

ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

LYMPHOID TUMORS

Прогностическая роль генетических аберраций при лимфоме из клеток мантии: обзор литературы и собственные данные

The Prognostic Role of Genetic Aberrations in Mantle Cell Lymphoma: A Literature Review and Clinical Experience

**Е.В. Kleina¹, С.В. Волошин^{1,2}, Ю.С. Вокуева¹,
О.Д. Петухова¹, Е.В. Мотыко¹, М.П. Бакай¹,
Д.В. Кустова¹, А.Н. Кириенко¹, С.Ю. Линников¹,
Е.В. Карягина³, О.С. Успенская⁴, И.С. Зюзгин⁵,
С.В. Сидоркевич¹, И.С. Мартынкевич¹**

**EV Kleina¹, SV Voloshin^{1,2}, YuS Vokueva¹,
OD Petukhova¹, EV Motyko¹, MP Bakai¹, DV Kustova¹,
AN Kirienko¹, SYu Linnikov¹, EV Karyagina³,
OS Uspenskaya⁴, IS Zyuzgin⁵, SV Sidorkevich¹,
IS Martynkevich¹**

¹ ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

¹ Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, ул. Академика Лебедева, д. 6, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194044

² SM Kirov Military Medical Academy, 6 Akademika Lebedeva ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 194044

³ ГБУЗ «Городская больница № 15», ул. Авангардная, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 198205

³ Municipal Hospital No. 15, 4 Avangardnaya ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 198205

⁴ ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», пр-т Луначарского, д. 45, корп. 2А, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194291

⁴ Leningrad Regional Clinical Hospital, 45 korp. 2A Lunacharskogo pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194291

⁵ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ул. Ленинградская, д. 68, пос. Песочный, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197758

⁵ NN Petrov National Medical Cancer Research Center, 68 Leningradskaya ul., Pesochnyi pos., Saint Petersburg, Russian Federation, 197758

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Лимфома из клеток мантии (МКЛ) — вариант периферической В-клеточной неходжкинской лимфомы, характеризуется конститутивной гиперэкспрессией циклина D1, приводящей к дисрегуляции клеточного цикла и нарушению процессов репарации повреждений в ДНК. Помимо типичной транслокации t(11;14)(q13;q32) и более редких вариантов t(2;11)(p11;q13), t(11;22)(q13;q11) у значительного числа пациентов нередко выявляются вторичные молекулярные и хромосомные аберрации, обуславливающие гетерогенность клинического течения МКЛ. Среди широкого спектра молекулярно-генетических нарушений в последние годы особое внимание уделяется изучению так называемой double-hit МКЛ в подгруппе пациентов с транслокациями, вовлекающими гены *CCND1* и *MYC*. «Double-hit» МКЛ отличается быстрым прогрессированием и генерализацией опухоли ко времени постановки диагноза. Неблагоприятный прогноз и низкие показатели выживаемости у большей части пациентов с МКЛ обуславливают необходимость в максимально быстрой постановке диагноза. Применение морфологических и иммуногистохимических методов исследования наряду с генетическими (стандартным цитогенетическим исследованием и флюоресцентной гибридизацией *in situ*) способствует улучшению качества диагностики с высокой доказательной базой. Результаты комплексных диагностических исследований создают оптимальные условия в клинике для оценки прогноза и выбора наиболее адекватной тактики лечения.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a type of peripheral B-cell non-Hodgkin's lymphoma characterized by constitutive cyclin D1 overexpression leading to cell-cycle dysregulation and disruption of DNA damage repair. Apart from the typical translocation t(11;14)(q13;q32) and more rare variants, such as t(2;11)(p11;q13) and t(11;22)(q13;q11), a considerable number of patients quite often show secondary molecular and chromosomal aberrations underlying heterogeneity of the clinical course of MCL. Among a wide range of molecular genetic abnormalities, particular attention during the last years has been concentrated on studying the so-called double-hit MCL within a subgroup of patients with translocations involving *CCND1* and *MYC* genes. Double-hit MCL is distinguished with rapid progression and tumor generalization at the time of diagnosis. Poor prognosis and low survival rates in most MCL patients call for the fastest possible diagnosis. Morphological and immunohistochemical as well as genetic methods (standard cytogenetic technique and fluorescence *in situ* hybridization) contribute to improving the quality of evidence-based diagnosis. The results of comprehensive diagnostic studies optimize prognosis assessment and treatment decision making in clinic.

Ключевые слова: лимфома из клеток мантии, «double-hit» МКЛ, кариотип, генетические aberrации, факторы прогноза.

Keywords: mantle cell lymphoma, double-hit MCL, karyotype, genetic aberrations, prognostic factors.

Получено: 16 августа 2022 г.

Принято в печать: 27 февраля 2023 г.

Received: August 16, 2022

Accepted: February 27, 2023

Для переписки: Елизавета Вячеславовна Клеина, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; e-mail: elizabeth.kleina@gmail.com

For correspondence: Elizaveta Vyacheslavovna Kleina, 16 2-ya Sovetskaya ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; e-mail: elizabeth.kleina@gmail.com

Для цитирования: Клеина Е.В., Волошин С.В., Вокуева Ю.С. и др. Прогностическая роль генетических aberrаций при лимфоме из клеток мантии: обзор литературы и собственные данные. Клиническая онкогематология. 2023;16(2):213–26.

For citation: Kleina EV, Voloshin SV, Vokueva YuS, et al. The Prognostic Role of Genetic Aberrations in Mantle Cell Lymphoma: A Literature Review and Own Experience. Clinical oncohematology. 2023;16(2):213–26. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-213-226

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-213-226

ВВЕДЕНИЕ

Лимфома из клеток мантии (МКЛ) — вариант периферической неходжкинской лимфомы (НХЛ) из зрелых В-лимфоцитов, характеризующийся наличием транслокации t(11;14)(q13;q32) [1–5] и гиперэкспрессией циклина D1 [3, 6]. МКЛ составляет примерно 3–10 % всех В-клеточных НХЛ [2, 3]. Медиана возраста у пациентов с МКЛ составляет 60 лет. Преимущественно болеют мужчины (соотношение мужчин/женщин примерно 2:1) [8].

Заболевание в большинстве случаев манифестирует на поздних стадиях распространения опухоли (III–IV по классификации Ann Arbor) и отличается агрессивным клиническим течением с кратковременной ремиссией и частыми рецидивами. Все это требует незамедлительного начала противоопухолевой терапии после постановки диагноза с учетом возраста, общесоматического статуса и рассмотрением возможности проведения трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток. В патологический процесс наиболее часто вовлекаются лимфатические узлы, селезенка (в 80 % случаев определяется спленомегалия), костный мозг с лейкозным составом крови и без такового. Другие зоны поражения включают ЖКТ (желудок, тонкую кишку, толстую кишку), глоточное лимфоидное кольцо Пирогова—Вальдейера, кожу, слезные железы, ЦНС.

Медиана общей выживаемости (ОВ) у пациентов с МКЛ существенно короче, чем при других В-линейных периферических мелкоклеточных лимфомах, и составляет около 3–5 лет. Однако у части больных (примерно 10–15 % случаев) наблюдается индолентное клиническое течение МКЛ, при котором длительное время применение противоопухолевой терапии не требуется [2, 4, 8–10].

Результаты проведенных исследований показали, что в основе вариабельности клинических проявлений при МКЛ наряду с другими параметрами лежат и молекулярно-генетические aberrации, выявление которых имеет важное диагностическое и прогностическое значение, а также помогает осуществлять мониторинг минимальной остаточной болезни.

Прогноз течения заболевания у пациентов с МКЛ в клинической практике строится на результатах оценки международного прогностического индекса (MIPI) и его модификаций (MIPI-c, MIPIb). Кроме того, учитывается индекс пролиферативной активности опухоли Ki-67, высокий уровень экспрессии которого коррелирует с агрессивным течением болезни и худшими показателями выживаемости больных МКЛ [7, 8, 11, 12].

Однако прогностические системы MIPI-c и MIPIb не включают молекулярно-цитогенетические характеристики опухолевых клеток, которые во многом определяют характер и степень выраженности клинических проявлений, а также помогают наиболее тщательно прогнозировать течение заболевания. Таким образом, в алгоритме диагностики МКЛ помимо оценки прогностических параметров, предусмотренных в MIPI, а также Ki-67 важно уделять особое внимание исследованию кариотипа у пациентов, в т. ч. с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Такой подход позволит выявлять МКЛ высокого риска: «double-hit» (одновременное наличие транслокаций, вовлекающих гены *CCND1* и *MYC*) и с комплексными нарушениями кариотипа (≥ 3 хромосомных aberrаций).

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Морфологические и молекулярно-генетические характеристики МКЛ

В 1970-е годы исследователи стали выделять особый гистологический тип НХЛ, который имел морфологические признаки, сходные как с высокодифференцированной лимфомой из малых лимфоцитов, так и с низкодифференцированной мелкоклеточной лимфомой с расщепленными ядрами из клеток типа centrocytes герминативного центра. Этот новый подтип НХЛ в Кильской классификации 1980 г. определялся как «центроцитарная лимфома» промежуточной степени дифференцировки (термин предложен C.W. Verard и соавт.) [8, 13]. Субстрат опухоли характеризовался наличием атипичных малых лимфоидных клеток с широкой мантией вокруг

герминативных центров и получил название «лимфома из клеток мантии». Позже было показано, что данный вариант НХЛ развивается из клеток мантии вторичных лимфоидных фолликулов и экспрессирует В-клеточные маркеры, отличные от фолликулярной лимфомы. С появлением пересмотренной Европейско-Американской классификации (REAL) и классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) МКЛ обозначена как самостоятельная нозологически очерченная единица [8, 9].

Постановка диагноза МКЛ осуществляется по результатам комплексного обследования пациента. С диагностической целью используются такие методы, как морфологический и иммуногистохимический (ИГХ), иммунофенотипический, цитогенетический и молекулярно-генетический [8, 10].

На основании морфологических методов исследования выделяют четыре варианта МКЛ: классический (мелкоклеточный), по типу лимфомы из клеток маргинальной зоны, а также бластоидный и плеоморфный, которые считаются наиболее агрессивными и связаны с неблагоприятным прогнозом, комплексными изменениями кариотипа и, в отдельных случаях, с атипичным иммунофенотипом [1, 14, 15]. При бластоидном варианте, встречающемся в 20 % случаев, опухолевые клетки по морфологии напоминают лимфобласты с дисперсным хроматином и высокой митотической активностью. Плеоморфный вариант характеризуется наличием преимущественно полиморфных клеток, часто крупного размера, с овальной или неправильной формой ядер и светлой цитоплазмой [8, 9]. Классический морфологический вариант МКЛ часто сопровождается пролиферацией атипичных лимфоидных клеток малого и среднего размеров с нечетким контуром ядра, напоминающих centroциты [2, 10]. В ряде случаев встречается мелкоклеточный вариант, который по морфологической картине похож на хронический лимфолейкоз/лимфому из малых лимфоцитов (ХЛЛ/ЛМЛ), но с отсутствием в пролиферативных центрах параиммунобластов. У части пациентов выявляются клетки с моноцитоподобной морфологией, напоминающие лимфому из клеток маргинальной зоны или ХЛЛ/ЛМЛ [10]. При оценке гистологической картины МКЛ также учитывается и тип роста опухолевой ткани: нодулярный, диффузный или мантийный.

При иммунофенотипическом исследовании выявляется экспрессия опухолевыми клетками рецепторов CD19, CD20, CD5. Экспрессия CD3, CD23, CD10 и CD11c не определяется. Встречаются редкие иммунофенотипы с отсутствием экспрессии CD5, CD10-позитивные или экспрессирующие BCL6 [9, 10].

ИГХ-маркеры, такие как лимфоидный энхансер-связывающий фактор 1 (LEF1) и ядерный белок SOX11 (Sry-related high-mobility-group box), важны для дифференциальной диагностики МКЛ и других В-клеточных лимфом: ХЛЛ/ЛМЛ, лимфомы из клеток маргинальной зоны и фолликулярной лимфомы. LEF1 в норме экспрессируется в ядрах Т-лимфоцитов, В-пролимфоцитов, а также выявляется на самых ранних этапах лимфопоэза [16]. Аберрантная экспрессия LEF1 определяется практически во всех случаях ХЛЛ/ЛМЛ,

что может учитываться в дифференциальной диагностике опухолей из малых В-лимфоцитов. При МКЛ экспрессия LEF1 не выявляется [17–19]. Большинство МКЛ, в т. ч. и без транслокации $t(11;14)(q13;q32)$, экспрессирует SOX11 — транскрипционный фактор, участвующий в регуляции эмбрионального развития и крайне редко определяющийся в нормальных лимфоцитах [20]. SOX11 присутствует в 93–95 % случаев МКЛ с экспрессией циклина D1 [20, 21]. Кроме того, показано, что наличие экспрессии SOX11 является диагностическим маркером циклин D1-негативных МКЛ, при которых экспрессия данного протеина обнаруживается в 90–95 % случаев. ИГХ-исследование для выявления экспрессии циклинов D2 и D3 не является высокоспецифичным и дает положительный результат при других вариантах лимфом [10, 22]. При ХЛЛ/ЛМЛ в пролиферативных центрах лимфатических узлов может выявляться экспрессия циклина D1. В подобных ситуациях опухолевые клетки не несут транслокацию $t(11;14)(q13;q32)$ и отрицательны по экспрессии SOX11, при этом могут экспрессировать LEF1 [10].

Кроме того, показано, что экспрессия SOX11 может служить маркером агрессивного течения опухоли с неблагоприятным исходом [3, 23].

Роль дополнительных хромосомных aberrаций в лимфогенезе МКЛ

Транслокация $t(11;14)(q13;q32)$ является первичным генетическим событием в патогенезе МКЛ, приводящим к конститутивной гиперэкспрессии циклина D1, не определяющейся в лимфоцитах в норме, нарушению регуляции клеточного цикла на стадии перехода из G1 в S-фазу и бесконтрольной клеточной пролиферации [1, 2, 8, 10, 15]. В дополнение к иницирующему онкогенетическому событию большинство случаев МКЛ сопровождается наличием вторичных генетических aberrаций, преимущественно вовлекающих гены репарации повреждений в ДНК, и регуляции клеточного цикла, что приводит к вовлечению в патологический процесс других механизмов регуляции клеточной дифференцировки и роста, необходимых для инициации лимфогенеза при МКЛ [2, 4].

МКЛ — вариант В-клеточной НХЛ, характеризующийся высокой частотой нестабильности генома. Такие aberrации, как делеции $del(1p)$, $del(8p)$, $del(9p)$ (*CDKN2A*, *CNKN2B*), $del(9q)$, $del(11q)$ (*ATM*), $del(17p)$ (*TP53*), амплификации локусов на 3q, 8q (*MYC*), 10p (*BMI1*), 15q, 18q, значительно снижают активность различных видов репарации повреждений в ДНК, потенцируют высокую пролиферативную активность клеток опухолевого клона и являются предикторами неблагоприятного прогноза [24, 25].

В классификации ВОЗ 2016 г. представлено два молекулярных пути развития МКЛ, характеризующихся различным дебютом заболевания. Субстратом при классическом морфологическом варианте МКЛ являются зрелые В-клетки, не входящие в герминативный центр и не имеющие мутаций в гене *IGHV*, однако с наличием экспрессии транскрипционного фактора SOX11. В дебюте заболевания возможно вовлечение лимфатических узлов и наличие экстранодальных очагов поражения. Эти варианты МКЛ склонны к

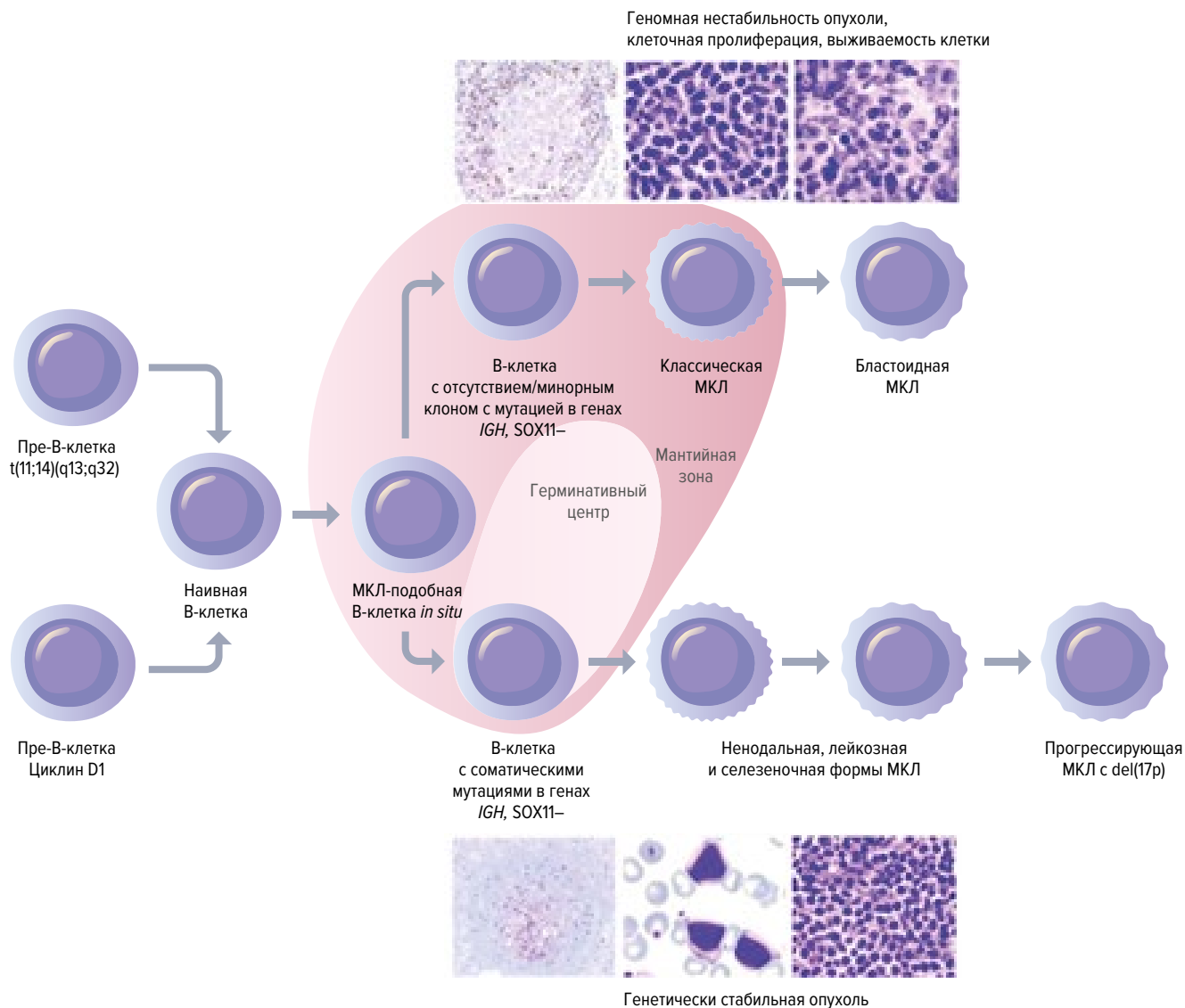


Рис. 1. Разработанная P. Jares и соавт. модель молекулярного патогенеза и прогрессии лимфомы из клеток мантии (МКЛ) (цит. по [26])

Fig. 1. The model of molecular pathogenesis and mantle cell lymphoma (МКЛ) progression developed by P. Jares et al. (quoted from [26])

накоплению дополнительных aberrаций в результате нарушений в процессах регуляции клеточного цикла, ответа на повреждение ДНК или сигнальных путей, поддерживающих основные функции клетки, что приводит к более агрессивному течению заболевания с бластоидной или плеоморфной гистологической картиной. Реже лейкозная ненодальная МКЛ развивается из клеток герминативного центра с соматическими гипермутациями в гене *IGHV* и с отсутствием или минимальной экспрессией *SOX11*. У ряда пациентов манифестация заболевания характеризуется вовлечением селезенки, костного мозга и лейкозными изменениями в периферической крови. Такая форма МКЛ протекает более индолентно, с генетической стабильностью опухоли в течение долгого времени. Однако вторичные генетические aberrации, такие как мутации в гене *TP53*, могут привести к более агрессивному течению МКЛ, связанному с неблагоприятным прогнозом [11].

Модель молекулярного патогенеза и прогрессии МКЛ, дополненная информацией о мутационном статусе генов *IGH* и *SOX11*, была предложена P. Jares и соавт. [26] (рис. 1).

На экспериментальных моделях трансгенных мышей показано, что наличия только транслокации *t(11;14)(q13;q32)* или гиперэкспрессии циклина D1 недостаточно для инициации лимфомогенеза и что реализация онкогенетической активности *CCND1-IGH* происходит за счет вторичных генетических aberrаций. Кроме того, обнаружено, что конститутивная экспрессия циклина D1 в значительной степени увеличивается под влиянием генов семейства *MYC* [10, 27–30]. Выявлено, что дополнительно в патогенез МКЛ вовлекаются гены-супрессоры опухолевого роста *CDKN2A*, *TP53* и различные онкогены: *BCL2*, *CDK4*, *BMI* [24, 31].

В частности, особого внимания заслуживают случаи с транслокацией, вовлекающей ген *MYC* (как с *IG*-генами, так и без них), или амплификацией *MYC* в сочетании с перестройкой *CCND1*, отнесенные в подгруппу «double-hit» МКЛ, которая морфологически характеризуется как бластоидный и плеоморфный варианты с крайне неблагоприятным прогнозом и низкими показателями выживаемости, как и в случаях «double-hit» диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ) с перестройкой генов *BCL2/BCL6* и *MYC* [1, 10, 14].

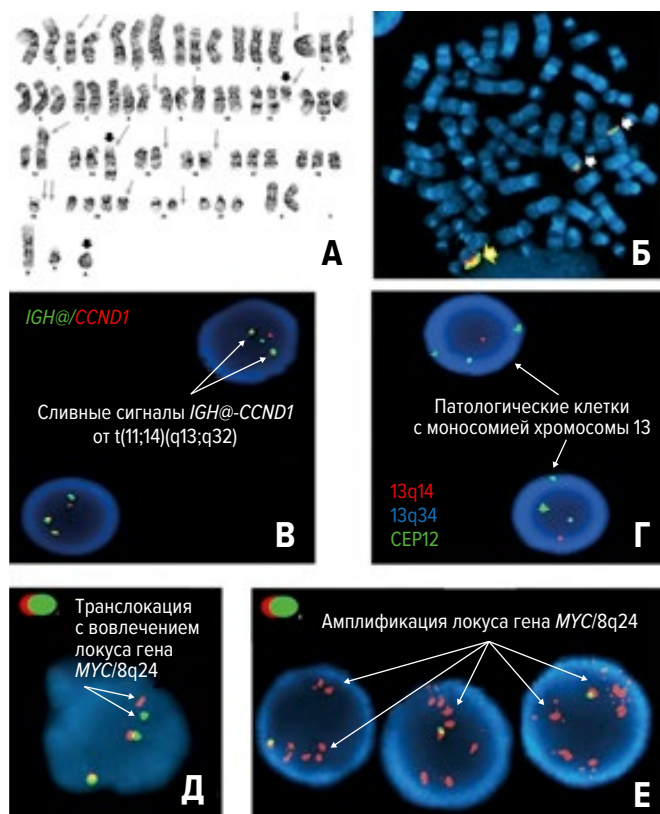


Рис. 2. Результаты цитогенетического исследования клеток (А–Г) периферической крови и (Д, Е) костного мозга при МКЛ (цит. по [1]):

А — кариограмма патологической клетки периферической крови с комплексным кариотипом, включающим транслокацию $t(11;14)$ и кольцевую хромосому; Б — FISH-исследование, выполненное на метафазной пластинке интерфазного ядра клеток периферической крови с ДНК-пробой для выявления изменений гена *MYC*. Определяются две нормальные хромосомы 8 и кольцевая хромосома с амплификацией *MYC*; В — интерфазные ядра клеток периферической крови с 2 сливными сигналами (*IGH@-CCND1*) транслокации $t(11;14)$; Г — интерфазные ядра клеток периферической крови с моносомией хромосомы 13; Д — клетка костного мозга с 2 неизменными копиями гена *MYC* и расщепленным сигналом *MYC*; Е — 3 интерфазных ядра клеток костного мозга с 1 нормальным сигналом от *MYC* и амплификацией сигнала от 5'-региона *MYC*

Fig. 2. The results of cytogenetic study of (А–Г) peripheral blood and (Д, Е) bone marrow cells in MCL (quoted from [1]):

А — karyogram of a pathological peripheral blood cell with complex karyotype including translocation $t(11;14)$ and a ring chromosome; Б — FISH assay performed on a metaphase plate of an interphase nucleus of peripheral blood cells with a DNA sample to detect changes in the *MYC* gene. Two normal chromosomes 8 and a ring chromosome with amplified *MYC*; В — interphase nuclei of peripheral blood cells with 2 fusion signals (*IGH@-CCND1*) of translocation $t(11;14)$; Г — interphase nuclei of peripheral blood cells with chromosome 13 monosomy; Д — a bone marrow cell with 2 unchanged *MYC* gene copies and split *MYC* signal; Е — 3 interphase nuclei of bone marrow cells with 1 normal signal of *MYC* and amplified signal of the *MYC* 5' region

Отличие от лимфомы Беркитта, для которой транслокация с вовлечением гена *MYC* является патогномоничной, изменения в этом гене также обнаруживаются при других НХЛ, в т. ч. и при МКЛ, преимущественно как вторичные цитогенетические aberrации [3].

С.М. Аукета и соавт. проанализировали данные 689 пациентов с НХЛ и выявили, что «double-hit» лимфомы с реаранжировкой генов *MYC* и *CCND1* обнаруживаются у 10 % больных [32]. Е.Г. Воерма и соавт.

также отнесли случаи В-клеточной лимфомы с изменениями гена *MYC* в сочетании с *CCND1* в подгруппу «double-hit» лимфом. Авторы пришли к выводу, что МКЛ с бластоидным морфологическим вариантом, перестройками генов *MYC* и *CCND1* могут быть включены в данную подгруппу, связанную с крайне неблагоприятным клиническим течением. При этом наличие транслокации с вовлечением гена *CCND1* и выраженной экспрессии белка циклина D1 позволяет поставить диагноз МКЛ [33].

Так, в исследовании, проведенном В. Sander и соавт., описано наблюдение с бластоидным морфологическим вариантом МКЛ с более 90 % клеток, экспрессирующих Ki-67, и с поражением средостения и плевры [10]. У больного выявлены амплификация и транслокация с вовлечением гена *CCND1*, а также транслокация *IGH/MYC* в 100 % опухолевых клеток. Кроме того, у пациента определялась делеция с вовлечением гена *CDKN2A*, наличие которой связано с агрессивностью клинических проявлений при МКЛ.

Авторы также представили клиническое наблюдение пациента с третьим рецидивом и отягощенным течением МКЛ. При анализе морфологической картины выявлены плеоморфный вариант, экспрессия Ki-67 и *MYC* в 90 и в 80 % клеток соответственно. При FISH-исследовании определялась амплификация *MYC*. Исследователи отмечают, что нет четкой корреляции между экспрессией белка *MYC* и реаранжировкой гена *MYC*. Случаи с высокой экспрессией *MYC* без перестройки *MYC* до сих пор хорошо не изучены, что обосновывает проведение дополнительных исследований на большей выборке пациентов для подробного изучения данного вопроса [10].

М.Е. Kallen и соавт. проанализировали случай В-лимфобластной трансформации у пациента с «double-hit» МКЛ, иллюстрирующий варибельность характеристик опухолевого клона и дополнительно расширяющий представления о биологии прогрессии данного варианта лимфом [1]. В пунктате костного мозга отмечалась инфильтрация бластными клетками, экспрессирующими CD19, PAX5, CD10, циклин D1, TdT, CD79a, *MYC*, но без экспрессии CD5, CD20, BCL2, BCL6, CD3, CD34, CD68, CD117 и миелопероксидазы. Индекс пролиферации Ki-67 составлял 90 %. При стандартном цитогенетическом исследовании (СЦИ) периферической крови и костного мозга у пациента обнаружен комплексный кариотип со множественными числовыми и структурными aberrациями: $64\sim 66 < 3n > XX, -Y, del(1)(p22), +del(1)(p22), -5, -8, t(11;14)(q13;q32), dic(13;13)(p12;p12), -15, -16, -19, -19, +20, -21, +2\sim 5mar, +r(8)[cp4]; 64\sim 66, XXY, +add(1)(p22), +add(1)(p22), +3, add(5)(p11.2), -8, -9, -10, t(11;14)(q13;q32), -13, add(13)(p11.2), -15, -16, -17, +20, -21, +3, -4mar[cp4]/46, XY[10]$, среди которых помимо типичной транслокации $t(11;14)(q13;q32)$, определяемой как в периферической крови, так и в костном мозге, установлена моносомия хромосомы 17, которая ассоциируется с крайне неблагоприятным прогнозом. Кроме того, выявлялись такие aberrации, как моносомия хромосомы 13, делеция р-плеча хромосомы 1, дополнительные хромосомы и потеря некоторых из них, маркерные и кольцевая хромосомы (рис. 2).

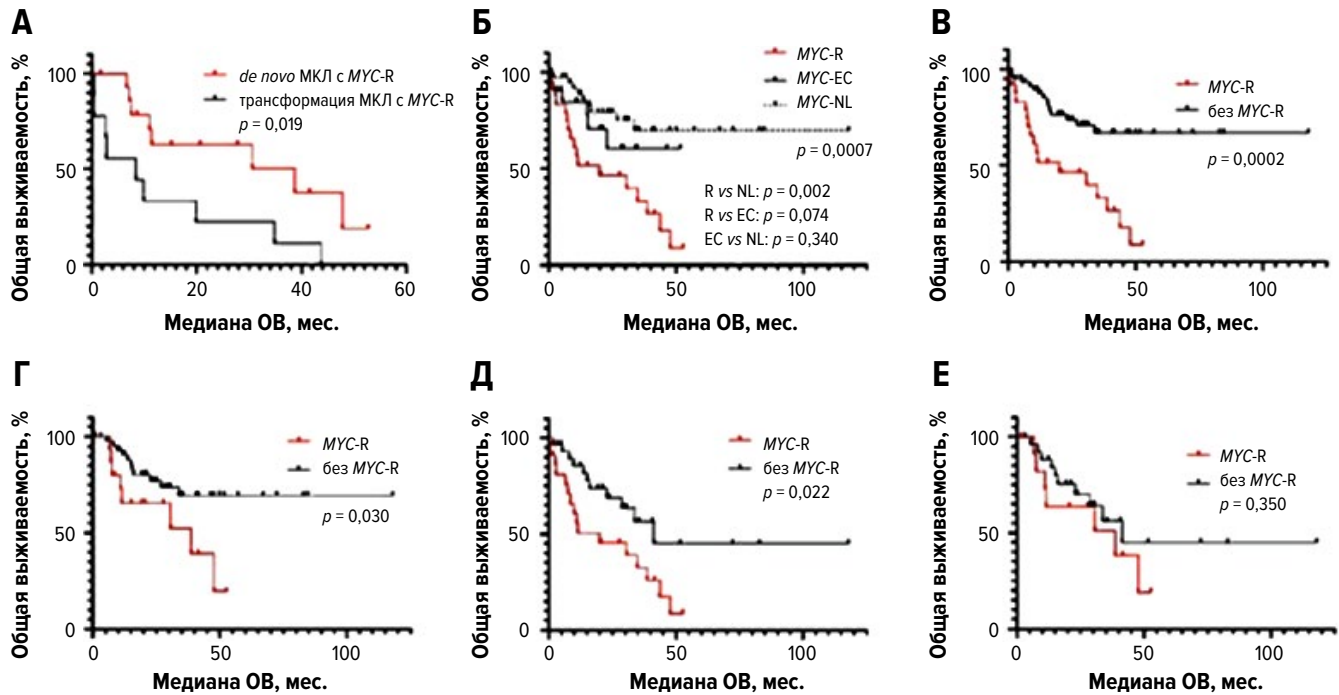


Рис. 3. Медианы ОБ в различных группах пациентов с МКЛ (цит. по [29]):

А — пациенты с впервые выявленной МКЛ с перестройкой *MYC* (*de novo*) и с приобретенными перестройками *MYC* в результате трансформации классического морфологического варианта МКЛ в бластоидный или плеоморфный; Б, В — пациенты с разными перестройками и без изменений *MYC*; Г — только случаи *de novo*; Д — пациенты с бластоидным морфологическим вариантом; Е — только пациенты с *de novo* бластоидным вариантом
 ЕС — амплификация; NL — без аберраций; R — транслокация; ОБ — общая выживаемость.

Fig. 3. OS medians in different MCL patients (quoted from [29]):

А — newly diagnosed MCL patients with *MYC* rearrangement (*de novo*) and acquired *MYC* rearrangement caused by the transformation of classical morphological MCL type to the blastoid or pleomorphic one; Б, В — patients with and without different *MYC* rearrangements; Г — *de novo* cases only; Д — patients with blastoid morphological type; Е — patients with *de novo* blastoid type only
 EC — amplification; NL — without aberrations; R — translocation; OB — overall survival.

FISH-исследование, выполненное на культивированных клетках крови, выявило транслокацию t(11;14)(q13;q32) в 74,3 % клеток и моносомию хромосомы 13 — в 79,7%. При исследовании костного мозга в 73,7 % ядер определялось 3–5 дополнительных копий гена *MYC*. В 46,2 % клеток выявлялись расщепление сигнала *MYC*, несбалансированная перестройка *MYC*, проявляющаяся делецией 3'-региона *MYC* и увеличением копийности 5'-региона *MYC*.

Одновременное присутствие перестроек в генах *CCND1* и *MYC* у больного коррелировало с прогностически неблагоприятным течением опухоли, лейкоцитозом, тотальным поражением костного мозга, спленомегалией, бластоидной или плеоморфной морфологией опухолевых клеток, что определяло необходимость применения интенсивных протоколов противоопухолевой терапии [1].

L. Wang и соавт. провели исследование по оценке влияния изменений гена *MYC* (перестроек и увеличения копийности) на ОБ у 88 пациентов с МКЛ [29]. Всем больным выполнены СЦИ и FISH-анализ. Результаты FISH-исследования с ДНК-пробой к локусу гена *MYC* показали, что транслокация с вовлечением гена *MYC* определялась у 27 пациентов, в 21 случае выявлялась амплификация *MYC*, у 40 больных изменения гена *MYC* не обнаружены. При этом у пациентов с перестройкой гена *MYC* чаще регистрировали бластоидный или плеоморфный морфологический

вариант МКЛ, выраженную экспрессию CD10, *MYC* и одновременную экспрессию *MYC* и *BCL2*, а также более высокий индекс пролиферации Ki-67 ($p < 0,05$) по сравнению с пациентами без перестроек в гене *MYC*. Несмотря на то что пациентам с реаранжировкой *MYC* лечение проводилось с использованием интенсивных режимов противоопухолевой терапии, показатели ОБ были в значительной степени хуже, чем у больных с отсутствием перестроек *MYC*. Кроме того, у этой категории пациентов в патологический процесс чаще вовлекался костный мозг и устанавливалась IV стадия заболевания. Анализ в группе с увеличением копийности *MYC* свидетельствует о том, что показатели ОБ были промежуточными у пациентов с транслокацией *MYC* и неизменным локусом гена *MYC*. Результаты многофакторного анализа позволили сделать вывод о том, что именно перестройки в гене *MYC*, а не амплификация *MYC* оказывают независимое прогностически неблагоприятное влияние на ОБ. При реаранжировке *MYC*, но не увеличении числа копий *MYC* отмечался более высокий уровень экспрессии белка *MYC*, что также служило фактором, отягощающим прогноз и течение МКЛ [29] (рис. 3).

Y. Miao и соавт. описали пациента с МКЛ, рефрактерной к интенсивным курсам химио- и лучевой терапии [14]. Следует отметить, что в дебюте заболевания у данного пациента выявлен классический морфологический вариант опухоли с экспрессией CD5.

Больному проведена иммунохимиотерапия (ИХТ), включавшая ритуксимаб, бендамустин и циклофосфамид. Однако ответа на проведенную терапию не получено. Последующее лечение (3 цикла по схеме, включавшей ритуксимаб, гемцитабин, цисплатин и дексаметазон) также не дало эффекта, и отмечалось дальнейшее прогрессирование заболевания. По результатам гистологического и ИГХ-исследований лимфатического узла у пациента констатированы трансформация классического варианта МКЛ в плеоморфный и отсутствие экспрессии CD5. СЦИ, проведенное в дебюте заболевания, выявило комплексные изменения кариотипа: 44,X, t(X;2)(p22.3;q21), del(2)(p21), del(6)(p23), add(7)(p22), -9, del(9)(p22), add(11)(q13), -13, add(14)(p11.2), der(14)t(11;14)(q13;q32)hsr(14)(q32), add(18)(q23), add(21)(p11.1), -22,+mar[12]. Дополнительный сливной сигнал от гена *CCND1-IGH* определялся в 90 % интерфазных ядер, что бывает крайне редким событием. Делеции генов *ATM* и *TP53* при выполнении FISH- и ПЦР-анализов не обнаружены. На фоне прогрессирования заболевания пациенту дополнительно выполнено FISH-исследование с ДНК-пробами к генам *MYC* и *BCL2*, по результатам которого определена амплификация гена *MYC* [14].

A.M. Gruszka-Westwood и соавт. [34] представили клиническое наблюдение МКЛ с комплексным кариотипом и дополнительной копией химерного гена *CCND1-IGH*, обнаруженными при СЦИ и FISH-исследовании периферической крови. Кроме того, у пациента определены aberrации в гене *TP53* (моноаллельная делеция и мутация в экзоне 5) и дополнительные копии гена *ATM*. Отмечалось агрессивное течение заболевания, и, несмотря на проводимое лечение, констатирован летальный исход через 6 мес. после постановки диагноза МКЛ [34]. T. Ishigaki и соавт. в своей работе представили больного с первичным плазмноклеточным лейкозом, у которого при выполнении FISH-исследования на метафазных пластинках была выявлена амплификация *CCND1-IGH* [27]. При этом химерный ген локализовался на двух разных хромосомах: 8 или 10 и 19. Кроме того, одна из копий *CCND1-IGH* визуализировалась на деривате хромосомы 11. Исследователи предположили появление транслокации t(11;14)(q13;q32) на ранней стадии онкогенеза с последующей амплификацией гена *CCND1-IGH* на деривате хромосомы 14 и вставкой в другие хромосомы [27]. Во всех случаях авторы связывают прогрессирующее клиническое течение заболевания с амплификацией *CCND1-IGH* [14, 27, 34].

По данным литературы, прослеживается выраженная корреляция между наличием генетических aberrаций и низкими показателями выживаемости при стандартных курсах ИХТ. В европейском исследовании, включавшем молодых пациентов с МКЛ, делеции в генах *TP53* и *CDKN2A* были связаны с худшей ОВ (медиана ОВ 1,8 года у больных с делециями в обоих генах по сравнению с 7 годами у пациентов с отсутствием таких делеций). В исследованиях Nordic MCL2 и MCL3 делеции в генах *TP53* и *CDKN2A* наряду с мутациями в генах *TP53* и *NOTCH1* коррелировали с худшей выживаемостью. Однако многофакторный анализ показал, что только мутация в гене *TP53* ока-

зывает независимое прогностическое влияние на ОВ. Пациенты с мутацией в гене *TP53* характеризовались плохим ответом как на индукционную ИХТ, так и на трансплантацию аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК), а также худшей медианой выживаемости без прогрессирования (ВВП) по сравнению с пациентами без мутации в гене *TP53*, что позволило отнести эту категорию больных МКЛ к группе высокого риска [11].

A. Delas и соавт. описали наблюдение пациента с бластоидным вариантом МКЛ, aberrантным фенотипом и нетипичным цитогенетическим профилем МКЛ [3]. Опухолевые клетки экспрессировали CD10, циклин D1, при этом экспрессия CD5 отсутствовала. При СЦИ в клетках обнаруживались транслокация t(11;22)(q13;q11) и перестройка с вовлечением гена *MYC* и генетического партнера не-IG, локализованного на коротком плече хромосомы 4.

При СЦИ определялись комплексные изменения кариотипа: 46,X, der(X)add(X)(p11)add(X)(q25), trp(1)(q21q32), der(4)t(4;8)(p15;q24), der(8)add(8)(p12)del(8)(q24), der(11)t(11;22)(q13;q11), add(13)(q31), der(22)del(22)(q11)ins(22;11)(q11;q24q13)[3]/46,sl, del(17)(p11)[10]/46,sl, add(17)(p11)[5]/46,XX[2].

В основном клоне опухолевых клеток выявлена транслокация t(11;22)(q13;q11), а также t(4;8)(p15;q24), структурные aberrации хромосом X и 13. Кроме того, прослеживалась клональная эволюция с вовлечением хромосомы 17. FISH-исследование с использованием ДНК-проб к генам *IGL* и *CCND1* показало вовлечение данных генов в транслокацию t(11;22)(q13;q11). Одновременно выявлялось расщепление одного аллеля гена *IGL* на 3'*IGL* (на деривате хромосомы 11) и 5'*IGL* (оставалось на деривате хромосомы 22). На деривате хромосомы 22 5'*IGL* и сигнал от *CCND1* были локализованы в теломерном регионе длинного плеча. Таким образом, на q-плече хромосомы 22 произошло два события: транслокация t(11;22), приводящая к реаранжировке 5'*IGL*-3'*CCND1*, и инверсия, в результате которой 5'*IGL*-3'*CCND1* переместился в теломерный регион. ДНК-проба для выявления изменений гена *MYC* позволила обнаружить реаранжировку *MYC* с не-IG-партнером на коротком плече хромосомы 4: сигнал от 5'*MYC* остался на деривате хромосомы 8, в то время как 3'*MYC* переместился на дериват хромосомы 4. В данном случае транслокация с вовлечением гена *CCND1* рассматривалась как первичное событие лимфомагенеза, произошедшее вследствие aberrантной рекомбинации VDJ, а транслокация с вовлечением *MYC* — как вторичная генетическая аномалия опухолевого клона [3].

B. Espinet и соавт. опубликовали результаты исследования по оценке прогностического влияния вторичных цитогенетических aberrаций у 145 больных МКЛ [30]. Вторичные aberrации определялись у 58 % больных, наиболее часто встречались делеции 1p (12 %), 13q, 17p (10 %), 10p (8 %), аномалии длинного плеча хромосомы 3 (8 %). Повторяющимися точками разрыва были 1p31-32, 1p21-22, 17p13, 1p36. Агрессивные бластоидный и плеоморфный варианты были связаны с наиболее частым определением комплексного кариотипа, высокой частотой делеций 1p и 17p и изменений 10p, высокими показателями

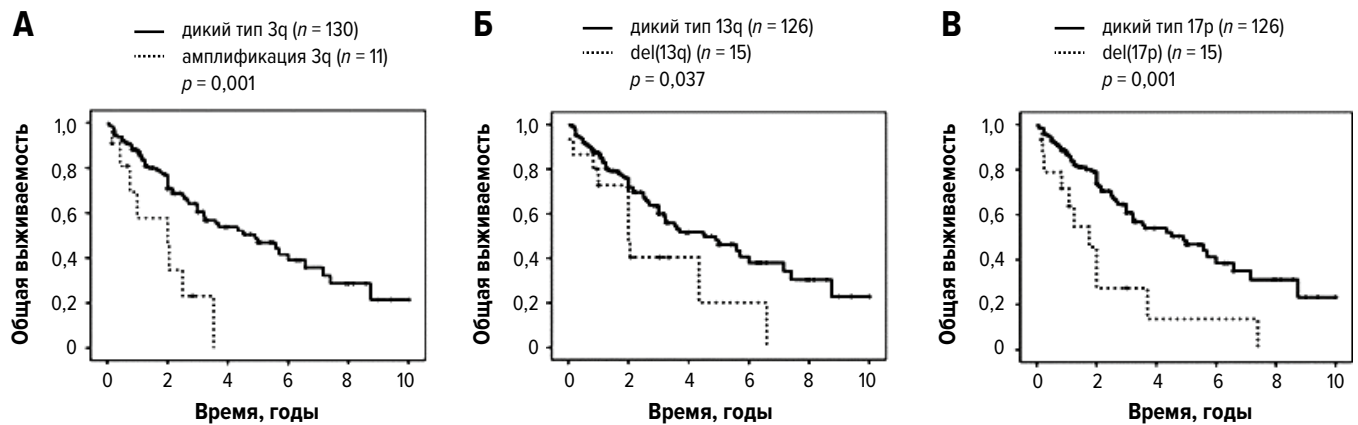


Рис. 4. Кривые выживаемости больных МКЛ (цит. по [30]):

А — с учетом амплификации 3q; Б — с учетом делеции 13q; В — с учетом делеции 17p

Fig. 4. Survival curves in MCL patients (quoted from [30]):

A — with regard to 3q gain; B — with regard to 13q loss; B — with regard to 17p loss

индекса пролиферативной активности Ki-67 и худшей выживаемостью. Увеличение копийности 3q, делеции 13q и 17p13 коррелировали с низкими показателями выживаемости. Однофакторный анализ показал, что бластоидный и/или плеоморфный морфологический вариант, высокий пролиферативный индекс, увеличение копийности 3q и делеция длинного плеча хромосом 13 и 17 связаны с неблагоприятным прогнозом (рис. 4) [30].

Таким образом, наряду со СЦИ проведение исследований с целью определить прогностически неблагоприятные дополнительные генетические aberrации, такие как аномалии генов *TP53* и *MYC*, представляется весьма обоснованным. Исходя из этого, в настоящее время стратификацию пациентов на группы риска помимо учета МРП и индекса пролиферации Ki-67 необходимо дополнять оценкой генетического профиля у каждого больного.

I.B. Greenwell и соавт. ретроспективно проанализировали кариотип 483 пациентов из 5 клинических центров США, чтобы оценить влияние генетических aberrаций, в частности комплексных изменений кариотипа, на выживаемость пациентов и ответ на проводимую интенсивную терапию [35]. Результаты исследования показали связь комплексного кариотипа с низкими показателями ОВ (медиана 4,5 vs 11,6 года) и ВБП (медиана 3,6 vs 7,8 года). В группе пациентов с комплексными изменениями кариотипа, получавших высокодозную индукционную ИХТ, значимого влияния на показатели ОВ и ВБП не выявлено. Кроме того, проведение аутоТГСК в первой ремиссии у больных с комплексными нарушениями кариотипа значительно не улучшало показатели ни ВБП (медиана 3,5 и 1,2 года), ни ОВ (медиана 5,1 и 4 года). Однофакторный анализ проводился с учетом специфических aberrаций, ассоциированных с худшей ВБП (*del(9p)/(9q)*, *del(10p)/10(q)*, *del(13q)*, *del(17p)*). Снижение показателей ОВ коррелировало с *del(9p)*, *del(9q)*, *del(13q)*. Выявлена связь *del(17p)* с низкой ВБП, но не ОВ. Многофакторный анализ, включавший такие параметры, как Ki-67, МРП и комплексные нарушения кариотипа, показал, что только комплексный кариотип был статистически значимым

прогностическим фактором, влиявшим на ОВ и ВБП. Комплексный кариотип и Ki-67 > 30 % коррелировали с непродолжительной ВБП. Многофакторный анализ, выполненный авторами, не учитывал специфические цитогенетические aberrации, связанные с непродолжительной медианой ВБП. На основании полученных данных исследователи сделали вывод о том, что комплексные нарушения кариотипа у пациентов с МКЛ влияют на течение заболевания вне зависимости от интенсивности индукционной ИХТ и высокодозной терапии (ВДХТ) с последующей аутоТГСК (рис. 5) [35].

Особое внимание необходимо уделять группе с комплексными изменениями кариотипа, поскольку продолжение изучения течения МКЛ у этой категории больных необходимо для разработки новых лечебных подходов и клинических рекомендаций [35].

Основываясь на том, что дополнительные aberrации, выявленные при СЦИ, в значительной степени влияют на течение заболевания, С. Sarkozy и соавт. провели исследование у 125 больных МКЛ и оценили прогностическое влияние таких aberrаций на биологические характеристики опухоли и ее клиническое течение [4]. У 87 % пациентов установлена IV стадия заболевания, у 20 % — бластоидный морфологический вариант МКЛ. У 54 % больных экспрессия Ki-67 определялась в более 30 % случаев. В соответствии с МРП 32 % пациентов относились к прогностической группе низкого риска, 27 % — промежуточного риска, 41 % — высокого риска. В многофакторном анализе высокий риск по шкале МРП, комплексный кариотип и бластоидный морфологический тип были независимо связаны с низкими показателями ОВ. У 19,2 % пациентов транслокация *t(11;14)(q13;q32)* выявлялась как единственная хромосомная aberrация в кариотипе, в то время как у 80,8 % больных эта транслокация сочеталась с дополнительными хромосомными изменениями. Наиболее часто встречались такие дополнительные хромосомные аномалии, как *del(13q)* (25,6 %), *del(9p)* (20 %), *del(6q)* (19,2 %), *del(17p)* (18,4 %), *del(1p)* (17,6 %), *del(10p)* (12,8 %) и *del(11q)* (8,7 %). Кроме того, выявлялись увеличение копийности 3q (9,6 %), хромосомы 12 (2,4 %), 15q (2,4 %). Анализ данных показал, что у пациентов с

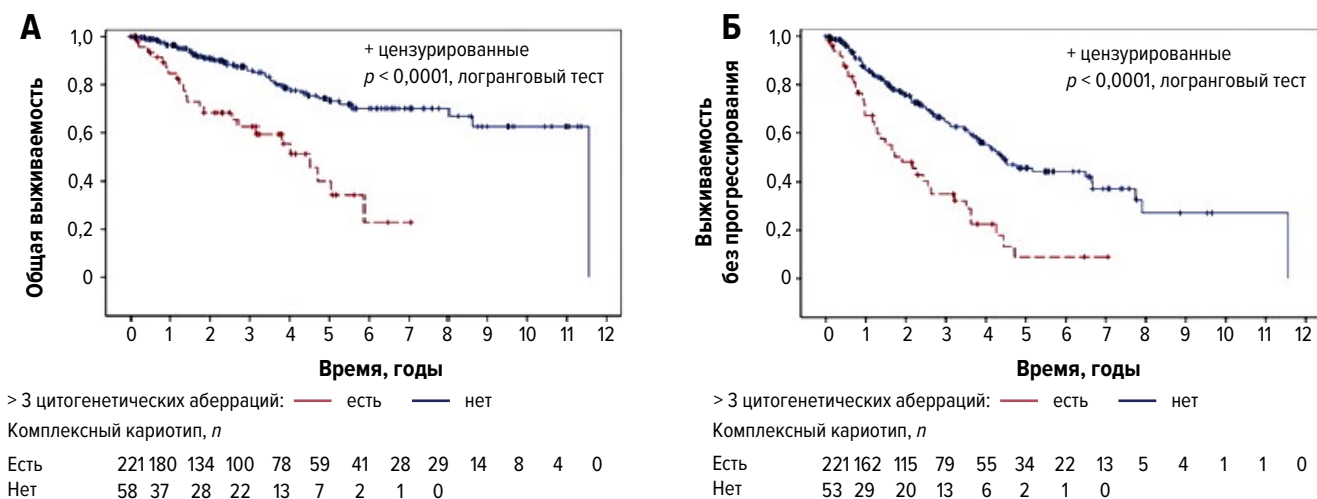


Рис. 5. (А) Общая выживаемость и (Б) выживаемость без прогрессирования у пациентов с наличием комплексного кариотипа и без такового (цит. по [35])

Fig. 5. (A) Overall and (B) progression-free survivals in patients with and without complex karyotype (quoted from [35])

бластоидным морфологическим вариантом МКЛ в сравнении с классическим чаще отмечались дополнительные хромосомные aberrации, в частности делеция del(13q) — 50 и 20 %, del(18q) — 27 и 7 % соответственно. Высокая группа риска по шкале MIPI ассоциировалась с более высокой частотой дополнительных хромосомных изменений, таких как del(9p) и del(9q) (31 %), del(10q) (23 %), del(17p) (35 %). Пациенты с del(17p) характеризовались высоким риском по шкале MIPI, анемией, лимфоцитозом, Ki-67 > 30 %, а также более высокой частотой комплексных нарушений кариотипа. Проведенный многофакторный анализ включал такие параметры, как MIPI, морфологический вариант МКЛ и цитогенетические aberrации (комплексные изменения кариотипа, del(9p), del(10p), del(17p), del(1p)). Полученные результаты демонстрируют, что комплексный кариотип имеет независимое неблагоприятное прогностическое значение в отношении ОВ и не коррелирует с индолентной формой МКЛ. Однофакторный анализ показал связь высокого риска по MIPI, бластоидного варианта, высокого индекса пролиферативной активности Ki-67, повышенного уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ), анемии, высокого балла по шкале ECOG с худшей ОВ [4].

К прогностически неблагоприятным факторам при МКЛ относятся и миссенс-мутации в гене TP53, влияющие на функциональную активность белка p53. А.М. Halldorsdottir и соавт. отметили корреляцию между соматическими мутациями в гене TP53, бластоидным морфологическим вариантом и высокой пролиферативной активностью опухоли по Ki-67 [36]. В исследовании, включавшем 119 пациентов, при определении мутаций в гене TP53 было показано, что патогенные варианты обнаруживались как при бластоидном, так и небластоидном морфологическом варианте МКЛ. Мутации в гене TP53 выявлены в 14 % случаев, в то время как делеция 17p определялась у 32 % пациентов. Ни бластоидный морфологический вариант, ни делеция 17p не коррелировали с показателями выживаемости, но была выявлена их значительная связь с неблагоприятным течением

заболевания с частыми рецидивами [36]. Кроме того, отмечено, что наличие мутаций в гене TP53 в дебюте заболевания ассоциировалось с плохим ответом на последующую интенсивную ИХТ и неблагоприятным прогнозом [15].

В. Sander и соавт. представили пациента с МКЛ, дебютировавшей с В-симптомами, генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, вовлечением плевры, костного мозга и периферической крови [10]. В биоптате лимфатического узла определялась инфильтрация клетками малого и среднего размеров с морфологическими чертами бластных клеток. При ИГХ-исследовании выявлены высокая пролиферативная активность опухоли и экспрессия SOX11, а в подобных бластных клетках также обнаруживалась и экспрессия TP53. При СЦИ определялись основной клон с транслокацией t(11;14)(q13;q32) и делецией del(11)(q21;q25) (ATM) и два клона с дополнительными цитогенетическими aberrациями. Полная ремиссия достигнута после ВДХТ с аутоТГСК, однако через 7 мес. у пациента развился рецидив заболевания [10].

Таким образом, проведенный анализ показал, что хромосомные aberrации обладают значительным прогностическим потенциалом наряду с такими параметрами, как MIPI и Ki-67 [35]. Вторичные цитогенетические aberrации (аномалии MYC, TP53, комплексные изменения кариотипа) служат маркерами крайне агрессивного течения заболевания и помогают предопределить такое развитие опухоли. Показано, что увеличение изменений в кариотипе часто связано с прогрессией или бластоидным вариантом МКЛ [1, 9, 11, 14]. В связи с этим крайне важно у каждого пациента с МКЛ проводить оценку изменений кариотипа для выявления группы высокого риска с комплексными нарушениями кариотипа [35].

MIPI и Ki-67 как прогностические параметры у пациентов с МКЛ

Для оценки прогноза течения МКЛ в клинической практике используется международный прогности-

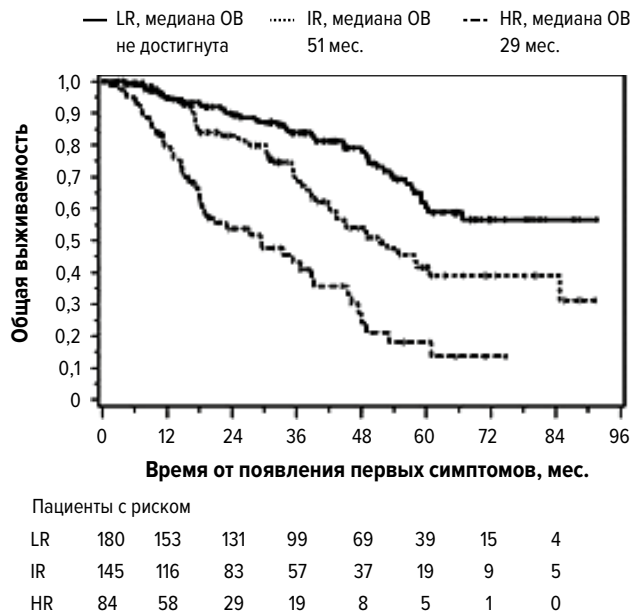


Рис. 6. Общая выживаемость (ОВ) в группах риска MIPI (цит. по [12])

HR — высокий риск ($\geq 6,2$ балла); IR — промежуточный риск ($\geq 5,7$, но $< 6,2$ балла); LR — низкий риск ($< 5,7$ балла)

Fig. 6. Overall survival (OS) in MIPI risk groups (quoted from [12])

HR — high risk (score ≥ 6.2); IR — intermediate risk (score ≥ 5.7 but < 6.2); LR — low risk (score < 5.7)

ческий индекс (MIPI), разработанный для МКЛ, и маркер пролиферативной активности опухоли (Ki-67). Первоначально прогностическая модель разрабатывалась для прогноза течения ДВКЛ с учетом таких параметров, как возраст, общее состояние больного по шкале ECOG, уровень ЛДГ, число лейкоцитов и клеток, экспрессирующих Ki-67 [8, 15, 35].

Принимая во внимание перечисленные выше параметры, E. Hoster и соавт. проанализировали данные 455 пациентов с поздними стадиями МКЛ с целью стратифицировать больных на группы риска и оценить ОВ. В результате получены следующие данные: пациенты с низким риском составляли 44 % (медиана ОВ не достигнута), с промежуточным риском — 35 % (медиана ОВ 51 мес.), с высоким — 21 % (медиана ОВ 29 мес.) [12]. Кроме того, авторы выявили значение Ki-67 как одного из важнейших биологических маркеров, влияющих на прогноз заболевания.

E. Hoster и соавт. при изучении группы молодых и пожилых пациентов с МКЛ предложили разработать комбинированный прогностический индекс (MIPI-c) для МКЛ и оценивать прогностическое значение морфологического строения МКЛ, Ki-67 и параметров MIPI [12]. Бластоидный морфологический вариант коррелировал с низкими показателями ВБП и ОВ, при этом на ОВ в этих случаях не оказывали влияния параметры MIPI. Путем объединения прогностических факторов, предусмотренных MIPI, а также Ki-67 авторы выделили три группы риска с учетом показателей 5-летней ОВ (рис. 6). Такой подход применялся ко всем пациентам вне зависимости от проведения ВДХТ с аутоТГСК [8, 11, 12].

Для каждого прогностического фактора определена шкала от 0 до 3 баллов, далее значения

суммируются. Максимальное количество баллов составляет 11. Пациентов, имеющих 0–3 балла, относят к группе низкого риска, 4–5 баллов — среднего риска, 6–11 баллов — высокого риска [7–9, 11].

Исследование индекса пролиферативной активности у пациентов с МКЛ показало, что Ki-67 является маркером, определяющим прогноз заболевания независимо от MIPI, и помогает прогнозировать выживаемость пациентов, получающих ВДХТ и аутоТГСК [7, 9].

L. Nordstrom и соавт. представили результаты протокола Nordic MCL2/3, в котором оценивалась прогностическая роль таких маркеров, как *SOX11*, *TP53* (p53), *MKI67* (Ki-67) и *CCND1* (циклин D1) [31]. Кроме того, исследователи предложили усовершенствованную схему стратификации пациентов за счет дополнений MIPI данными об исследуемых молекулярных маркерах. Анализ результатов показал, что *SOX11* в значительной степени дополняет прогностическую модель при МКЛ наряду с MIPI. Однако, согласно многофакторному анализу, только *TP53* был независимым фактором неблагоприятного прогноза у больных МКЛ. Кроме того, группа исследователей выявила корреляцию гиперэкспрессии *TP53* с низкими показателями выживаемости. Принимая во внимание полученные данные, авторы предложили внести в протокол обследования показатели *TP53* и *SOX11*, а также использовать комбинированный критерий *TP53*/MIPI, что позволит дать дополнительную информацию на этапе принятия решения о лечебной тактике [31].

Результаты исследований показали, что шкала MIPI является неотъемлемым инструментом в клинической практике, позволяющим стратифицировать пациентов на группы риска для выбора оптимальной лечебной стратегии [8, 12, 31].

Прогностическая значимость МКЛ с индолентным течением

Большинство пациентов с МКЛ нуждаются в ИХТ уже ко времени постановки диагноза. Распространенность поражения органов и тканей определяет степень выраженности клинической симптоматики и скорость прогрессирования опухоли. В настоящее время показано, что некоторые больные могут благополучно наблюдаться в течение длительного времени без применения противоопухолевого лекарственного воздействия [11]. При этом такая тактика не ухудшает показатели выживаемости больных. В зависимости от того, какие критерии в каждом конкретном случае использовались для определения соответствия пациента группе «наблюдай и жди», в нее включали 9–30 % больных МКЛ.

R. Martin и соавт. провели исследование с целью определить влияние отсрочки терапии у пациентов с МКЛ на исход заболевания. Из 97 больных 31 (32 %) наблюдался более 3 мес. до начала противоопухолевой терапии с медианой времени до начала лечения 12 мес. (диапазон 4–128 мес.) [37]. Медиана возраста пациентов составила 58 лет (медиана 40–81 год). Прогностические факторы, которые оценивались у пациентов, включали поздние (III–IV) стадии заболевания (75 % больных), повышенный уровень ЛДГ (25 % больных), промежуточный риск по шкале MIPI (54 % больных).

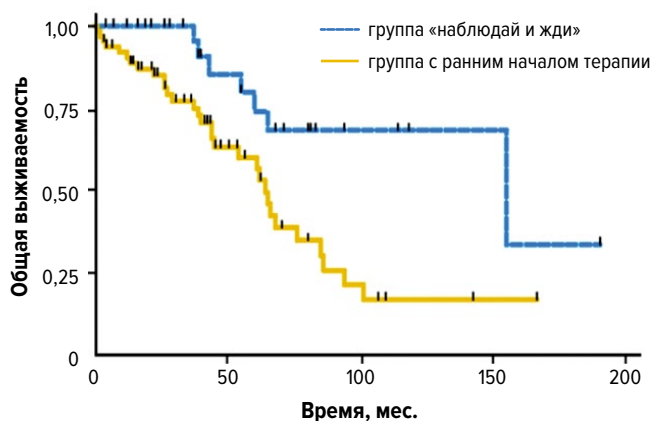


Рис. 7. Общая выживаемость пациентов с МКЛ из группы «наблюдай и жди» в сравнении с группой пациентов с ранним началом противоопухолевой терапии (цит. по [37])

Fig. 7. Overall survival (OS) in MCL patients in the observation vs. early-treatment groups (quoted from [37])

ОВ пациентов из группы наблюдения была лучше, чем у больных, начавших получать терапию в течение 3 мес. после постановки диагноза МКЛ (медиана ОВ не достигнута vs 64 мес.; $p = 0,004$) (рис. 7) [37].

Онкологический исследовательский центр Британской Колумбии опубликовал данные о 440 пациентах с первичной МКЛ. Среди них было 75 (17 %) больных, наблюдавшихся на протяжении 3 мес. и более после постановки диагноза МКЛ с медианой времени до начала противоопухолевой терапии 35 мес. (диапазон 5–79 мес.). Медиана ОВ была значительно больше в группе пациентов с возможностью применения тактики «наблюдай и жди» (72 vs 52,5 мес.; $p = 0,041$). Факторами, связанными с возможностью применения выжидательной тактики, были удовлетворительный общесоматический статус, отсутствие В-симптомов, массивной лимфаденопатии, бластоидной морфологии, а также нормальные показатели ЛДГ и низкий Ki-67 [38].

Таким образом, показано, что отсроченная терапия у отдельных пациентов не оказывает негативного влияния на течение заболевания. И хотя большинство больных МКЛ нуждаются в начале ИХТ при прогрессировании заболевания, отсрочка лечения допустима примерно у 20 % первичных пациентов с возможным индолентным течением опухоли [11].

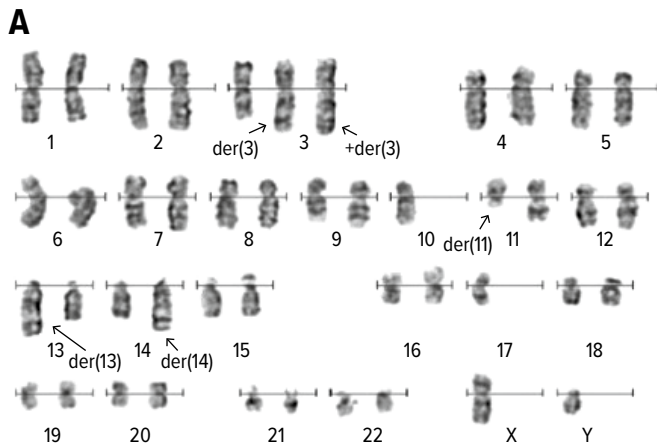
Некоторые исследователи отмечают наличие поражений, предшествующих развернутой клинической картине МКЛ, а также нодальную и экстранодальную диссеминацию опухолевых клеток без каких-либо клинических проявлений [39, 40]. В редких случаях клетки с транслокацией $t(11;14)(q13;q32)$ могут выявляться в периферической крови у 1–7 % здоровых доноров. В настоящее время неизвестно, как и с какой частотой такие клетки перерождаются в злокачественные. У некоторых людей транслокация $t(11;14)(q13;q32)$ сохранялась в периферической крови на протяжении 9 лет [41].

Моноклональный асимптоматический лимфоцитоз с клетками, содержащими транслокацию $t(11;14)(q13;q32)$, — редкое событие, характеризующееся отсутствием лимфаденопатии и спленомегалии и не требующее лечения [40]. Другая форма раннего

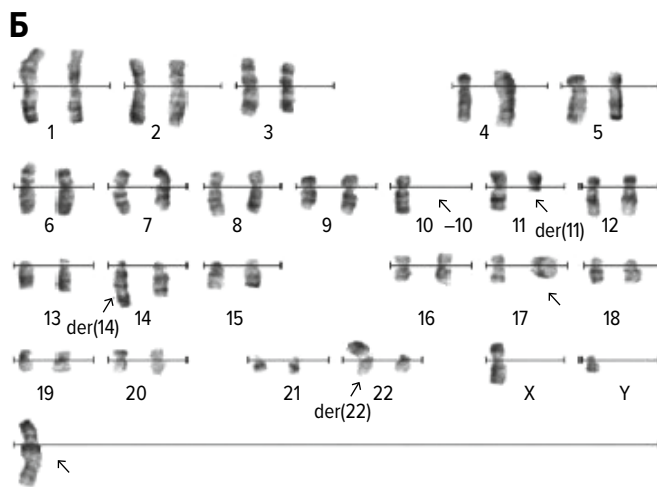
поражения, которая может предшествовать развитию классической МКЛ в течение нескольких лет, — МКЛ *in situ*. В диагностике данного варианта МКЛ важно применение ИГХ-исследования, поскольку цитоархитектоника лимфатического узла в этих случаях, как правило, не изменена [10]. Прогрессирование МКЛ *in situ* в классическую МКЛ встречается редко. Вероятно, для такой трансформации необходимо накопление дополнительных генетических aberrаций [42].

F. Racke и соавт. проанализировали «непораженные» лимфатические узлы у 7 пациентов с МКЛ и обнаружили опухоль *in situ* во всех биоптатах этих узлов, что предшествовало постановке диагноза МКЛ на 2–15 лет [43]. P. Adam и соавт. ретроспективно исследовали образцы ткани лимфатических узлов до постановки диагноза МКЛ у 37 пациентов и выявили признаки раннего поражения МКЛ в 10 случаях [39]. Эти ранние признаки лимфомы в течение 2–86 мес. предшествовали развитию МКЛ с выраженными изменениями гистологической картины лимфатического узла и характеризовались вовлечением в патологический процесс других групп лимфатических узлов или малых групп циклин D1-позитивных лимфоцитов в зонах экстранодальных поражений. В одном редком случае преклинической МКЛ в биоптате отмечался фолликулярный характер роста за счет вовлечения герминативных центров лимфоидных фолликулов. Через 4 года у этого пациента диагностирована МКЛ с развернутой клинической картиной [44]. Таким образом, перед развитием МКЛ может наблюдаться длительный латентный период, характеризующийся циркуляцией лимфоцитов с транслокацией $t(11;14)(q13;q32)$, инфильтрацией тканей по типу МКЛ *in situ* и диссеминированными преклиническими проявлениями (нодальными или экстранодальными). Время, необходимое для развития МКЛ с выраженной клинической симптоматикой, неизвестно, но может предположительно составлять 12–15 лет.

В настоящее время нет универсальных маркеров или клинических характеристик, которые могли бы предопределить индолентное течение МКЛ ко времени первичной диагностики. Локализованная стадия заболевания, низкая пролиферативная активность, мантийный тип роста, высокое соотношение CD4/CD8 и отсутствие aberrаций с вовлечением гена *TP53* коррелируют с лучшей выживаемостью [10]. Лейкозная манифестация служит признаком, отягощающим течение МКЛ, что отражено в прогностической шкале MIPI [12]. С другой стороны, есть клинически отличительный индолентный подтип МКЛ, характеризующийся как ненодальная лейкозная МКЛ, со спленомегалией и без таковой [26]. Мутации генов иммуноглобулинов, низкий уровень экспрессии CD38, в большей степени интерстициальная, чем нодулярная, инфильтрация лимфоидными клетками костного мозга и малое количество aberrаций в геноме характеризуют большинство этих случаев. Отмечено, что ненодальные лейкозные случаи с aberrациями генов *TP53* и *ATM* связаны с более агрессивным течением МКЛ [10, 45]. L. Nordstrom и соавт. выявили корреляцию между отсутствием экспрессии SOX11 и изменениями в гене *TP53* [31]. Возможно, ненодальная лейкозная SOX11-негативная МКЛ изначально протекала индолентно, но приобрела агрессивный характер



Кариотип:
mos46,XY, +der(3), +der(3), -8, -10, t(11;14)(q13;q32), der(13)t(11;13)(q13;q34)
с вариациями [6]/46,XY[14]



Кариотип:
mos46,XY, t(11;14)(q13;q32), i(17)(q10), add(22)(13)[13]/46,XY, idem, -10, +mar[7]

Рис. 8. (А, Б) Кариограммы 2 больных МКЛ с транслокацией t(11;14)(q13;q32) в составе комплексного кариотипа

Fig. 8. (A, B) Karyograms of 2 MCL patients with translocation t(11;14)(q13;q32) in the complex karyotype

в момент, когда возникли мутации в гене *TP53* или других генах [26].

СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

В нашей лаборатории с 2013 г. по 2022 г. наблюдались 75 пациентов с диагнозом МКЛ. Приведены результаты СЦИ у 51 больного и FISH-исследований у всех 75 пациентов. СЦИ выполнялось методом G-окрашивания (G-banding) на клетках костного мозга или периферической крови. Транслокация t(11;14)(q13;q22), перестройка генов *TP53*, *MYC* определялись FISH-методом с использованием локус-специфичных ДНК-зондов.

При СЦИ патологический кариотип обнаружен у 25/51 (49 %) пациентов. Транслокация t(11;14)(q13;q22) выявлена у 23/51 (45 %) больных. В составе комплексного кариотипа t(11;14)(q13;q22) определялась у 16/51 (31,4 %) пациентов (рис. 8).

Одновременное включение FISH-исследования в алгоритм диагностики МКЛ позволило нам выявлять дополнительные хромосомные aberrации. Так, у

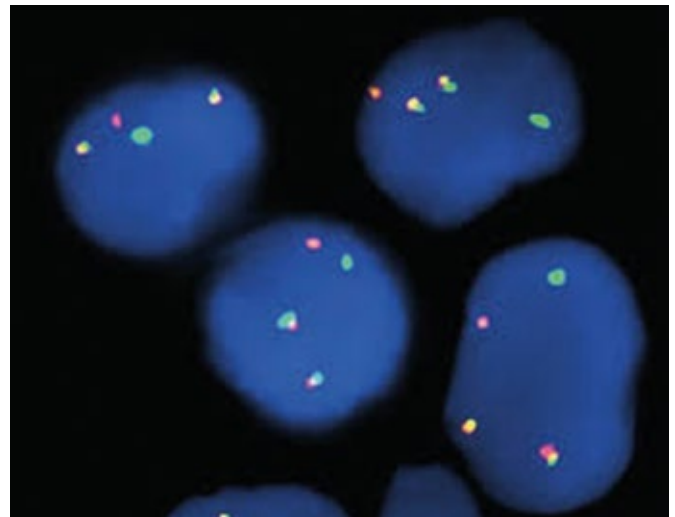


Рис. 9. FISH-исследование при МКЛ. Транслокация t(11;14)(q13;q32)

Fig. 9. FISH assay in MCL. Translocation t(11;14)(q13;q32)

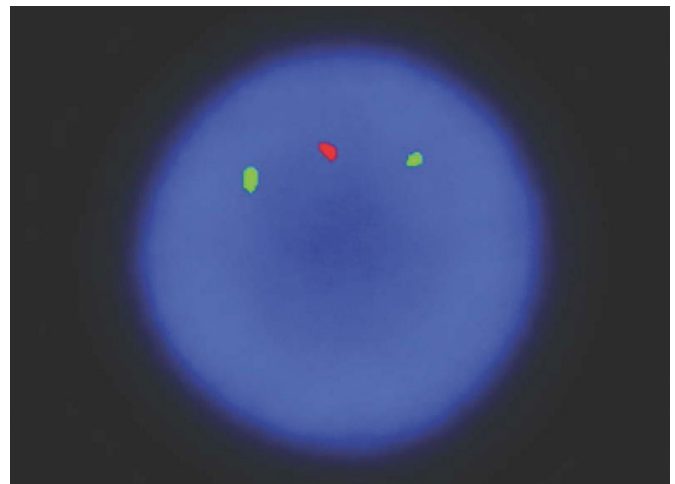


Рис. 10. FISH-исследование при МКЛ. Делеция гена *TP53*

Fig. 10. FISH assay in MCL. *TP53* gene deletion

пациентов с нормальным кариотипом транслокация t(11;14)(q13;q22) обнаружена дополнительно еще в 18/51 (35 %) случаях (рис. 9).

Перестройки, вовлекающие ген *MYC*, выявлены у 16/75 (21 %) пациентов. В данной группе хромосомные aberrации обнаружены у 7/11 (64 %) больных, у 5 пациентов митозы не получены. У всех пациентов транслокация t(11;14)(q13;q22) определялась как одиночная хромосомная aberrация (1/7; 14 %) или в составе комплексного кариотипа (6/7; 86 %) в сочетании с аномалиями хромосом 7 и 17 у 83 % больных МКЛ. У 8/16 (50 %) пациентов перестройка *MYC* сочеталась с делецией гена *TP53*.

Во второй группе у 59/75 (79 %) больных перестройки гена *MYC* не выявлены. Хромосомные aberrации обнаруживались у 18/39 (46 %) пациентов, в т. ч. комплексные изменения кариотипа — у 10/18 (56 %). Транслокация t(11;14)(q13;q32)1 выявлена у 16/18 (89 %) пациентов. Делеция гена *TP53* определялась у 10/59 (17 %) больных (рис. 10).

Предварительный анализ данных пациентов с МКЛ показал, что наличие комплексных изменений

Таблица 1. Сравнительный анализ пациентов с различным FISH-статусом гена *MYC*/8q24 ($n = 75$)

Пациенты	Число пациентов	Патологический кариотип	Комплексные изменения кариотипа	Транслокация $t(11;14)(q13;q32)$	Делеции, вовлекающие ген <i>TP53</i> /17p13
С изменениями <i>MYC</i> /8q24	16/75 (21,3 %)	7/16 (43,8 %)	6/16 (37,5 %)	13/16 (81,3 %)	8/16 (50,0 %)
Без изменений <i>MYC</i> /8q24	59/75 (78,7 %)	18/59 (30,5 %)	10/59 (16,9 %)	43/59 (72,9 %)	10/59 (16,9 %)

кариотипа, делеций, вовлекающих ген *TP53*, и аббераций *MYC* имеет значимое неблагоприятное влияние на клиническое течение заболевания по сравнению с группой стандартного риска. У пациентов из группы высокого молекулярного риска отмечались поздние стадии заболевания, быстрое прогрессирование и низкие показатели выживаемости. Медиана ВВП в группе пациентов с высоким риском составила 12,5 мес., в то время как у больных из группы промежуточного риска медиана ВВП не достигнута.

Кроме того, было показано, что в группе пациентов с изменениями в генах *MYC* и *CCND1* («double-hit» МКЛ) чаще выявлялись прогностически неблагоприятные хромосомные нарушения: комплексные изменения кариотипа (наличие ≥ 3 аббераций) — в 36 и 17 % случаев соответственно, абберации с вовлечением гена *TP53* — в 50 и 17 % соответственно (табл. 1). Наличие изменений в данных генах ассоциировалось с более низкими показателями ВВП. Полученные результаты позволяют определить группу пациентов с высоким риском, которым требуется безотлагательное начало лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетическая диагностика МКЛ с применением СЦИ и FISH помогает выделять группу пациентов с высоким риском: «double-hit» МКЛ и комплексные нарушения кариотипа. Последние несколько лет особое внимание уделяется изучению больных с крайне агрессивным течением МКЛ с абберациями, вовлекающими гены *CCND1* и *MYC* («double-hit» МКЛ). К настоящему времени практически нет данных многоцентровых исследований, посвященных больным с «double-hit» МКЛ.

В литературе представлены только отдельные клинические наблюдения или данные исследований. Кроме того, согласно имеющимся публикациям, нет единого мнения относительно включения в подгруппу «double-hit» МКЛ больных с амплификацией гена *MYC* в сочетании с транслокацией *CCND1*.

Таким образом, необходимы дополнительные многоцентровые исследования с целью получить новые данные о молекулярно-генетическом профиле МКЛ, который определяет как свойства опухолевого клона, так и вариабельность клинического течения заболевания.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.С. Мартынкевич, С.В. Волюшин, Е.В. Клеина.

Сбор и обработка данных: Е.В. Клеина.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: Е.В. Клеина.

Подготовка рукописи: Е.В. Клеина.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kallen ME, Rao NP, Kulkarni SK, et al. B-lymphoblastic transformation of mantle cell lymphoma/leukemia with “double hit” changes. *J Hematopathol.* 2015;8(1):31–6. doi: 10.1007/s12308-014-0229-9.
- Geling Li, Zhou Yi, Sindhu Ch, et al. An unusual case of co-existing classic mantle cell lymphoma and transformed lymphoma with Burkitt-like features with leukemic presentation. *J Hematopathol.* 2016;9(2):91–9. doi: 10.1007/s12308-016-0274-7.
- Delas A, Sophie D, Brousset P, Laurent C. Unusual concomitant rearrangements of Cyclin D1 and MYC genes in blastoid variant of mantle cell lymphoma: Case report and review of literature. *Pathol Res Pract.* 2013;209(2):115–9. doi: 10.1016/j.prp.2012.12.001.
- Sarkozy C, Terre C, Jardin F, et al. Complex karyotype in mantle cell lymphoma is a strong prognostic factor for the time to treatment and overall survival, independent of the MCL international prognostic index. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(1):106–16. doi: 10.1002/gcc.22123.
- Oka K, Ohno T, Kita K, et al. PRAD1 gene over-expression in mantle-cell lymphoma but not in other low-grade B-cell lymphomas, including extranodal lymphoma. *Br J Haematol.* 1994;86(4):786–91. doi: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb04830.x.
- Rule S. The modern approach to mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2019;37(1):66–9. doi: 10.1002/hon.2596.
- Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, et al. The mantle cell lymphoma international prognostic index (MIPI) is superior to the international prognostic index (IPI) in predicting survival following intensive first-line immunochemotherapy and autologous stem cell transplantation (ASCT). *Blood.* 2010;115(8):1530–3. doi: 10.1182/blood-2009-08-236570.
- Vose JM. Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am J Hematol.* 2017;92(8):806–13. doi: 10.1002/ajh.24797.
- Ladha A, Zhao J, Epner EM, Pu JJ. Mantle cell lymphoma and its management: where are we now? *Exp Hematol Oncol.* 2019;8:2. doi: 10.1186/s40164-019-0126-0.
- Sander B, Quintanilla-Martinez L, Ott G, et al. Mantle cell lymphoma – a spectrum from indolent to aggressive disease. *Virchows Arch.* 2016;468(3):245–57. doi: 10.1007/s00428-015-1840-6.
- Maddocks K. Update on mantle cell lymphoma. *Blood.* 2018;132(16):1647–56. doi: 10.1182/blood-2018-03-791392.
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, et al. German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG); European Mantle Cell Lymphoma Network. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood.* 2008;111(2):558–65. doi: 10.1182/blood-2007-06-095331.
- Berard CW, Dorfman RF. Histopathology of malignant lymphomas. *Clin Haematol.* 1974;3:39–45.
- Miao Y, Lin P, Wang W, et al. CCND1-IGH Fusion-Amplification and MYC Copy Number Gain in a Case of Pleomorphic Variant Mantle Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2016;146(6):747–52. doi: 10.1093/ajcp/aqw194.
- Hanel W, Epperla N. Emerging therapies in mantle cell lymphoma. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):79. doi: 10.1186/s13045-020-00914-1.

16. Reya T, O’Riordan M, Okamura R, et al. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 2000;13(1):15–24. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00004-2.
17. Tandon B, Peterson L, Gao J, et al. Nuclear overexpression of lymphoid-enhancer-binding factor 1 identifies chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in small B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2011;24(11):1433–43. doi: 10.1038/modpathol.2011.103.
18. Menter T, Dirnhofer S, Tzankov A. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2015;68(6):473–8. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202862.
19. Walther N, Ulrich A, Vockerodt M, et al. Aberrant lymphocyte enhancer-binding factor 1 expression is characteristic for sporadic Burkitt’s lymphoma. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1092–8. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.013.
20. Mozos A, Royo C, Hartmann E. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94(11):1555–62. doi: 10.3324/haematol.2009.010264.
21. Lord M, Wasik AM, Christensson B, et al. The utility of mRNA analysis in defining SOX11 expression levels in mantle cell lymphoma and reactive lymph nodes. *Haematologica*. 2015;100(9):369–72. doi: 10.3324/haematol.2015.123885.
22. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, et al. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(2):800–5. doi: 10.1182/blood-2007-06-093401.
23. Wang X, Asplund AC, Porwit A. The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br J Haematol*. 2008;143(2):248–52. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07329.x.
24. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, et al. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(5):322–34. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.09.007.
25. Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*. 2009;2(2):103–11. doi: 10.1007/s12308-009-0036-x.
26. Jares P, Colomer D, Campo E, et al. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3416–23. doi: 10.1172/JCI61272.
27. Ishigaki T, Sasaki K, Watanabe K, et al. Amplification of IGH/CCND1 fusion gene in a primary plasma cell leukemia case. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;201(1):62–5. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2010.05.006.
28. Lovéc H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, et al. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1994;13(15):3487–95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06655.x.
29. Wang L, Tang G, Medeiros LJ, et al. MYC rearrangement but not extra MYC copies is an independent prognostic factor in patients with mantle cell lymphoma. *Haematologica*. 2021;106(5):1381–9. doi: 10.3324/haematol.2019.243071.
30. Espinet B, Salaverria I, Bea S, et al. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(5):439–51. doi: 10.1002/gcc.20754.
31. Nordstrom L, Sernbo S, Eden P, et al. SOX11 and TP53 add prognostic information to MIPI in a homogeneously treated cohort of mantle cell lymphoma—a Nordic Lymphoma Group study. *Br J Haematol*. 2014;166(1):98–108. doi: 10.1111/bjh.12854.
32. Aukema SM, Siebert R, Schuurung E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319–31. doi: 10.1182/blood-2010-09-297879.
33. Boerma EG, Siebert R, Kluin PM, et al. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today’s knowledge. *Leukemia*. 2009;23(2):225–34. doi: 10.1038/leu.2008.281.
34. Gruszka-Westwood AM, Atkinson S, Summersgill BM, et al. Unusual case of leukemic mantle cell lymphoma with amplified CCND1/IGH fusion gene. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33(2):206–12. doi: 10.1002/gcc.1216.
35. Greenwell IB, Staton AD, Lee MJ, et al. Complex karyotype in patients with mantle cell lymphoma predicts inferior survival and poor response to intensive induction therapy. *Cancer*. 2018;124(11):2306–15. doi: 10.1002/cncr.31328.
36. Halldorsdottir AM, Lundin A, Murray F, et al. Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 2011;25(12):1904–8. doi: 10.1038/leu.2011.162.
37. Martin P, Chadburn A, Christos P, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1209–13. doi: 10.1200/JCO.2008.19.6121.
38. Abrisqueta P, Scott DW, Slack GW, et al. Observation as the initial management strategy in patients with mantle cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2489–95. doi: 10.1093/annonc/mdx333.
39. Adam P, Schiefer AI, Prill S, et al. Incidence of preclinical manifestations of mantle cell lymphoma and mantle cell lymphoma in situ in reactive lymphoid tissues. *Mod Pathol*. 2012;25(12):1629–36. doi: 10.1038/modpathol.2012.117.
40. Espinet B, Ferrer A, Bellosillo B, et al. Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry. *Clin Cancer Res*. 2014;20(4):1007–19. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1077.
41. Lecluse Y, Lebaillly P, Roulland S, et al. t(11;14)-positive clones can persist over a long period of time in the peripheral blood of healthy individuals. *Leukemia*. 2009;23(6):1190–3. doi: 10.1038/leu.2009.31.
42. Karube K, Scarfo L, Campo E, Ghia P. Monoclonal B cell lymphocytosis and “in situ” lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2014;24:3–14. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.003.
43. Racke F, Simpson S, Christian B, et al. Evidence of Long Latency Periods Prior to Development of Mantle Cell Lymphoma. *Blood*. 2010;116(21):323. doi: 10.1182/blood.V116.21.323.323.
44. Edlefsen KL, Greisman HA, Yi HS, et al. Early lymph node involvement by mantle cell lymphoma limited to the germinal center: report of a case with a novel “follicular in situ” growth pattern. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(2):276–81. doi: 10.1309/AJCP6KFFGTC8PLVR.
45. Chapman-Fredricks J, Sandoval-Sus J, Vega F, et al. Progressive leukemic non-nodal mantle cell lymphoma associated with deletions of TP53, ATM, and/or 13q14. *Ann Diagn Pathol*. 2014;18(4):214–9. doi: 10.1016/j.anndiagnpath.2014.03.006.