 см).

На основании результатов проведенных исследований пациенту поставлен диагноз Неходжкинская лимфома, В-клеточная лимфома из клеток мантии, IVст. по Ann-Arbor. MIPIb - High risk.

Пациенту назначено проведение полихимиотерапии (ПХТ) по программе CAP+VR: дексаметазон, ритуксимаб, циклофосфан, доксорубицин, бортезомиб.

До начала ПХТ больному выполнено СЦИ и FISH-исследование костного мозга и периферической крови в ФГБУ РосНИИ гематологии и трансфузиологии.

При СЦИ костного мозга у пациента определялся НК (рисунок 53).

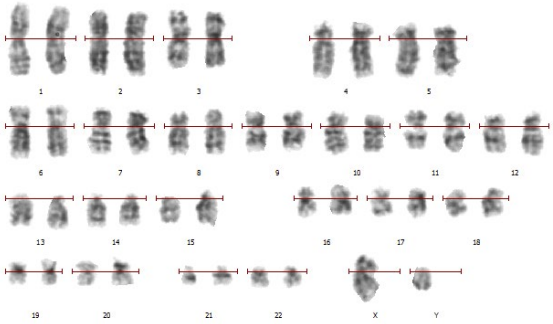


Рисунок 53 – Кариограмма пациента Б.Г.И. при СЦИ костного мозга (46,XY[20])

Культивирование периферической крови выполнялось с митогенами LPS+TPA в течение 72 часов. У больного обнаружен КК (рисунок 54).

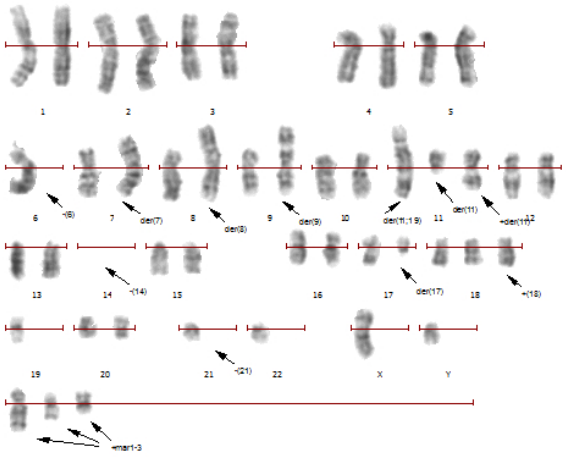


Рисунок 54 – Результат СЦИ клеток периферической крови пациента Б.Г.И.

Кариограмма с комплексными нарушениями кариотипа численного и структурного характера

(44-46,XY,-6,t(7;17)(p22;q11.2),add(8)(p23),t(9;11)(p24;q11),dic(11;19)(p15;p13.3),+der(11)der(11)(q23),-14,+18,-21,+mar1-3 с вариациями[18]/46XY[2])

Исследовании кариотипа клеток КМ и ПК не выявило высокоспецифическую для МКЛ транслокацию t(11;14)(q13;q32).

Дополнительно пациенту проведено FISH-исследование на интерфазных ядрах ПК с ДНК-пробами для обнаружения транслокации t(11;14)(q13;q32) и аберраций генов *IGH*, *MYC* и *TP53*.

1. FISH-исследование с ДНК-пробой для выявления транслокации t(11;14)(q13;q32). Транслокация t(11;14)(q13;q32) определялась в 80,0% интерфазных ядер, при этом, в 48,0% клеток детектировался дополнительный сливной сигнал от транслокации t(11;14)(q13;q32). Результаты гибридизации представлены на рисунке 55.

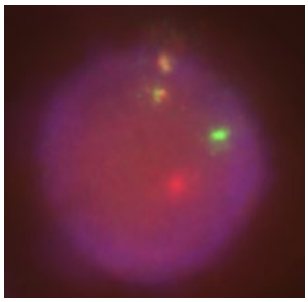
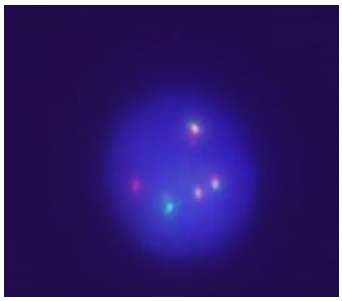
А)  Б) 

Рисунок 55 – Интерфазные ядра ПК с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

А) Транслокация t(11;14)(q13;q32)

Б) Транслокация t(11;14)(q13;q32) с дополнительным сливным сигналом от транслокации t(11;14)(q13;q32)

2. FISH-исследование с ДНК-зондом к гену *IGH*. Перестройка гена *IGH* выявлялась в 68,0% интерфазных ядер, в 51,0% из которых определялась перестройка *IGH* с амплификацией константного участка *IGH* (1 дополнительный сигнал). Результаты гибридизации представлены на рисунке 56.

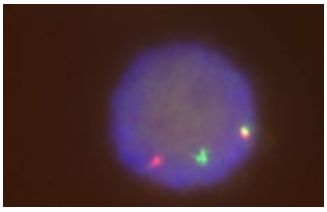
А)  Б)

Рисунок 56 – Результат FISH-исследования с ДНК-пробой для выявления перестройки гена *IGH*

А) Перестройка гена *IGH*

Б) Перестройка гена *IGH* с дополнительным сигналом от константного участка *IGH*

3. FISH-исследование с ДНК-зондом к гену *MYC*. В 80,0% интерфазных ядер выявлена амплификация гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*. Результат гибридизации представлен на рисунке 57.

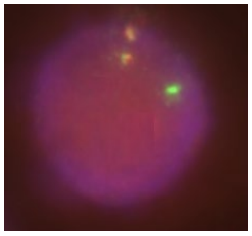


Рисунок 57 – Амплификация гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*

4. FISH-исследование с ДНК-зондом к гену *TP53*. В 11,0% интерфазных ядер обнаружена делеция гена *TP53*. Результат гибридизации представлен на рисунке 58.

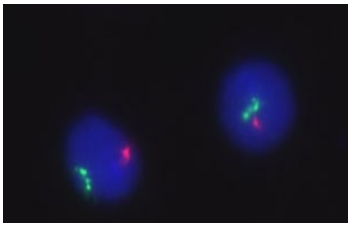


Рисунок 58 – Делеция гена *TP53*

Проведенное FISH-исследование на интерфазных ядрах ПК выявило транслокацию t(11;14)(q13;q32), а также молекулярно-генетические изменения неблагоприятного прогноза с вовлечением генов *MYC* и *TP53*.

Таким образом, комбинация СЦИ и FISH-исследования помогла оценить весь геном пациента, выявить КК, патогномоничную для МКЛ транслокацию

t(11;14)(q13;q32), а также аберрации генов *MYC* и *TP53*. Результаты проведенных генетического и молекулярно-генетического исследований позволили отнести больного к группе высокого риска.

С 19.09.2019 г. по 05.03.2020 г. пациенту проведены 8 курсов ПХТ по программе CAP+VR. Достижение полной ремиссии констатировано после 4 курса ПХТ (от 16.12.2019 г.). После прохождения 8 курсов ПХТ достигнутый эффект сохранялся. У больного восстановился эффективный гемопоэз, ушли В-симптомы, по данным КТ уменьшились размеры печени, селезенки, лимфатических узлов. Для сохранения ремиссии пациенту с 19.03.2020 г. назначена комбинированная поддерживающая терапия бортезомибом и ритуксимабом.

При обследовании в сентябре 2020 г. у больного обнаружено нарастание лейкоцитоза (24,8x10^9/л) и лимфоцитоза (73,5%), определялась тромбоцитопения (96x10^9/л), появились В-симптомы. При физикальном осмотре выявлены множественные подчелюстные, шейные лимфоузлы, сливающиеся в конгломераты, цепочкой до 2-3 см в диаметре, гепатомегалия (+3 см), спленомегалия (+4 см), конгломераты подмышечных лимфоузлов (слева – 2x3 см, справа – 3x4 см), паховые лимфоузлы – множественные цепочкой, диаметром 3-4 см с обеих сторон. У пациента диагностирован рецидив МКЛ от 10.09.2020 г. и начата иммунохимиотерапия по программе R-HAD±B (AraC 1 г/$м^2$x4). Состояние больного осложнялось сопутствующей патологией – гипертонической болезнью 3 ст., артериальной гипертензией 3 ст., нестабильной стенокардией, постинфарктным кардиосклерозом, кандидозом пищевода 1 ст.

Несмотря на проводимое лечение пациент скончался от инфекционных осложнений и прогрессирования сердечной недостаточности 12.11.2020 г.

Тяжесть клинического течения МКЛ у больного обусловлена наличием прогностически неблагоприятных дополнительных генетических аберраций: комплексных изменений кариотипа, делеции гена *TP53*, амплификации гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*.

Клинический случай 2.

Больной Н.М.А., 1961 г.р. с октября 2012 г. стал отмечать появление слабости, чувство дискомфорта в животе. За медицинской помощью не обращался. При проведении планового медосмотра в сентябре 2013 г. впервые выявлен лейкоцитоз до $55x10^9$/л. Постепенно нарастала общая слабость (4 балла по ВАШ), начались периодические головные боли, ночная потливость (со сменой нательного белья 1 раз за ночь) и боль в области послеоперационного рубца. Пациент для обследования был направлен к гематологу в поликлинику РосНИИ гематологии и трансфузиологии.

Для постановки диагноза больному выполнены КАК, миелограмма, ИФТ ПК и КМ, ПЭТ-КТ, спленэктомия с последующим гистологическим и ИГХ исследованием.

Результат КАК от 19.09.2013 г.: гемоглобин – 115 г/л, лейкоциты – $107,3x10^9$/л (пролимфоциты – 3%, лимфобласты – 2%, лимфоциты – 88%), тромбоциты – $176x10^9$/л.

Миелограмма от 19.09.13 г.: лимфоидный ряд 87,2% (лимфобласты – 0,8%, пролимфоциты – 4,0%, лимфоциты – 82,4%).

По данным КАК у пациента обнаружены анемия, лейкоцитоз с лимфоцитозом, тромбоцитопения. При исследовании пунктата КМ выявлена инфильтрация лимфоидными клетками.

Дополнительно больному проведено ИФТ клеток КМ и ПК, которое показало наличие В-клеток с фенотипом CD19+CD5+CD20+CD22+CD81+CD79b+HLA-DR+FMC7+CD23-, что соответствует диагнозу МКЛ.

Пациенту выполнено ПЭТ-КТ всего тела, которое выявило спленомегалию (152x90x225 мм). Очагов патологического накопления радиофармпрепарата определено не было.

06.11.13 г. больному проведена спленэктомия. Гистологическое исследование препаратов селезенки обнаружило нарушение рисунка строения селезенки, вытеснение нормальных структур нодулярными инфильтратами, в которых прослеживается зональность. В центре инфильтратов располагаются

лимфоидные клетки среднего размера. Между фолликулами лежат прослойки из мелких лимфоцитов. Опухолевые узлы варьируют в размерах, сливаются, формируют большие зоны инфильтрации. При ИГХ в опухолевых клетках выявлена выраженная экспрессия CD20 (L26), CD5 (4C7), циклин D1 (PS4), bcl-2 (124), а экспрессия CD23 (1B12), bcl-6 (PG-B6p) – отсутствует. CD3 (poly) маркирует группы мелких лимфоцитов, лежащих между нодулярными инфильтратами. Заключение: совокупность результатов гистологического и ИГХ исследований свидетельствует в пользу МКЛ (полиморфноклеточный вариант).

На основании данных обследования больному поставлен диагноз МКЛ IVA стадия с поражением селезенки, костного мозга (MIPI – 5).

С 02.12.2013 г. пациенту начата ХТ по программе R-CHOP: ритуксимаб, циклофосфан, доксорубицин, винкристин, преднизолон.

До начала курсов ХТ больному проведено СЦИ и FISH-исследование клеток ПК.

Периферическая кровь культивировалась с митогенами LPS+TPA в течение 72 часов. При кариотипировании определялась высокоспецифическая транслокация t(11;14)(q13;q32) в составе КК (рисунок 59).

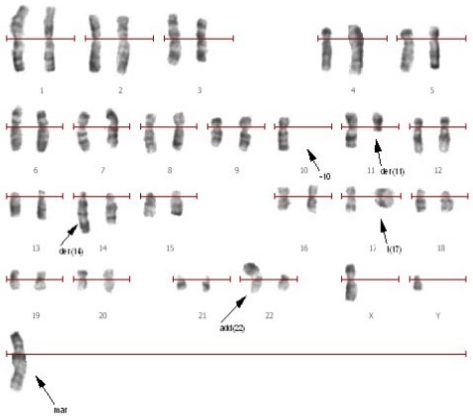


Рисунок 59 - Кариограмма пациента Н.М.А. при СЦИ клеток ПК (46,XY,t(11;14)(q13;q22),i(17)(q10),add(22)(p13)[23]/46,XY,idem,-10,+mar[7])

Больному также выполнено FISH-исследование с ДНК-пробами для выявления транслокации t(11;14)(q13;q32), аберраций генов *MYC*, *TP53*.

1. FISH-исследование с ДНК-пробой для определения наличия транслокации t(11;14)(q13;q32). Транслокация t(11;14)(q13;q32) выявлена в 93,0% интерфазных ядер. Результаты гибридизации представлены на рисунке 60.

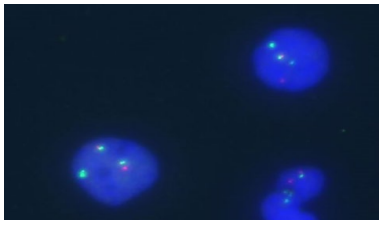


Рисунок 60 - Интерфазные ядра ПК с транслокацией t(11;14)(q13;q32)

2. FISH-исследование с ДНК-зондом для обнаружения аберраций гена *TP53*. В 96,0% интерфазных ядер выявлена делеция *TP53*. Результат гибридизации представлен на рисунке 61.

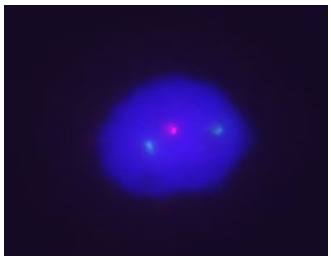


Рисунок 61 – Делеция гена *TP53*

3. FISH-исследование с ДНК-зондом к гену *MYC*. В 26,5% интерфазных ядер определялась амплификация гена *MYC* (1-2 дополнительные копии *MYC*). Результат гибридизации представлен на рисунке 62.

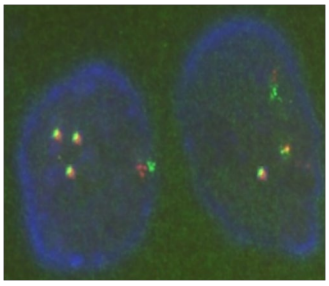


Рисунок 62 – Амплификация гена *MYC*

Сочетанное выполнение СЦИ и FISH-исследования у больного помогло оценить весь спектр цито- и молекулярно-цитогенетических характеристик опухолевого клона, обнаружить высокоспецифическую для МКЛ транслокацию t(11;14)(q13;q32), КК с множественными числовыми и структурными изменениями, нарушения генов *MYC*, *TP53* и на основании полученных результатов исследований определить больного в группу неблагоприятного прогноза.

С 02.12.2013 г. по 02.02.2014 г. проведены 6 курсов ПХТ по программе R-CHOP. Достижение частичной ремиссии констатировано после 4 курса ПХТ (от 25.02.2014 г.). У пациента наблюдался положительный эффект в виде нормализации показателей крови.

После 6 курса ПХТ больному выполнена операция лейкоцитафереза. Собрано и заготовлено 2,67x10^6/кг CD34+ клеток с последующим проведением АТГСК (6,31x10^6/кг, CD34+ клеток). Дополнительно пациенту назначена поддерживающая терапия ритуксимабом (375 мг/м^2) 1 раз в 8 недель.

При контрольной ПЭТ-КТ от 21.09.2015 г. констатировано прогрессирование заболевания (определялись паратрахеальные, парааортальные и бифуркационные, межножковые лимфатические узлы) и, кроме того, отмечено увеличение количества лимфоцитов в миелограмме (15,6%), очаговое поражение КМ (3%) при исследовании трепанобиоптата и обнаружение транслокации t(11;14)(q13;q32) методом FISH.

У пациента возобновились жалобы на периодические боли в области послеоперационного рубца, дискомфорт в животе и общую слабость (4 балла по ВАШ).

С 22.11.2015 г. больному начата терапия 2 линии по программе RBV (ритуксимаб, бендамустин, бортезомиб). Несмотря на проводимую ХТ продолжилось прогрессирование заболевания. 29.02.2016 г. пациент умер от опухолевой прогрессии.

Тяжесть клинического течения МКЛ у больного определена выявленными хромосомными и молекулярно-генетическими аберрациями группы высокого риска: КК, делецией гена *TP53*, увеличением копийности гена *MYC*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время молекулярно-генетические маркеры имеют ключевое значение в диагностике, дифференциальной диагностике, прогнозировании клинического течения МКЛ и мониторинге ответа на проводимую терапию. Дополнительные хромосомные и молекулярно-цитогенетические аберрации, определяющиеся у большинства пациентов с МКЛ, наряду с высокоспецифической транслокацией t(11;14)(q13;q32), особенно множественные комплексные и структурные нарушения кариотипа нарушают регуляцию ведущих механизмов жизненного цикла клетки и ассоциированы с более агрессивным течением МКЛ [66, 111].

В нашем исследовании при оценке параметров, влияющих на выживаемость больных МКЛ, обнаружена значимая роль наличия хромосомных изменений в кариотипе. Так, сравнительный анализ ОВ пациентов в зависимости от выявления патологического кариотипа показал, что у больных с аберрантным кариотипом медиана ОВ значимо ниже, чем в случае обнаружения НК (62 мес против 144 мес, p=0,002). Выявленный у 26,3% пациентов КК также оказывал значимое неблагоприятное влияние на снижение ОВ и БРВ пациентов с МКЛ (49 мес против 144 мес, p< 0,001, соответственно, 32 мес против 120 мес, p=0,015, соответственно). Однако, для кариотипа с 1-2 хромосомными нарушениями не выявлено статистической значимости при оценке ОВ и БВ (p=0,497, p=0,143, соответственно). Вместе с тем, сравнение ОВ и БРВ больных МКЛ в группах с КК и 1-2 хромосомными аберрациями обнаружило наиболее неблагоприятное влияние КК (p=0,032, p=0,075, соответственно).

Greenwell, Jonaton Cohen, Diana Malarikova и Tiemo Katzenberger с соавт., также продемонстрировали в проведенных исследованиях значимую ассоциацию КК со снижением медианы ОВ у пациентов с МКЛ [36, 53, 71, 83]. Jonaton B. Cohen и Greenwell с соавт., кроме того, дополнительно выявили достоверное влияние КК на укорочение беспрогрессивной выживаемости (БПВ) [36, 53]. Tiemo Katzenberger с соавт. показали, что у больных с 4 и более нарушениями кариотипа

медиана ОВ соответствовала 15 месяцам по сравнению с 36 месяцами [71]. Группа исследователей под руководством D. Malarikova обнаружила статистически значимую ассоциацию наличия КК со снижением медиан бессобытийной выживаемости (26,99 мес против 9,07 мес, соответственно, p=0,0140) и ОВ (47,28 мес против 12,59, соответственно, p=0,0010) [83].

Jonaton Cohen с соавт. выполняли СЦИ в дебюте заболевания до начала проведения ХТ. В 40% (32/80) случаев обнаруживался КК. Сравнение 2-летней ОВ и БПВ показало более высокие показатели у пациентов без КК (85% и 58%, соответственно, p=0,02; 70% и 48%, соответственно, p=0,02). Однако для КК не было выявлено неблагоприятной прогностической значимости для группы высокого риска по прогностической шкале MIPI, «bulky disease» и выполнения АТСК [36].

Корреляционный анализ клинических параметров у пациентов в зависимости от характеристики кариотипа, проведенный в нашем исследовании, показал достоверную ассоциацию обнаружения патологического кариотипа с группой промежуточного или высокого риска по шкале MIPI (32,3% против 20,5%, соответственно и 64,5% против 53,8%, соответственно, p=0,034)).

Группа исследователей во главе с Sarkozy провели унивариативный и мультивариативный анализы 125 пациентам с МКЛ, который обнаружил значимое неблагоприятное влияние КК на выживаемость и прогноз больных с МКЛ, а также ассоциацию КК с неиндолентными клиническими формами МКЛ [113].

Greenwell с соавт. проанализировали результаты СЦИ у 483 больных МКЛ и оценили прогностическую значимость выявленных аберраций. Статистический анализ показал, что КК достоверно снижал продолжительность ОВ (4,5 против 11,6 лет, p<0,01) и БПВ (1,9 против 4,4 лет, p<0,01). Многофакторный анализ, включающий наряду с КК такие параметры как Ki-67, стратификацию по прогностическим шкалам MIPI, определил, что только КК был независимым фактором, оказывающим влияние на ОВ, вместе с тем, для КК и Ki-67>30% выявлена ассоциация с низкой БПВ [53].

Мультивариативный анализ параметров, влияющих на ОВ и БРВ, проведенный у наших пациентов, учитывал помимо КК изменения гена *MYC*, повышение активности ЛДГ в сыворотке крови и аберрации хромосомы 17. Результаты анализа показали ключевое негативное влияние на ОВ независимо от других параметров только нарушений гена *MYC* (p=0,05). При оценке БРВ выявлена статистическая тенденция также для изменений *MYC* (p=0,30). При мультивариативном анализе КК не являлся независимым неблагоприятным фактором, оказывающим влияние как на ОВ, так и БРВ (p=0,67, p=0,62, соответственно).

Исследователи, полагают, что выявление ДХА значительно увеличивает генетическую нестабильность патологического клона, потенцируют онкогенный потенциал *CCND1*, что способствует повышению пролиферативной активности опухолевых клеток и прогрессирующему клиническому течению заболевания [37, 142].

По результатам СЦИ в нашем исследовании, из 36 пациентов с аберрантным кариотипом транслокация t(11;14)(q13;q32) определялась у 32 больных (88,9%). Только в 12,5% (4/32) случаев обнаруживалась изолированная транслокация t(11;14)(q13;q32), в то время как у большинства пациентов транслокация t(11;14)(q13;q32) выявлялась в сочетании с ДХА (28/32, 87,5%). Наиболее часто встречающимися ДХА были нарушения хромосом 3 (7/21 (33,3%)), 7 (5/21 (23,8%)) и 17 (10/21 (47,6%)).

Достоверная ассоциация наличия ДХА в кариотипе со снижением выживаемости обнаруживалась в исследованиях Espinet, Sarkozy, Salaverria, Greenwell и Delfau-Larue. Наиболее неблагоприятное влияние на прогноз МКЛ оказывали аберрации гена *TP53* [39, 47, 53, 111, 113]. Кроме того, авторы показали, что ухудшало клиническое течение МКЛ выявление таких хромосомных и молекулярно-цитогенетических нарушений как делеции гена *CDKN2A* [39, 53, 111, 113] и локусов 1p, 10q [113], а также изменения 3q [47, 111].

Результаты унивариативного анализа 483 пациентов с МКЛ, выполненного Greenwell с соавт., показали ассоциацию обнаруженных ДХА с низкими БПВ (делеция локусов 9p, 9q, 10p, 10q, 13q, 17p), и ОВ (делеция 9p, 9q, 13q) [53].

По данным Espinet с коллегами, частота встречаемости ДХА у 145 больных МКЛ составила 58%. Чаще всего обнаруживались делеции локусов 1p (1p31-32, 1p21-22, 1p36), 10p, 13q, 17p (17p13), амплификация 3q. У больных с плеоморфным и бластоидным гистологическими вариантами МКЛ преимущественно определялись КК, делеция локусов 1p, 17p, а также нарушения 10p. Для выявленных изменений установлена ассоциация с высокими показателями Ki-67 и короткой выживаемостью. Делеция 17p и нарушения 3q детектировались в 8,0% и 10,0% случаев, соответственно. Статистический анализ обнаружил их независимое неблагоприятное влияние на продолжительность ОВ. Так, четырехлетняя ОВ в зависимости от наличия делеции 17p составила (14,0% *vs* 54%), а для пациентов с дополнительным генетическим материалом на хромосоме 3 по сравнению с его отсутствием соответствовала 0% против 54%. Выявление данных аберраций значимо ассоциировано с бластоидным морфологическим вариантом МКЛ (add(3) - p=0,001, del(17p) - p=0,014) [47].

В нашем исследовании аберрации гена *TP53*, детектируемые методом FISH, обнаруживались в 23,1% (27/117) случаев. У большинства пациентов (24/27 (88,9%)) определялась делеция *TP53*, моносомия хромосомы 17 выявлялась у 3/27 (11,1%) больных. Статистический анализ показал достоверное неблагоприятное влияние наличие изменений *TP53* на ОВ и БРВ (p< 0,001, p=0,015, соответственно).

Мы сравнили частоту встречаемости патологического кариотипа, КК, нарушений гена *MYC* в зависимости от выявляемости аберраций *TP53*, которое продемонстрировало значимо высокую частоту обнаружения данных изменений у больных с аномалиями *TP53* (55,6% против 23,3%, соответственно, p<0,001; 51,9% против 7,8%, соответственно, p<0,001; 44,4% против 18,9%, соответственно, p=0,007).

Таким образом, аберрации гена *TP53* у пациентов с МКЛ являются предикторами неблагоприятного течения заболевания, достоверно

укорачивающими медианы ОВ, а также БРВ, и значимо ассоциированными как с высоким уровнем нестабильности генома, характеризующимся выявлением дополнительных численных и структурных цитогенетических нарушений, так и наличием аберраций гена *MYC*.

В настоящее время ведется подробное изучение подгруппы пациентов «double-hit» МКЛ, которая характеризуется сочетанием аберраций гена *MYC* и транслокацией t(11;14)(q13;q32). Выявлено, что изменения гена *MYC* в комбинации с транслокацией t(11;14)(q13;q32) нарушают регуляцию апоптоза и репарацию поврежденной ДНК, определяя особо агрессивное клиническое течение МКЛ. Нарушения, вовлекающие ген *MYC* могут детектироваться как в дебюте заболевания, так и при прогрессии или рецидиве МКЛ [17, 119, 133, 139].

На сегодняшний день в литературе практически нет данных о многоцентровых исследованиях, которые оценивают влияние наличия изменений гена *MYC* на продолжительность ОВ и БРВ пациентов с МКЛ. Описаны отдельные клинические случаи или исследования, проведенные на малой выборке больных [37, 57, 62, 69, 89, 105, 116, 138, 140]. Также представлено крайне мало данных по группе пациентов «double-hit» МКЛ, характеризующейся сочетанием аберраций гена *MYC* и транслокацией t(11;14)(q13;q32).

Таким образом, одной из задач нашего исследования являлось изучение частоты встречаемости и генетической гетерогенности нарушений гена *MYC* у больных МКЛ, определение прогностической значимости нарушений *MYC* для ОВ и БРВ пациентов с МКЛ, а также выделение особой подгруппы больных с «double-hit» МКЛ.

Выполнение FISH-анализа с ДНК-зондом для выявления аберраций *MYC* у пациентов в нашем исследовании определило, что нарушения, вовлекающие *MYC*, обнаруживались у 29/117 (24,8%) больных, при этом, в большинстве случаев определялась амплификация *MYC* с 1–14 дополнительными копиями *MYC* (79,3% (23/29)). Перестройка *MYC* детектировалась у 2/29 (7,0%) пациентов. Более редкими аберрациями были сочетания амплификации *MYC* с делецией центромерного или теломерного участков *MYC* (по 1/22 (4,5%) для каждого типа

нарушения, соответственно). Оценка кариотипа показала высокую частоту выявляемости хромосомных аберраций у больных с нарушениями *MYC* (47,4% (9/19)), подавляющее большинство случаев из которых - КК (88,9% (8/9)).

У 5 пациентов с МКЛ с изменениями гена *MYC*/8q24, представленных Hao S с соавт., при СЦИ во всех случаях обнаруживалась транслокация t(11;14)(q13;q32) в сочетании с ДХА. В 3 из 5 случаев при СЦИ выявлялись аберрации 8q24*:* транслокации t(8;14)(q24;q32) - 1/5, t(2;8)(q13;q24) – 1/5, у 3/5 определялся дополнительный генетический материал на q-плече 8 хромосомы (add(8)(q24)). Проведенное пациентам с add(8)(q24) FISH-исследование обнаружило увеличение копийности *MYC* у 2/3 больных, в 1 случае выявлялась реарранжировка *MYC*. Все больные характеризовались повышением активности ЛДГ, вовлечением КМ с объемом поражения (40-100%), лимфоцитозом (от 13,6 до 392,9x10^9/л), плеоморфным и бластоидным вариантами МКЛ и количеством клеток, экспрессирующих Ki-67 от 25-75% [57].

У пациентов с аберрациями *MYC* в нашем исследовании преимущественно диагностировалась IV стадия заболевания по стадирующей системе Ann-Arbor и, согласно прогностической шкале MIPI, больные стратифицировались в группы промежуточного и высокого риска. У больных часто выявлялись экстранодальные очаги поражения, вовлечение в патологический процесс КМ, а также симптомы опухолевой интоксикации.

Исследование, оценивающее выявляемость и прогностическую значимость изменений гена *MYC* на ОВ 88 больных МКЛ, провели Lifu Wang с соавт., которое показало высокую частоту встречаемости транслокации *MYC* (27/88 пациентов) и амплификации *MYC* (21/88 больных). Вместе с тем была продемонстрирована достоверная ассоциация выявленных аберраций с более низкой ОВ по сравнению с пациентами без аберраций *MYC* (p=0,001), высоким Ki-67 (медиана 90%), p<0,004 и плеоморфным или бластоидным морфологическими вариантами МКЛ, p=0,004. У подавляющего числа пациентов, которым проводилось СЦИ (17/18), обнаруживался КК. Показатели продолжительности ОВ больных с увеличением копийности *MYC* были промежуточными между ОВ больных с перестройкой *MYC*

и без таковой. Также исследователи выявили достоверное неблагоприятное влияние на ОВ транслокации *MYC*, а не амплификации *MYC* [133].

Setoodeh R, Yi S с соавт. также изучили нарушения гена *MYC* у больных МКЛ и их ассоциацию с молекулярно-цитогенетическими и клинико-гематологическими параметрами [116, 139].

Setoodeh R и соавт. описали четырех пациентов с «double-hit» МКЛ и представили анализ литературных данных 26 больных МКЛ с изменениями гена *MYC*. У 3 из 4 пациентов выявлялась транслокация с вовлечением *MYC*, у одного больного определялось увеличение копийности *MYC*. По литературным данным, у 15 из 26 больных выявлялась перестройка *MYC*, у 11 пациентов – амплификация *MYC*. При этом все изменения гена *MYC* детектировались методами СЦИ и FISH. Во всех случаях у больных обнаруживались IV стадия заболевания, вовлечение КМ, повышение активности ЛДГ в сыворотке крови, спленомегалия, лейкоцитоз с абсолютным лимфоцитозом (от 14 до 425 х 10^9/л, медиана 68,5 х 10^9/л), агрессивное клиническое течение МКЛ с низкой выживаемостью, которая не превышала двух лет от момента установления диагноза несмотря на проведение высокодозной ПХТ. По результатам гистологического исследования, у больных преимущественно верифицировался плеоморфный и бластоидный морфологические варианты МКЛ с количеством клеток, экспрессирующих Ki-67, более 50%, и только у троих пациентов выявлялся классический вариант МКЛ [116].

Группа исследователей под руководством Yi S проанализировали выявляемость изменений гена *MYC* у 50 больных МКЛ и их прогностическое влияние на продолжительность ОВ и БПВ. Нарушения *MYC* определялись в 36,0% (18/50) случаев (дополнительные копии *MYC* и перестройка гена *MYC*). Анализ показал, что у пациентов с аберрациями *MYC* уровень лейкоцитов и β-2 микроглобулина, а также количество опухолевых клеток, экспрессирующих Ki-67, была выше, чем у пациентов без нарушений *MYC*. Исследователи выявили, что больные с изменениями *MYC* в большинстве случаев относились к группам промежуточного и высокого риска по прогностической шкале MIPI. Кроме того, у таких пациентов обнаруживались вторичные молекулярно-цитогенетические

нарушения: 18,0% – делеция *ATM*, 36,0% – делеция 13(q), 34,0% – делеция *TP53*). Проведенный мультивариативный анализ у больных МКЛ показал, что наличие аберраций гена *MYC* являлось независимым неблагоприятным прогностическим фактором, достоверно ассоциированным с короткой ОВ (12,0 месяцев против 94,5, p= .000) и БПВ (9,0 мес против 48,0, p= .000). Исследование также обнаружило, что ХТ у больных с изменениями *MYC* не увеличивало продолжительность выживаемости [139].

Статистический анализ ОВ у наших пациентов в зависимости от наличия нарушений *MYC* показал достоверную ассоциацию аберраций *MYC* со снижением медианы ОВ (43 мес против 108 мес, p=0,013). Из выявленных изменений гена *MYC* наиболее неблагоприятное влияние на продолжительность ОВ оказывало сочетание амплификации гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC*, которая составила 15 месяцев (p=0,028), в то время как у больных с перестройкой *MYC* и амплификацией *MYC* обнаружена тенденция к снижению медианы ОВ (p=0,074, p=0,098). Анализ БРВ пациентов выявил статистическую тенденцию к снижению медианы БРВ только для реарранжировки *MYC* (p=0,071) и амплификации *MYC* с делецией центромерного участка *MYC* (p=0,093).

Результаты СЦИ не показали достоверных статистических отличий в выявляемости аберрантного кариотипа у пациентов с нарушениями гена *MYC* и без таковых (31,0% против 30,7%, соответственно, p=0,812), тем не менее, у больных с нарушениями *MYC* прослеживалась тенденция к более частому обнаружению КК (27,6% против 14,8%, соответственно, p=0,072). Также у пациентов с изменениями гена *MYC* значимо чаще детектировались аберрации *TP53* (41,4% против 17,0%, соответственно, p=0,007).

Zhihong Hu и соавт. представили данные результатов исследования 17 больных с «double-hit» МКЛ. Транслокация с вовлечением гена *MYC* у 10 пациентов обнаруживалась в дебюте заболевания, в то время как у 7 больных при выявлении перестройки *MYC* определялись продвинутые стадии заболевания. При оценке кариотипа в 13 из 14 случаев обнаруживался КК. У большинства пациентов определялась группа высокого риска по прогностической шкале MIPI, III и IV

стадии заболевания по стадирующей системе Ann-Arbor, индекс пролиферативной активности Ki-67≥60%. Продолжительность ОВ у больных соответствовала 31,3 месяца несмотря на химиотерапевтическое лечение и трансплантацию стволовых клеток [62].

В подгруппе пациентов с «double-hit» МКЛ, которая характеризовалась аберрациями гена *MYC* в сочетании с транслокацией t(11;14)(q13;q32) (22/117 (18,8%)), патологический кариотип определялся в 56,3% (9/16) случаев, преимущественно обнаруживался КК (8/9 (88,9%)). Параллельное выполнение FISH-исследования выявило нарушения гена *TP53* у 10/22 (45,5%) больных (делеция *TP53* – в 70,0% случаев, моносомия хромосомы 17 – у 30,0% пациентов).

В нашем исследовании на момент выявления аберраций *MYC* в 90% случаев определялся дебют МКЛ, прогрессия и рецидив заболевания были выявлены у 5% пациентов в каждой группе, соответственно. Согласно стратификации на прогностические группы по шкале MIPI больные относились к промежуточному и высокому риску (26,3% и 73,7%, соответственно). III стадия заболевания по классификации Ann-Arbor выявлялась у 5,3% пациентов, 94,7% - IV стадия. Общее состояние больного по шкале ECOG соответствовало 1 балл у 54,5% больных, 2 балла – 36,4%, 9,1% – 3 балла. Во всех случаях детектировалась спленомегалия, гепатомегалия обнаруживалась у 78,9% пациентов. Поражение более одного экстранодального органа выявлено в 77,8%. Жалобы на симптомы опухолевой больные предъявляли в 66,7% случаев. Среднее значение индекса пролиферативной активности Ki-67 соответствовало 38%.

Корреляционный анализ клинико-лабораторных параметров у больных с «double-hit» МКЛ в нашем исследовании по сравнению с пациентами, у которых не выявлялись аберрации *MYC*, показал, что в группе «double-hit» МКЛ достоверно чаще определялся общесоматический статус, соответствующий 2 и 3 баллам по шкале ECOG (36,4% против 11,7%, соответственно, p=0,018; 9,1% против 6,7%, соответственно, p=0,018), гепатомегалия (78,9% против 46,3%, соответственно, p=0,018), тромбоцитопения (76,5% против 40,5%, соответственно, p=0,020), анемия (88,2% против 47,6%, соответственно, p=0,004), более высокая медиана уровня

лейкоцитоза в ПК ($26x10^9$/л против $9x10^9$/л, соответственно, p=0,041) и снижение медианы уровня гемоглобина как у мужчин (109 г/л против 127 г/л, соответственно, p=0,016) так и у женщин (112 г/л против 116 г/л, соответственно, p=0,024).

Таким образом, можно предположить, что у пациентов с нарушениями *MYC* в нашем исследовании и случаях, представленных в обзоре литературы, ключевым событием лимфомогенеза, отягощающим течение МКЛ, было сочетанное однонаправленное действие гиперэкспрессии циклина D1 и патологической активации *MYC*, индуцированной аберрациями *MYC*.

При проведении исследования мы уделили прицельное внимание изучению цитогенетических и молекулярно-цитогенетических особенностей опухолевого клона у больных МКЛ, корреляции выявленных изменений с клинико-лабораторными характеристиками заболевания и оценке их влияния на продолжительность ОВ и БРВ.

Результаты исследования показали, что изменениями, оказывающими наибольшее достоверное неблагоприятное влияние на ОВ, являлись аберрантный кариотип (p=0,002), КК (p<0,001) и нарушения, вовлекающие гены *TP53* (p< 0,001) и *MYC* (p=0,013). Прицельный анализ нарушений *MYC* выявил самое прогностически неблагоприятное влияние на ОВ сочетания амплификации гена *MYC* с делецией центромерного участка *MYC* (p=0,028).

Предикторами, достоверно ухудшающими ОВ у больных, были Ki–67 и соматический статус пациента, оцениваемый в 2 или 3 балла по шкале ECOG.

Статистический анализ БРВ выявил достоверную значимость таких параметров как аберрации гена *TP53* (p=0,005) и КК (p=0,009).

Множественный регрессионный анализ продемонстрировал ведущее независимое неблагоприятное влияние на ОВ больных МКЛ нарушений гена *MYC* (p=0,05). При оценке факторов, оказывающих негативное влияние на БРВ, именно для изменений гена *MYC* выявлена наибольшая тенденция (p=0,30).

Комплексный подход в генетической диагностике МКЛ, включающий СЦИ и FISH-анализ, является важным для правильной постановки диагноза,

дифференциальной диагностики и мониторинга ответа больных на проводимую терапию. Сочетанное применение методов исследований, оценивающих совокупность цито- и молекулярно-цитогенетических характеристик каждого пациента, значительно увеличивает выявляемость опухолевого клона, помогает детектировать специфические хромосомные аберрации, обнаружение которых дает возможность определять прогноз течения заболевания, а также выявлять пациентов группы высокого риска, характеризующихся короткой выживаемостью и низкой чувствительностью к стандартным курсам ХТ. Вместе с тем стратификация больных на прогностические группы на основании полученных результатов способствует выбору наиболее эффективной и максимально персонифицированной терапевтической тактики.

Метод СЦИ позволял в нашем исследовании проводить детальную оценку кариотипа пациента, определять его числовые и структурные хромосомные изменения. Важно отметить, что только при СЦИ мы выявляли крайне неблагоприятную группу пациентов с КК.

Параллельное исследование кариотипа клеток ПК и КМ у 14 пациентов с МКЛ показало, что хромосомные изменения значимо чаще определялись в митоген-стимулированных В-лимфоцитах периферической крови (57,1% *vs* 7,1%, $p<0,05$).

Проведение каждому больному FISH-исследования с использованием локус-специфических ДНК-проб помогло четко детектировать наличие или отсутствие транслокации t(11;14)(q13;q32) и нарушений, вовлекающих гены *TP53* и *MYC*, наличие которых, как показал статистический анализ, являлось достоверным предиктором неблагоприятного прогноза. Благодаря прицельному анализу интерфазных ядер данные аберрации обнаруживались в том числе у части пациентов с НК и низкой митотической активностью опухолевых клеток. К тому же выполнение FISH-исследования позволяло детектировать криптические делеции, амплификации или транслокации, выявление которых было затруднено методом СЦИ из-за невысокой разрешающей способности световой микроскопии.

Вместе с тем, именно FISH-анализ позволил обнаружить у больных в нашем исследовании нарушения *MYC* и на основании полученных результатов выделить подгруппу пациентов МКЛ высокого риска, «double-hit» МКЛ, характеризующуюся наличием нарушений гена *MYC*, транслокацией t(11;14)(q13;q32), а также, в большинстве случаев КК.

На основании полученных результатов предложен алгоритм диагностики и оценки прогноза у больных МКЛ с использованием данных молекулярно-цитогенетического и цитогенетического исследований (рисунок 63).

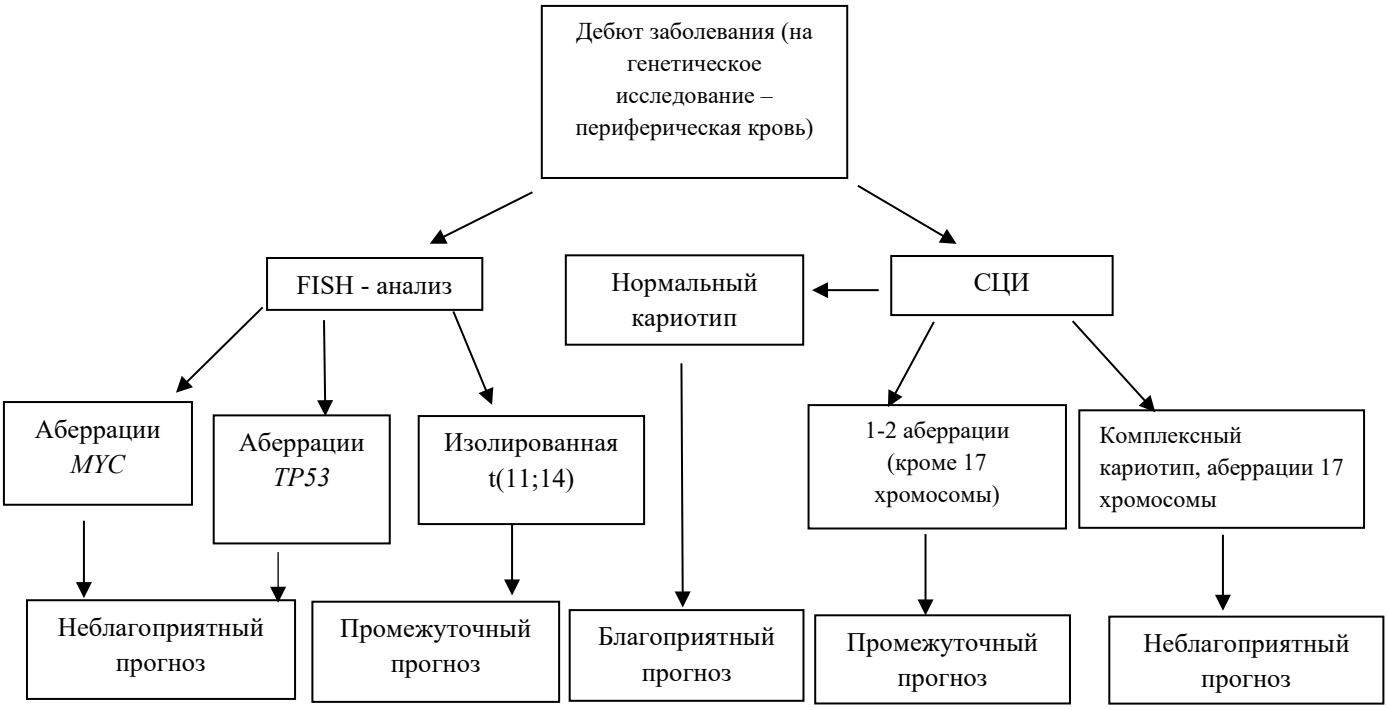


Рисунок 63 – Алгоритм генетической диагностики пациентов с МКЛ

В дебюте заболевания пациенту рекомендовано проведение СЦИ и FISH-исследования с ДНК-пробами для выявления транслокации t(11;14)(q13;q32) и аберраций генов *MYC* и *TP53*. Если при кариотипировании обнаруживается КК или изменения хромосомы 17, то больного следует относить к группе неблагоприятного прогноза вне зависимости от результатов FISH-анализа. В случае если выявляются 1-2 аберрации (кроме нарушений хромосомы 17) или НК, для оценки прогноза необходимо проведение FISH-исследования. При

обнаружении изменений генов *MYC* и *TP53* пациента определяют в группу неблагоприятного прогноза, промежуточного – при выявлении изолированной транслокации t(11;14)(q13;q32).

Таким образом, алгоритм генетической диагностики больных МКЛ, разработанный на основании полученных результатов нашего исследования, может дополнить применяемые на настоящее время методики оценки риска при МКЛ, что поможет улучшить диагностику, прогнозирование характера клинического течения МКЛ и выбор оптимального метода лечения для каждого пациента с учетом цито- и молекулярно-цитогенетических характеристик опухолевого клона.

ВЫВОДЫ

1. Параллельное культивирование клеток периферической крови и костного мозга показало, что хромосомные аберрации чаще выявлялись при культивировании митоген-стимулированных В-лимфоцитов (57,1% vs 7,1%, $p<0,05$).
2. Частота встречаемости транслокации t(11;14)(q13;q32) при стандартном цитогенетическом исследовании и FISH-анализе составила 40,0% и 70,1%, соответственно, $p<0,001$; аберраций хромосомы 17 при FISH-исследовании и оценке кариотипа – 22,2% и 11,3%, соответственно, $p<0,001$. Изменения гена *MYC* обнаруживались в 24,8% случаев (выявлялись только при FISH-анализе).
3. Корреляционный анализ клинико-лабораторных параметров у пациентов в зависимости от:

   - FISH-статуса гена *MYC* выявил достоверную ассоциацию аберраций *MYC* с более частым поражением костного мозга ($p=0,027$), наличием гепатомегалии ($p=0,002$), спленомегалии ($p=0,023$), общесоматическим статусом, соответствующим 2 и 3 баллам по шкале ECOG ($p<0,001$), тромбоцитопенией ($p=0,002$), анемией ($p=0,002$) и более высоким уровнем лейкоцитов в периферической крови ($p<0,001$);

   - FISH-статуса гена *TP53* выявил значимую ассоциацию аберраций *TP53* с общесоматическим статусом, соответствующим 2 и 3 баллам по шкале ECOG ($p=0,036$), более высокой частотой встречаемости спленомегалии ($p=0,015$), поражения костного мозга ($p=0,013$), более высоким содержанием лейкоцитов в периферической крови ($p=0,004$);

   - выявления патологического кариотипа обнаружил статистическую значимость наличия хромосомных нарушений с Международным прогностическим индексом MIPI групп промежуточного и высокого риска ($p=0,034$), общесоматическим статусом, соответствующим 2 и 3 баллам по шкале ECOG ($p=0,018$), более низким уровнем содержания тромбоцитов

(p=0,012), гемоглобина (у мужчин) (p=0,015), более частым выявлением тромбоцитопении (p=0,027).

4. Наиболее прогностически неблагоприятными цито- и молекулярно-цитогенетическими маркерами, достоверно ухудшающими общую выживаемость, являлись патологический кариотип (p=0,002), комплексные нарушения кариотипа (p<0,001), изменения генов *TP53* (p<0,001) и *MYC* (p=0,013). Оценка безрецидивной выживаемости выявила статистическую значимость комплексных изменений кариотипа (p=0,019) и аберраций *TP53* (p=0,005). Множественный регрессионный анализ показал ключевое негативное влияние на общую выживаемость независимо от других параметров нарушений гена *MYC* (p=0,05). При изучении факторов, оказывающих независимое влияние на безрецидивную выживаемость выявлена статистическая тенденция также для *MYC* (p=0,30).
5. В алгоритм генетической диагностики мантийноклеточной лимфомы целесообразно включить скрининг на наличие аберраций гена *MYC* для выявления пациентов группы высокого риска и прогностически неблагоприятной подгруппы «double-hit» мантийноклеточной лимфомы с множественными хромосомными нарушениями, изменениями гена *MYC* и транслокацией t(11;14)(q13;q32).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сочетанное проведение стандартного цитогенетического исследования и FISH-анализа значительно увеличивает частоту выявления опухолевого клона, и, таким образом, помогает осуществлять более точную диагностику у пациентов с мантийноклеточной лимфомой.
2. Прогностически значимый неблагоприятный потенциал цитогенетических (комплексные нарушения кариотипа) и молекулярно-цитогенетических изменений (аберраций генов *TP53* и *MYC*) позволяет рекомендовать проведение стандартного цитогенетического и FISH-исследований всем пациентам с мантийноклеточной лимфомой для подтверждения диагноза и выявления больных группы высокого риска с низкими показателями общей и безрецидивной выживаемости.
3. В случае обнаружения при кариотипировании комплексных нарушений кариотипа или изменений хромосомы 17, пациента следует относить к группе неблагоприятного прогноза вне зависимости от результатов FISH-анализа. При выявлении 1-2 аберрации (кроме нарушений хромосомы 17) или нормального кариотипа для оценки прогноза необходимо проведение FISH-исследования.
4. При наличии изменений генов *MYC* и *TP53* больного определяют в группу неблагоприятного прогноза, а изолированная транслокация t(11;14)(q13;q32) ассоциируется с промежуточным прогнозом.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты, полученные при выполнении данной работы, могут являться основой для продолжения изучения вопросов оптимизации генетической диагностики МКЛ за счет внедрения дополнительных методов исследований с молекулярными маркерами, обуславливающими резистентость к проводимой терапии (*НСК, NOTCH1, TP53*) и, таким образом, значительно расширить представления о генетическом профиле больных МКЛ и стратификации пациентов на прогностические группы. Актуальными темами для дальнейшего изучения являются:

1. Дополнение алгоритма генетической диагностики МКЛ ПЦР-исследованием мутаций в генах *НСК, NOTCH1, TP53,* а также определение частоты встречаемости данных генетических нарушений у больных МКЛ.

2. Установление взаимосвязи между выявленными цитогенетическими и молекулярно-цитогенетическими аберрациями (изменения генов *TP53, MYC*) и наличием мутаций *НСК, NOTCH1, TP53.*

3. Сравнение прогностической значимости комплексных изменений кариотипа, нарушений генов *TP53, MYC* и мутаций *НСК, NOTCH1, TP53*.

4. На основе полученных данных определить группу пациентов высокого риска неблагоприятного течения МКЛ и резистентности к таргетной и иммунохимиотерапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТГСК – аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

БПВ – беспрогрессивная выживаемость

БРВ – безрецидивная выживаемость

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

В-симптомы – симптомы опухолевой интоксикации

ДИ – доверительный интервал

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДХА – дополнительные хромосомные аберрации

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИГХ - иммуногистохимическое исследование

иМКЛ - индолентные клинические формы МКЛ

ИФТ – иммунофенотипическое исследование

КАК - клинический анализ крови

КК – комплексные изменения кариотипа

КМ – костный мозг

ЛБ - лимфома Беркитта

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛМЗ – лимфома маргинальной зоны

ЛМЛ - лимфома из малых лимфоцитов

МКЛ – мантийноклеточная лимфома

Моносомия - наличие одной из пары гомологичных хромосом

НК – нормальный кариотип

НХЛ – неходжкинские лимфомы

ОВ – общая выживаемость

ОР – отношение рисков

ПК – периферическая кровь

ПХТ – полихимиотерапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ-КТ – компьютерная томография, совмещенная с позитронно-эмиссионной томографией

СЦИ - стандартное цитогенетическое исследование

ФЛ – фолликулярная лимфома

ХЛЛ - хронический лимфоцитарный лейкоз

ХТ – химиотерапия

ЦНС – центральная нервная система

add - добавление хромосомного материала неизвестного происхождения

amp – амплификация (наличие дополнительных копий определенного участка ДНК)

ATM – ген протеинкиназы ATM (ataxia telangiectasia mutated)

BCL2 – ген-регулятор апоптоза (apoptosis regulator)

BCR – В-клеточный рецептор

CDKN2A - ингибитор циклин-зависимой киназы 2А (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)

CCND1 – ген циклина D1

CCND2 - ген циклина D2

CCND3 - ген циклина D3

del – делеция (потеря хромосомного материала)

der - дериваты хромосом или структурно перестроенные хромосомы

dup – дупликация сегмента хромосомы

ECOG – шкала eastern cooperative oncology group (объединенная восточная онкологическая группа)

FISH - флуоресцентная in situ гибридизация

i - изохромосома (структурно аномальная хромосома из двух идентичных плеч, ориентированных как зеркальное отражение одна другой)

IGH – гены тяжелой цепи иммуноглобулинов

IGHV – гены вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов

IGL – гены легкой цепи иммуноглобулинов

IGк - гены легкой цепи иммуноглобулинов к

IGλ - гены легкой цепи иммуноглобулинов λ

Ki-67 – индекс пролиферативной активности опухоли

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

MIPI - Международный прогностический индекс

MIPI-c – упрощенный Международный прогностический индекс (модификация MIPI)

MIPI-b – комбинированный биологический Международный прогностический индекс (модификация MIPI)

MYC – протоонкоген myelocytomatosis viral homolog

MYCN - v-myc вирусный онкоген миелоцитоматоза, полученный из нейробластомы (viral oncogene of myelocytomatosis derived from neuroblastoma)

RB – ген ретинобластомы (retinoblastoma gene)

SOX11 – ген, кодирующий белок SOX11 (Sry-related high-mobility-group box)

t – хромосомная транслокация (перенос материала с одной хромосомы на другую)

TP53 – ген-супрессор опухолевого роста

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К.М. Современные методы диагностики и лечения неходжкинских лимфом: методические рекомендации / К.М. Абдулкадыров, С.С. Бессмельцев, А.В. Чечеткин и др. – Санкт-Петербург, 2015. – 83 с.
2. Аль-Ради, Л.С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфомы из клеток мантии / Аль-Ради Л.С., И.Э. Белоусова, Е.А. Барях и др. – 2014. – URL: https://blood.ru/documents/clinical%20guidelines/31.%20 limfoma- mantii.pdf.
3. Аль-Ради, Л.С. Опухоли лимфатической системы: атлас / Л.С. Аль-Ради, Е.А. Барях, Е.Ю. Варламова и др.; под ред. А.И. Воробьева, А.М. Кременецкой. – Москва: Ньюдиамед, 2007. – 292 с.
4. Бакиров, Б.А. Анализ полиморфных вариантов протоонкогенов, генов апоптоза и факторов роста у больных с нехождкинскими лимфомами / Б.А. Бакиров, Д.О. Каримов, О.В. Гончаров // Казанский медицинский журнал. – 2011. – Т. 92, № 6. – С. 799-804.
5. Биология и медицина: сайт. – URL: http://medbiol.ru/medbiol/epigenetica/ 0001430a.html.
6. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология / М.А. Волкова. – Издательство: Медицина, 2007. – 1120 с.
7. Воробьев, В.И. Лимфома из клеток мантии: клинические рекомендации / В.И. Воробьев, Г.С. Тумян, Н.А. Фалалеева и др. – 2020. – URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/limfoma_iz_kletok_mantii.pdf.
8. Воробьев, В.И. Лимфомы из клеток мантии у взрослых: клинические рекомендации / В.И. Воробьев, Г.С. Тумян, И.В. Поддубная и др. – 2016. – URL: https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/limfomy-iz-kletok-mantii-u-vzroslykh_ 14050/#part_13.
9. Гидранович, А.В. Метаболическая активность гликолиза в сыворотке крови больных раком молочной железы / А.В. Гидранович // Новости хирургии. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 88-95.

10. Домрачева, Е.В. Хромосомные нарушения при гемобластозах / Е.В. Домрачева // Врач. – 2001. – № 10. – С. 13-15.
11. Захарова, А.И. Молекулярно-генетические маркеры как факторы прогноза при хроническом В-клеточном лимфолейкозе / А.И. Захарова, Т.Н. Обухова // Онкогематология. – 2007. – № 1. – С. 17-23.
12. Захарова, А.И. Прогностическое значение цитогенетических нарушений при хроническом В-клеточном лимфолейкозе: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.29, 03.00.15 / Захарова А.И. – Москва, 2008. – 27 с.
13. Илюшкина, Е.А. Лимфома из клеток мантийной зоны с первичным поражением кожи: клиническое наблюдение / Е.А. Илюшкина, А.М. Ковригина, С.К. Кравченко и др. // Клиническая онкогематология. – 2012. – Т. 5, № 2. – С. 129-134.
14. Кабилова, Т.О. Онкогены семейства myc как терапевтические мишени / Т.О. Кабилова, Е.Л. Черноловская // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – № 7. – С. 11-25.
15. Капланов, К.Д. Первая линия терапии лимфомы из клеток зоны мантии: анализ эффективности и клинико-экономическая оценка / К.Д. Капланов, Н.П. Волков, Т.Ю. Клиточенко и др. // Клиническая онкогематология. – 2018. – Т. 11, № 2. – С. 150-159.
16. Ланг, Т. Как описывать статистику в медицине: руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. Ланг, М. Сесик; перевод с английского под ред. В.П. Леонова. – Москва: Практическая медицина, 2016. – 480 с.
17. Обухова, Т.Н. Диагностика «Double-hit» лимфом / Т.Н. Обухова, Е.А. Барях, Г.А. Алимова и др. // Вестник гематологии. – 2013. – Т.9, № 2. – С. 39-40.
18. Обухова, Т.Н. Цитогенетика лимфомы из клеток мантийной зоны / Т.Н. Обухова Ю.Ю. Лорие, Л.А. Водинская и др. // Терапевтический архив. – 2004. – № 7. – С. 70-77.
19. Ольшанская, Ю.В. Хромосомные перестройки при острых лейкозах / Ю.В. Ольшанская, Е.В. Домрачева. – Москва: МЕДпресс-информ, 2006. – 112 с.

20. Плавинский, С.Л. Введение в биостатистику для медиков / С.Л. Плавинский. – Москва: Астрель, 2011. – 584 с.
21. Поддубная, И.В. Современные подходы к терапии неходжкинских лимфом / И.В. Поддубная // Русский медицинский журнал. – 2001. – № 22. – С. 992.
22. Реброва, О.В. Статистический анализ медицинских данных с помощью пакета программ «Статистика» / О.В. Реброва. – Москва: Медиа Сфера, 2002. – 380 с.
23. Тумян, Г.С. Мантийноклеточная лимфома: история, современные принципы диагностики, лечение (обзор литературы) / Г.С. Тумян // Клиническая онкогематология. – 2020. – Т. 13, № 4. – С. 366-381.
24. Чумаков, П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме / П.М. Чумаков // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 3-52.
25. Abrisqueta, P. Observation as the initial management strategy in patients with mantle cell lymphoma / P. Abrisqueta, D.W. Scott, G.W. Slack et al. // Ann. Oncol. – 2017. – Vol. 28, № 10. – P. 2489-2495.
26. Adam, P. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues / P. Adam, A.I. Schiefer, S. Prill et al. // Mod. Pathol. – 2012. – Vol. 25, № 12. – P. 1629-1636.
27. Adams, J.M. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice / J.M. Adams, A.W. Harris, C.A. Pinkert et al. // Nature. – 1985. – Vol. 318. – P. 533-538.
28. Aguilar, V. Cycling through metabolism / V. Aguilar, L. Fajas // EMBO Mol. Med. – 2010. – Vol. 2, № 9. – P. 338-348.
29. Au, W.Y. 8q24 translocations in blastic transformation of mantle cell lymphoma / W.Y. Au, D.E. Horsman, D.S. Viswanatha et al. // Haematologica. – 2000. – Vol. 85. – P. 1225-1227.
30. Aukema, S.M. Double-hit B-cell lymphomas / S.M. Aukema, R. Siebert, E. Schuuring et al. // Blood. – 2011 – Vol. 117, № 8. – P. 2319-2331.
31. Aukema, S.M. MYC-positive lymphomas other than Burkitt's lymphoma / S.M. Aukema, R. Siebert // Hematology Education: the education programme for the

annual congress of the European Hematology Association. – 2012. – Vol. 6, № 1. – P. 197.

32. Bodrug, S.E. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene / S.E. Bodrug, B.J. Warner, M.L. Bath et al. // EMBO J. – 1994. – Vol. 13. – P. 2124-2130.
33. Boerma, E.G. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of todays knowledge / E.G. Boerma, R. Siebert, P.M. Kluin et al. // Leukemia. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 225-234.
34. Chapman-Fredricks, J. Progressive leukemic non-nodal mantle cell lymphoma associated with deletions of TP53, ATM, and/or 13q14 / J. Chapman-Fredricks, J. Sandoval-Sus, F. Vega et al. // Ann. Diagn. Pathol. – 2014. – Vol. 18, № 4. – P. 214-219.
35. Cheah, C.Y. Mantle Cell Lymphoma / C.Y. Cheah, J.F. Seymour, M.L. Wang // J. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 34, № 11. – P. 1256-1269.
36. Cohen, J.B. Complex karyotype is associated with aggressive disease and shortened progression-free survival in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma / J.B. Cohen, A.S. Ruppert, N.A. Heerema et al. // Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. – 2015. – Vol. 15, № 5. – P. 278-285.e1.
37. Delas, A. Unusual concomitant rearrangements of Cyclin D1 and MYC genes in blastoid variant of mantle cell lymphoma: Case report and review of literature / A. Delas, D. Sophie, P. Brousset et al. // Pathol. Res. Pract. – 2013. – Vol. 209, № 2. – P. 115-119.
38. Delfau-Larue, M.H. CDKN2A and TP53 deletions predict adverse outcome in younger mantle cell lymphoma patients, independent of treatment and MIPI / M.-H. Delfau-Larue, W. Klapper, F. Berger et al. // Blood. – 2016. – Vol. 126, № 5. – P. 604-611.
39. Delfau-Larue, M.H. High-dose cytarabine does not overcome the adverse prognostic value of CDKN2A and TP53 deletions in mantle cell lymphoma / M.H. Delfau-Larue, W. Klapper, R. Berger et al. // Blood. – 2015. – Vol. 126, № 5. – P. 604-611.

40. Diamond, B. Mantle cell lymphoma: Current and Emerging treatment strategies and unanswered questions / B. Diamond, A. Kumar // Hematol. Oncol. Clin. North Am. – 2019. – Vol. 33, № 4. – P. 613-626.
41. Durot, E. An aggressive B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and CCND1 genes: a rare subtype of double-hit lymphoma / E. Durot, M. Patey, I. Luquet et al. // Leuk. Lymphoma. – 2013. – Vol. 54, № 3. – P. 649-652.
42. Dreyling, M. Blastoid and pleomorphic mantle cell lymphoma: still a diagnostic and therapeutic challenge! / M. Dreyling, W. Klapper, S. Rule // Blood. – 2018. – Vol. 132, № 26. – P. 2722-2729.
43. Dreyling, M. Mantle cell lymphoma: biology, clinical presentation, and therapeutic approaches / M. Dreyling // Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. – 2014. – Vol. 2014. – P. 191-198.
44. Edlefsen, K.L. Early lymph node involvement by mantle cell lymphoma limited to the germinal center: report of a case with a novel “follicular in situ” growth pattern / K.L. Edlefsen, H.A. Greisman, H.S. Yi et al. // Am. J. Clin. Pathol. – 2011. – Vol. 136, № 2. – P. 276-281.
45. Ek, S. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma / S. Ek, M. Dictor, M. Jerkeman et al. // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 2. – P. 800-805.
46. Espinet, B. Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry / B. Espinet, A. Ferrer, B. Bellosillo et al. // Clin. Cancer Res. – 2014. – Vol. 20, № 4. – P. 1007-1019.
47. Espinet, B. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma / B. Espinet, I. Salaverria, S. Beà et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2010. – Vol. 49, № 5. – P. 439-451.
48. Felten, C.L. Burkitt transformation of mantle cell lymphoma / C.L. Felten, C.F. Stephenson, R.O. Ortiz, L. Hertzberg // Leuk. Lymphoma. – 2004. – Vol. 45, № 10. – P. 2143-2147.

49. Ferrero, S. KMT2D mutations and TP53 disruptions are poor prognostic biomarkers in mantle cell lymphoma receiving high-dose therapy: a FIL study / S. Ferrero, D. Rossi, A. Rinaldi et al. // Haematologica. – 2020. – Vol. 105, № 6. – P. 1604-1612.
50. Fu, K. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling / K. Fu, D.D. Weisenburger, T.C. Greiner et al. // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 13. – P. 4315-4321.
51. Geisler, C.H. The mantle cell lymphoma international prognostic index (MIPI) is superior to the international prognostic index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT) / C.H. Geisler, A. Kolstad, A. Laurell et al. // Blood. – 2010. – Vol. 115, № 8. – P. 1530-1533.
52. Geling L. An unusual case of co-existing classic mantle cell lymphoma and transformed lymphoma with Burkitt-like features with leukemic presentation / L. Geling, Z. Yi, C. Sindhu et al. // J. Hematopathol. – 2016. – Vol. 9. – P. 91-99.
53. Greenwell, I.B. Complex karyotype in patients with mantle cell lymphoma predicts inferior survival and poor response to intensive induction therapy / I.B. Greenwell, A.D. Staton, M.J. Lee et al. // Cancer. – 2018. – Vol. 124, № 11. – P. 2306-2315.
54. Gruszka-Westwood, A.M. Unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with amplified CCND1/IGH fusion gene / A.M. Gruszka-Westwood, S. Atkinson, B.M. Summersgill et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2002. – Vol. 33, № 2. – P. 206-212.
55. Halldórsdóttir, A.M. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma / A.M. Halldórsdóttir, A. Lundin, F. Murray et al. // Leukemia. – 2011. – Vol. 25, № 12. – P. 1904-1908.
56. Hanel, W. Emerging therapies in mantle cell lymphoma / W. Hanel, N. Epperla // J. Hematol. Oncol. – 2020. – Vol. 13, № 1. – P. 79.
57. Hao, S. Mantle cell lymphoma with 8q24 chromosomal abnormalities: a report of 5 cases with blastoid features / S. Hao, W. Sanger, M. Onciu et al. // Mod. Pathol. – 2002. – Vol. 15. – P. 1266-1272.

58. Hartmann, E.M. Lymphoid Neoplasia Pathway discovery in mantle cell lymphoma by integrated analysis of high-resolution gene expression and copy number profiling / E.M. Hartmann, E. Campo, G. Wright et al. // Blood. – 2010. – Vol. 116, № 6. – P. 953-961.
59. Herens, C. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma with cryptic t(12;14)(p13;q32) and cyclin D2 overexpression / C. Herens, F. Lambert, L. Quintanilla-Martinez et al. // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 3. – P. 1745-1746.
60. Hoster, E. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma / E. Hoster, M. Dreyling, W. Klapper et al // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 2. – P. 558-565.
61. Hsi, E.D. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study / E.D. Hsi, S.-H. Jung, R. Lai et al. // Leuk. Lymphoma. – 2008. – Vol. 49, № 11. – P. 2081-2090.
62. Hu, Z. Mantle cell Lymphoma with MYC rearrangement: a report of 17 patients / Z. Hu, L.J. Medeiros, Z. Chen et al. // Am. J. Surg. Pathol. – 2017. – Vol. 41, № 2. – P. 216-224.
63. Hwang, H.C. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles / H.C. Hwang, B.E. Clurman // Oncogene. – 2005. – Vol. 24, № 17. – P. 2776-2786.
64. Inamdar, A.A. Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine-diagnosis, biomarkers and therapeutic agents / A.A. Inamdar, A. Goy, N.M. Ayoub et al. // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7, № 30. – P. 48692-48731.
65. Ishigaki, T. Amplification of IGH/CCND1 fusion gene in a primary plasma cell leukemia case / T. Ishigaki, K. Sasaki, K. Watanabe et al. // Cancer Genet Cytogenet. – 2010. – Vol. 201, № 1. – P. 62-65.
66. Jares, P. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma / P. Jares, E. Campo // Br. J. Haematology. – 2008. – Vol. 142. – P. 149-165.
67. Jares, P. Genetic and Molecular Pathogenesis of Mantle Cell Lymphoma: Perspectives for new Targeted Therapies / P. Jares, D. Colomer, E. Campo // Nat. Rev. Cancer. – 2007 – Vol. 7. – P. 750-762.

68. Jares, P. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma / P. Jares, D. Colomer, E. Campo et al. // J. Clin. Invest. – 2012. – Vol. 122, № 10. – P. 3416-3423.
69. Kallen, M.E. B-lymphoblastic transformation of mantle cell lymphoma/leukemia with “double hit” changes / M.E. Kallen, N.P. Rao, S.K. Kulkarni et al. // J. Hematopathol. 2015. – Vol. 8. – P. 31-36.
70. Karube, K. Monoclonal B cell lymphocytosis and "in situ" lymphoma / K. Karube, L. Scarfò, E. Campo et al. // Semin Cancer Biol. – 2014. – Vol. 24. – P. 3-14.
71. Katzenberger, T. Delineation of distinct tumour profiles in mantle cell lymphoma by detailed cytogenetic, interphase genetic and morphological analysis / T. Katzenberger, D. Kienle, S. Stilgenbauer et al. // Br. J. Haematology. – 2008. – Vol. 142, № 4. – P. 538-550.
72. Katzenberger, T. The Ki67 proliferation index is a quantitative indicator of clinical risk in mantle cell lymphoma / T. Katzenberger, C. Petzoldt, S. Höller et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 8. – P. 3407.
73. Klapper, W. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network / W. Klapper, E. Hoster, O. Determann et al. // J. Hematop. – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 103-111.
74. Klener, P. Advanced in Molecular Biology and Target Therapy of Mantle Cell Lymphoma / P. Klener // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Vol. 20. – P. 4417.
75. Komatsu, H. A variant chromosome translocation at 11q13 identifying PRAD1/cyclin D1 as the BCL-1 gene / H. Komatsu, S. Iida, K. Yamamoto et al. // Blood. – 1994. – Vol. 84, № 4. – P. 1226-1231.
76. Kumar, A. Clinical presentation determines selection of patients for initial observation in mantle cell lymphoma / A. Kumar, Z. Ying, A. Alperovich et al. // Haematologica. – 2019. – Vol. 104, № 4. – P. e163-e166.
77. Ladha, A. Mantle cell lymphoma and its management: where are we now? / A. Ladha, J. Zhao, E.M. Epner, J.J. Pu // Exp. Hematol. Oncol. – 2019. – Vol. 8. – P. 2.

78. Lecluse, Y. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals / Y. Lecluse, P. Lebailly, S. Roulland et al. // Leukemia. – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 1190-1193.
79. Lee, J. Activation of MYC, a bona fide client of HSP90, contributes to intrinsic ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma / J. Lee, L.L. Zhang, W. Wu et al. // Blood Adv. – 2018. – Vol. 2, № 16. – P. 2039-2051.
80. Lord, M. The utility of mRNA analysis in defining SOX11 expression levels in mantle cell lymphoma and reactive lymph nodes / M. Lord, A.M. Wasik, B. Christensson et al. // Haematologica. – 2015. – Vol. 100, № 9. – P. e369-372.
81. Lovec, H. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice / H. Lovec, A. Grzeschiczek, M.B. Kowalski et al. // EMBO J. – 1994. – Vol. 13. – P. 3487–3495.
82. Maddocks, K. Update on mantle cell lymphoma / K. Maddocks // Blood. – 2018. – Vol. 132, № 16. – P. 1647-1656.
83. Malarikova, D. Concurrent TP53 and CDKN2A gene aberrations in newly diagnosed mantle cell lymphoma correlate with chemoresistance and call for innovative upfront therapy / D. Malarikova, A. Berkova, A. Obr et al. // Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12, № 8. – P. 2120.
84. Martin, P. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma / P. Martin, A. Chadburn, P. Christos et al. // J. Clin. Oncol. – 2009. – Vol. 27, № 8. – P. 1209-1213.
85. McCall, R.K. Non-nodal CD5-negative mantle cell lymphoma with secondary TP53 deletion / R.K. McCall, C.S. Pang, M.J. Pettenati // Case Rep. Hematol. – 2020. – Vol. 2020. – P. 9185432.
86. McGowan-Jordan, J. Re: International System for Human Cytogenetic or Cytogenomic Nomenclature (ISCN): Some Thoughts, by T. Liehr / J. McGowan-Jordan, R.J. Hastings, S. Moore // Cytogenet Genome Res. – 2021. – Vol. 161, № 5. – P. 225-226.
87. Meggendorfer, M. SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation, CCND1expression and an

adverse prognosis / M. Meggendorfer, W. Kern, C. Haferlach et al. // Leukemia. – 2013. – Vol. 27. – P. 2388-2391.

88. Menter, T. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma / T. Menter, S. Dirnhofer, A. Tzankov // J. Clin. Pathol. – 2015. – Vol. 68, № 6. – P. 473-478.
89. Miao, Y. CCND1-IGH Fusion-Amplification and MYC Copy Number Gain in a Case of Pleomorphic Variant Mantle Cell Lymphoma / Y. Miao, P. Lin, W. Wang et al. // Am. J. Clin. Pathol. – 2016. – Vol. 146, № 6. – P. 747-752.
90. Michaux, L. Coexistence of BCL1/CCND1 and C-MYC aberrations in blastoid mantle cell lymphoma: a rare finding associated with very poor outcome / L. Michaux, I. Wlodarska, I. Theate et al. // Ann. Hematol. – 2004. – Vol. 83. – P. 578-583.
91. Morice, W.G. An unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with a blastoid component showing loss of CD5 and aberrant expression of CD10 / W.G. Morice, J.M. Hodnefield, P.J. Kurtin, C.A. Hanson // Am. J. Clin. Pathol. – 2004. – Vol. 122, № 1. – P. 122-127.
92. Mossafa, H. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis / H. Mossafa, D. Damotte, A. Jenabian et al. // Leuk. Lymphoma. – 2006. – Vol. 47. – P. 1885-1893.
93. Mozos, A. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype / A. Mozos, C. Royo, E. Hartmann // Haematologica. – 2009. – Vol. 94, № 11. – P. 1555-1562.
94. Nabrinsky, E. High-Risk Mantle Cell Lymphoma in the Era of Novel Agents / E. Nabrinsky, A.V. Danilov, P.B. Koller // Curr. Hematol. Malig. Rep. – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 8-18.
95. Nguyen, L. The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects / L. Nguyen, P. Papenhausen, H. Shao // Genes. – 2017. – Vol. 8. – P. 116.
96. Nordström, L. SOX11 and TP53 add prognostic information to MIPI in a homogenously treated cohort of mantle cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group

study / L. Nordström, S. Sernbo, P. Eden et al. // Br. J. Haematol. – 2014. – Vol. 166, № 1. – P. 98-108.

97. Oka, K. PRAD1 gene over-expression in mantle-cell lymphoma but not in other low-grade B-cell lymphomas, including extranodal lymphoma / K. Oka, T. Ohno, K. Kita et al. // Br. J. Haematol. – 1994. – Vol. 86, № 4. – P. 786-791.
98. Oliveira, F.M. Blastoid mantle cell lymphoma with t(2;8) (p12;q24) / F.M. Oliveira, L.G. Tone, D.P. Simoes et al. // Leuk. Lymphoma. – 2007. – Vol. 48. – P. 2079-2082.
99. Onciu, M. Cytogenetic findings in mantle cell lymphoma cases with a high level of peripheral blood involvement have a distinct pattern of abnormalities / M. Onciu, E. Schlette, L.J. Medeiros et al. // Am. J. Clin. Pathol. – 2001. – Vol. 116. – P. 886-892.
100. Pérez-Galán, P. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era / P. Pérez-Galán, M. Dreyling, A. Wiestner // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 1. – P. 26-38.
101. Pileri, S.A. Mantle Cell Lymphoma / S.A. Pileri, B. Falini // Haematologica. – 2009. – Vol. 94. – P. 1488-1492.
102. Quintanilla-Martinez, L. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR / L. Quintanilla-Martinez, J. Slotta-Huspenina, I. Koch et al. // Haematologica. – 2009. – Vol. 94, № 11. – P. 1595-1598.
103. Rack, K.A. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms / K.A. Rack, E. van den Berg, C. Haferlach et al. // Leukemia – 2019. – Vol. 33, № 8. – P. 1851-1867.
104. Racke, F. Evidence of Long Latency Periods Prior to Development of Mantle Cell Lymphoma / F. Racke, S. Simpson, B. Christian et al. // Blood. – 2010. – Vol. 116, № 21. – P. 323.
105. Reddy, K. Blastic mantle cell lymphoma with a Burkitt translocation / K. Reddy, M. Ansari-Lari, B. Dipasquale // Leuk. Lymphoma. – 2008. – Vol. 49. – P. 740-750.

106. Reya, T. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism / T. Reya, M. O'Riordan, R. Okamura et al. // Immunity. – 2000. – Vol. 13, № 1. – P. 15-24.
107. Rocha, C.K. A rare case of t(11;22) in a mantle cell lymphoma like B-cell neoplasia resulting in a fusion of IGL and CCND1: case report / C.K. Rocha, I. Praulich, I. Gehrke et al. // Mol. Cytogenet. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 8.
108. Royo, C. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma / C. Royo, I. Salaverria, Hartmann EM et al. // Semin. Cancer Biol. – 2011. – Vol. 21. – P. 322-334.
109. Rule, S. The modern approach to mantle cell lymphoma / S. Rule // Hematol. Oncol. – 2019. – Vol. 37, Suppl. 1. – P. 66-69.
110. Salaverria, I. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma / I. Salaverria, C. Royo, A. Carvajal-Cuenca et al. // Blood. – 2013. – Vol. 121, № 8. – P. 1394-1402.
111. Salaverria, I. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression – based proliferation signature / I. Salaverria, A. Zettl, S. Beà et al. // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol. 25, № 10. – P. 1216-1222.
112. Sander, B. Mantle cell lymphoma – a spectrum from indolent to aggressive disease / B. Sander, L. Quintanilla-Martinez, G. Ott et al. // Virchows Arch. – 2016. – Vol. 468, № 3. – P. 245-257.
113. Sarkozy, C. Complex karyotype in mantle cell lymphoma is a strong prognostic factor for the time to treatment and overall survival, independent of the MCL international prognostic index / C. Sarkozy, C. Terré, F. Jardin et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2014. – Vol. 53, № 1. – P. 106-116.
114. Seabright, M. A rapid banding technique for human chromosomes / M. Seabright // Lancet. – 1971. – Vol. 298, № 7731. – P. 971-972.
115. Seok, Y. CD5-negative blastoid variant mantle cell lymphoma with complex CCND1/ IGH and MYC aberrations / Y. Seok, J. Kim, J.R. Choi et al. // Ann. Lab. Med. – 2012. – Vol. 32. – P. 95-98.

116. Setoodeh, R. Double-hit mantle cell lymphoma with MYC gene rearrangement or amplification: a report of four cases and review of the literature / R. Setoodeh, S. Schwartz, P. Papenhausen et al. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2013. – Vol. 6, № 2. – P. 155-167.
117. Shiller, S.M. CD5-positive, gene and the IGL locus / S.M. Shiller, A. Zieske, H. Holmes et al. // Cancer Genet. – 2011. – Vol. 204, № 3. – P. 162-164.
118. Shipp, M.A. Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high- risk" disease? / M.A. Shipp // Blood. – 1994. – Vol. 83. – P. 1165-1173.
119. Slack, G.W. MYC and aggressive B-cell lymphomas / G.W. Slack, R.D. Gascoyne // Adv. Anat. Pathol. – 2011. – Vol. 18, № 3. – P. 219-228.
120. Swerdlow, S.H. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course / S.H. Swerdlow // Mod. Pathol. – 2013. – Vol. 26. – P. S1-S14.
121. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues / S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris et al. – 4th ed. – Lyon: IARC press, 2008. – P. 229-232.
122. Tandon, B. Nuclear overexpression of lymphoid-enhancer-binding factor 1 identifies chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in small B-cell lymphomas / B. Tandon, L. Peterson, J. Gao et al. // Mod. Pathol. – 2011. – Vol. 24, № 11. – P. 1433-1443.
123. Tirier, C. Simultaneous presence of t(11;14) and a variant Burkitt's translocation in the terminal phase of a mantle cell lymphoma / C. Tirier, Y. Zhang, H. Plendl et al. // Leukemia. – 1996. – Vol. 10. – P. 346-350.
124. Trněný, M. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): A phase 2, randomised, multicentre trial / M. Trněný, T. Lamy, J. Walewski et al. // Lancet Oncology. – 2016. – Vol. 17, № 3. – P. 319-331.
125. Vaishampayan, U.N. Blastic mantle cell lymphoma associated with Burkitt-type translocation and hypodiploidy / U.N. Vaishampayan, A.N. Mohamed, M.C. Dugan et al. // Br. J. Haematol. – 2001. – Vol. 115. – P. 66-68.

126. Vaqué, J.P. B-Cell lymphoma mutations: improving diagnostics and enabling targeted therapies / J.P. Vaqué, N. Martínez, A. Batlle-López et al. // Haematologica. – 2014 – Vol. 99. – P. 222-231.
127. Vega, F. Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin lymphomas / F. Vega, L.J. Medeiros // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2003. – Vol. 127, № 9. – P. 1148-1160.
128. Veloza, L. Mantle cell lymphoma pathology update in the 2016 WHO classification / L. Veloza, I. Ribera-Cortada, E. Campo // Ann. Lymphoma. – 2019. – Vol. 3. – P. 3-3.
129. Ventura, R.A. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue / R.A. Ventura, J.I. Martin-Subero, M. Jones et al. // J. Mol. Diagn. – 2006. – Vol. 8, № 2. – P. 141-151.
130. Vogt, N. The molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma / N. Vogt, B. Dai, T. Erdmann et al. // Leuk Lymphoma. – 2017. – Vol. 58, № 7. – P. 1530-1537.
131. Vose, J.M. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management / J.M. Vose // Am. J. Hematol. – 2017. – Vol. 92, № 8. – P. 806-813.
132. Walther, N. Aberrant lymphocyte enhancer-binding factor 1 expression is characteristic for sporadic Burkitt's lymphoma / N. Walther, A. Ulrich, M. Vockerodt et al. // Am. J. Pathol. – 2013. – Vol. 182, № 4. – P. 1092-1098.
133. Wang, L. MYC rearrangement but not extra MYC copies is an independent prognostic factor in patients with mantle cell lymphoma / L. Wang, G. Tang, L.J. Medeiros et al. // Haematologica. – 2021. – Vol. 106, № 5. – P. 1381-1389.
134. Wang, M.L. Ibrutinib plus Bendamustine and Rituximab in Untreated Mantle-Cell Lymphoma / M.L. Wang, W. Jurczak, M. Jerkeman et al. // New Engl. J. Med. – 2022. – Vol. 386, № 26. – P. 2482-2494.
135. Wang, X. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival / X. Wang, A.C. Asplund, A. Porwit // Br. J. Haematol. – 2008. – Vol. 143, № 2. – P. 248-252.

136. Wlodarska, I. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas / I. Wlodarska, D. Dierickx, V. Vanhentenrijk et al. // Blood. – 2008. – Vol. 111, № 12. – P. 5683-5690.
137. Wlodarska, I. Variant t(2;11)(p11;q13) associated with the IgK-CCND1 rearrangement is a recurrent translocation in leukemic small-cell B non-Hodgkin lymphoma / I. Wlodarska, P. Meeus, M. Stul et al. // Leukemia. – 2004. – Vol. 18, № 10. – P. 1705-1710.
138. Xu, J. Triple-hit blastoid mantle cell lymphoma presenting like acute leukemia / J. Xu, S. Li // Blood. – 2017. – Vol. 129, № 18. – P. 2593.
139. Yi, S. High incidence of MYC and BCL2 abnormalities in mantle cell lymphoma, although only MYC abnormality predicts poor survival / S. Yi, S. Zou, C. Li et al. // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6. – P. 42362-42371.
140. Zhang, L. Cryptic and complex chromosomal rearrangements and the deletion of TP53 gene in a patient with leukemic mantle cell lymphoma / L. Zhang, W.F. Kern, Z. Yu et al. // Cancer Genet Cytogenet. – 2006. – Vol. 169. – P. 169-173.
141. Zhang, X. Myc Represses miR-15a/miR-16-1 Expression Through Recruitment of HDAC3 in Mantle Cell and Other non-Hodgkin B-cell Lymphomas / X. Zhang, X. Chen, J. Lin et al. // Oncogene. – 2012. – Vol. 31, № 24. – P. 3002-3008.
142. Zhou, J. An Uncommon Case of Double-Hit Mantle Cell Lymphoma That Demonstrates a Transformation Process / J. Zhou, L. Hu, M. Zuo et al. // Am. J. Clin. Pathol. – 2020. – Vol. 153, № 1. – P. 49-57.