

<https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

# ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДА DSP30 В СОЧЕТАНИИ С ИНТЕРЛЕЙКИНОМ-2 ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Кислицына М. А.<sup>\*</sup>, Обухова Т. Н., Алимова Г. А., Шишигина Л. А., Гребенюк Л. А., Абрамова Т. В., Горячева С. Р., Моисеева Т. Н.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Цель работы** — оценить эффективность использования DSP30 в сочетании с IL2 при культивировании клеток крови/костного мозга/лимфоузла больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) для выявления клональных нарушений кариотипа.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 50 больных ХЛЛ. Всем больным выполнено стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) (46 больных — с DSP30 + IL2 и LPS + TPA; 4 больных — только с DSP30 + IL2) и FISH с ДНК-зондами для выявления трисомии 12, делеций 13q14, 11q22, 17p13.

**Результаты.** При культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA СЦИ успешно выполнено 41 (82 %) и 38 (83 %) больным: aberrantный кариотип — у 36 (72 %) и 15 (33 %), комплексные нарушения кариотипа — у 13 (26 %) и 5 (11 %) соответственно. Выявлено достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA ( $V = 490,5$ ,  $p < 0,05$ ). У 6 больных при СЦИ выявлены сбалансированные транслокации, у 4 из них — с вовлечением локуса IgH/14q32, подтвержденные FISH, у 11 — несбалансированные транслокации, у 6 — сочетания транслокаций. В 5 случаях выявленные при FISH делеции 13q14, 11q22, 17p13 по результатам СЦИ сопровождалась сбалансированными/несбалансированными транслокациями в этих локусах. Несбалансированная t(12;16)(q14;q23) — случай частичной трисомии — выявлена только при культивировании с DSP30 и IL2.

**Заключение.** Частота выявления aberrantного кариотипа у больных ХЛЛ более чем в два раза выше при культивировании с DSP30 + IL2, чем с LPS + TPA. СЦИ является важным методом, позволяющим уточнять структуру хромосомных нарушений, в частности выявлять транслокации и выделять группу больных самого высокого риска ХЛЛ — с комплексными нарушениями кариотипа для определения тактики их лечения.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, стандартное цитогенетическое исследование, комплексный кариотип, олигонуклеотид DSP30, интерлейкин-2

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Кислицына М.А., Обухова Т.Н., Алимова Г.А., Шишигина Л.А., Гребенюк Л.А., Абрамова Т.В., Горячева С.Р., Моисеева Т.Н. Эффективность использования олигонуклеотида DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 для выявления хромосомных aberrаций у больных хроническим лимфолейкозом. *Гематология и трансфузиология*. 2019; 64(1): 21–34. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

# EFFICACY OF OLIGONUCLEOTIDE DSP30 IN COMBINATION WITH INTERLEUKIN-2 FOR THE DETECTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Kislitsyna M. A.\*, Obukhova T. N., Alimova G. A., Shishigina L. A., Grebenyuk L. A., Abramova T. V., Goryacheva S. R., Moiseeva T. N.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**Aim.** To evaluate the efficacy of DSP30 in combination with IL2 in cultivating blood cells/bone marrow/lymph nodes in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients to detect clonal abnormalities.

**Materials and methods.** The study included 50 patients with CLL, all of whom underwent both chromosome banding analysis (CBA) (46 patients with DSP30+IL2 and LPS+TPA; 4 patients with only DSP30+IL2) and FISH with DNA probes to detect trisomy 12 and deletions of 13q14, 11q22 and 17p13.

**Results.** Under cell cultivation with DSP30+IL2 and LPS+TPA, CBA was successfully performed in 41 (82 %) and 38 (83 %) patients. Chromosome aberrations were observed in 36 (72 %) and 15 (33%) cases, while a complex karyotype was detected in 13 (26%) and 5 (11%) cases, respectively. A significant difference was found between the number of metaphases with chromosomal abnormalities obtained by cultivation with DSP30+IL2 and LPS+TPA ( $V = 490.5$ ,  $p < 0.05$ ). CBA revealed balanced translocations in 6 patients, with the involvement of the IgH/14q324 locus being confirmed in 4 cases. Unbalanced translocations and various combinations of translocations were detected in 11 and 6 patients, respectively. In 5 cases, according to CBA, the results of 13q14, 11q22, 17p13 deletions identified by FISH were accompanied by balanced or unbalanced translocations in these loci. Unbalanced  $t(12;16)(q14;q23)$  — a case of partial trisomy — was detected only by CBA with DSP30+IL2.

**Conclusions.** An abnormal karyotype was detected in CLL patients twice as more frequently under cultivation with DSP30+IL2 compared to LPS+TPA. CBA is an important method allowing the structure of chromosomal abnormalities to be specified and translocations to be identified. As a result, patients running the highest risk of CLL — those with a complex karyotype — can be singled out for selecting an optimal strategy of their management.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia (CLL), chromosome banding analysis (CBA), complex karyotype, CpG-oligonucleotide DSP30, interleukin-2

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial disclosure:** the study had no sponsorship.

**For citation:** Kislitsyna M.A., Obukhova T.N., Alimova G.A., Shishigina L.A., Grebenyuk L.A., Abramova T.V., Goryacheva S.R., Moiseeva T.N. Efficacy of oligonucleotide DSP30 in combination with Interleukin-2 for the detection of chromosomal aberrations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya)*. 2019; 64(1): 21–34 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-1-21-34>

## Введение

На долю хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) приходится около четверти случаев всех лейкозов и неходжкинских лимфом среди взрослого населения европейских стран [1]. ХЛЛ отличается гетерогенностью клинических проявлений — от бессимптомного

или медленно прогрессирующего до агрессивного течения с показаниями к началу специфической терапии [1, 2]. Для стратификации больных на группы риска и определения подходов к лечению применяются различные параметры: системы стадирования по Binet

и Rai, возраст, время удвоения абсолютного количества лимфоцитов, концентрация  $\beta 2$ -микроглобулина, экспрессия CD38 и ZAP70, мутации генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (мутационный статус) и цитогенетические нарушения [1, 3]. В клинической практике используется международный прогностический индекс (МПИ, CLL-IPI), для которого необходимо исследование делеции 17p13/TP53. Однако, согласно рекомендациям международной рабочей группы по исследованию ХЛЛ (iwCLL), для оценки прогноза важно использовать данные о других генетических нарушениях [1].

Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зондов к локусам известных хромосомных aberrаций позволяет выявлять хромосомные нарушения у 80 % больных ХЛЛ. Наиболее часто встречающимися хромосомными aberrациями являются делеция 13q14 — 51–57 % случаев, делеция 11q22/ATM — 12–20 %, трисомия хромосомы 12 — 16 %, делеция 17p13/TP53 — 7 % [4, 5]. В 2000 г. Döhner и соавт. [5] предложили иерархическую прогностическую модель ХЛЛ на основании анализа общей выживаемости больных с характерными хромосомными aberrациями, выявленных при FISH-исследовании. Медиана общей выживаемости в группе с делецией 17p составила 32 месяца, с делецией 11q — 79 месяцев, с трисомией хромосомы 12 — 114 месяцев, с отсутствием aberrаций — 111 месяцев, с изолированной делецией 13q — 133 месяца [5]. На сегодняшний день иерархическая модель ХЛЛ сохраняет свою актуальность [6]. Однако изменения кариотипа при ХЛЛ не ограничиваются этими хромосомными нарушениями.

Выявление хромосомных aberrаций при ХЛЛ с помощью стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) затруднено в связи с крайне низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов [7]. Применение стандартных стимуляторов деления В-лимфоцитов, таких как липополисахарид (LPS) и 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА), значительно увеличивает количество делящихся опухолевых клеток. Клональные хромосомные aberrации выявляются не более чем у половины больных [7–9].

В исследованиях Decker и соавт. [10] было показано иммуностимулирующее влияние на деление клеток ХЛЛ CpG-олигонуклеотида DSP30 за счет активации внутриклеточных сигнальных путей, приводящей к пролиферации опухолевых В-клеток, продукции цитокинов, секреции иммуноглобулина на поверхности клетки и экспрессии таких молекул, как CD25, CD80, CD86. Увеличение на мембране клеток ХЛЛ костимулирующих молекул CD80, CD86 приводит к активации Т-лимфоцитов, которые способствуют формированию специфического микроокружения опухолевых В-лимфоцитов [11]. Молекула CD25 представляет

собой вариативный домен комплекса рецептора к интерлейкину-2 и определяет высокое сродство к этому цитокину. Добавление интерлейкина-2 (IL-2) при стимуляции клеток CpG-олигонуклеотидом DSP30 усиливает пролиферацию клеток ХЛЛ [10, 12].

В ряде клинических исследований была показана эффективность использования сочетания CpG-DSP30 и IL-2 в качестве стимулятора деления В-лимфоцитов для исследования кариотипа больных ХЛЛ [4, 13]. В исследовании Haferlach и соавт. [4] при стимулировании DSP30 и IL-2 СЦИ успешно выполнено 98 % больным, из них aberrантный кариотип выявлен в 83 % случаев и комплексные нарушения кариотипа (3 и более хромосомных нарушения) обнаружены в 21 % случаев. Результаты наших предыдущих исследований и данные литературы свидетельствуют о независимом неблагоприятном прогностическом значении комплексных нарушений кариотипа [9, 14, 15].

Наличие делеции 17p13/TP53 является неблагоприятным прогностическим фактором. Потеря гена TP53, выявляемая при FISH-исследовании у больных ХЛЛ, коррелирует с коротким временем до начала терапии, низкой общей выживаемостью и резистентностью к стандартной иммунохимиотерапии [16–18]. Применение новых таргетных препаратов, таких как ибрутиниб и венетоклак, улучшает эффективность лечения больных с делецией 17p13 [19–21]. В ряде исследований показана высокая ассоциация делеции 17p с комплексным кариотипом: в 65–80 % случаев делеция 17p выявляется в составе комплексного кариотипа [4, 14]. Однако в исследовании Thompson и соавт. [14] многофакторный анализ результатов лечения ибрутиниб-содержащими схемами больных с резистентным и рецидивирующим течением ХЛЛ показал независимое негативное влияние на бессобытийную и общую выживаемость комплексного кариотипа вне зависимости от наличия делеции 17p, выявленной при FISH-исследовании. В работе Anderson и соавт. [22] показано, что комплексный кариотип является доминирующим фактором риска прогрессии ХЛЛ у больных при лечении венетоклаксом.

Ряд исследователей выделяет в отдельную группу риска больных ХЛЛ с выявленными при кариотипировании транслокациями [15, 23, 24]. В работе Maugt и соавт. [25] впервые было показано, что наличие любых транслокаций неблагоприятно влияет на течение ХЛЛ. Транслокации встречаются примерно у 30 % больных ХЛЛ как в составе комплексного кариотипа, так и в виде единственного нарушения [15, 23, 24]. В кариотипе они могут быть представлены в виде сбалансированных и несбалансированных транслокаций. [26]. В составе комплексного кариотипа чаще встречаются несбалансированные транслокации. В исследовании Rigolin и соавт. [24] было выявлено, что несбалансированные транслокации влияют

на общую выживаемость и время до начала терапии у больных ХЛЛ.

Особое внимание среди сбалансированных перестроек занимают транслокации с вовлечением генов тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGH*) в регионе 14q32. Данные транслокации встречаются в 5–7 % случаев ХЛЛ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом. По мнению авторов, больные с транслокациями *IGH* представляют собой отдельную группу с морфологическими особенностями, такими как плазматизация цитоплазмы опухолевых лимфоцитов и наличие пролимфоцитов [26–28].

Таким образом, актуальным остается исследование кариотипа больных ХЛЛ для изучения спектра и частоты встречаемости отдельных хромосомных аномалий и выявления комплексных нарушений кариотипа для формирования групп риска и разработки индивидуальных подходов к лечению.

**Целью** настоящей работы являлась оценка эффективности использования DSP30 в сочетании с IL2 при культивировании клеток крови/костного мозга/лимфоузла больных ХЛЛ для выявления клональных нарушений кариотипа.

## Материалы и методы

В исследование включены 50 больных ХЛЛ, наблюдавшихся в ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России в период с марта 2016 по декабрь 2017 г.: 34 мужчины и 16 женщин в возрасте от 35 до 86 лет (медиана возраста — 58 лет). Диагноз ХЛЛ был установлен на основании данных проточной цитометрии. На опухолевых клетках выявлялась экспрессия CD5, CD19, CD23, слабая экспрессия CD20 и поверхностного иммуноглобулина. СЦИ и флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) выполнены 31 больному до начала терапии и 19 больным, получавшим лечение, с резистентным и рецидивирующим течением заболевания. Всем 50 больным выполнено СЦИ и FISH.

**СЦИ.** При культивировании в 39 случаях исследовали клетки периферической крови, в 10 — клетки костного мозга, в 1 — клетки биоптата лимфоузла. Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки в соотношении 4:1, L-глутамин в конечной концентрации 0,584 мг/мл, антибиотика гентамицина в конечной концентрации 0,28 мг/мл с двумя комбинациями митогенов: (1) DSP30 + IL2 — иммуностимулятором деления олигонуклеотидом DSP30 в конечной концентрации 2 нмоль/мл (TibMolBiol, Германия) и 200 Ед/мл интерлейкином-2 (IL2, Sigma-Aldrich, США) (DSP30 + IL2); (2) LPS + TPA — стимулятором деления В-лимфоцитов липополисахаридом LPS *E.coli* (SIGMA, США) в конечной концентрации 0,01 мг/мл и TPA в конечной концентрации 0,01 нг/мл (SIGMA, США). Культивировали при температуре

37 °С в течение 72 часов, последние 17 часов с добавлением коллемеда (KaryoMAX, Gibco, США) 0,15 г/мл среды. Обработку гипотоническим раствором, фиксацию клеток и приготовление препаратов хромосом проводили по стандартной методике. 46 больным были выполнены 2 серии постановки культур, 4 больным — только с DSP30 и IL2. G-дифференциальную окраску хромосом осуществляли по методике Seabright, 1971 г. [29] с модификациями. Кариотип описывали в соответствии с Международной цитогенетической номенклатурой ISCN, 2016 [30]. По возможности анализировали 20 метафаз.

**FISH.** Мононуклеары периферической крови (костного мозга) выделяли на градиенте плотности 1,077 раствора Lympho Separation Medium (LSM, “ISN Biomedicals”). При FISH-анализе исследовали мононуклеары периферической крови у 48 больных, костного мозга — у одного больного, клетки биоптата лимфоузла — у одного больного. В работе использовали многоцветный зонд: P53(TP53)/ATM and D13S319/13qter/12cen CLL PROFILER Kit (“Aquarius@Cytocell”, Великобритания). Для подтверждения перестройки локуса гена тяжелой цепи Ig (14q32) 4 больных использовали ДНК-зонд: Vysis LSI *IGH* Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott, США). Для подтверждения перестройки локуса гена легкой цепи (2p11) 1 больному выполнено FISH-исследование с ДНК-зондом XL 2p11 *IGK* BA Break Apart Probe (Metasystems, США).

**Статистический анализ.** Статистический анализ проводили с использованием программы для статистической обработки данных R 3.5.0 (Lucent Technologies, США) и Excel 2016 (Microsoft, США). Для сравнения результатов кариотипирования двух серий культур с DSP30 + IL2 и LPS + TPA применяли парный тест Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

В результате культивирования с DSP30 + IL2 СЦИ успешно выполнено 41 (82 %) больному (табл. 1). Аберрантный кариотип выявлен у 36 (72 %) больных: у 15 (30 %) из них была найдена одна аберрация, у 8 (16 %) — две и у 13 (26 %) — три или более аберраций (комплексные нарушения кариотипа) (рис. 1). Нормальный кариотип выявлен у 5 (10 %) больных, но у 3 из них при FISH-исследовании были выявлены аберрации: у 2 — делеция 13q, у одного — делеция 11q (табл. 3, № 14, 31, 40). В одном случае при отсутствии митозов в культуре с DSP30 + IL2 хромосомные нарушения были выявлены при культивировании с LPS + TPA (табл. 3, № 48).

При культивировании с LPS + TPA кариотипирование успешно выполнено 38 (83 %) больным (табл. 1). Аберрантный кариотип в культуре с LPS + TPA

**Таблица 1.** Результаты культивирования опухолевых клеток с DSP30 + IL2 и LPS + TPA у больных ХЛЛ**Table 1.** Cultivation of tumour cells with DSP30 + IL2 and LPS + TPA in patients with CLL

Стимуляторы деления B-cell division stimulators	Количество больных Number of patients	Наличие митозов, количество больных (%) Presence of mitoses, number of patients, (%)	Аберрантный кариотип, количество больных (%) Aberrant karyotype, number of patients (%)	Комплексный кариотип, количество больных (%) Complex karyotype, number of patients (%)
DSP30 + IL2	50	41 (82)	36 (72)	13 (26)
LPS + TPA	46	38 (83)	16 (35)	5 (11)

**Таблица 2.** Частота хромосомных нарушений, выявленных при культивировании DSP30 + IL2, LPS + TPA и методом FISH у больных ХЛЛ**Table 2.** Frequency of chromosomal abnormalities detected by the cultivation of DSP30 + IL2, LPS + TPA and the FISH method in patients with CLL

Хромосомные нарушения Chromosomal abnormalities	DSP30 + IL2, количество больных (%) DSP30 + IL2, number of patients (%)	LPS + TPA, количество больных (%) LPS + TPA, number of patients (%)	FISH, количество больных (%) FISH, number of patients (%)
del(11)(q22)	13 (26)	6 (13)	17 (34)
Трисомия 12 Trisomy 12	8 (16)	4 (8)	7 (14)
del(13)(q14)	7 (14)	2 (4)	19 (38)
del(17)(p13)	7 (14)	4 (8)	9 (18)
Комплексный кариотип Complex karyotype	13 (26)	5 (11)	2 (4)

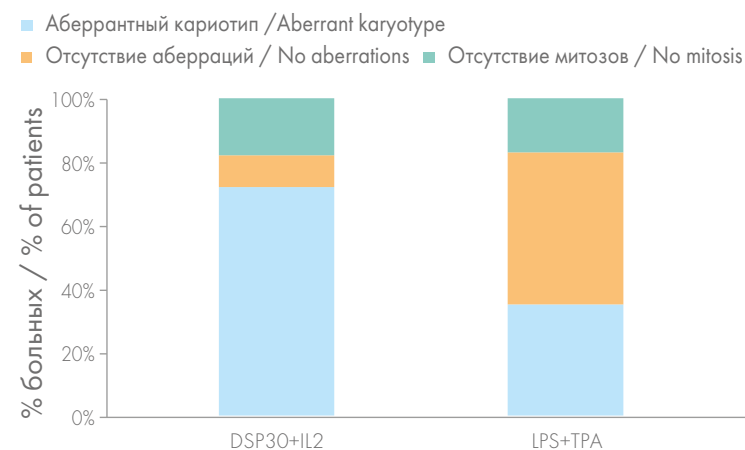
выявлен только в 16 (35 %) случаях: в 7 (15 %) из них найдена одна аберрация, в 4 (9 %) — две и в 5 (11 %) — комплексные нарушения кариотипа (рис. 1). Нормальный кариотип выявлен у 22 (48 %) больных, но у 14 из них при культивировании с DSP30 + IL2 были выявлены аберрации. У 14 (28 %) больных с нормальным

кариотипом в культуре с LPS + TPA при культивировании с DSP30 + IL2 выявлены клональные хромосомные аберрации: у 4 — комплексные нарушения кариотипа, у 3 — делеция 13q (у одного — с t(13;18)(q14;p11)), у 2 — трисомия 12, у одного — делеция 17p, у одного — делеция 11q и 13q, у одного — делеция 11q, у одного — делеция 6q, у одного — сбалансированная и несбалансированная транслокации с участием хромосомы 8 (табл. 3, № 3, 12, 13, 15, 17, 20, 21, 23, 24, 37, 39, 41, 42, 49).

У 7 из 14 больных в культуре с LPS + TPA хромосомные аберрации были выявлены только в одной из 20 метафаз (неклональные нарушения), при этом в культуре с DSP30 + IL2 они обнаружены в среднем в 60 % метафаз.

Показано достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA (критерий Вилкоксона,  $p = 0,000023$ ). При FISH-исследовании хромосомные нарушения были выявлены у 41 из 50 больных (82 %): у 32 — одна аберрация, у 7 — 2 аберрации, у 2 — комплексный кариотип.

В группе больных до начала терапии хромосомные аберрации выявлены у 21 из 31 (68 %) больного в культуре с DSP30 + IL2 и у 8 (26 %) в культуре с LPS + TPA. Комплексные нарушения кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 выявлены в 5 случаях (16 %), в культуре с LPS + TPA — в одном случае. В группе больных, получающих терапию, у большинства из которых отмечалось рецидивирующее и резистентное течение,



**Рисунок 1.** Частота выявления аберрантного кариотипа методом СЦИ с использованием двух комбинаций митогенов: DSP30 + IL2 и LPS + TPA у больных ХЛЛ. СЦИ — стандартное цитогенетическое исследование; DSP30 + IL2 — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с олигонуклеотидом DSP30 и с интерлейкином-2; LPS + TPA — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с В-клеточными митогенами LPS и TPA

**Figure 1.** Frequency of chromosomal aberrations detected by chromosome banding analysis with DSP30 + IL2 and LPS + TPA in CLL patients. All of 50 CLL cases analyzed by chromosome banding analysis: share of patients showing the presence of chromosome abnormalities and the absence of aberrations and mitosis in culture with DSP30+IL2 compared to that with LPS+TPA



**Таблица 3.** Результаты культивирования с использованием DSP30 + IL2, LPS + TPA и FISH-исследования у больных ХЛЛ**Table 3.** Results of chromosome banding analysis using DSP30 + IL2, LPS + TPA and FISH in patients with CLL

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
1	47,XY, + 12[19]/45,XY,-3[1]		-	-	+	-
2	46,XX,del(11)(q22)[11]/46,XX[14]		-	+	-	-
3	46,XX, + 12[2]/46,XX[25]	46,XX[5]	-	-	+	-
4	46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(11)(q22),del(13)(q14q31)[2]/ 47,XX,idem, + mar[12]/47,XX,del(13)(q14q31), + mar[1]/ 46,XX,del(11)(q22),del(13)(q14q31)[1]/46,XX,del(13)(q14q31)[1]/46,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(13)(q14q31)[1]/46,XX[2]	47,XX,t(2;12)(q13;p12-13),del(11)(q22),del(13)(q14q31), + mar[2]/46,XX,del(11)(q22),del(13)(q14q31)[1]/46,XX,del(13)(q14q31), + mar[1]/46,XX[16]	+	+	-	-
5	46,XY,t(6;14)(p21;q32)[19]/46,XY[1]	46,XY,t(6;14)(p21;q32)[19]/46,XY[1]	-	-	-	-
6	41,X,-Y,der(2),add(7)(p21-22),-8,add(8)(p22-23),-9,t(13;21)(q21;q22),-17,add(19)(q13),-22[5]/41,X,-Y,idem,add(1)(p35-36) or t(1;3)(p35-36;p13),-15, + mar[1]	41,X,-Y,der(2),-8,add(8)(p22-23),-9,t(13;21)(q21;q22),-17,add(19)(q13),-22[1]/41,X,-Y,idem,add(7)(p21-22)[4]/36,X,-Y,idem,-3,-4x2,add(7)(p21-22),t(7;11)(q22;p13)-13,-21[1]/31,X,-Y,idem,inv(1)(p36q21)-3,-4,-6,-13x2,-16,-18x2,-19,-20[1]/41,X,-Y,idem,del(5)(q33) or t(5;11)(q33;p14),add(7)(p21-22),add(11)(p14)[1]	-	-	-	+
7	46,XY,del(17)(p11)[6]/46,XY,add(17)(p11)[4]/46,XY,t(14;17)(q10;q10)[1]/45,XY,t(3;7)(q10;p10)[1]/46,XY[8]	45,XY,der(12)t(12;17)(q24;q21),-17[7]/46,XY,del(17)(p11)[4]/46,XY,add(17)(p11)[2]/46,XY[7]	-	-	-	+
8	46,XX,del(13)(q11q14)[4]/46,XX[16]	46,XX,del(13)(q11q14)[3]/46,XX[17]	+	-	-	-
9	[0]	46,XX,t(8;16)(q23;q24)[1]/46,XX[19]	+	-	-	-
10	47,XX,t(9;14)(p13;q31-32), + 12[5]/46,XX[5]	47,XX,t(9;14)(p13;q31-32), + 12[4]/46,XX[16]	-	-	+	-
11	[0]	46,XX[6]	-	-	-	-
12	44,XY,del(3)(p22),-8,-11,add(11)(p14),add(16)(q24),add(17)(p13), + mar[cp3]/45,XY,-11,add(17)(p13)[cp4]/44~45,XY,add(4)(q35),-11,-13,-17, + dic(2;13;17),add(17)(p13),del(17)(p13), + mar[cp6]/46,XY[2]	44,XY,-3,-11,add(11)(p13),add(16)(q24),add(17)(p13)[1]/46,XY[10]	-	-	-	+
13	46,XX,9qh + ,add(11)(q22),del(13)(q14q22)[20]	46,XX,9qh + ,add(11)(q22),del(13)(q14q22)[1]/46,XX[19]	+	+	-	-
14	46,XY,2del(13)(q12q14)x2[1]/46,XY[2]	[0]	+6	-	-	-
15	45,X,-Y,del(10)(q24),del(11)(q22),add(13)(q34)[2]/46,XY[28]	45,X,-Y,del(10)(q24),del(11)(q22),add(13)(q34)[1]/46,XY[19]	+6	+	-	-
16	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q23)[6]/46,XY,del(5)(q15q33)[9]/46,XY[5]	46,XY,der(16)t(12;16)(q14;q23)[18]/46,XY[2]	-	-	-	-
17	46,XY,del(13)(q12q14)[4]/46,XY[16]	45,X,-Y,del(13)(q12q14)[1]/46,XY[19]	+	-	-	-
18	[0]	46,XX[20]	+	-	-	-
19	45,XY,1qh + c2,der(2)x2,add(4)(p15-16),-8[3],del(9)(p21) or t(4;9)(p15-16;p21)[cp6]	[0]	-	-	-	-

Продолжение таблицы 3 на с. 27

Продолжение таблицы 3

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
20	46,XX,t(2;14)(p14-15;q31-32),der(7)(p12->q36::p13->pter),add(8)(p23),del(11)(q22),-13, + mar or der(13)[9]/46,XX[6]	46,XX[20]	-	+	-	-
21	47,XY,inv(9)(p13q21),del(11)(q22), + 12,t(12;18)(q10;p10)[4]	47,XY,inv(9)(p13q21),del(11)(q22), + 12,t(12;18)(q10;p10)[1]/47,XY,inv(9)(p13q21), + 12[1]/46,XY[3]	+	+	+	-
22	44,XY,add(2)(q37),add(7)(q22) or dup(7)(q11q36),del(8)(q22),der(13)t(13;2)(q21;2),del(14)(q21) or mar,-17,-18,-21, + mar[18]/44,XY,idem,del(1)(q31)[1]/44,XY,t(11;15)(p15;q22),-15,-20[1]	44,XY,add(2)(q37),add(7)(q22) or dup(7)(q11q36),del(8)(q22),der(13)t(13;2)(q21;2),del(14)(q21) or mar,-17,-18,-21, + mar[8]/44,XY,der(11)t(11;15)(p15;q22),-15,-20[1]/46,XY,der(2)t(2;11)(q32;q13)[1]/46,XY[10]	-	-	-	+
23	46,XX,del(6)(q22)[19]/46,XX[1]	46,XX[20]	-	-	-	-
24	46,XY,del(6)(q22),add(17)(p13)[13]/46,XY[2]	46,XY[20]	-	-	-	+
25	46,XX,del(11)(q22)[14]/45,XX,-4,add(8)(p23),del(11)(q22),add(15)(p13)[5]/45,XX,del(3)(q24-25),add(7)(p22) or t(3;7)(q24-25;p22),-10[1]	46,XX,del(11)(q22)[4]/45,XX,-4,add(8)(p23),del(11)(q22),add(15)(p13)[1]/46,XX[15]	-	+	-	-
26	[0]	[0]	-	+	-	-
27	[0]	[0]	-	+	-	-
28	46,XY,del(11)(q22)[14]/46,XY[6]	46,XY,del(11)(q22)[3]/46,XY,t(6;13)(p24;q14),del(11)(q22)[1]/46,XY[16]	-	+	-	-
29	47,XY, + 12[14]/46,XY[1]	47,XY, + 12[2]/46,XY[8]	+	-	+	-
30	[0]	[0]	+	-	-	-
31	46,XX[8]	46,XX[19]/46,XX,t(7;12)(q22;q24)[1]	-	+	-	-
32	[0]	46,XY[20]	+	-	-	-
33	[0]	46,XX[20]	-	-	-	-
34	46,XY,t(2;7)(q31-32;q36),del(11)(q13)[3]/46,XY[17]	46,XY,t(2;7)(q31-32;q36),del(11)(q13)[2]/47,XY, + mar[1]/45,XY,-13,-14,-20, + mar1 + mar2[1]/46,XY[16]	+	+	-	-
35	46,XY,del(11)(q22)[4]/46,XY,4,del(11)(q22), + r(4)(p10q28)[12]/46,XY,-4[1],del(4)(q26q34)[1],del(7)(q11)[1],der(6)add(p25)del(q14)[1],-7[1],del(7)(q22)[1],del(11)(q22)[6],t(11;13)(p15;q21)[1],add(22)(q13)[1], + r(4)(p10q28)[3], + 2mar[1][cp7]	46,XY,del(11)(q22)[3]/46,XY,-4,del(11)(q22), + r(4)(p10q28)[4]/46,XY,t(1;7)(q32;q36)[1],-2[1],-4[2],der(6)add(p25)del(q14)[1],-7[1],del(11)(q22)[2], + r(4)(p10q28)[2], + 2mar[1][cp3]/46,XY[10]	-	+	-	-
36	46,XY,t(14;19)(q32;q13)[18]/46,XY,del(1)(p31),t(14;19)(q32;q13)[2]	-	-	-	-	+
37	47,XY, + 12[12]/46,XY[8]	46,XY[20]	-	-	+	-
38	46,XY,del(11)(q22)[11]/46,XY,del(17)(p11-12),-18[6]/45,XY,der(3),-4,del(17)(p11-12),-18, + mar or ?del(4)(q22)[7]/45,XY,add(2)(q37),del(17)(p11-12),-18[2]/44,XY,-3,-16,del(17)(p11-12),-18, + dic[1]/44,XY,-2,-16,del(17)(p11-12),-18, + dic[1]/46,XY[2]	46,XY,del(11)(q22)[4]/45,XY,der(3),-4,del(17)(p11-12),-18, + mar or ?del(4)(q22)[3]/46,XY[10]	+ 6	+	-	+

Продолжение таблицы 3 на с. 28

№	DSP30 + IL2	LPS + TPA	FISH			
			del 13	del 11	tris 12	del 17
39	46,XX,add(8)(q24),t(8;10)(q21;p14-15)[10]/46,XX,del(4)(p14)[2]/46,XX[8]	46,XX[20]	+	+	-	-
40	46,XY[20]	46,XY[20]	+	-	-	-
41	46,XY,del(13)(?q14q34)[3]/46,XY[7]	46,XY,del(13)(?q14q34)[1]/46,XY[9]	+6	-	-	-
42	46,XY,del(11)(q22)[11]/46,XY[9]	46,XY[20]	-	+	-	-
43	46,XY,del(11)(q22)[4]/46,XY[13]	[0]	-	+	-	-
44	[0]	[0]	+6	-	-	-
45	45,XY,-17[9]/45,XY,del(6)(q13),-17[4]/44~45,XY,+3,del(3)(q13),del(3)(p13),del(6)(q13),add(7)(p15),add(9)(p21),?del(13)(q12q21),-13x2,-17,-19,+mar[cp2]/44,XY,del(6)(q22),del(9)(p21),-13,-17[2]/42~44,XY,del(1)(q22),-5,-11,-17,-18,-20,+2mar[cp2]/45,XY,t(9;14)(p13;q31-32)[1]	[0]	-	-	-	+
46	43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10)[20]	-	-	-	-	-
47	46,XY[9]	46,XY[20]	-	-	-	-
48	46,XY[20]	46,XY,del(1)(q31)[11]/46,XY[9]	-	-	-	-
49	46,XY,t(13;18)(q14;p11),add(15)(q26)[4]/46,XY,del(13)(q14q21)[2]/46,XY[14]	46,XY,del(13)(q14q21)[1]/46,XY[19]	+	-	-	-
50	47,XY,+12[6]/48,XY,+5,+12[9]/47,XY,t(1;4)(?p31;q33-q34),+12[2]/47,XY,+12,add(19)(q13)[1]/48,XY,+12,+mar[1]/48,XY,+11,+12[1]	47,XY,+12[4]/48,XY,+5,+12[4]/46,XY[9]	-	-	+	-

Примечание. DSP30 + IL2 — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с олигонуклеотидом DSP30 и с интерлейкином-2; LPS + TPA — культивирование опухолевых клеток ХЛЛ с В-клеточными митогенами LPS и TPA; FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*; del 13 — делеция 13q14, 6 — биаллельная делеция 13q14; del 11 — делеция 11q22, tris 12 — трисомия хромосомы 12, del 17 — делеция 17p13.

Note. DSP30+IL2 — cultivation of CLL tumour cells with oligonucleotide DSP30 and Interleukin-2; LPS+TPA — cultivation of CLL tumour cells with B-cell mitogens LPS and TPA; FISH — fluorescence *in situ* hybridization; del 13 — deletion 13q14, b — biallelic deletion 13q14; del 11 — deletion 11q22, tris 12 — trisomy of chromosome 12, del 17 — deletion 17p13.

хромосомные aberrации выявлены у 16 из 19 (84 %) в культуре с DSP30 + IL2 и у 7 (44 %) в культуре LPS + TPA. Комплексные нарушения кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 выявлены у 8 (42 %), в культуре с LPS + TPA — у 4 (25 %).

Частота выявления комплексного кариотипа в культуре с DSP30 + IL2 составила 13 (26 %), в культуре с LPS + TPA — 5 (11 %), методом FISH — 2 (4 %) (табл. 2). Из 13 больных с комплексными нарушениями в культуре с DSP30 + IL2 при FISH-исследовании aberrации или не были выявлены (3 случая), или выявлены 1–2 аномалии (8 случаев). Делеция 17p методом FISH определена менее чем у половины больных с комплексными нарушениями кариотипа (5 из 13), у 4 из них изолированно. У 6 из 8 больных с комплексным кариотипом без делеции 17p обнаружена делеция 11q (табл. 2).

При СЦИ были выявлены различные структурные aberrации, не входящие в стандартную диагностическую панель при FISH-исследовании. В 11 случаях

выявлены несбалансированные транслокации, в 6 — сбалансированные транслокации, (в 4 из них — с вовлечением локуса генов *IGH/14q32*), в 6 — сочетания сбалансированных и несбалансированных транслокаций. Несбалансированные транслокации в повторяющихся точках разрыва хромосом (2q, 7p, 8p, 17p, 15q, 19q) чаще выявлялись в составе комплексного кариотипа — 10 из 17 (59 %) случаев. Среди сбалансированных транслокаций кроме транслокаций с вовлечением локуса *IGH/14q32* выявлены следующие: t(1;4)(?p31;q33-q34), t(2;7)(q31-32;q36), t(2;12)(q13;p12-13), t(12;18)(q10;p10), t(13;18)(q14;p11), t(13;21)(q21;q22), t(14;17)(q10;q10).

В кариотипе у 4 больных выявлены сбалансированные транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32): t(6;14)(p21;q32), t(9;14)(p13;q31-32), t(2;14)(p14-15;q31-32), t(14;19)(q32;q13) (табл. 3, № 5, 10, 20, 36). Во всех 4 случаях перестройка локуса генов *IGH* подтверждена методом FISH.



У 5 больных выявленные при FISH делеции 13q14, 11q22 и 17p13 по результатам СЦИ сопровождались сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах: у 2 больных в кариотипе выявлены несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 11q22 и 17p13 (табл. 3, № 13, 24); у одного больного в разных субклонах выявлены делеция 13q14 и t(13;18)(q14;p11) (табл. 3, № 49); у 2 больных в разных субклонах выявлены различные хромосомные aberrации — делеции, сбалансированные и несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 17p13/*TP53* (табл. 3, № 7, 12). У одного больного (табл. 3, № 7) с потерей локуса гена *TP53* по результатам FISH-исследования в двух культурах выявлены различные хромосомные aberrации с участием хромосомы 17: в культуре с DSP30 + IL2 выявлена t(14;17)(q10;q10), в культуре с LPS + TPA — несбалансированная t(12;17)(q24;q21) и моносомия 17. У одного больного с трисомией 12, выявленной при FISH-исследовании, одна из хромосом 12 по результатам СЦИ вовлечена в t(12;18)(q10;p10) (табл. 3, № 21). У одного больного при отсутствии трисомии по результатам FISH в культуре с DSP30 + IL2 выявлена несбалансированная t(12;16)(q14;q23) — случай частичной трисомии 12, то есть наличие дополнительного длинного плеча хромосомы 12, подтвержденное при FISH с использованием ДНК-зонда к локусу гена *MDM2/12q15* (табл. 3, № 16).

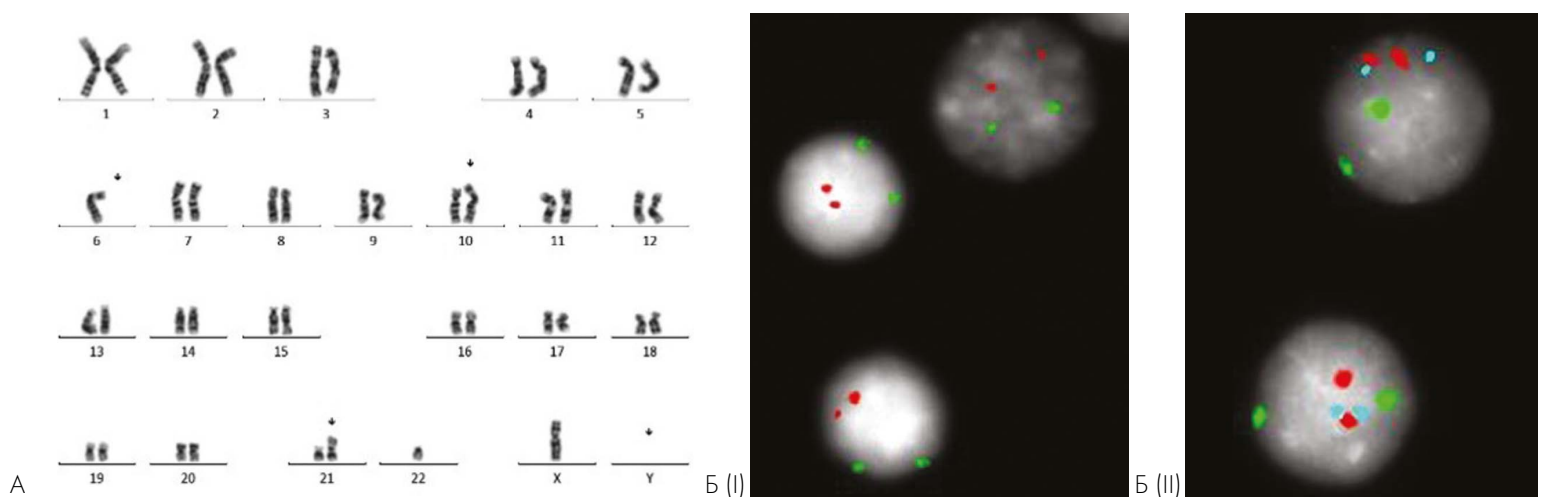
Выявляемость характерных для ХЛЛ хромосомных нарушений методом FISH, методом СЦИ при культивировании с DSP30 + IL2 и методом СЦИ при культивировании с LPS + TPA составила: для делеции 13q14 — 38 % (10 % — биаллельная делеция), 14 и 13 %; для делеции 11q22 — 34, 26 и 4 %; для трисомии 12 — 14, 16 и 8 %; для делеции 17p13 — 18, 14 и 8 %

соответственно. Комплексные нарушения в кариотипе при культивировании с DSP30 + IL2 выявлены у 13 больных (26 %), при культивировании с LPS + TPA — у 5 больных (11 %) и лишь у 2 больных (4 %) при исследовании методом FISH (табл. 2).

Таким образом, при использовании двух методов исследования, СЦИ и FISH, увеличилась частота выявления хромосомных aberrаций. При отсутствии митозов (9 больных) и хромосомных aberrаций (5 больных) при кариотипировании DSP30 + IL2 были определены хромосомные aberrации методом FISH у 10 из них: у 6 — делеция 13q, у 3 — делеция 11q, у одного — делеция 17p (табл. 3, № 9, 14, 18, 26, 27, 30, 31, 32, 40, 44). В 9 случаях отсутствия хромосомных нарушений при FISH-исследовании были выявлены хромосомные нарушения: в культуре с DSP30 + IL2 в 5 случаях и в культуре с LPS + TPA в одном случае, среди них комплексные нарушения кариотипа, t(6;14)(p12;q32), делеция 6q, несбалансированная t(12;16)(q14;q23) и делеция 1q (табл. 3, № 5, 16, 19, 23, 33, 46, 48). На рисунке 2 представлен пример комплексного кариотипа, выявленного при культивировании с DSP30 + IL2 (культивирование с LPS + TPA не проводилось из-за малого количества исследуемого материала). При FISH-исследовании у данного больного хромосомные aberrации не выявлены (табл. 3, № 46).

## Обсуждение

СЦИ является важным методом, позволяющим, в отличие от FISH-исследования, анализировать весь кариотип, выявлять диагностические и прогностически значимые хромосомные нарушения и предоставляющим дополнительную информацию о патогенезе



**Рисунок 2.** Цитогенетическое исследование клеток крови больного ХЛЛ (#46). А — СЦИ с использованием при культивировании DSP30 и IL2. Выявлены комплексные нарушения кариотипа: 43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10). Б — FISH-исследование с использованием многоцветного зонда к локусам (I) 17p13/*TP53* (два красных сигнала), 11q22/*ATM* (два зеленых сигнала) и (II) 13q14 (два красных сигнала), 13q34/*qter* (два голубых сигнала) и центромере хромосомы 12 (два зеленых сигнала). Хромосомные нарушения не выявлены

**Figure 2.** Chromosome banding analysis of peripheral blood cells in a CLL patient (#46). А — CBA was performed using DSP30 and IL2. Karyotyping showed the presence of a complex karyotype: 43,X,-Y,-6,der(10)t(6;10)(p14;p21),der(21;22)(q10;q10). Б — FISH study using multicolor probe to loci (I) 17p13/*TP53* (two red signals), 11q22/*ATM* (two green signals) and (II) 13q14 (two red signals), 13q34/*qter* (two blue signals) and the centromere of chromosome 12 (two green signals). No chromosomal abnormalities were detected using FISH

опухолевых заболеваний системы крови. Проведение СЦИ у больных ХЛЛ затруднено в связи с низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов. СрG-олигонуклеотид DSP30 в сочетании с интерлейкином-2 обладает способностью стимулировать к делению опухолевые клетки ХЛЛ. Результаты проведенного исследования показали, что эффективность СЦИ у больных ХЛЛ более чем в два раза выше при культивировании с DSP30 и IL2, чем со стандартными В-клеточными митогенами LPS и TPA: аберрантный кариотип выявлен у 36 (72 %) и 16 (35 %) больных соответственно.

Следует отметить, что у 14 больных (28 %) хромосомные аберрации были обнаружены только в культуре с DSP30 + IL2, в то время как в культуре с LPS + TPA у 7 из 14 выявлен нормальный кариотип и еще у 7 неклональные нарушения, то есть хромосомные аберрации выявлены в одной из 20 метафаз. При этом при культивировании с DSP30 + IL2 хромосомные перестройки были выявлены в среднем в 60 % метафаз, что подтверждало клональную природу хромосомных аберраций. В настоящем исследовании показано достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30 + IL2 и LPS + TPA.

Комплексный кариотип является неблагоприятным фактором прогноза у больных ХЛЛ. Согласно данным литературы, комплексный кариотип сохраняет неблагоприятное прогностическое значение у больных ХЛЛ, получающих как стандартную химиотерапию, так и терапию новыми препаратами таргетного действия, такими как ибрутиниб и венетоклакс [14, 22]. Описано, что комплексные нарушения кариотипа коррелируют с коротким временем до начала терапии и низкой общей выживаемостью [24]. В настоящем исследовании сравнение результатов кариотипирования и FISH-анализа показало наибольшую выявляемость комплексного кариотипа при культивировании с DSP30 + IL2 — 13 (26 %) случаев, что в два раза превышает частоту выявления в культуре с LPS + TPA — у 5 (13 %) и методом FISH — у 2 (4 %) больных. Частота выявления комплексного кариотипа при кариотипировании с DSP30 + IL2 в группе больных, получающих терапию, у которых было резистентное и рецидивирующее течение заболевания, и в группе больных до начала терапии составила 84 и 16 % соответственно.

В литературе описана взаимосвязь комплексных нарушений кариотипа и делеции 17p и 11q [15, 23]. Именно с данной корреляцией многие исследователи связывают неблагоприятное прогностическое значение комплексных нарушений кариотипа [4, 15, 31]. Однако в работах Thompson и соавт. [14] и Rigolin и соавт. [24] показано, что вне зависимости от наличия делеции 17p комплексный кариотип является независимым неблагоприятным фактором прогноза. В проведенном нами исследовании делеция 17p методом FISH была определена

у 5 (38,5 %) из 13 больных с комплексным кариотипом. В 5 из 8 случаев с комплексными нарушениями без делеции 17p в кариотипе присутствовала делеция 11q.

Ряд исследователей выделяет в отдельную группу риска больных ХЛЛ с выявленными при кариотипировании транслокациями [15, 23, 24]. В работе Maug и соавт. [25] впервые было показано, что наличие любых транслокаций имеет неблагоприятное значение при ХЛЛ. Несбалансированные транслокации могут быть выявлены в составе комплексного кариотипа в 35–73 % случаев [15, 24]. В нашем исследовании наиболее часто несбалансированные транслокации в повторяющихся точках разрыва хромосом (2q, 7p, 8p, 17p, 15q, 19q) выявлялись в составе комплексного кариотипа — у 10 из 17 (59 %). В ряде исследований показано, что наличие несбалансированных перестроек в составе комплексного кариотипа связано с укорочением времени до начала терапии и низкой общей выживаемостью [15, 24].

Среди сбалансированных транслокаций у 4 больных выявлены транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32): t(6;14)(p21;q32), t(9;14)(p13;q31-32), t(2;14)(p14-15;q31-32), t(14;19)(q32;q13), что подтверждено методом FISH с использованием зонда к локусу генов *IGH*. По данным литературы, транслокации с вовлечением локуса генов *IgH* встречаются в 5–7 % случаев ХЛЛ и ассоциируются с неблагоприятным прогнозом [4, 26, 27].

В данной работе показано, что выявляемые при FISH делеции 13q14, 11q22, 17p13 могут в отдельных случаях сопровождаться при СЦИ сбалансированными или несбалансированными транслокациями в этих локусах, что согласуется с данными других авторов [4, 15]. Были выявлены делеция 13q и t(13;18)(q14;p11) в разных субклонах, несбалансированные транслокации с вовлечением локусов 11q22 и 17p13, различные хромосомные аберрации — делеции, сбалансированные или несбалансированные транслокации с вовлечением локуса 17p13/*TP53*. Возможно, что все случаи объединяет схожее развитие клональной эволюции: возникновение в исходном клоне делеции, затем в ходе опухолевой прогрессии образование субклонов со сбалансированными и несбалансированными транслокациями в известной точке разрыва хромосомы и в целом нарастание геномной нестабильности.

Частичная трисомия хромосомы 12 в виде несбалансированной транслокации t(12;16)(q14;q23) была определена только при культивировании ввиду того, что в набор для проведения FISH-исследования включена проба, которая представляет собой ДНК-зонд к центромерному региону хромосомы 12. Для подтверждения частичной трисомии хромосомы 12 мы использовали ДНК-зонд к локусу гена *MDM2/12q15*. В литературе описано, что трисомия хромосомы 12 может быть представлена как в виде полной, так и в виде частичной трисомии [8, 32].

Определен минимальный участок дупликации — регион q13q22, в котором ведется поиск генов-кандидатов, предположительно среди них *HIP1R*, *MYF6*, *ANAPC5*, *E2F1*, *BAX*, *P27*, *CDK4* и ген *MDM-2* [33–35]. Считается, что нет отличия в прогностическом значении полной и частичной трисомии ввиду того, что частичная трисомия происходит за счет дупликации региона q13q22 хромосомы 12 [8].

Результаты СЦИ и FISH различаются по частоте выявленных хромосомных аномалий. В настоящем исследовании наиболее часто встречающейся хромосомной aberrацией по результатам FISH-исследования была делеция 13q14, которая выявлена в 19 (38 %) случаев, из них в 5 — биаллельная делеция. При СЦИ делеция 13q была определена только у 7 (14 %) пациентов в культуре с DSP30 + IL2 и у 2 (4 %) — в культуре с LPS + TPA. Описано, что делеция 13q14 более чем в половине случаев является субмикроскопической и не определяется при СЦИ [13, 36, 37]. Полученные данные согласуются с результатами других исследований: делеция 13q была определена при СЦИ с использованием DSP30 + IL2 менее чем в половине случаев по сравнению с частотой выявления методом FISH (14 и 38 % соответственно). По данным литературы, у больных ХЛЛ до начала терапии делеция 13q14 при FISH-анализе выявляется в 55–57 % [4, 5].

## Литература

1. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131: 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398
2. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению лимфопролиферативных заболеваний. Под ред. И.В. Поддубной, В.Г. Савченко. М., 2018: 179–200.
3. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198–206. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1 < 198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V
4. Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVHstatus and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007; 21: 2442–51. DOI: 10.1038/sj.leu.2404935
5. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910–6. DOI: 10.1056/NEJM200012283432602
6. Van Dyke D.L., Werner L., Rassenti L.Z., et al. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016; 173: 105–13. DOI: 10.1111/bjh.13933
7. Gahrton G., Robert K.H., Friberg K., et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*. 1980; 56: 640–7.
8. Juliusson G., Oscier D.G., Fitchett M., et al. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *N Engl J Med*. 1990; 323: 720–4. DOI: 10.1056/NEJM199009133231105

В проведенном исследовании частота выявления делеции 11q в культуре DSP30 + IL2, LPS + TPA и методом FISH составила 13 (26 %), 6 (13 %) и 17 (34 %). Согласно литературным данным, делеция 11q на момент диагностики определяется у 12–19 % больных ХЛЛ методом FISH [4, 5, 9]. Можно предположить, что более низкая выявляемость делеции 13q и более высокая частота делеции 11q связана с включением в исследование больных с прогрессией и рефрактерным течением заболевания, которые характерны для больных с делецией 11q и не свойственны для больных с делецией 13q. По данным FISH, делеция 11q выявлена у 37 % (7 из 19) больных с рецидивирующим и рефрактерным течением, из них у 3 — в составе комплексного кариотипа. На момент диагностики делеция 11q определялась у 23 % (7 из 31) больных ХЛЛ.

Таким образом, при совместном использовании двух методов исследования, СЦИ и FISH, значительно увеличивается частота выявления хромосомных aberrаций. Выполнение СЦИ с использованием при культивировании DSP30 и IL2 не заменяет FISH, но является необходимым методом исследования, позволяющим выявлять дополнительные хромосомные aberrации, в том числе транслокации и, что особенно важно, выделять группу больных самого неблагоприятного прогноза ХЛЛ с комплексными нарушениями для разработки терапевтической тактики.

## References

1. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131: 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398
2. Russian clinical guidelines for the diagnosis and treatment of lymphoproliferative diseases. Ed.: Poddubnaya I.V., Savchenko V.G. Moscow; 2018 (In Russian).
3. Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981; 48: 198–206. DOI: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1 < 198::AID-CNCR2820480131>3.0.CO;2-V
4. Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., et al. Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVHstatus and immunophenotyping. *Leukemia*. 2007; 21: 2442–51. DOI: 10.1038/sj.leu.2404935
5. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1910–6. DOI: 10.1056/NEJM200012283432602
6. Van Dyke D.L., Werner L., Rassenti L.Z., et al. The Döhner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *Br J Haematol*. 2016; 173: 105–13. DOI: 10.1111/bjh.13933
7. Gahrton G., Robert K.H., Friberg K., et al. Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*. 1980; 56: 640–7.
8. Juliusson G., Oscier D.G., Fitchett M., et al. Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *N Engl J Med*. 1990; 323: 720–4. DOI: 10.1056/NEJM199009133231105
9. Zakharova A.I., Obukhova T.N., Lorie Yu.Yu., et al. Cytogenetic abnormalities

9. Захарова А.И., Обухова Т.Н., Лорие Ю.Ю. и др. Цитогенетические нарушения при хроническом В-клеточном лимфолейкозе и их связь с клинико-биологическими особенностями и прогнозом заболевания. *Терапевтический Архив*. 2006; 78: 57–62.
10. Decker T., Schneller F., Sparwasser T., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000; 95(3): 999–1005.
11. Burger J.A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc. Hematol Educ Progr*. 2011; 96–103. DOI: 10.1182/asheducation-2011.1.96
12. Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000; 28: 558–68. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00144-2
13. Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80 % of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006. Nov 1;108(9):3152-60. DOI: 10.1182/blood-2006-02-005322
15. Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89: 249–55. DOI: 10.1002/ajh.23618
16. Döhner H., Fischer K., Bentz M., et al. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580–9.
17. Gonzalez D., Martinez P., Wade R., et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2223–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.0838
18. Zenz T., Habe S., Denzel T., et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009; 114: 2589–97. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224071
19. Stilgenbauer S., Eichhorst B., Schetelig J., et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 1973–80. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6840
20. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369: 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637
21. O'Brien S., Jones J.A., Coutre S.E., et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 1409–18. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30212-1
22. Anderson M.A., Tam C., Lew T.E., et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017; 129: 3362–70. DOI: 10.1182/blood-2017-01-763003
23. Dicker F., Herholz H., Schnittger S., et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009; 23: 117–24. DOI: 10.1038/lev.2008.274
24. Rigolin G.M., Saccenti E., Guardalben E., et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018; 181: 229–33. DOI: 10.1111/bjh.15174
- in chronic B-cell lymphocytic leukemia and their connection with clinical and biological features and prognosis of the disease. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2006; 78: 57–62 (In Russian).
10. Decker T., Schneller F., Sparwasser T., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*. 2000; 95(3): 999–1005.
11. Burger J.A. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc. Hematol Educ Progr*. 2011; 96–103. DOI: 10.1182/asheducation-2011.1.96
12. Decker T., Schneller F., Kronschnabl M., et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol*. 2000; 28: 558–68. DOI: 10.1016/S0301-472X(00)00144-2
13. Dicker F., Schnittger S., Haferlach T., et al. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80 % of CLL patients: A study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006. Nov 1;108(9):3152-60. DOI: 10.1182/blood-2006-02-005322
15. Baliakas P., Iskas M., Gardiner A., et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014; 89: 249–55. DOI: 10.1002/ajh.23618
16. Döhner H., Fischer K., Bentz M., et al. p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias. *Blood*. 1995; 85: 1580–9.
17. Gonzalez D., Martinez P., Wade R., et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 2223–9. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.0838
18. Zenz T., Habe S., Denzel T., et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009; 114: 2589–97. DOI: 10.1182/blood-2009-05-224071
19. Stilgenbauer S., Eichhorst B., Schetelig J., et al. Venetoclax for Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia With 17p Deletion: Results From the Full Population of a Phase II Pivotal Trial. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 1973–80. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6840
20. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 369: 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637
21. O'Brien S., Jones J.A., Coutre S.E., et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol*. 2016; 17: 1409–18. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30212-1
22. Anderson M.A., Tam C., Lew T.E., et al. Clinicopathological features and outcomes of progression of CLL on the BCL2 inhibitor venetoclax. *Blood*. 2017; 129: 3362–70. DOI: 10.1182/blood-2017-01-763003
23. Dicker F., Herholz H., Schnittger S., et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2009; 23: 117–24. DOI: 10.1038/lev.2008.274
24. Rigolin G.M., Saccenti E., Guardalben E., et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018; 181: 229–33. DOI: 10.1111/bjh.15174

25. Mayr C., Speicher M.R., Kofler D.M., et al. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2006; 107: 742–51. DOI: 10.1182/blood-2005-05-2093
26. Cavazzini F., Hernandez J.A., Gozzetti A., et al. Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis. *Br J Haematol*. 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07227.x
27. Satterwhite E., Sonoki T., Willis T.G., et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*. 2001; 98: 3413–20.
28. Iida S., Rao P.H., Ueda R., et al. Chromosomal Rearrangement of the PAX-5 Locus in Lymphoplasmacytic Lymphoma with t(9; 14) (p13; q32). *Leuk Lymphoma*. 1999; 34: 25–33. DOI: 10.3109/10428199909083377
29. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* (London, England). 1971; 2: 971–2.
30. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. McGowan-Jordan J., Simons A., Schmid M. (eds). Basel: Karger; 2016.
31. Jaglowski S.M., Ruppert A.S., Heerema N.A., et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012; 159: 82–7. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2012.09239.x
32. Bird M.L., Ueshima Y., Rowley J.D. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia*. 1989; 3: 182–91.
33. Haslinger C., Schweifer N., Stilgenbauer S., et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 3937–49. DOI: 10.1200/JCO.2004.12.133
34. Porpacz E., Bilban M., Heinze G., et al. Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39: 568–75. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02146.x
35. Kienle D.L., Korz C., Hosch B., et al. Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 3780–92. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.568
36. Karakosta M., Manola K.N. The parallel application of karyotype interphase and metaphase FISH after DSP-30/IL-2 stimulation is necessary for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 2016; 21: 526–35. DOI: 10.1080/10245332.2015.1110948
37. Shi M., Cipollini M.J., Crowley-Bish P.A., et al. Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol*. 2013; 139: 662–9. DOI: 10.1309/AJCP7G4VMYZJQVFI

### Информация об авторах

**Кислицына Мария Анатольевна\***, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории кариологии, аспирант лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: makislitsyna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3337-2487>

**Обухова Татьяна Никифоровна**, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: obukhova\_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

### Information about the authors

**Maria A. Kislitsyna\***, Medical Laboratory Specialist, Postgraduate researcher, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology, e-mail: makislitsyna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3337-2487>

**Tatyana N. Obukhova**, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory Karyology, National Research Centre of Hematology, e-mail: obukhova\_t@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1613-652X>

**Алимова Галина Анатольевна**, врач — лабораторный генетик лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: galialy@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-2240>

**Шишигина Любовь Александровна**, специалист по молекулярной биологии лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: lubov\_shishigina@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7157-6643>

**Гребенюк Любовь Алексеевна**, специалист по молекулярной биологии лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: lyuba.grebenyuk@yandex.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2117-8775>

**Абрамова Татьяна Валерьевна**, кандидат медицинских наук, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории кариологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: abramova.blood@gmail.com;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

**Горячева Светлана Рудольфовна**, кандидат медицинских наук, врач-гематолог консультативного гематологического отделения с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: goryacheva.s@blood.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3906-9171>

**Моисеева Татьяна Николаевна**, кандидат медицинских наук, заведующая консультативным гематологическим отделением с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «Национальный исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: taniamoiseeva@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>

**\* Автор, ответственный за переписку**

Поступила 10.01.19

Принята к печати 14.05.2019

**Galina A. Alimova**, Medical Laboratory Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: galialy@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-2240>

**Lyubov A. Shishigina**, Molecular Biology Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: lubov\_shishigina@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7157-6643>

**Lyubov A. Grebenyuk**, Molecular Biology Specialist, Karyology Laboratory, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: lyuba.grebenyuk@yandex.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2117-8775>

**Tatyana V. Abramova**, Cand. Sci. (Med.), Medical Laboratory Specialist, Laboratory of Karyology, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: abramova.blood@gmail.com;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3163-4930>

**Svetlana R. Goryacheva**, Cand. Sci. (Med.), Physician-Hematologist, Hematology Department with an Outpatient Facility for Intensive High-dose Chemotherapy, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: goryacheva.s@blood.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3906-9171>

**Tatyana N. Moiseeva**, Cand. Sci. (Med.), Head of the Hematology Department with an Outpatient Facility for Intensive High-dose Chemotherapy, National Research Centre of Hematology,  
e-mail: taniamoiseeva@mail.ru;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9591-8508>

**\* Corresponding author**

Received 10 Jan 2019

Accepted 14 May 2019