

**Федеральное медико-биологическое агентство
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ПРОГНОЗА У
БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ
ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Санкт-Петербург
2015

Методические рекомендации посвящены современным подходам к генетической диагностике злокачественных новообразований лимфоидной ткани. Разработанный и апробированный алгоритм цитогенетической и молекулярно-генетической диагностики лимфопролиферативных заболеваний позволяет на более высоком уровне, с применением молекулярно-генетических маркеров, верифицировать варианты и определять прогностические особенности течения лимфом.

Предназначены для врачей клинической лабораторной диагностики, цитогенетиков, врачей-гематологов, онкологов.

Область применения: онкология, гематология.

Авторы: К.М. Абдулкадыров, С.С. Бессмельцев, А.В. Чечеткин, И.С. Мартынкевич, С.В. Волошин, С.В. Грицаев, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, Е.В. Клеина, А.Ю. Кувшинов

Рецензенты: доктор медицинских наук Алексеев С.М.

кандидат биологических наук Харченко Т.В.

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

Утверждены заместителем руководителя Федерального медико-биологического агентства Е.Ю. Хавкиной 27.02.2015, Рег.№07-2015

Содержание

Введение	4
Обозначения и сокращения	6
Основные нормативные положения	7
1 Методика проведения исследования	7
1.1 Методы цитогенетических исследований, используемых в диагностике хронического лимфолейкоза	7
1.1.1 Стандартный цитогенетический анализ	7
1.1.2 Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)	9
1.2 Алгоритм генетической диагностики хронического лимфоцитарного лейкоза	18
Библиография	19

Введение

Достижения в области молекулярной биологии в последние годы позволили расшифровать или значительно прояснить патогенез многих гематологических заболеваний [1-4]. Молекулярные методы стали широко применяться в практической гематологии. В диагностике и мониторинге лимфатических опухолей они имеют особое значение. Это связано, во-первых, с наличием уникально перестроенных генов варибельного региона антигенных рецепторов в каждом лимфоците. Данная особенность отличает лимфоидную ткань от любой другой и лежит в основе оценки клональности и отслеживания минимальной остаточной болезни. Во-вторых, гемобластозы часто сопровождаются высокоспецифичными генетическими аномалиями, определение которых имеет диагностическое значение [5].

Всемирная организация здравоохранения признает, что именно хромосомные аномалии являются одними из самых надежных критериев классификации и диагностики лимфатических опухолей. Идентификация генов, вовлеченных в развитие злокачественной опухоли, является фундаментальной биологической задачей, решение которой способствует формированию представлений о патогенезе заболевания, а также позволяет выявить генетические факторы риска развития лимфопролиферативных заболеваний [6].

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) является наиболее распространенным вариантом лимфопролиферативных заболеваний. Течение ХЛЛ крайне варибельно. Это заболевание считается индолентным, хотя почти у 50% пациентов наблюдается быстрая прогрессия с последующим неблагоприятным исходом. Стандартным подходом к началу терапии до сих пор является тактика «наблюдай и жди», однако в последнее время становится очевидным, что некоторым пациентам необходимо начинать лечение на ранних стадиях болезни, не дожидаясь ее прогрессирования. Это связано с открытием новых прогностических маркеров. Кроме того, тщательное прогнозирование течения заболевания имеет большое значение для оценки необходимости применения новых методов терапии, в том числе аутологичной и аллогенной трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток.

К классическим прогностическим факторам относятся: клиническая стадия заболевания, лейкоцитоз периферической крови на момент начала терапии, время удвоения лимфоцитов, характер инфильтрации костного мозга, пол, возраст, общий соматический статус пациента [7-10].

В последние годы появились новые прогностические маркеры [11], отражающие биологию опухолевых клеток. Наиболее важными из них являются:

- цитогенетические изменения (в том числе определяемые методом FISH);
- мутационный статус VH- генов;
- уровень экспрессии CD38.

Таким образом, генетические методы исследования являются одними из основных методов диагностики ХЛЛ, позволяющих изучить биологические особенности заболевания, что во многом обуславливает клиническое течение, результаты лечения и отдаленный прогноз у больных ХЛЛ. Поэтому разработанный в методических рекомендациях алгоритм генетической диагностики ХЛЛ имеет важное не только научное, но и практическое значение.

Обозначения и сокращения

- Ген — единица наследственной информации,
детерминирующая развитие того или иного признака,
неделимая в функциональном отношении
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- ХЛЛ — хронический лимфоцитарный лейкоз
- ЦГ — цитогенетика
- del — делеция, потеря хромосомного материала
- FISH — флуоресцентная *in situ* гибридизация
- p — короткое плечо хромосомы
- q — длинное плечо хромосомы

Основные нормативные положения

1. Методика проведения исследования

1.1 Методы цитогенетических исследований, используемых в диагностике ХЛЛ

Основными генетическими методами, используемыми как на этапах диагностики, так и при контроле проводимой терапии больных ХЛЛ, являются стандартное цитогенетическое исследование и флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) с локуспецифическими зондами на интерфазных ядрах.

FISH анализ информативнее по частоте выявляемости клональных aberrаций при ХЛЛ в сравнении со стандартным цитогенетическим исследованием (в 68,4% и в 36,7% соответственно) [12]. Однако только цитогенетическое исследование позволяет произвести анализ одновременно всего хромосомного набора клетки целиком, тем самым выявить не только специфические аномалии кариотипа, но и комплексные множественные хромосомные aberrации, крайне неблагоприятно влияющие на прогностические особенности течения заболевания. В то же время криптические, не выявляемые при стандартном цитогенетическом исследовании перестройки генома, позволяют выявить только молекулярные методы анализа – FISH- метод.

Таким образом, одновременное применение всех доступных генетических методов исследований в диагностике ХЛЛ позволяет получить наиболее полную картину заболевания.

1.1.1 Стандартный цитогенетический анализ

Цитогенетическое исследование у больных ХЛЛ проводится на митаген-стимулированных В-лимфоцитах периферической крови, стабилизированной любым антикоагулянтом и полученной отбором в специальные вакуумные пробирки.

Материалы и оборудование

- Венозная кровь
- Центрифуга лабораторная
- Термостат
- Микроскоп биологический (лабораторный)
- Компьютерная система анализа изображений
- Дозаторы пипеточные с фиксированными и переменными объемами,
- Наконечники полимерные к дозаторам пипеточным
- Центрифужные пробирки
- Стекла предметные
- Пипетка одноразовая, объем 3 мл

- Стерильная среда RPMI-1640
- Эмбриональная 20% телячья сыворотка
- Колленид
- Липополисахарид (LPS)
- Фосфатно-буферные растворы
- Краситель Гимза

Методика

Подсчитав количество лейкоцитов, кровь разделяют на две или более культур, выдержав оптимальную концентрацию – $3-5 \times 10^9$ /мл клеток на 1 мл среды RPMI – 1640, дополненной 20% эмбриональной телячьей сывороткой, антибиотиком, глутамином (292,3 мг/л) и митогенами: липополисахарид и ТРА в соотношении 1:1 . Периферическая кровь культивируется в термостате 72 часа при температуре 37°C. За 24 часа до окончания культивирования добавляется колленид, что обеспечивает получение необходимого для исследования количества качественных метафазных пластин.

Полученный материал делится на две пробирки и центрифугируется в течение 10 минут при 1000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости, полученная клеточная суспензия обрабатывается гипотоническим раствором хлорида калия в течение 30 минут при температуре 37°C. Остановку воздействия гипотонического раствора производят 5% уксусной кислотой, что позволяет более щадяще воздействовать на клетки, или фиксатором, состоящим из 3 частей метанола и 1 части ледяной уксусной кислоты. Модифицированный нами метод позволяет улучшить качество и увеличить количество метафазных пластин, пригодных для анализа.

После центрифугирования и удаления надосадочной жидкости, материал подвергается 3-4 кратной фиксации по 10 минут смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 при комнатной температуре. После этого полученную суспензию клеток наносят на холодные обезжиренные предметные стекла.

После высушивания препаратов хромосом в течение 1 суток в термостате при температуре 37°C, выполняется процедура дифференциальной окраски на G-диски по методу Seabright (Seabright, 1971; ISCN, 2009) [13-14]. Для этого препараты обрабатываются 0,25% раствором трипсина, нагретым до 37°C в течение 2-10 с и промываются в трех сменах дистиллированной воды. Затем стекла покрывают краской Гимзы, разведенной на фосфатном буфере (pH = 6,8) и промывают под проточной водой. Далее высушивают препараты при комнатной температуре и анализируют качество

окраски хромосом под световым микроскопом. В каждом наблюдении окрашивается 5-10 стекол.

Оценка результатов

В каждом отдельном случае анализируется 20-30 метафазных пластин. При обнаружении патологической клетки — все имеющиеся митозы для подтверждения клональности хромосомных aberrаций и установления процентного соотношения между нормальным и патологическим клоном клеток. Если одни и те же структурные нарушения кариотипа или дополнительные хромосомы обнаруживаются в двух и более клетках, а потери хромосом — в трех, констатируют наличие патологического клона клеток. Интерпретация патологии кариотипа производится в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2009) [14].

Использование компьютерной системы анализа изображений при проведении цитогенетических исследований позволяет ускорить время кариотипирования и создать базу результатов цитогенетических исследований.

1.1.2 Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH)

Для FISH исследования используют суспензию клеток, приготовленную для стандартного цитогенетического исследования или мазок периферической крови на предметном стекле.

Материалы и оборудование

- Венозная кровь
- Центрифуга лабораторная
- Термостат
- Микроскоп биологический (лабораторный)
- Микроскоп люминисцентный
- Микроцентрифуга
- Программируемый термостат Hybrite
- Термобаня
- Дозаторы пипеточные с фиксированными и переменными объемами,
- Наконечники полимерные к дозаторам пипеточным РП
- Стекла предметные (адгезивные, с поли-L- лизином)
- Покровные стекла
- Сосуд коплина
- Пипетка одноразовая, объем 3 мл
- Буфер фосфатный

- Дистиллированная вода
- DAPI
- 20SSC
- Вектошилд
- Спирты 70%, 85%, 100%
- Активированный пепсин
- ДНК- зонды del(11q)/ATM, del(13q), del(17p)/TP53, +12

FISH на суспензии клеток периферической крови

Методика:

1-й день

1. Эппендорф с суспензией центрифугируется в микроцентрифуге 5 минут/1000 оборотов.
2. В отдельном эппендорфе осадок разбавляется фиксатором.
3. Осадок наносится пипеткой на стекло (адгезивное, с поли-L-лизинном).
4. Стекло помещается на термopлату (предварительно нагреть до 65°C) до высыхания.
5. Под микроскопом размещается участок (в поле зрения должно быть не менее 200 клеток).
6. Подготавливается проба (4 мкл – буфер, 0,5 мкл – дистиллированная вода, 0,5 мкл – зонд).
7. Наносится проба, закрывается покровным стеклом, заклеивается клеем.
8. Денатурация 73°C 2 минуты, гибридизация 37°C не менее 17 часов.

2-й день

1. Предварительно нагревается водяная баня до 72 - 73°C.
2. Готовится раствор 0,4 SSC (1 мл 20 SSC/49 мл дистиллированной воды – на 1 сосуд коплина).
3. Снимается клей, покровное стекло, предметное стекло помещается в 1 сосуд коплина в баню на 2 минуты.
4. Отмывка продолжается во втором сосуде коплина при комнатной температуре 2 минуты.
5. Готовится DAPI (190 мкл вектошилд/10 мкл DAPI).
6. Наносится 8 мкл, накрывается покровным стеклом.

FISH на мазках периферической крови

Методика:

1-й день

1. Мазки помещаются в фиксатор на 1 час.
2. Высушиваются на воздухе 15-20 минут.
3. Водяная баня нагревается до температуры 37°C.
4. Готовится сосуд коплина с раствором пепсина, активированного HCl (50 мл дистиллированной воды, 100 мкл стокового раствора пепсина), и вместе с сосудом коплина с раствором 20SSC (5 мл 20SSC/45 мл дистиллированной воды) помещаются в баню.
5. Стекло помещается в сосуд коплина с активированным пепсином на 2 минуты, затем в раствор 20SSC на 20 минут.
6. Проводка по спиртам (70%, 85%, 100%) производится по 2 минуты в каждом.
7. Стекла высушиваются на воздухе.
8. Размечается участок, наносится проба.

2-й день

7. Предварительно нагревается баня до 72 - 73°C.
8. Готовится раствор 0,4 SSC (1 мл 20SSC/49 мл дистиллированной воды – на 1 сосуд коплина).
9. Снимается клей, покровное стекло, предметное стекло помещается в 1 сосуд коплина в баню на 2 минуты.
10. Отмывка во втором сосуде коплина при комнатной температуре осуществляется в течение 2 минут.
11. Готовится DAPI (190 мкл вектошейлд/10 мкл DAPI).
12. Наносится 8 мкл DAPI, накрывается покровным стеклом.

Оценка результатов

При исследовании каждого зонда анализируются 200 интерфазных ядер. Интерпретация патологии кариотипа и полученных результатов производится в соответствии с Международной номенклатурой (ISCN, 2009) [14].

1.2 Алгоритм генетической диагностики хронического лимфоцитарного лейкоза

Одними из основных методов, определяющих диагностические и прогностические особенности заболевания у больных ХЛЛ, являются генетические методы исследования. Включение данных методов анализа в алгоритм диагностики и мониторинга терапии ХЛЛ

(рисунок 8) позволит выделить более однородные прогностические группы пациентов и отслеживать минимальную резидуальную болезнь.

Первые данные, описывающие хромосомные aberrации при ХЛЛ, появились в конце 70-х гг. прошлого века [15-16]. При выполнении обычного рутинного анализа методом бэндрования возникают затруднения в связи с низкой пролиферативной активностью клеток. При использовании В-клеточных митогенов хромосомные аномалии выявляются у 50-60% пациентов [17-19]. С появлением в начале 1990-х гг. метода FISH стало возможным выявление хромосомных аномалий в интерфазных ядрах. Сегодня при помощи генетических методов приблизительно у 70% больных ХЛЛ обнаруживаются хромосомные изменения.

Цитогенетические аномалии при ХЛЛ являются важными прогностическими маркерами прогрессии заболевания и выживаемости. Среди описанных при ХЛЛ хромосомных изменений наиболее часто встречаются трисомия 12 хромосомы (в 15-30%), *del(11q)/ATM* (в 15-20%), *del(13q)* (в 40-60%), *del(17p)/TP53* (в 10%), *del(6q)* (в 15%) и *del(14q)* [20-23]. В 1990 г. G. Juliusson и соавторы впервые описали прогностическое значение хромосомных аномалий. В частности было показано, что пациенты с нормальным кариотипом или *del(13q)* изолированной перестройкой имеют лучший прогноз, чем больные с комплексным кариотипом, *del(11q)/ATM* или *del(17p)/TP53*.

В клинических исследованиях Dohner H. et al., [24] с соавторами было показано, что медиана общей выживаемости у пациентов с *del(17p)/TP53*, *del(11q)/ATM*, трисомией 12, нормальным кариотипом и *del(13q)* равнялась 32, 79, 114, 111 и 133 месяцам, соответственно (Рисунок 1).

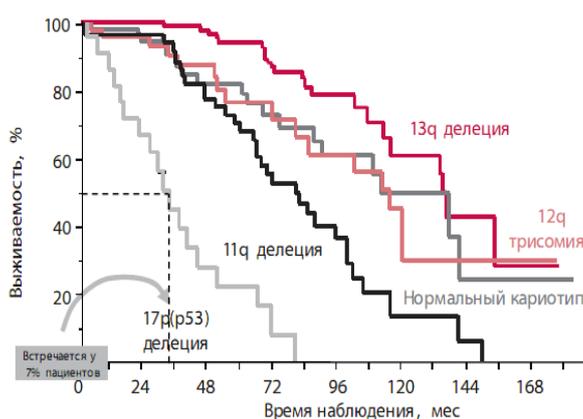
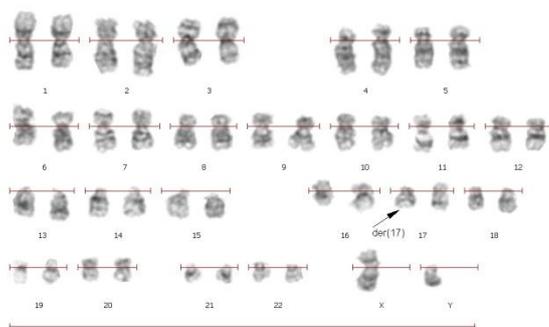


Рисунок 1 – Общая выживаемость больных ХЛЛ с различными хромосомными aberrациями (Dohner H. et al., 2000)

Дальнейшие исследования Dohner подтвердили различия в выживаемости и ответе на проводимую терапию у больных ХЛЛ в зависимости от обнаруженных хромосомных aberrаций.

1. Делеция **del(17)(p13)**

Патогенетическая роль del(17) (Рисунок 2) ассоциируется с повреждениями опухолевого супрессорного гена *TP53*, который играет ключевую роль в индукции апоптоза клеток, имеющих поврежденную ДНК. Блок этого механизма обуславливает неконтролируемую пролиферацию и клональную экспансию опухолевых клеток [25-26]. Действие флударабина, ритуксимаба, алкилирующих агентов ассоциировано с p53-сигнальным путем опухолевого роста. Поэтому комбинации на основе перечисленных лекарственных препаратов не эффективны у пациентов с делецией 17-й хромосомы [27-28]. *TP53/p53* аномалии являются предиктом короткой выживаемости больных ХЛЛ и резистентности к проводимой терапии [29-30].



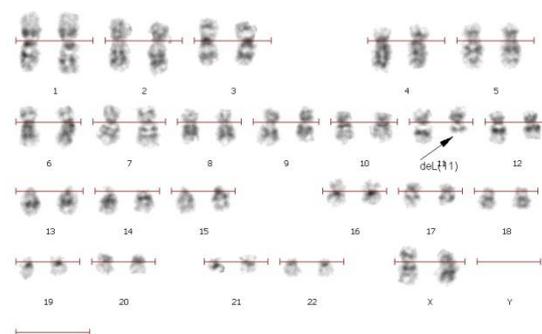
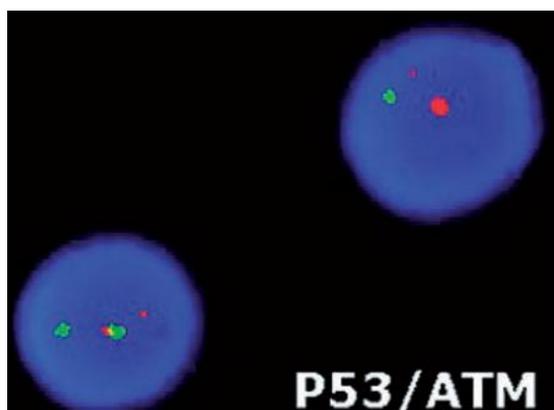
Кариограмма: 46,XY,del(17)(p13)

Рисунок 2 – Делеция del(17)(p13)

2. Делеция **del(11)(q13-23)**

ATM-ген расположен в локусе q13 и кодирует белок, усиливающий действие *P53* в ответ на повреждение ДНК. Повреждения гена ассоциированы с неблагоприятным прогнозом при ХЛЛ [31]. Делеция del(11q) (Рисунок 3) чаще встречается у лиц более молодого возраста с развернутой стадией заболевания, генерализованной лимфоаденопатией [17].

Делеция (11)(q13–23), как и del(17)(p13), является независимым прогностическим маркером, обуславливающим быструю прогрессию заболевания и короткую выживаемость [32-35].



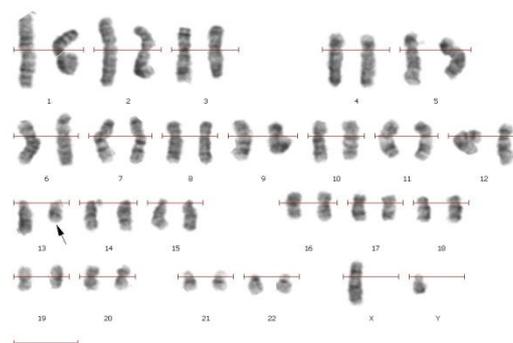
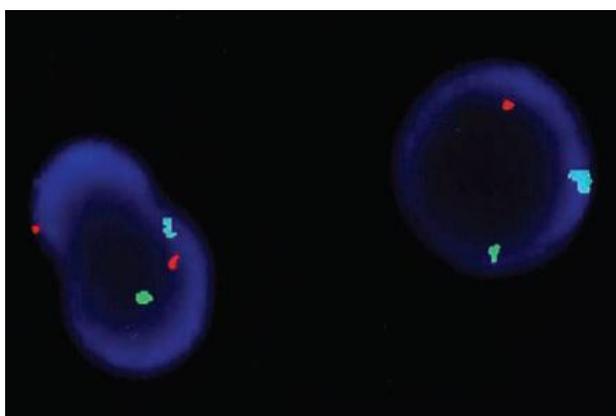
а) FISH – делеция генов *P53* и *ATM*
 Рисунок 3 – Делеция *del(11)(q13)/ATM*

б) Кариограмма: 46,XX,del(11)(q13)

2. Делеция *del(13)(q14)*

Делеция 13q (Рисунок 4) является наиболее частой хромосомной перестройкой при ХЛЛ и наблюдается у 40-60% больных. Делеция q плеча 13 хромосомы, криптическая, с перестроенным на молекулярном уровне единственным локусом q14, или потеря большого терминального региона 13 хромосомы ассоциируется с благоприятным прогнозом. Наличие же дополнительных хромосомных перестроек, особенно *del(11q)*, значительно укорачивает выживаемость и нивелирует благоприятное влияние *del(13)(q14)*.

Ген-супрессор опухоли, вовлеченный в *del(13)(q14)*, остается не идентифицированным. Существуют данные, что две микро-РНК, расположенные в регионе q14, регулируют *BCL-2* [36-37].

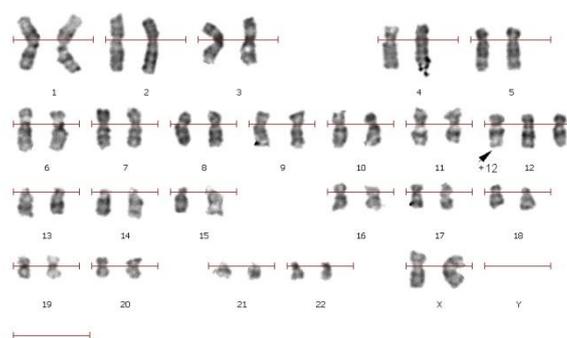
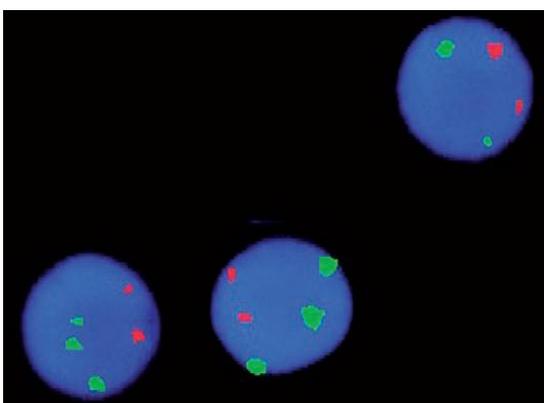


FISH – делеция *del13q*
 Рисунок 4 – Делеция *del(13)(q14)*

Кариограмма: 46,XY,del(13)(q14)

4. Трисомия 12-й хромосомы

В геномном регионе, вовлеченном в трисомию 12-й хромосомы (Рисунок 5), находятся онкоген *MDM-2* и ген циклина *D2*, регулирующие клеточный цикл. Однако их гиперэкспрессия отмечается в клетках ХЛЛ и в отсутствие этой аберрации [38]. Кроме того, ни один ген, роль которого доказана в патогенезе ХЛЛ, не идентифицирован на 12-й хромосоме. В большинстве исследований показано, что пациенты с трисомией 12-й хромосомы имеют атипичную морфологию и иммунофенотип, диффузную инфильтрацию костного мозга и выживаемость короче, чем больные с нормальным кариотипом или *del(13q)*.



FISH – трисомия 12

Кариограмма: 47,XX,+12

Рисунок 5 – Трисомия 12 хромосомы

2. Делеция *del(6)(q27)*

Делеция 6q (Рисунок 6) выявляется у 15% больных ХЛЛ. У пациентов, как правило, наблюдаются лейкоцитоз, спленомегалия, атипичная морфология клеток, высокий уровень экспрессии CD38, более короткое время от момента установления диагноза до первого курса терапии и меньшая выживаемость в сравнении с пациентами с благоприятными хромосомными перестройками [39].

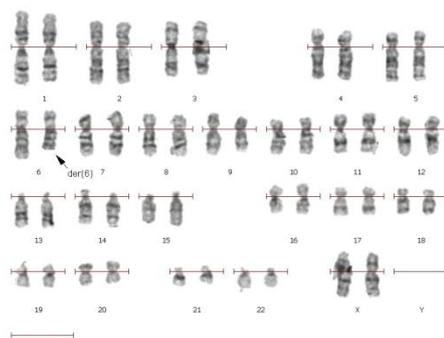


Рисунок 6 – Кариограмма: 46,XX, del(6)(q27)

3. Комплексный кариотип

Комплексный кариотип (Рисунок 7), с вовлечением в перестройки трёх и более хромосом, некоторые исследователи считают более важным прогностическим фактором, чем данные FISH и иммунный статус больных ХЛЛ [4]. Множественные нарушения кариотипа определяются у 15-20% больных ХЛЛ, отличительной особенностью которых является короткая выживаемость и резистентность к проводимой терапии.

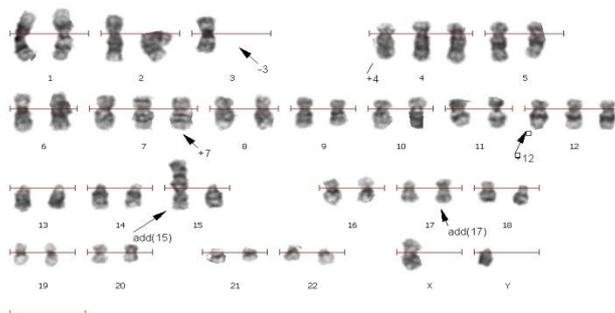
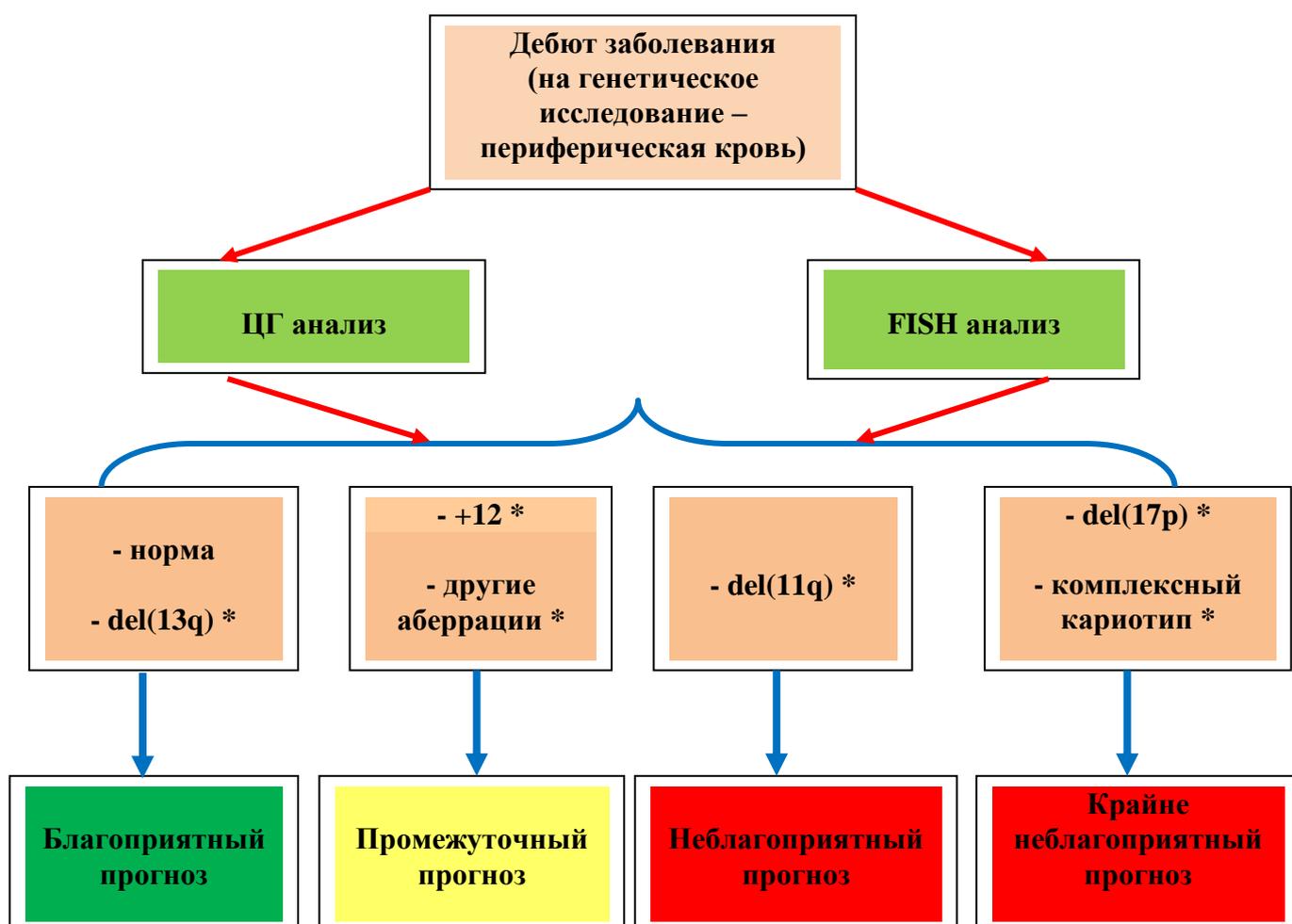


Рисунок 7 – Кариограмма: 40,XY,-3,+4,+7,+12,add(15)(p13),add(17)(p13)

По нашим данным, стандартный цитогенетический и молекулярно-цитогенетический FISH анализ выполнены у 60 впервые диагностированных больных ХЛЛ. Патологический кариотип определялся у 47 из 60 (78,3%) исследуемых пациентов. Хромосомные aberrации были изолированными или сочетанными. Высокоспецифические для ХЛЛ аномалии выявлялись со следующей частотой: трисомия 12 хромосомы – у 18 (29,8%) из 60 больных, del(11q) в точке локализации прогностически значимого ATM гена – у 14 (22,6%) из 60 пациентов, комплексные нарушения кариотипа - у 11 (18,8%) из 60 больных, del(13q) – у 9 (14,7%) из 60 обследованных и del(17p)/P53 – у 5 (8,3%) из 60 обследованных. Использование FISH метода одновременно со стандартным

цитогенетическим анализом позволяло повысить выявляемость патологического кариотипа у больных ХЛЛ на 15,8%.

Таким образом, согласно данным литературы и собственных исследований одними из основных методов, определяющих диагностические и прогностические особенности заболевания у больных ХЛЛ, являются генетические методы исследования. Включение перечисленных методов анализа в алгоритм диагностики и мониторинга терапии ХЛЛ (Рисунок 8) является обязательным условием для выбора адекватной терапии больных ХЛЛ.



*Необходим дальнейший мониторинг терапии

Рисунок 8 – Алгоритм генетической диагностики ХЛЛ

Впервые предложенный нами алгоритм генетической диагностики хронического лимфоцитарного лейкоза включает кариотипирование митоген-стимулированных В-лимфоцитов периферической крови и FISH-исследование, что позволяет повысить выявляемость высокоспецифичных генетических маркеров, играющих важную роль в

диагностике и определении прогностических особенностей течения заболевания, и выделить более однородные прогностические группы пациентов с ХЛЛ.

Библиография

- [1] Гематология: Новейший справочник / Под общ. ред. К.М. Абдулкадырова. – СПб.: Изд-во Сова. – 2004. –194 с.
- [2] Клиническая гематология: Руководство для врачей / Под ред. А.Н. Богданова и В.И. Мазурова. – СПб. : ООО «Издательство Фолиант» – 2008. – 488 с.
- [3] Клиническая онкогематология: Руководство для врачей / Под ред. М.А. Волковой. – М.: Медицина. – 2001. – 576 с.
- [4] Gorczyca, W. : Cytogenetics, FISH and molecular testing in hematologic malignancies/ W. Gorczyca // - New York: Informa UK Ltd, 2008. – P. 334.
- [5] Криволапов, Ю.А.: Морфологическая диагностика лимфом / Ю.А Криволапов, Е.Е. Леенман - СПб.: КОСТА, 2006. – 208 с.
- [6] Swerdlow S.H.: WHO Classification of tumors. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Pathology and Genetics/ S.H. Swerdlow, E. Campo, N. Harris, E. S. Jaffe et al.// Lyon IARC Press, 2008. – P.311.
- [7] Binet, J.L.: A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis/ J.L. Binet, A. Auquier, G. Dighiero et al. // Cancer. – 1981. – Vol. 48. – P. 198-206.
- [8] Binet, J.L.: A clinical studying system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance/ J.L. Binet, M. Lepoprier, G. Dighiero et al. // Cancer. 1977. - Vol. 40. - P. 855-864
- [9] Rai, K.R. A critical analysis of studing in CLL. In: R.P. Gale, K.R. Rai, eds. Chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future directions/ K.R Rai // Vol. 59, N.Y.: R. Liss Alan, 1987. P. 253—264.
- [10] Rai, K.R.: Clinical studing of chronic lymphocytic leukemia/ K.R. Rai, A. Savitsky, E.P. Cronkite et al. // Blood. 1975. Vol. 46. P. 219-234.

- [11] Nola, M.: Prognostic factors influencing survival in patients with B-cell small lymphocytic lymphoma./ M Nola, SZ Pavletic, DD Weisenburger et al. // *Am J Hematol.* 2004; 77:31–5.
- [12] Ripolles, L: Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia./ L Ripolles, M Ortega, F Ortuno et al. // *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 171:57–64.
- [13] Seabright, M.: A rapid banding technique for human chromosome./ Seabright M. // *Lancet* — 1971 — 2:970-975.
- [14] ISCN: 2009 : An International System for Human Cytogenetic Nomenclature // Eds. L.G.Shaffer // *Birth Defects: Orig. Articl. Ser.* 2009.
- [15] Autio, K. : Human chronic lymphocytic leukemia: karyotypes in different lymphocyte populations/ K.Autio, O.Turunen, O.Pentilla et al. // *Cancer Gen. Cytogen.* 1979. Vol. 1. P. 147—155.
- [16] Robert, K.H.: B-cell activation of peripheral blood lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukemia/ K.H. Robert, E. Moller, G. Gahrton et al. // *Clin. Exp. Immunol.* - 1978. - Vol. 33. - P. 302-308.
- [17] Gahrton, G. : Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia/ G.Gahrton, K.H. Robert, K. Friberg et al. // *Lancet.* - 1980. - Vol. 1. - P. 146-147.
- [18] Gahrton, G.: Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation/ G. Gahrton, K.H. Robert, K. Friberg et al. // *Blood.* 1980. Vol. 56. P. 640—647.
- [19] Hurley, J.N.: Chromosome abnormalities of leukemic B lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia/ J.N. Hurley, S.M. Fu, H.G. Kunkel et al. // *Nature.* 1980. 283. P. 76—78.
- [20] Dierlamm, J. : Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications./ J Dierlamm, L Michaux, A Criel, I Wlodarska, H Van den Berghe, D.K. Hossfeld // *Cancer Genet Cytogenet.* – 1997. – Vol. 94. – P. 27–35.
- [21] Foon, K.A. : Chronic lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy./ KA Foon, KR Rai, RP Gale.// *Ann Intern Med.* – 1990. – Vol. 113. – P. 525–539.
- [22] Oscier, DG : Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors./ DG Oscier, AC Gardiner, SJ Mould et al. // *Blood.* 2002; 100:1177–84.
- [23] Bea, S : Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome)/ S Bea, A Lopez-Guillermo, M Ribas et al. // *Am J Pathol.* – 2002. – Vol. 161. – P. 957–968.
- [24] Dohner, H: Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia / H Dohner, S Stilgenbauer, A Benner et al.// *N Engl J Med.* – 2000. – Vol. 343. – P. 1910–1916.

- [25] Byrd, JC: Interphase cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia may predict response to rituximab./ JC Byrd, L Smith, ML Hackbarth et al. // *Cancer Res.* 2003; 63:36–38.
- [26] Gaidano, G. : Analysis of alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in chronic lymphocytic leukemia/ G.Gaidano, E.W.Newcomb, J.Z. Gong et al. // *Am. J. Pathol.* - 1994. - Vol. 144. - P. 1312-1319.
- [27] Byrd, J.C.: Select highrisk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia: justification for risk adapted therapy/ J.C.Byrd, J.G.Gribben, B.L. Peterson et al. // *J. Clin. Oncol.* - 2006. - Vol. 24. - P. 437-443.
- [28] Sturm, I. : Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy/ I. Sturm, A.G. Bosanquet, S. Hermann et al. // *Cell Death Differ.* - 2003. - Vol. 10. - P. 477-484.
- [29] Rouby, S : P53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression./ S Rouby, A Thomas, D Costin et al. // *Blood.* – 1993. – Vol. 82. – P. 3452–3459.
- [30] Dohner, H : P53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias./ H Dohner, K Fischer, M Bentz et al.// *Blood.* – 1995. – Vol. 85. – P. 1580–9.
- [31] Austen, B. : Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL/ B.Austen, J.E.Powell, A.Alvi et al. // *Blood.* - 2005. - Vol. 106. - P. 3175—3182
- [32] Dohner, H : 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis./ H Dohner, S Stilgenbauer, MR James et al.// *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 2516–2522.
- [33] Oscier, DG : Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53gene are independent prognostic factors./ DG Oscier, AC Gardiner, SJ Mould et al.// *Blood.* – 2002. – Vol. 100. – P. 1177–1184.
- [34] Stilgenbauer, S : Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. / S Stilgenbauer, L Bullinger, P Lichter, H. Dohner // *Leukemia.* – 2002. – Vol. 16. – P. 993–1007.
- [35] Stilgenbauer, S : Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia./ S Stilgenbauer, P. Lichter, H. Dohner // *Rev Clin Exp Hematol.* - 2000. – Vol. 4. – P. 48–72.

- [36] Calin, G.A.: Frequent deletions and down-regulation of *micro-RNA* genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia/ G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002. - Vol. 99. - P. 15524-15529.
- [37] Cimmino, A.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 / A. Cimmino, G.A. Calin, M. Fabbri et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2005. Vol. 102. P. 13944-13949.
- [38] Haidar, M.A. Expression profile of MDM-2 proteins in chronic lymphocytic leukemia and their clinical relevance/ M.A. Haidar, H. El-Hajj, C.E. Bueso-Ramos et al. // Am. J. Hematol. - 1997. - Vol. 54. - P. 189—195.
- [39] Cuneo, A: Chronic lymphocytic leukemia with 6q- shows distinct hematological features and intermediate prognosis./ A Cuneo, GM Rigolin, R Bigoni et al. // Leukemia. – 2004. – Vol. 18. –P. 476–83.