

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК С ИЗОЛИРОВАННОЙ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ДЕЛЕЦИЕЙ 13q14 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Тамара Павловна ЗАГОСКИНА¹, Екатерина Николаевна ЗОТИНА²

¹ Кировский государственный медицинский университет Минздрава России
610998, г. Киров, ул. Карла Маркса, 112

² Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России
610027, г. Киров, ул. Красноармейская, 72

В настоящее время является актуальным поиск новых факторов прогноза, улучшающих стратификацию пациентов на группы риска и позволяющих определить показания к различным программам терапии хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) с целью повышения их клинической эффективности. **Материал и методы.** В работе представлены данные исследования хромосомных aberrаций с помощью метода FISH у 224 больных ХЛЛ в момент постановки диагноза, в том числе у 49 пациентов в стадии А, у 166 – в стадии В и у 29 – в стадии С. **Результаты и их обсуждение.** Хромосомные нарушения обнаружены у 176 (72 %) больных. Наиболее частой aberrацией при ХЛЛ явилась del13q14, которая обнаружена у 124 (51 %) пациентов и встречалась изолированно или в сочетании с другими хромосомными изменениями. В качестве единственной хромосомной аномалии del13q14 обнаружена у 77 пациентов, которые отличались друг от друга по количеству опухолевых клеток, имеющих изолированную del13q14. Мы изучили прогностическое значение содержания опухолевых клеток с изолированной делецией 13q14 у больных ХЛЛ в момент постановки диагноза. Проведен сравнительный анализ двух групп пациентов, у которых количество лейкозных клеток, имеющих указанную делецию, составило 60 % и более или менее 60 %. Установлено, что количество клеток с изолированной del13q14 является предиктором выживаемости, свободной от лечения, а также общей выживаемости больных ХЛЛ и может служить дополнительным фактором прогноза.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, делеция 13q14, клинический исход, прогноз.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) представляет собой лимфопролиферативное заболевание, возникающее вследствие мутаций в геноме В-лимфоцитов, которые приводят к трансформации и аномальному разрастанию отдельных В-клеточных клонов. Заболевание характеризуется разнообразной клинической картиной, длительностью и ответом на терапию. Продолжительность жизни пациентов варьирует от полутора до двух десятков лет. В одних случаях заболевание протекает индолентно и длительное время не требует назначения лечения, в других – быстро прогрессирует в течение нескольких месяцев, несмотря на интенсивную терапию [3, 9]. Принимая во внимание выраженную гетерогенность ХЛЛ, не исключено, что он представлен разными болезнями, отличающимися по патогенезу. Единственный биологический маркер, определяющий вариант ХЛЛ, до сих пор не найден. В настоящее время варианты заболевания дифференцируются с помощью мутационного статуса генов *IgVH* или

суррогатных маркеров [2, 6]. Возможно, различия в патогенезе проявляются разным распределением хромосомных нарушений.

В последние годы достигнут значительный прогресс в лечении ХЛЛ. Вместе с тем при использовании современной терапии полные и частичные ремиссии удается достичь не у всех пациентов. Резистентных к терапии больных следует относить к группе высокого риска, поскольку продолжительность их жизни не превышает 3–5 лет, и очень важно найти критерии, которые позволили бы выделить пациентов с ожидаемой рефрактерностью к химио- и иммунохимиотерапии [9, 12]. Причины различного течения заболевания и неоднородности ответа на терапию при ХЛЛ остаются до конца не расшифрованными. Но можно предположить, что хромосомные нарушения играют решающую роль в развитии ХЛЛ.

В интерфазных ядрах опухолевых клеток до 80 % пациентов с ХЛЛ могут встречаться хромосомные aberrации [6]. На сегодняшний день

Загоскина Т.П. – к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии, e-mail: zagoskina@blood.kirov.ru

Зотина Е.Н. – к.м.н., руководитель научно-клинического отдела гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга, e-mail: zotina@niigpk.ru

доказано, что хромосомные нарушения являются значимыми независимыми предикторами беспрогрессивной и общей выживаемости больных ХЛЛ. Наиболее распространенным хромосомным нарушением является делеция длинного плеча 13-й хромосомы (del13q14), которая связана с благоприятным прогнозом и с большим интервалом времени между постановкой диагноза и началом лечения [5, 7, 8, 10]. Делеция хромосомы 13 при ХЛЛ чаще всего охватывает участок 13q14. Наличие изолированной del13q14 у больных ХЛЛ продолжает считаться благоприятным фактором течения заболевания. Так, при обследовании 159 ранее не леченных больных ХЛЛ, выполненном в клинике Майо [7], изолированная del13q14 выявлена в 45 % случаях. Медиана общей выживаемости (ОВ) пациентов с единственной del13q14 равнялась 17 лет, тогда как у больных с нормальным кариотипом – 13,2 года.

В то же время установлено, что группа больных с изолированной del13q14 также характеризуется неоднородностью. При рассмотрении этой категории пациентов выявлены различия в клиническом течении заболевания, ответе на терапию. Больные с индолентным и прогрессирующим течением ХЛЛ отличались друг от друга по количеству опухолевых клеток, содержащих изолированную del13q14 [1, 4, 11]. Имеющиеся в литературе сведения по этому вопросу немногочисленны и противоречивы. Кроме того, отсутствуют данные о влиянии количества лейкозных клеток с del13q14 на выживаемость, свободную от лечения, и общую выживаемость больных ХЛЛ.

Целью настоящего исследования явилась оценка прогностического значения количества опухолевых клеток, содержащих изолированную del13q14, у больных ХЛЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включено 244 больных ХЛЛ, в том числе 163 (67 %) мужчины, 81 (33 %) женщина. Возраст обследуемых колебался от 33 до 81 года. Медиана возраста составила 60 лет. У 49 (20 %) пациентов установлена стадия А, у 166 (68 %) – стадия В и у 29 (12 %) – стадия С по классификации Binet. Медиана времени наблюдения за больными составила 68 месяцев (от 2 до 175 месяцев). Диагноз ХЛЛ верифицирован согласно общепринятым критериям, а именно общему анализу крови, иммунофенотипированию клеток периферической крови и костного мозга, миелограмме пунктата грудины, гистологическому исследованию биоптата лимфатического узла и трепанобиоптата подвздошной кости с иммуно-

гистохимией [3]. Кроме того, для уточнения распространенности опухолевого процесса выполнялись рентгенография органов грудной клетки, ультразвуковое исследование или компьютерная томография органов брюшной полости и забрюшинного пространства.

Хромосомные аномалии в мононуклеарах периферической крови определяли методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), с помощью зондов к локусам 13q14.3; 12p11-q11; 11q22.3 и 17p13.1. В работе использован коммерческий многоцветный набор ДНК-зондов («Abbott/Vysis», США), состоящий из двух коктейлей: LSI p53/LSI ATM (SpectrumOrange/SpectrumGreen) и LSI D13S319/LSI 13q34/CEP 12 (SpectrumOrange/SpectrumAqua/SpectrumGreen) («Abbott/Vysis»). Анализ препаратов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioptan-2-mot» («Carl Zeiss», Германия) с набором фильтров DAPI, Orange, Green, Aqua (Vysis, США). В каждом случае анализировали не менее 200 интерфазных клеток с четкими сигналами. Пороговые значения всех исследованных делеций и трисомии-12 составляли соответственно 9 и 3 %.

Исследования выполняли в момент постановки диагноза до начала проведения специфической терапии. Кроме того, у всех больных до начала лечения оценивали экспрессию антигена CD38 и белка Zap-70 с помощью проточной цитофлуориметрии, а также содержание тимидинкиназы в сыворотке крови радиоэнзимным методом. Уровень экспрессии Zap-70 и CD38 считали позитивным, если он выявлялся на поверхности соответственно более чем 30 и 20 % клеток.

Для изучения достоверности различий качественных признаков в сравниваемых группах использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса, а в случаях малого числа наблюдения – точный критерий Фишера. Кривые выживаемости, свободной от лечения, и ОВ строили по методу Каплана – Майера. Кривые выживаемости сравнивали по значению логрангового критерия. Оценка прогностической ценности признаков в отношении ОВ изучали, применяя модель пропорциональных рисков Кокса. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$ для всех критериев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью метода FISH хромосомные аберрации обнаружены у 176 (72 %) больных ХЛЛ. Нормальный кариотип выявлен у 68 (28 %) обследованных. У 127 (72 %) пациентов встречалось одно хромосомное нарушение, у 42 (24 %) – два, у 5 (3 %) – три и у 2 (1 %) – четыре хромосомных

аномалии. Наиболее частой хромосомной аберрацией являлась del13q14, она обнаружена у 124 (51 %) пациентов, реже встречались del11q22 и трисомия-12 – у 49 (20 %) и 24 (10 %) больных соответственно. Делеция 17p13 выявлена у 12 (5 %) пациентов. В качестве единственной хромосомной аномалии del13q14 обнаружена у 77 (62 %) больных, в сочетании с другими хромосомными нарушениями – у 47 (38 %) пациентов. Среди больных с изолированной del13q14 у 54 (70 %) делеция произошла в локусе D13S319, у 5 (7 %) – в локусе RB-1 и у 18 (23 %) – в обоих локусах.

Наряду с этим отмечено, что больные ХЛЛ отличаются друг от друга по количеству опухоле-

вых клеток, имеющих изолированную del13q14. Нами изучены особенности клинического течения ХЛЛ в зависимости от количества лейкозных клеток с del13q14. Больные с изолированной del13q14 были разделены на две группы в зависимости от содержания клеток, имеющих данную аберрацию. Согласно результатам ROC-анализа, пороговое значение (чувствительность – 95 %, специфичность – 87 %) равнялось 60 %. В первую группу вошли 36 (47 %) пациентов с del13q14 в менее чем 60 % клеток, во вторую группу – 41 (53 %) больной с del13q14 в 60 % клеток и более. В табл. 1 и 2 представлена характеристика больных ХЛЛ в зависимости от коли-

Таблица 1

Клиническая характеристика больных ХЛЛ в зависимости от количества клеток с del13q14

Параметр	Количество клеток с del13q14		p
	< 60 % (n = 36)	≥ 60 % (n = 41)	
Медиана возраста (диапазон), лет	63 (35–81)	60 (38–75)	0,723
Пол			0,803
Количество мужчин	20 (56 %)	25 (61 %)	
Количество женщин	16 (44 %)	16 (39 %)	
Стадия по Binet:			0,964
А	6 (17 %)	4 (10 %)	
В	28 (78 %)	31 (76 %)	
С	2 (5 %)	16 (14 %)	
В-симптомы:			0,903
есть	17 (47 %)	21 (51 %)	
нет	19 (53 %)	20 (49 %)	
Лимфаденопатия:			0,330
есть	31 (86 %)	39 (95 %)	
нет	5 (14 %)	2 (5 %)	
Гепатомегалия:			0,096
есть	24 (67 %)	35 (85 %)	
нет	12 (33 %)	6 (15 %)	

Таблица 2

Биологическая характеристика больных ХЛЛ в зависимости от количества клеток с del13q14

Параметр	Количество клеток с del13q14		p
	< 60 % (n = 36)	≥ 60 % (n = 41)	
Содержание гемоглобина, г/л	131,8 ± 5,62	127,1 ± 4,59	0,515
Содержание тромбоцитов, ×10 ⁹ /л	168,8 ± 12,41	157,3 ± 11,90	0,506
Содержание лейкоцитов, ×10 ⁹ /л	21,2 ± 4,44	39,3 ± 5,37	0,015
Содержание лимфоцитов, ×10 ⁹ /л	18,5 ± 3,12	31,7 ± 4,75	0,027
Содержание лактатдегидрогеназы, Ед/л	351,2 ± 23,37	408,6 ± 35,41	0,193
Содержание тимидинкиназы, Ед/л	9,7 ± 1,75	18,9 ± 2,46	0,004
CD38+	30 (83 %)	37 (90 %)	0,324
CD38-	6 (17 %)	4 (10 %)	
Zap-70+	4 (11 %)	40 (98 %)	< 0,001
Zap-70-	32 (89 %)	1 (2 %)	

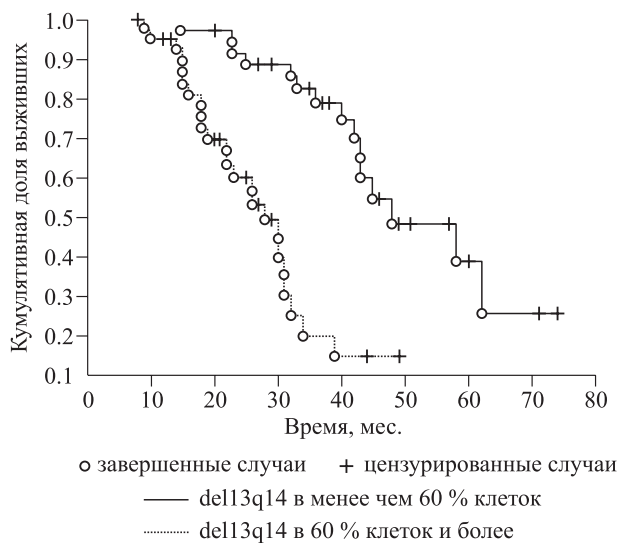


Рис. 1. Выживаемость, свободная от лечения, больных ХЛЛ в зависимости от количества клеток с del13q14

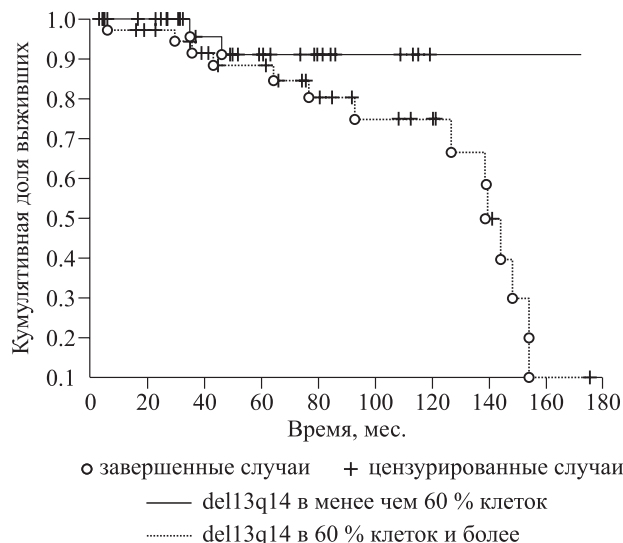


Рис. 2. Общая выживаемость больных ХЛЛ в зависимости от количества клеток с del13q14

чества опухолевых клеток с del13q14. Пациенты с различным количеством клеток, имеющих данное хромосомное нарушение, не отличались друг от друга по возрасту, полу, стадии заболевания, наличию В-симптомов, лимфаденопатии, органомегалии, содержанию гемоглобина, тромбоцитов, уровню ЛДГ, экспрессии CD38. Вместе с тем группы больных отличались друг от друга по количеству лейкоцитов и лимфоцитов в периферической крови, по концентрации сывороточной тимидинкиназы, а также по уровню экспрессии белка Zap-70.

Медиана наблюдения за больными составила 68 месяцев. При анализе свободной от лечения выживаемости больных ХЛЛ в зависимости от количества лейкозных клеток с del13q14 установлено, что ее медиана у пациентов с del13q14 в менее чем 60 % клеток равнялась 47 месяцам, у больных с del13q14 в 60 % клеток и более – 23 месяцам (рис. 1). У пациентов с del13q14 в менее чем 60 % клеток медиана ОВ не достигнута за период наблюдения, тогда как у больных с del13q14 в 60 % клеток и более она составила 139 месяцев (рис. 2). Таким образом, группы пациентов с различным количеством клеток с del13q14 значительно различались по выживаемости, свободной от лечения, и ОВ: у больных с del13q14 в 60 % клеток и более величины обоих показателей были достоверно меньше.

Для выявления независимых факторов прогноза ОВ проведен однофакторный и многофакторный анализ с использованием модели пропорциональных рисков Кокса, в который были включены такие параметры, как возраст (≤ 60 лет

или > 60 лет), пол (мужской или женский), стадия заболевания (стадия А или стадии В и С), содержание тимидинкиназы (≤ 10 Ед/л или > 10 Ед/л), уровень экспрессии белка Zap-70 (< 20 % и ≥ 20 %) и содержание клеток с изолированной del13q14 (< 60 % или ≥ 60 %). Однофакторный анализ ОВ показал, что продолжительность жизни больных ХЛЛ была значительно короче у пациентов старше 60 лет ($p = 0,017$), со стадией В или С по Binet ($p < 0,001$), с del13q14 в 60 % клеток и более ($p = 0,009$), с содержанием тимидинкиназы в сыворотке крови 10 Ед/л и более ($p = 0,023$) и положительным уровнем экспрессии Zap-70 ($p < 0,001$). При проведении многофакторного анализа установлено, что независимыми факторами прогноза ОВ у больных ХЛЛ служат уровень экспрессии Zap-70, концентрация сывороточной тимидинкиназы, а также количество лейкозных клеток с изолированной del13q14 (табл. 3).

Таблица 3

Многофакторный анализ общей выживаемости у больных хроническим лимфолейкозом

Параметр	Отношение рисков (95%-й доверительный интервал)	<i>p</i>
Возраст	3,24 (0,67–15,8)	0,152
Стадия по Binet	2,74 (0,58–14,0)	0,206
Тимидинкиназа	1,42 (1,13–1,69)	$< 0,001$
Zap-70	1,30 (1,10–1,52)	$< 0,001$
Del13q14	1,25 (1,08–1,46)	$< 0,001$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что количество опухолевых клеток с изолированной del13q14 влияет на клиническое течение ХЛЛ. Пациенты, имеющие изолированную del13q14 в 60 % лейкозных клеток и более, характеризуются менее благоприятным прогнозом заболевания по сравнению с больными с del13q14 в менее чем 60 % клеток. Содержание клеток с del13q14 в 60 % лимфоидных элементов и более является предиктором короткой выживаемости, свободной от лечения, и ОВ больных ХЛЛ. При этом число опухолевых клеток с изолированной del13q14 в комплексе с такими факторами прогноза, как уровень экспрессии белка Zap-70 и концентрация сывороточной тимидинкиназы, обеспечивает более точную стратификацию пациентов ХЛЛ на группы риска в момент постановки диагноза, позволяя тем самым более точно выделить лиц, подверженных быстрому прогрессированию опухолевого процесса.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кировского НИИ гематологии и переливания крови и Кировского государственного медицинского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dal Bo M., Rossi F.M., Rossi D., Deambrogi C., Bertoni F., del Giudice I., Palumbo G., Nanni M., Rinaldi A., Kwee I., Tissino E., Corradini G., Gozzetti A., Cencini E., Ladetto M., Coletta A.M., Luciano F., Bulian P., Pozzato G., Laurenti L., Forconi F., di Raimondo F., Marasca R., del Poeta G., Gaidano G., Foa R., Guarini A., Gattei V. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia // *Genes Chromosomes Cancer*. 2011. 50. (8). 633–643.
2. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia // *N. Engl. J. Med*. 2000. 343. (26). 1910–1916.
3. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Döhner H., Hillmen P., Keating M., Montserrat E., Chiorazzi N., Stilgenbauer S., Rai K.R., Byr J.C., Eichhorst B., O'Brien S., Robak T., Seymour J.F., Kipps T.J. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL // *Blood*. 2018. 131. (25). 2745–2760.
4. Hernandez J.A., Rodriguez A.E., Gonzalez M., Benito R., Fontanillo C., Sandoval V., Romero M., Martin-Nunez G., de Coca A.G., Fisac R., Galende J., Recio I., Ortuno F., Garcia J.L., de las Rivas J., Gutierrez N.C., san Miguel J.F., Hernandez J.M. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia // *Haematologica*. 2009. 94. (3). 364–371.
5. Hrubá M., Subrt I. Multiclonal monoallelic 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia // *Leuk. Lymphoma*. 2013. 54. (2). 413–416.
6. Janssens A., van Roy N., Poppe B., Noens L., Philippe J., Speleman F., Offner F. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence in situ hybridization study and review of the literature // *Eur. J. Haematol*. 2012. 89 (1). 72–80.
7. Ouillette P., Collins R., Shakhan S., Li J., Li C., Shedden K., Malek S.N. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia // *Clin. Cancer Res*. 2011. 17. (21). 6778–6790.
8. Ouillette P., Erba H., Kujawski L., Kaminski M., Shedden K., Malek S.N. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14 // *Cancer Res*. 2008. 68. (4). 1012–1021.
9. Rodriguez-Vicente A.E., Diaz M.G., Hernandez-Rivas J.M. Chronic lymphocytic leukemia: a clinical and molecular heterogenous disease // *Cancer Genet*. 2013. 206 (3). 49–62.
10. Van Dyke D.L., Shanafelt T.D., Call T.G., Zent C.S., Smoley S.A., Rabe K.G., Schwager S.M., Sonbert J.C., Slager S.L., Kay N.E. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia // *Br. J. Haematol*. 2010. 148. (4). 544–550.
11. Yi S., Li H., Li Z., Xiong W., Liu H., Liu W., Lv R., Yu Z., Zou D., Xu Y., An G., Qiu L. The prognostic significance of 13q deletions of different sizes in patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders: a retrospective study // *Int. J. Hematol*. 2017. 106. (3). 418–425.
12. Zenz T., Döhner H., Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia // *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. 2007. 20. (3). 439–453.

CLINICAL VALUE OF CELL CONTENT WITH ISOLATED INTERSTITIAL DELETION 13q14 IN CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

Tamara Pavlovna ZAGOSKINA¹, Ekaterina Nikolaevna ZOTINA²

¹ *Kirov State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
610998, Kirov, Karl Marks str., 112*

² *Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion of FMBA of Russia
610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72*

Currently, it is urgent to search for new prognostic factors that improve the stratification of patients into risk groups and allow the determination of indications for various CLL therapy programs with the aim of increasing their clinical effectiveness. **Material and methods.** The research presents the data on chromosomal aberrations with the help of the FISH method in 224 CLL patients during the diagnosis, among them 49 patients are in stage A, 166 patients – in stage B and 29 patients – in stage C. **Results and discussion.** Chromosomal abnormalities were detected in 176 (72 %) patients. The most frequent aberration in CLL was del13q14, which was found in 124 (51 %) patients and occurred alone or in combination with other chromosomal changes. As the only chromosomal abnormality, del13q14 was found in 77 patients who differed from each other in the number of tumor cells that had isolated del13q14. We have studied the prognostic value of the content of tumor cells with isolated 13q14 deletion in CLL patients during the diagnosis. A comparative analysis of 2 groups of patients who had the percentage of leukemia cells with this deletion (it was ≥ 60 % or < 60 %) was conducted. It has been established that the number of cells with isolated del13q14 is an independent predictor of survival, free from treatment, as well as the overall survival of CLL patients and may serve as an additional prognostic factor.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, 13q14 deletion, clinical outcome, prognosis.

Zagoskina T.P. – candidate of medical sciences, assistant professor of the department of hospital therapy, e-mail: zagoskina@blood.kirov.ru

Zotina E.N. – candidate of medical sciences, head of the scientific and clinical department of hematology, chemotherapy and bone marrow transplantation, e-mail: zotina@niigpk.ru