

УДК 616-006.441; 616.155.321

# Клональные реаранжировки и опухолевые клоны при периферической Т-клеточной лимфоме

Ю. В. Сидорова<sup>1</sup>, Н. Г. Чернова<sup>1</sup>, Н. В. Рыжикова<sup>1</sup>, С. Ю. Смирнова<sup>1</sup>, М. Н. Сеницына<sup>1</sup>, Ю. Е. Виноградова<sup>2</sup>, У. Л. Джулакян<sup>1</sup>, А. М. Ковригина<sup>1</sup>, Е. Е. Звонков<sup>1</sup>, А. Б. Судариков<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова, кафедра госпитальной терапии № 2, 119435, Москва, Б. Пироговская ул., 4

\*E-mail: dusha@blood.ru

Поступила в редакцию 24.03.2015

**РЕФЕРАТ** Определяли целесообразность и информативность молекулярно-генетического исследования клональности при периферической Т-клеточной лимфоме (ПТКЛ). Анализировали биоптаты пораженных органов, кровь и костный мозг 30 пациентов с диагнозом периферическая Т-клеточная лимфома. Клональность Т-клеток оценивали по реаранжировкам генов *TCRG* и *TCRB* методом ПЦР с последующим секвенированием фрагментов. Исследование клональности по генам *TCRG* и *TCRB* позволяет доказать наличие опухоли у большинства (97%) пациентов с ПТКЛ. Методом ПЦР показано поражение костного мозга и/или лейкокемия у большинства (93%) пациентов, тогда как морфологически поражение костного мозга подтверждено только у 73% пациентов. Множественные реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов  $\gamma$  и  $\beta$ , утрата и появление новых, присутствие нескольких опухолевых клонов обнаружено у 63% пациентов с ПТКЛ. Возможно, они связаны с генетической нестабильностью при ПТКЛ. Сделан вывод, что наличие множественных клональных реаранжировок *TCRG* и *TCRB* при ПТКЛ должно учитываться при использовании данного метода в диагностических целях. Клональная эволюция опухоли, появление новых клональных пиков (клонов) не свидетельствуют о появлении новой опухоли. Множественные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* при ПТКЛ затрудняют оценку минимальной остаточной болезни.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** периферическая Т-клеточная лимфома, ПЦР, реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов, клональность Т-лимфоцитов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПТКЛн – периферическая Т-клеточная лимфома, неуточненная; TCR – Т-клеточный рецептор; TCRG – Т-клеточный рецептор  $\gamma$ ; TCRB – Т-клеточный рецептор  $\beta$ ; TCRD – Т-клеточный рецептор  $\delta$ ; CD – кластер дифференцировки.

## ВВЕДЕНИЕ

Периферическая Т-клеточная лимфома, неуточненная (ПТКЛн) – гетерогенная группа лимфом с иммунофенотипом зрелых периферических (посттимических) Т-лимфоцитов. Данный диагноз охватывает более 29% Т-клеточных лимфом, которые не попадают под другие нозологические формы и является диагнозом исключения [1, 2]. Клинически заболевание протекает агрессивно (пятилетняя общая выживаемость не превышает 32%), часто носит распространенный (у 69% пациентов диагностируется стадия III/IV) и внеузловой характер, поражает костный мозг, кожу, подкожную клетчатку, легкие [3]. Считается, что морфологическим субстратом опу-

холи являются Т-лимфоциты, имеющие иммунофенотип зрелых Т-клеток с  $\alpha\beta$ -вариантом Т-клеточного рецептора на поверхности (TCR $\alpha\beta$ ) и маркерами CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+ или CD8+, экспрессия которых несет признаки aberrантности (утрата одного или нескольких из них). ПТКЛн чаще имеет иммунофенотип CD4+/CD8-, реже CD4-/CD8+. В некоторых случаях у периферических Т-клеточных лимфом наблюдается очень скудная экспрессия Т-клеточных маркеров на поверхности, например только CD2 или CD3. Кроме того, небольшое число ПТКЛн – это лимфомы из  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов, которые невозможно отнести по клинико-морфологическим данным к гепато-лиентальной

$\gamma\delta$ -лимфоме или  $\gamma\delta$ -варианту лейкоза из больших гранулированных лимфоцитов [3–6]. Исследование клональных реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов при ПТКЛн позволяет в сложных диагностических случаях подтвердить Т-клеточную клональность и доказать наличие опухоли [7–11]. Суть метода состоит в ПЦР-амплификации и анализе области соединения V-D-J-сегментов генов Т-клеточных рецепторов  $\delta$  (*TCRD*),  $\gamma$  (*TCRG*) и  $\beta$  (*TCRB*). В каждом нормальном Т-лимфоците данная область имеет уникальную нуклеотидную последовательность. При фрагментном анализе амплификатов, полученных из здоровой ткани, наблюдается множество пиков с Гауссовским распределением длин (рис. 1А). Моноклональные образцы, имеющие одинаковую длину ПЦР-продуктов, определяются

в виде одного пика (моноаллельная реаранжировка, рис. 1Б) или двух пиков (биаллельная реаранжировка, рис. 1В).

Длина моноклонального ПЦР-продукта уникальна для опухолевого клона и неизменна во всех пораженных тканях у данного пациента. Обнаружение клона, например, в пунктате костного мозга, будет указывать на поражение костного мозга. Кроме того, по характеру реаранжировок можно судить о степени зрелости лимфоидной опухоли. При созревании Т-лимфоцита в норме реаранжировки проходят последовательно: сначала перестраивается локус генов *TCRD* ( $V\delta-D\delta$ ,  $D\delta-D\delta$ ,  $D\delta-J\delta$ ,  $V\delta-J\delta$ ), затем *TCRG* ( $V\gamma-J\gamma$ ) и неполностью *TCRB* ( $D\beta-J\beta$ ). Несколько позже происходят полные реаранжировки *TCRB* ( $V\beta-J\beta$ ) и  $\alpha$ -локуса *TCR* ( $V\alpha-J\alpha$ ) (рис. 2) [12, 13].

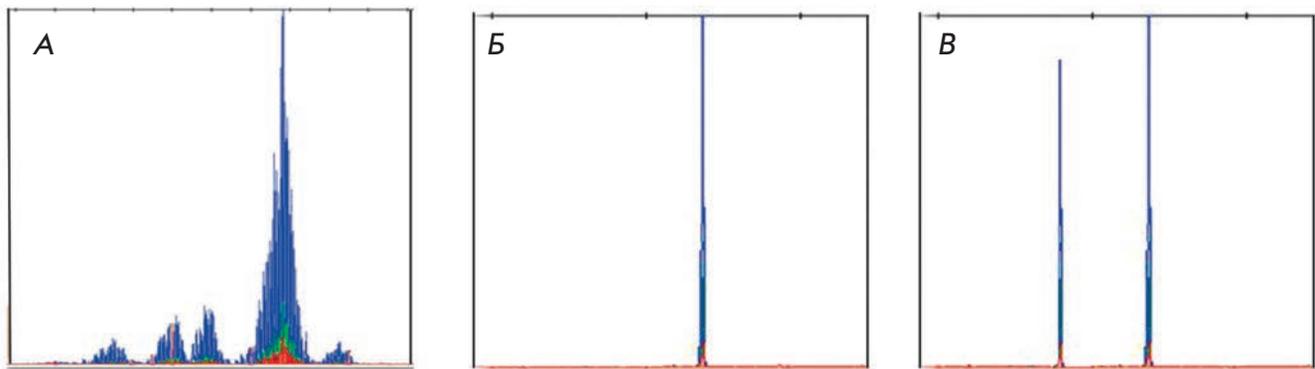


Рис. 1. Пример определения клональности по генам *TCRG*. А – поликлональный результат. Б – моноклональный результат (моноаллельная реаранжировка). В – моноклональный результат (биаллельная реаранжировка)

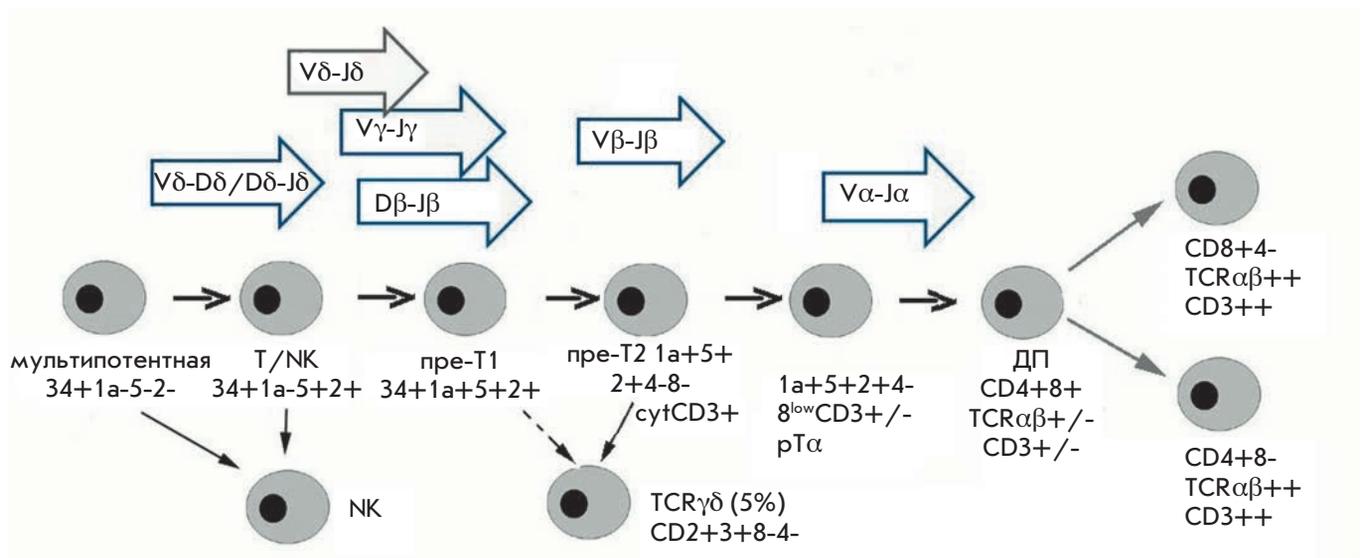


Рис. 2. Ранние стадии развития Т-лимфоцитов. Последовательные реаранжировки  $\delta$ -,  $\gamma$ -,  $\beta$ - и  $\alpha$ -цепей генов *TCR*. ДП – двойные позитивные клетки

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Таблица 1. Данные лабораторно-диагностических исследований

№	Основные иммунофенотипические характеристики опухоли	Объем поражения	Стадия	КМ ПЦР	Общее кол-во клональных реаранжировок***			Кол-во клонов**	Кол-во иссл. тканей
					TCRG, TCRD*	TCRB Dβ-Jβ	TCRB Vβ-Jβ		
1	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30-GranzB-CD5-CD57-CXCL13-CD7+	ЛУ	I	нм	3 Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	0	2	1
2	Сел CD3m+CD4+CD8+CD5+TIA-1+GranzB+CD7+CD56+	КМ Печ Сел Киш	IV	+	2 Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	1Vβ-Jβ	<u>3</u>	5
3	Сел CD3m+CD4-CD8+CD2+CD7+CD30-CD10-CD5+	КМ Сел	IV	+	1 Vγ-Jγ 3TCRD	2 Dβ-Jβ	5 Vβ-Jβ	<u>4</u>	2
4	КМ CD3m+CD4+CD8+CD10-CD1a-CD5+CD7+	КМ Сел	IV	+	6 Vγ-Jγ	4 Dβ-Jβ	5 Vβ-Jβ	<u>4</u>	2
5	КМ CD3e-CD4-CD8+(часть)CD7-CD2-CD1a-CD5-CD56-CD30-Сел CD3e+CD4-CD8-CD7-CD2-CD1a-CD5-CD30-ALK-GranzB-	КМ Сел	IV	+	3 Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	3Vβ-Jβ	<u>3</u>	3
6	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD45RO+CD2+CD7-CD30-ALK-	КМ ЛУ	IV	+	3 Vγ-Jγ	нд	нд	2	1
7	ЛУ CD3m+CD4-CD8+CDRO+CD30-CD15-CD23-CD56-	КМ ЛУ Сел Жел	IV	+	3 Vγ-Jγ	1 Dβ-Jβ	2Vβ-Jβ	<u>2</u>	5
8	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD 5+CD10-CD23-	КМ ЛУ Кожа Минд	III	+	5Vγ-Jγ	1 Dβ-Jβ	3Vβ-Jβ	<u>4</u>	9
9	ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD2+CD5+CD30+	КМ ЛУ Кожа Горт Минд	IV	+	8Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	3Vβ-Jβ	<u>7</u>	6
10	ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD5+TIA-1+	КМ ЛУ Киш МЖ Легк	IV	+	2Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	3Vβ-Jβ	<u>3</u>	6
11	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD2+CD5+CD7+CD15-CD1a-	КМ ЛУ Легк Жел Кожа Печ Сел НЛ	III	+	4Vγ-Jγ	2 Dβ-Jβ	2 Vβ-Jβ	<u>5</u>	7
12	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30+GranzB-EMA+	КМ ЛУ МЖ Легк Минд НЛ	IV	+	3 Vγ-Jγ	2 Dβ-Jβ	1 Vβ-Jβ	<u>2</u>	2
13	Сел CD3m+CD4-CD8-TIA-I+	КМ Сел Печ	IV	+	8Vγ-Jγ	2 Dβ-Jβ	4Vβ-Jβ	<u>4</u>	4
14	ЛУ CD3m+CD4+CD8+CD7+CD2+CD30-NK-	КМ ЛУ Кожа	IV	+	2 Vγ-Jγ	3 Dβ-Jβ	1 Vβ-Jβ	<u>2</u>	2
15	Сред CD3m+CD4+CD8-CD30-ALK-	Средостение	IE	нм	2 Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	1 Vβ-Jβ	1	1
16	Легк CD3m+CD4+CD8-CD45RO+CD5+CD7+CD30-CD10-CD23-	ЛУ Легк	IE	+	3Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	2Vβ-Jβ	<u>2</u>	3
17	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD30+CD33+CD56-	Сред ЛУ	III	+	3Vγ-Jγ	2Dβ-Jβ	1Vβ-Jβ	<u>2</u>	2
18	ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD5+CD7+	ЛУ	III	+	2Vγ-Jγ	0	2Vβ-Jβ	1	2
19	ЛУ CD3m+CD4+CD8-CD5+CD4+CD10-ALK-	ЛУ Сел	III	+	2Vγ-Jγ	0	1Vβ-Jβ	1	2
20	Сел CD3c+CD4-CD8-CD1a-CD2+CD5-CD7-CD4-CD8-CD16+CD56+	КМ Сел	IV	+	2Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	2Vβ-Jβ	2	2
21	ЛУ CD3m+CD4-CD8-CD30-CD15-CD5+CD7+NK-CD2+GranzB-	КМ ЛУ	IV	+	2Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	2Vβ-Jβ	<u>2</u>	2
22	ЛУ CD3m+CD4-CD8+CD30-CD10-CD15-CD23-	КМ ЛУ	IV	+	1Vγ-Jγ	0	2Vβ-Jβ	1	1
23	Орбита CD3m+CD4+CD8+CD5+CD7+TIA-1+CD10-CD30-CD56-LPM-1-CD23-ALK-	Мягкие ткани орбиты	IE	нм	1Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	1Vβ-Jβ	1	1

24	Сел CD3m+CD4+CD8- CD2+CD5+CD7+CD56+TIA-1+	КМ Сел	IV	+	2Vγ-Jγ	1Dβ-Jβ	2Vβ-Jβ	1	2
25	ЛУ CD3m+CD4+CD8- CD2+CD7+GranzB+CD30-CXCL13- PD1-LMP1-	Сел ЛУ	III	-	0	0	0	0	2
26	ЛУ CD3m+CD4+CD8- CD2+CD5+CD7+CD30-ALK- GranzB-EMA-CD56-CD57-	КМ ЛУ	IV	-	0	2 Dβ-Jβ (сомн)	1Vβ-Jβ (сомн)	1	2
27	ЛУ CD3e-CD4-CD8-CD10-CD5- CD23-CD30-ALK-ЛСА+CD2+CD7+ GranzB-	КМ ЛУ Кожа	IV	+	0	1Dβ-Jβ (КМ)	0	1	3
28	КМ CD2+CD3+CD5-CD7+-CD4- CD8-CD16+56+cytCD3TCRγδ+ Сел CD3e+ (m+cyt) CD4-CD8-CD5- CD7-TIA-I+CD56+	КМ Сел	IV	+	2Vγ-Jγ 3TCRD	2Dβ-Jβ	0	1	2
29	Кровь CD3+TCRαβ+CD4+CD8+CD5+CD7+	КМ Сел	IV	+	1Vγ-Jγ	0	2Vβ-Jβ	1	1
30	КМ 30% клеток CD3+CD4-CD8- CD5-CD2+	КМ Сел	IV	+	3 Vγ-Jγ	2Dβ-Jβ	1Vβ-Jβ	2	2

**Примечание.** ЛУ – лимфоузел, Сел – селезенка, КМ – костный мозг, Киш – кишечник, Жел – желудок, Горт – гортань, Печ – печень, Минд – миндалина, Легк – легкое, МЖ – молочные железы, НЛ – нейролейкемия, Сред – средостение. *TCRD\** – исследование генов *TCRD* проведено у двух пациентов с подозрением на γδ-Т-клеточную лимфому. Кол-во клонов\*\* – минимальное количество опухолевых клонов у пациента, которое оценивалось по количеству клональных реаранжировок в одном локусе и по появлению (смене) клональных продуктов в различных тканях. Случаи, где зафиксировано появление (смена) клональных продуктов, подчеркнуты. Объяснение см. в разделе Результаты и обсуждение. Общее кол-во клональных реаранжировок\*\*\* – совокупное количество клональных реаранжировок (пиков), обнаруженное во всех исследованных тканях. нм – нет материала, нд – нет данных, сомн – сомнительная картина.

Так как гены *TCRδ* (*TCRD*) располагаются внутри локуса *TCRα*, то они вырезаются при реаранжировках *TCRα*. Таким образом, спектр наблюдаемых при лимфомах клональных реаранжировок можно разделить на ранние и более зрелые. Если в опухоли обнаруживают клональные продукты локусов *TCRD*, *TCRG*, неполные перестройки Dβ-Jβ, и не находят полных Vβ-Jβ-реаранжировок генов *TCRB*, то это говорит о раннем характере реаранжировок, что соответствует опухоли из γδ-Т-лимфоцитов. Чаще в опухоли представлен более зрелый спектр реаранжировок: одновременно присутствуют реаранжировки Vγ-Jγ, Dβ-Jβ и Vβ-Jβ, что характерно для большинства *TCRαβ*-лимфом, в том числе и ПТКЛ. Согласно опубликованным данным, клональные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* имеют 81–94% и 96% ПТКЛн соответственно [7, 8].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В Гематологическом научном центре Минздрава России (далее ГНЦ) проведен ретроспективный анализ результатов исследования клональности при ПТКЛн за последние 10 лет (2005–2015 гг.).

### Пациенты и образцы

Выборка больных состояла из 30 человек (15 мужчин и 15 женщин, медиана возраста 56 лет (32–75)).

Стадию заболевания определяли согласно классификации Ann-Arbor (1971), поражение костного мозга считали IV стадией. У четырех пациентов диагностирована стадия I, у четырех – III, у 22 – IV. Поражение лимфатических узлов отмечено у 18 (60%) пациентов, костного мозга у 22 (73%), селезенки у 14 (47%), кожи у 5 (17%), желудочно-кишечного тракта у 4 (13%), легких у 4 (13%), миндалин у 3 (10%), печени у 3 (10%), средостения у 2 (7%), оболочек головного мозга (нейролейкемия) у 2 (7%), молочных желез у 2 (7%), мягких тканей орбиты у 1 (3%) (табл. 1). Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнены в патолого-анатомическом отделении ГНЦ, молекулярно-генетические исследования клональности – в лаборатории молекулярной гематологии ГНЦ.

### Выделение ДНК из тканей

Лейкоциты и ДНК из крови и костного мозга выделяли как описано ранее [14]. Для выделения ДНК из ткани, залитой в парафиновый блок, брали пять срезов по 5 мкм в пробирки Eppendorf. Ткань депарафинизировали методом нагревания [15, 16]. Свежезамороженную ткань для выделения ДНК размораживали и вырезали кусочек 1 × 1 × 1 мм. ДНК выделяли методом, основанным на растворении ткани в концентрированном аммиаке, с последующей

Таблица 2. Наборы ПЦР-праймеров по протоколу BIOMED-2 для генов *TCRD*, *TCRG*, *TCRB*

Набор праймеров (название пробирок)	Прямые праймеры	Обратные праймеры	Длина продуктов, п.н.
<i>TCRD</i> Tube A	Dδ2, Vδ1, Vδ2, Vδ3, Vδ4, Vδ5, Vδ6	Jδ1FAM Jδ2R6G Jδ3TAMRA Jδ4ROX	130–280
<i>TCRD</i> Tube B	Dδ2, Vδ1, Vδ2, Vδ3, Vδ4, Vδ5, Vδ6	Dδ3FAM	190–280
<i>TCRG</i>	Vγ1f, Vγ9, Vγ10, Vγ11	Jγ1/2FAM Jρ1/2FAM	100–250
<i>TCRB</i> Tube A	Vβ2–Vβ24 (23 праймера)	Jβ1.1–Jβ1.6HEX (6 праймеров) Jβ2.2, Jβ2.6, Jβ2.7 FAM (3 праймера)	240–280
<i>TCRB</i> Tube B	Vβ2–Vβ24 (23 праймера)	Jβ2.1, Jβ2.3, Jβ2.4, Jβ2.5 FAM (4 праймера)	240–280
<i>TCRB</i> Tube C	Dβ1, Dβ2	Jβ1.1–Jβ1.6HEX Jβ2.1–Jβ2.7FAM (13 праймеров)	170–210 (Dβ2) 290–310 (Dβ1)

нейтрализацией ледяной уксусной кислотой и высаливанием белков [17]. Концентрацию ДНК определяли на УФ-спектрофотометре. Образцы ДНК хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Исследование реаранжировок генов *TCR* при помощи ПЦР и фрагментного анализа

T-клеточную клональность оценивали с использованием мультиплексных систем праймеров BIOMED-2 для фрагментного анализа [13] по перестройкам генов *TCRG* (Vγ–Jγ), *TCRB* (Vβ–Jβ, Dβ–Jβ). При γδ-T-клеточных лимфомах анализировали также перестройки генов *TCRD*. Мультиплексную амплификацию генов *TCRD*, согласно протоколу BIOMED-2, проводили в двух пробирках – Tube A и Tube B, а амплификацию генов *TCRB* в трех пробирках – Tube A, Tube B и Tube C (описание реакций см. в табл. 2). Для амплификации генов *TCRD*, *TCRG* использовали праймеры производства «Синтол», Россия. Реакционная смесь в конечном объеме 20 мкл включала: 100 нг ДНК, 10 мкл 2 × смеси для ПЦР (PCR Master Mix Promega), 5 пмоль каждого праймера. Гены *TCRB* амплифицировали с использованием коммерческого набора *TCRB Gene Clonality Assay* ABI Fluorescence Detection (Invivoscribe Technologies) и ДНК-полимеразу *AmpliTaq Gold* (Applied Biosystems) в соответствии с инструкцией производителя. Условия ПЦР: предварительная денатурация  $95^{\circ}\text{C}$  (5 мин); 35 циклов –  $92^{\circ}\text{C}$  (35 с),  $60^{\circ}\text{C}$  (35 с),  $72^{\circ}\text{C}$  (35 с); окончательная элонгация –  $72^{\circ}\text{C}$  (10 мин). ПЦР проводили на автоматическом термоциклере *DNA Engine* (BioRad, Hercules, США).

Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеи-

новых кислот ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Для этого 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл формамида (Applied Biosystems) и 0.04 мкл *GeneScan 500-LIS Size Standard* (Applied Biosystems). После денатурации при  $95^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси вносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems). Флуоресценцию амплификатов и их профиль (распределение по длинам) анализировали при помощи компьютерной программы *GeneMapper v. 4.0* (Applied Biosystems).

#### Статистический анализ

Для сравнения результатов, полученных двумя методами, вычисляли критерий ранговой корреляции Спирмена по формуле:  $r_s = 1 - 6 \sum d^2 / (N^3 - N)$ , где  $N$  – число членов совокупности,  $d$  – разность рангов для каждого члена выборки,  $r_s$  – коэффициент Спирмена.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клональность генов *TCR* выявлена у 29 из 30 пациентов (97%): по генам *TCRG* – у 27 из 30 (90%), по генам *TCRB* – у 29 из 30 (97%). В некоторых образцах ПТКЛ реаранжировка обнаружена только в одном из локусов – *TCRG* или *TCRB*, что обусловлено аномальной дифференцировкой опухолевых клеток и часто сочетается с незрелым и aberrантным иммунофенотипом. Например, у опухолевых клеток пациента № 27, в костном мозге которого найдена лишь одна клональная реаранжировка Dβ–Jβ, на поверхности не найдены CD3, CD5, CD4 или CD8, а об-

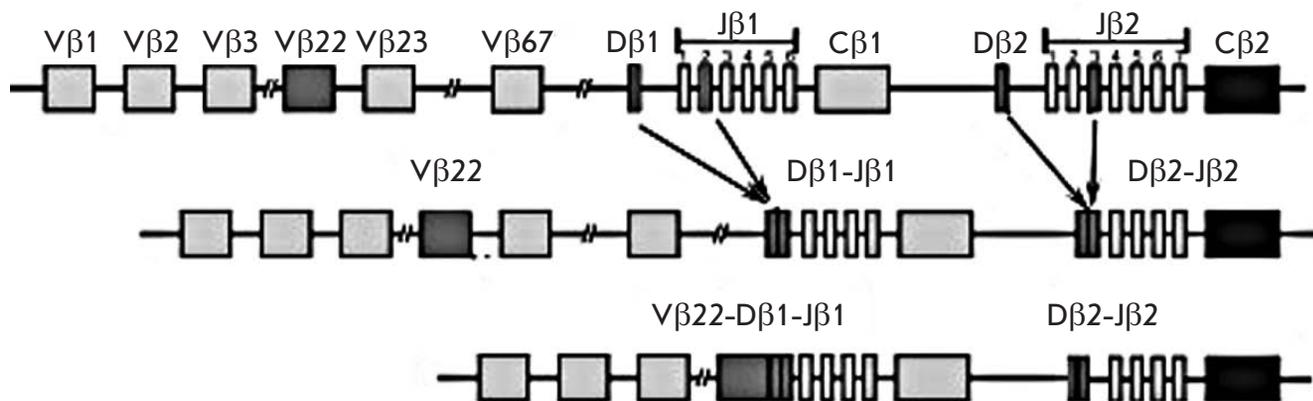


Рис. 3. Пример появления дополнительной реаранжировки Dβ2–Jβ. Представлена схема локуса TCRB с двумя реаранжировками Vβ22–Dβ1–Jβ1 и Dβ2–Jβ2

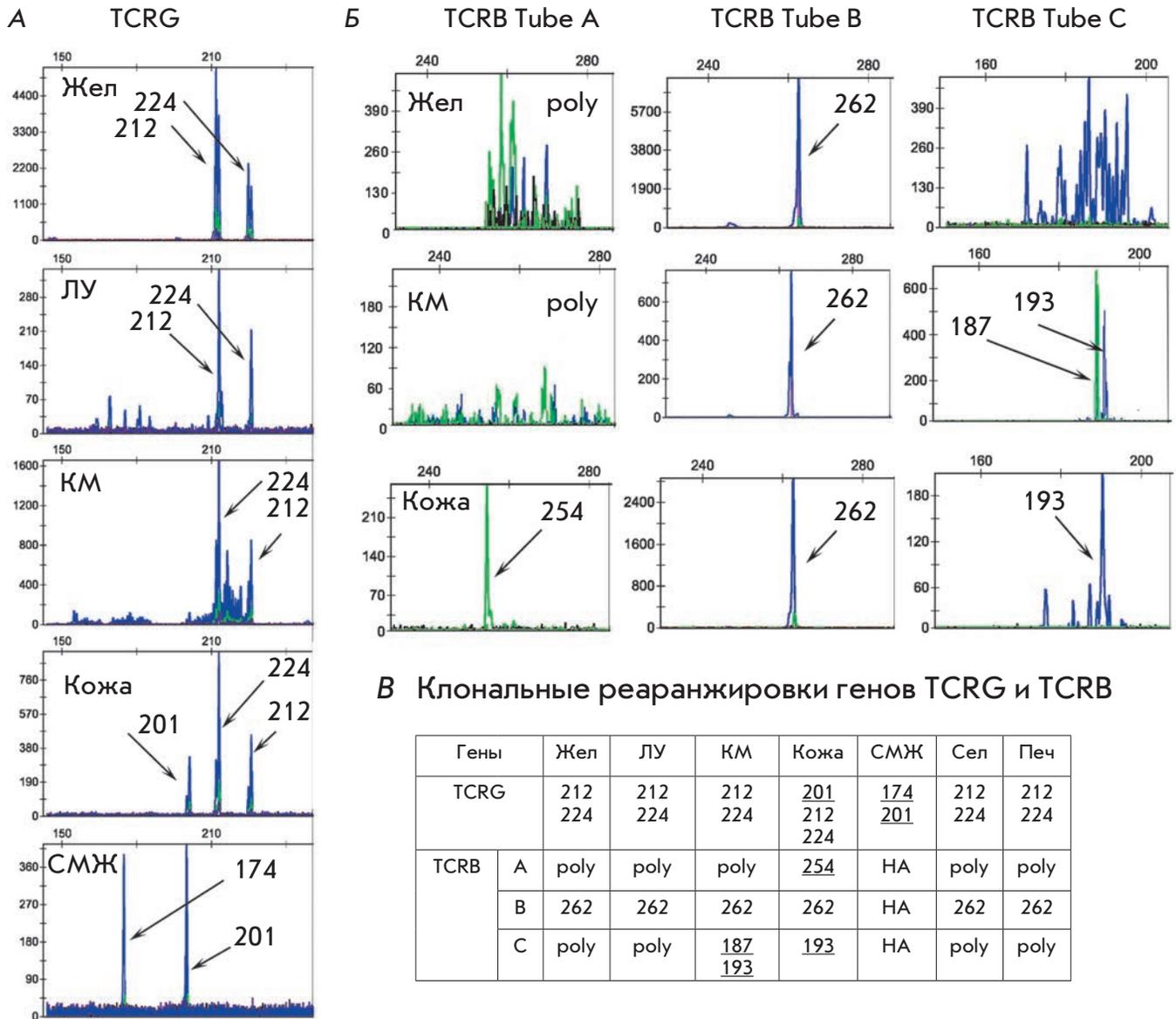
наружены только CD2 и CD7. Наиболее вероятная причина отсутствия клональных пиков при исследовании генов TCR (пациент № 25) – малое количество опухолевых клеток в образце (много реактивных Т-лимфоцитов). Методом ПЦР поражение костного мозга или лейкемизация (присутствие клональных лимфоцитов в крови) обнаружено у 93% (у 25 из 27) пациентов (табл. 1). При этом клональные реаранжировки в костном мозге не обнаружены только у пациентов № 25 и № 26, у которых клональные пики также отсутствовали или были сомнительными в лимфоузлах. У четырех пациентов (№ 16–19) морфологическими методами поражение костного мозга не выявлено, тогда как методом ПЦР клональные клетки выявлены в костном мозге. Обнаружение клональных реаранжировок генов TCRG в костном мозге или крови считается плохим прогностическим фактором при ПТКЛ [18]. У большинства пациентов мы наблюдали множественные (более двух) клональные реаранжировки в одном локусе. Клон опухолевых лимфоцитов может иметь реаранжировку на одной хромосоме (моноаллельная реаранжировка) или на двух гомологичных хромосомах (биаллельная реаранжировка). Таким образом, для каждого гена (TCRD или TCRG, или TCRB) в одном опухолевом клоне мы можем обнаружить только один или два клональных пика.

В качестве исключения описано появление дополнительной реаранжировки Dβ2–Jβ (рис. 3) [19, 20]. В этом случае при фрагментном анализе мы наблюдаем появление дополнительного клонального пика в диапазоне 170–210 п.н. в пробирке С (Tube С, см. табл. 2) при амплификации генов TCRB.

У 13 из 30 (43%) пациентов, хотя бы в одной ткани обнаружены три и более клональных пика в одном

локусе генов TCR (у 10 пациентов в локусе TCRG, у 11 – в локусе генов TCRB). При этом множественные (три и более) клональные пики с одинаковой частотой обнаруживались в костном мозге, лимфоузлах и/или селезенке (у 10 из 13 пациентов). Теоретически «лишние» пики можно было бы отнести на счет реактивных Т-клеток, однако мы столкнулись с совершенно иной ситуацией. У 63% пациентов (15 из 24), у которых анализировали несколько тканей, мы наблюдали появление новых клональных пиков и соответственно новых клонов в различных тканях. Зафиксированные ранее клональные реаранжировки либо не определялись, либо частично сохранялись. При этом картина по генам TCRG и TCRB совпадала, т.е. обнаружение нового клонального пика по генам TCRG обычно сопровождалось выявлением новой клональной реаранжировки генов TCRB. Такую картину можно объяснить только присутствием нескольких опухолевых клонов и различным их представительством в тканях и органах. В общей сложности у 19 из 30 пациентов (63%) мы обнаружили несколько клонов. Число клонов варьировало от двух до семи (табл. 1). Корреляции с возрастом ( $p = 0.43$ ) и стадией заболевания ( $p = 0.29$ ) не обнаружено. Выявление нескольких клонов коррелировало с количеством проанализированных тканей ( $r_s = 0.6$ ,  $p < 0.0005$ ). Возможно, данный феномен не был обнаружен у других пациентов лишь из-за малого количества изученных тканей. Ниже приведены наиболее репрезентативные примеры исследования клональности при ПТКЛ.

**Пациент 11** (рис. 4). При постановке диагноза у пациента 11 выявлена типичная для зрелой Т-клеточной лимфомы картина: биаллельная реаранжировка генов TCRG (212 и 224 п.н.) и полная ре-



**Рис. 4.** Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 11. А – исследование генов *TCRG*. Б – исследование генов *TCRB*. В – общая таблица. Жел – желудок, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, СМЖ – спинномозговая жидкость, poly – поликлональный результат, HA – нет амплификации. Новые клональные продукты подчеркнуты

аранжировка генов *TCRB* (Tube B 262 п.н.). При исследовании костного мозга выявлено еще два клона с неполными реаранжировками генов *TCRB* (Tube C 187 и 193 п.н.). Прогрессия заболевания приводит к поражению кожи, при котором обнаружены один или два новых клона с реаранжировкой генов *TCRG* (201 п.н.) и полной реаранжировкой генов *TCRB* (Tube A 254 п.н.). Дальнейшая прогрессия приводит к развитию нейрорлейкемии. В спинномозговой жидкости (СМЖ) отсутствуют клоны, обнаруженные в опухоли ранее (*TCRG* 212 и 224 п.н.), но найден клон с реаранжировкой генов *TCRG* длиной 201 п.н. и новый

клон с реаранжировкой генов *TCRG* длиной 174 п.н. Через 11 месяцев в связи с нарастающей цитопенией пациенту проведена спленэктомия и биопсия печени. В селезенке и печени картина клональных реаранжировок совпадает с первоначальной картиной в лимфоузле и желудке. Таким образом, у пациента 11 в общей сложности выявлены четыре реаранжировки генов *TCRG*: две полные реаранжировки генов *TCRB* и две неполные реаранжировки генов *TCRB*. Динамика появления новых реаранжировок в ходе прогрессии заболевания свидетельствует о пяти или более различных опухолевых клонах.

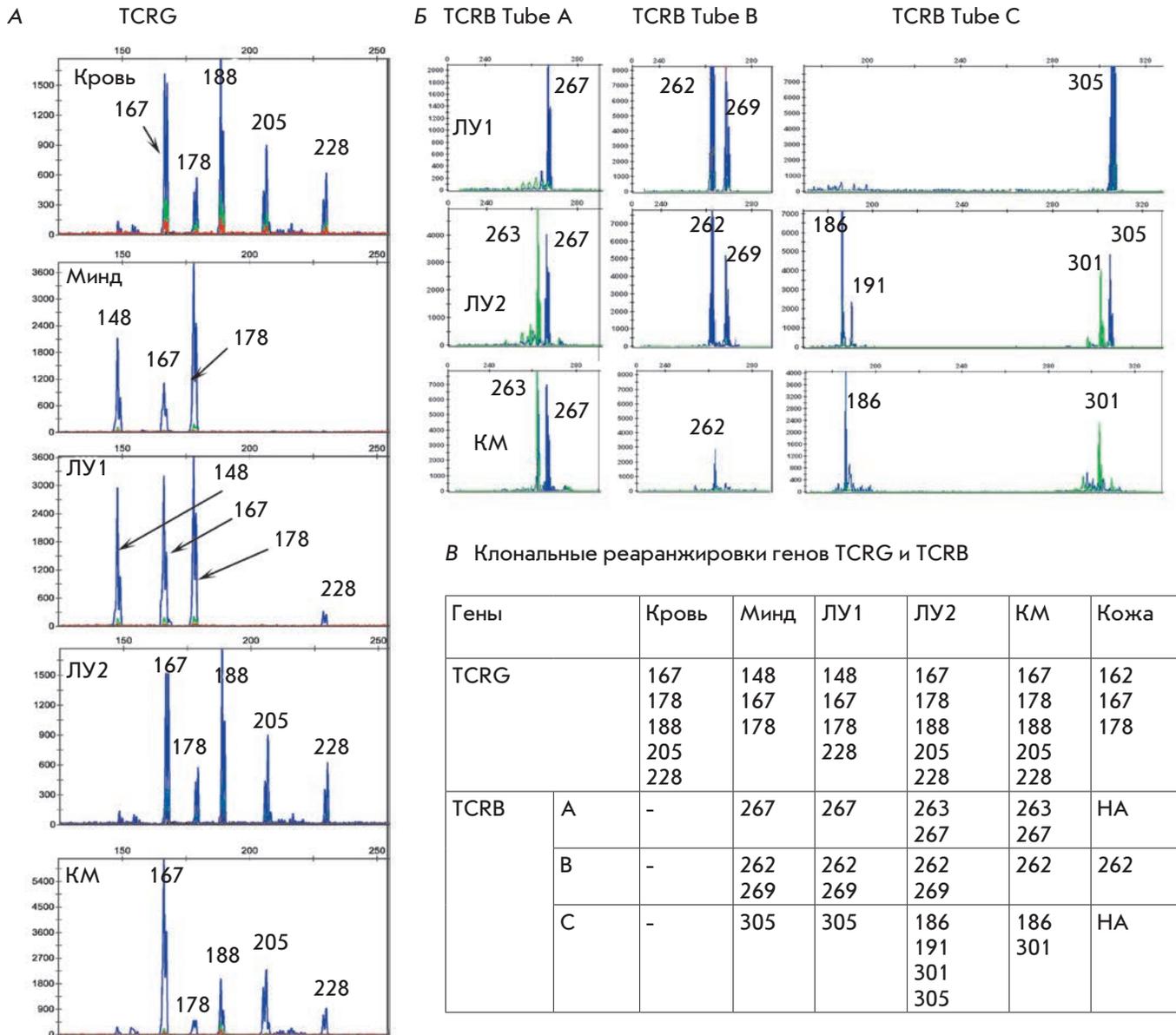


Рис. 5. Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 9. А – исследование генов *TCRG*. Б – исследование генов *TCRB*. В – общая таблица. Минд – миндалина, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, HA – нет амплификации

**Пациент 9** (рис. 5). У пациента 9 выявлены множественные клональные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB* с различным представительством клонов в тканях и органах. При первичной диагностике исследовали кровь, костный мозг, биоптат миндалины и лимфоузла № 1. В крови и костном мозге выявлено пять и более реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB*. В миндалине и лимфоузле № 1 найдены три и четыре клональных реаранжировки *TCRG* соответственно, и четыре реаранжировки генов *TCRB*. При прогрессии заболевания выполнена

биопсия лимфоузла № 2 и кожи. В биоптате лимфоузла найдено пять реаранжировок генов *TCRG* и восемь – *TCRB*. За исключением реаранжировки генов *TCRB* (А) 267 п.н. и генов *TCRB* (В) 262 п.н., которые в большинстве тканей присутствуют одновременно, остальные реаранжировки генов *TCRB* распределены произвольно и относятся к различным опухолевым клонам. Данные молекулярного исследования клональности свидетельствуют о наличии у данного пациента семи или более опухолевых клонов.

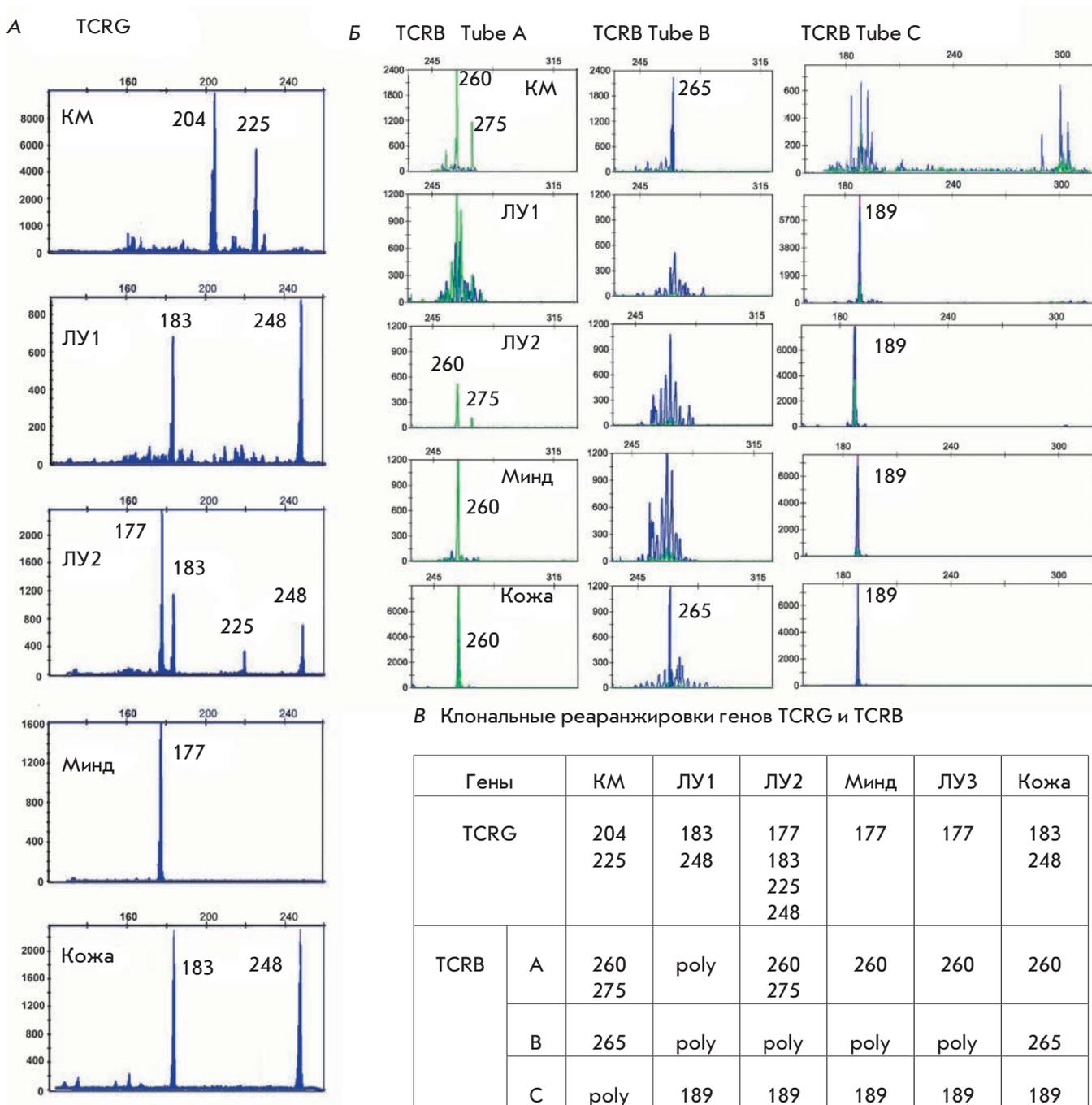


Рис. 6. Результаты исследования клональных реаранжировок пациента 8. А – исследование генов *TCRG*. Б – исследование генов *TCRB*. В – общая таблица. Минд – миндалина, КМ – костный мозг, ЛУ – лимфатический узел, poly – поликлональный результат

**Пациент 8 (рис. 6).** У пациента 8 выявлено пять различных реаранжировок *TCRG* (177, 183, 204, 225, 248 п.н.), при этом в исследованных тканях представлены разные клоны. Найдено четыре реаранжировки генов *TCRB*: три полные реаранжировки (Tube А и В) и одна неполная D $\beta$ 2–J $\beta$ 2 (Tube С). В данном случае

нет четкой связи между картиной реаранжировок генов *TCRG* и *TCRB*. Например, в лимфоузле № 1 и коже доминируют реаранжировки генов *TCRG* 183 и 248 п.н., однако в случае генов *TCRB* картина различается. Количество клонов у данного пациента – четыре или более, однако не исключено, что клонов

может быть гораздо больше. Например, клоны только с реаранжировкой *TCRG* или *TCRB*, или клоны с реаранжировкой генов *TCRG* 177 п.н. и *TCRB* 260 п.н., *TCRG* 177 п.н. и *TCRB* 189 п.н. и т.д.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие нескольких опухолевых клонов, описанное при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ), объясняется «текущим» незавершенным процессом реаранжировок генов иммуноглобулинов и *TCR* в ранних клетках-предшественниках [21–24]. Секвенирование клональных продуктов при манифестации ОЛЛ и в рецидиве показало, что при ОЛЛ одновременно присутствуют клоны с незавершенной реаранжировкой генов *TCRD* или *TCRB* и производные от них клоны с завершенными реаранжировками. Кроме того, в ряде случаев происходит изменение завершенной реаранжировки. Ген *V* заменяется другим (вышележащим) либо реаранжировка полностью заменяется на другую из вышележащих генов *V* и нижележащих *J*, т.е. генов, которые находятся дистальной предыдущей реаранжировки. Иногда в рецидиве наблюдается делеция и исчезновение клональной реаранжировки генов *TCR*.

Мы предполагаем, что молекулярные события, происходящие при ОЛЛ, могут иметь место и при ПТКЛ. В опухолевой клетке нарушены механизмы контроля, которые при наличии продуктивной реаранжировки останавливают дальнейшие перестройки локуса: повышена активность ферментов *RAG1* и *RAG2*, изменена организация хроматина и т.д. Вероятно, при ПТКЛ реаранжировки могут заменяться новыми и/или возможна замена незавершенных *D $\beta$ -J $\beta$*  на завершенные *V $\beta$ -J $\beta$* . Кроме того, наблюдается общая хромосомная нестабильность, которая может приводить к делециям или дуплика-

циям локуса генов *TCR*. Делеция локуса, вероятно, запускает механизм дальнейших реаранжировок на гомологичной хромосоме. Комплексные хромосомные изменения, в том числе триплоидия, тетраплоидия, потери хромосом, трисомия 7q, транслокации с участием локусов генов *TCR* (14q11, 7q34–35, 7p13–21), описаны при различных периферических Т-клеточных лимфомах [25–27]. В любом случае клональные реаранжировки – это лишь маркер, который показывает гетерогенность данной опухоли и клональную эволюцию при прогрессии заболевания. У большинства пациентов нами выявлена «многоклоновость», однако пока неясно, присущ ли данный феномен только ПТКЛ. Возможно, некоторые другие лимфомы также обладают значительной клональной гетерогенностью, но для их «визуализации» требуются другие подходы и методы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение клональности по генам *TCRG* и *TCRB* позволяет эффективно доказывать присутствие опухоли у большинства (97%) пациентов с ПТКЛ. Методом ПЦР показано поражение костного мозга и/или лейкокемия у большинства (93%) обследованных, тогда как морфологически поражение костного мозга подтверждено только у 73% пациентов. Специфическая картина реаранжировок при ПТКЛ (множественные реаранжировки генов *TCRG* и *TCRB*, утрата и появление новых, присутствие нескольких опухолевых клонов) наблюдалась у большей части пациентов (63%) и безусловно должна учитываться при использовании данного метода в диагностических целях. Появление новых клональных пиков (клонов) не должно расцениваться как появление новой опухоли. Кроме того, множественные реаранжировки крайне затрудняют оценку минимальной остаточной болезни при ПТКЛ. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC, 2008. V. 2. 439 p.
2. Vose J., Armitage J., Weisenburger D., Savage K., Connors J., Gascoyne R., Chhanabhai M., Wilson W., Jaffe E., Armitage J., et al. // J. Clin. Oncol. 2008. V. 26. № 25. P. 4124–4130.
3. Weisenburger D.D., Savage K.J., Harris N.L., Gascoyne R.D., Jaffe E.S., MacLennan K.A., Rüdiger T., Pileri S., Nakamura S., Nathwani B., et al. // Blood. 2011. V. 117. № 12. P. 3402–3408.
4. de Leval L., Gaulard P. // Histopathology. 2011. V. 58. № 1. P. 49–68.
5. Виноградова Ю.Е., Луценко И.Н., Самойлова Р.С., Селиванова Е.И., Замулаева И.А., Грецов Е.М., Воробьев И.А., Капланская И.Б., Рыжикова Н.А., Аль-Ради Л.С. и др. // Гематология и трансфузиология. 2009. Т. 54. № 2. С. 14–18.
6. Vinogradova Y.E., Kaplanskaya I.B., Samoilova R.S., Vorobiev I.A., Zingerman B.V., Sidorova Y.V., Shklovskiy-Kordi N.E., Aitova L.G., Maryin D.C., Vorobiev A.I., et al. // Clin. Med. Insights: Blood Disorders. 2012. № 5. P. 1–13.
7. Brüggemann M., White H., Gaulard P., Garcia-Sanz R., Gameiro P., Oeschger S., Jasani B., Ott M., Delsol G., Orfao A., et al. // Leukemia. 2007. V. 21. № 2. P. 215–221.
8. Tan B.T., Warnke R.A., Arber D.A. // J. Mol. Diagn. 2006. V. 8. № 4. P. 466–475.
9. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Пекло М., Власик Т.Н., Самойлова Р.С., Кравченко С.К., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Е., Пивник А.В., Судариков А.Б. // Терапевт. архив. 2003. Т. 75. № 7. С. 48–52.
10. Никитин Е.А., Сидорова Ю.В., Рыжикова Н.В., Бидерман Б.В., Меликян А.Л., Виноградова Ю.Э., Аль-Ради Л.С., Судариков А.Б. // Терапевт. архив. 2006. Т. 78. № 7. С. 52–57.
11. Сидорова Ю.В., Никитин Е.А., Бидерман Б.В., Грознова

- А.А., Сорокина Т.В., Судариков А.Б. // Справочник заведующего КДЛ. 2009. № 6. P. 13–21.
12. Rothenberg E.V., Moore J.E., Yui M.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. V. 8. № 1. P. 9–21.
13. Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuur- ing E., García-Sanz R., et al. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
14. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисиличина Д.Г., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Лугов- ская С.А., Иванова В.Л., Ковалева Л.Г., и др. // *Клин. лаб. диагностика.* 2011. № 12. С. 22–35.
15. Wu L., Patten N., Yamashiro C.T., Chui B. // *Appl. Immuno- histochem. Mol. Morphol.* 2002. V. 10. № 3. P. 269–274.
16. Coombs N.J., Gough A.C., Primrose J.N. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 16. e12.
17. Sidorova J.V., Biderman B.V., Nikulina E.E., Sudarikov A.B. // *Exp. Dermatol.* 2012. V. 21. № 1. P. 57–60.
18. Schützinger C., Esterbauer H., Hron G. // *Leuk. Lymphoma.* 2008. V. 49. № 2. P. 237–246.
19. Langerak A.W., Wolvers-Tettero I.L.M., Van Dongen J.J.M. // *Leukemia.* 1999. V. 13. № 6. P. 965–974.
20. Groenen P.J., Langerak A.W., van Dongen J.J., van Krieken J.H. // *J. Hematop.* 2008. V. 1. № 2. P. 97–109.
21. Szczepański T., van der Velden V.H., Raff T., Jacobs D.C., van Wering E.R., Brüggemann M., Kneba M., van Dongen J.J. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 11. P. 2149–2156.
22. de Haas V., Verhagen O.J., von dem Borne A.E., Kroes W., van den Berg H., van der Schoot C.E. // *Leukemia.* 2001. V. 15. № 1. P. 134–140.
23. Szczepański T., Willemsse M.J., Brinkhof B., van Wering E.R., van der Burg M., van Dongen J.J. // *Blood.* 2002. V. 99. № 7. P. 2315–2323.
24. Germano G., del Giudice L., Palatron S., Giarin E., Cazza- niga G., Biondi A., Basso G. // *Leukemia.* 2003. V. 17. № 8. P. 1573–1582.
25. Boehm T., Rabbitts T.H. // *FASEB J.* 1989. V. 3. № 12. P. 2344–2359.
26. Schlegelberger B., Himmler A., Godde E., Grote W., Feller A.C., Lennert K. // *Blood.* 1994. V. 83. № 2. P. 505–511.
27. Gesk S., Martín-Subero J.I., Harder L., Luhmann B., Schlegelberger B., Calasanz M.J., Grote W., Siebert R. // *Leu- kemia.* 2003. V. 17. № 4. P. 738–745.