

## Динамическое молекулярно-цитогенетическое наблюдение за больными хроническим лимфоцитарным лейкозом с неблагоприятным прогнозом

Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова, Е.В. Голуб, В.В. Цепенко, А.А. Даниленко, В.В. Павлов

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России;  
Россия, 249036, Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Татьяна Геннадьевна Шкаврова [shkavrova@mail.ru](mailto:shkavrova@mail.ru)

В данном пилотном исследовании представлены результаты длительного (до 74 мес) динамического наблюдения за 16 больными хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ), у которых при первом исследовании методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации клеток (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) были выявлены *del17p13* или *del11q22*. Показано, что для прогноза течения заболевания имеет значение не только наличие делеций *17p13* или *11q22*, но и процент aberrантных клеток с этими нарушениями. Высокая частота (более 70 %) клеток с делецией *17p13* является цитогенетическим маркером неблагоприятного течения ХЛЛ и низкой продолжительности жизни, в то время как низкая частота таких клеток может быть предиктором прогрессирования заболевания, но при эффективном лечении это не отражается на выживаемости больных ХЛЛ. Наличие более 70 % клеток с *del11q22* свидетельствует о необходимости раннего начала лечения. Также было выявлено, что доля клеток с маркерными aberrациями при ХЛЛ у одного и того же человека может меняться (в том числе снижаться до контрольного уровня) как в результате лечения, так и без него. После завершения адекватной программы лечения больных процент aberrантных клеток достоверно снижается, а при рецидиве и/или прогрессировании, как правило, достигает первоначального уровня. Соотношение между субклонами клеток с различными маркерными нарушениями в процессе лечения и после его окончания может меняться, возможно появление новых субклонов лейкозных клеток. Проведение FISH-исследования при ХЛЛ может дать больше полезной информации, чем просто отнесение больного к определенной группе прогноза при постановке диагноза, поскольку на прогноз течения заболевания могут влиять не только качественные показатели (есть или нет нарушения), но и количественные (% клеток с нарушением). Учитывая широкий спектр вариантов течения ХЛЛ и возможность клональной эволюции, выполнение динамического FISH-анализа может быть полезным инструментом при данном заболевании.

**Ключевые слова:** хронический лимфоцитарный лейкоз, интерфазная флуоресцентная *in situ* гибридизация клеток, *del17p13*, *del11q22*, динамическое наблюдение

DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-2-30-36

### Molecular cytogenetic follow-up of chronic lymphocytic leukemia patients with unfavorable prognosis

T.G. Shkavrova, G.F. Mikhailova, E.V. Goloub, V.V. Tsepenko, A.A. Danilenko, V.V. Pavlov

A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 4, Korolev St., Obninsk, 249036, Kaluga Region, Russia

In this pilot study results of prolonged (up to 74 month) follow-up of 16 CLL patients with *del17p13* or *del11q22* in the first I-FISH analysis have been presented. It was shown that the presences of *del17p13* or *del11q22* as well as the rate of the aberrant cells having those abnormalities are significant for the prognosis and clinical course of CLL. The high rate (more than 70 %) of cells with *17p13* deletion means very unfavorable cytogenetic marker and indicates the short survival. On the other hand the low rate of cells with *17p13* deletion may predict disease progression but in case of effective treatment there are no effects on the patient's survival. The high rate (more than 70 %) of cells with *del11q22* indicates the early requiring for treatment. It was revealed the frequency of cells with marker aberrations may change in the same patient including decreasing to the control level as result of treatment and without it too. The frequency of aberrant cells decreases significantly after the finishing of appropriated treatments program and usually returns to its previous level in case of relapse and/or progression of disease. The subclones' ratio between different marker abnormalities could vary during treatment and after its ending. It's also possible the occurrence of new leukemic cells subclones. Taking in consideration the wide range of clinical CLL course and the possibility of the clonal evolution, the FISH-analysis should be as integral part of clinical practice both during the CLL staging and the next patient's follow-up.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia (CLL), interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH), *del17p13*, *del11q22*, follow-up

## Введение

Ежегодно в странах Европы, США и России диагноз «хронический лимфоцитарный лейкоз» (ХЛЛ) устанавливают впервые у 3–5 человек на 100 тыс. населения [1, 2]. Несмотря на значительные достижения в понимании молекулярных механизмов возникновения и течения этого заболевания, множество вопросов все еще остаются нерешенными. Распространенность ХЛЛ, многочисленные молекулярно-генетические изменения, выявляемые как в начале заболевания, так и при его прогрессировании, вариабельность клинического течения, ответа на терапию и результатов лечения, оцененных по продолжительности общей выживаемости, дают основание для планирования и реализации персонализированных терапевтических программ.

За последние 2 десятилетия многочисленные клинические исследования позволили значительно изменить подходы к терапевтической стратификации больных ХЛЛ в соответствии с прогнозом. Тем не менее заболевание все еще остается неизлечимым, что побуждает к проведению дальнейших исследований.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на выявлении молекулярно-генетических нарушений, играющих ключевую роль в патогенезе ХЛЛ. Использование молекулярно-цитогенетического метода интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (interphase fluorescence *in situ* hybridization, I-FISH) с ДНК-зондами к 17p13, 11q22, 13q14 и Cep12 позволяет выявлять эти цитогенетические нарушения в лимфоцитах более чем у 80 % больных ХЛЛ [3, 4]. Информация, которую дает метод I-FISH, может быть использована лечащим врачом для стратификации больных по группам риска, выбора тактики лечения, оценки эффективности проводимой терапии и прогноза течения заболевания.

**Целью** данной работы был анализ нарушений локусов 17p13 и 11q22 при динамическом наблюдении у больных ХЛЛ с неблагоприятным прогнозом. Результаты, представленные в статье, являются частью исследовательской работы, проводимой с целью формирования банка биологических образцов больных ХЛЛ и накопления фактического материала по изучению динамики молекулярно-цитогенетических маркеров. Полученные предварительные результаты позволяют говорить о целесообразности проведения подобных исследований.

## Материалы и методы

В исследование включены 16 пациентов (11 мужчин и 5 женщин) с ХЛЛ, находящихся в процессе лечения или постклинического наблюдения, у которых при первичном I-FISH-исследовании были выявлены del17p13 или del11q22. Повторные I-FISH-анализы были выполнены при плановом обследовании в процессе наблюдения до начала терапии, после проведения лечения, при рецидиве/прогрессировании заболевания. Схемы лечения, адекватные периоду течения

ХЛЛ, были подобраны индивидуально. Период времени между проведением первого и последнего FISH-анализа колебался от 4 до 74 мес. Возраст обследованных на момент проведения первого FISH-анализа варьировал от 47 до 76 лет (медиана 59 лет).

Контрольную группу составили 5 клинически здоровых доноров (3 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 39 до 85 лет (медиана 62 года).

Образцы венозной крови (4–6 мл) забирали при помощи вакуумной системы, содержащей Li-гепарин в концентрации 12–30 МЕ на 1 мл крови. Затем цельную кровь разбавляли 1:1 средой RPMI-1640 и выделяли лимфоциты при помощи сепарационной среды LMS (MP Biomedicals, США). Клеточную суспензию (20–30 мкл) наносили на сухие предварительно очищенные предметные стекла. В работе был использован коммерческий многоцветный набор прямомеченных ДНК-зондов (Vysis, США), состоящий из 2 проб: LSI p53/LSI ATM и LSI D13S319/LSI 13q34/Cep 12. Пред- и постгибридизационные отмывки проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к ДНК-зондам. Для денатурации и гибридизации использовали гибридайзер HYBrite (Vysis, США).

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе AxioImager A-2 (Carl Zeiss, Германия) с набором фильтров DAPI, Orange/Green, Aqua (Vysis, США). В каждом случае анализировали не менее 200 интерфазных клеток с четкими сигналами.

При определении границ нормы для каждой из проб многоцветного зонда анализировали 1000 интерфазных ядер от каждого из 5 здоровых доноров. Граница нормальных значений: для трисомии хромосомы 12 < 3 %, del 13q14 < 6 %, del 13q34 < 9 %, del 11q23 < 4 %, del 17p13 < 7 %.

Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2007. Достоверность различий оценивали по t-критерию. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

У 16 больных ХЛЛ проведено 42 I-FISH-анализа: 10, 3, 2 и 1 человек были обследованы 2, 3, 4 и 5 раз соответственно. Интервал времени между обследованиями варьировал от 3 до 46 мес. Первый I-FISH-анализ у 7 человек был выполнен при установлении диагноза ХЛЛ, у 9 человек – спустя 7–128 мес от даты установления диагноза.

### Делеция 17p13

Делеция 17p13 считается самым неблагоприятным цитогенетическим маркером, свидетельствующим о плохом прогнозе и резистентности к стандартной терапии. Медиана выживаемости больных с этим нарушением составляет 32 мес [3, 5]. Эта маркерная абберрация выявляется у 2–6 % больных ХЛЛ при установлении ди-

агноза (*de novo* делеция) или в дебюте заболевания, но может появиться и в процессе развития болезни, особенно у пациентов, уже получивших химиотерапию. В работе [6] было показано, что при рецидивирующем или резистентном ХЛЛ доля пациентов с del17p увеличивается до 30 %. Тем не менее в ряде работ установлено, что у части больных с этим нарушением прогноз не является неблагоприятным. В исследовании [7] обнаружено, что пациенты, имевшие от 5 до 20 % клеток с del17p13, ответили на лечение так же, как и пациенты без этой делеции, в то время как больные с высокой частотой аберрантных клеток – лишь в 13 % случаев. Были выявлены достоверные различия и по медиане общей выживаемости между больными с низким и высоким содержанием клеток с потерей локуса 17p13. Однако при дальнейшем наблюдении за этими пациентами первоначальные результаты не были подтверждены, а частота клеток с del17p13, ниже которой больные имели благоприятный прогноз, была установлена на уровне 10 % [8]. В работах [9, 10] также было показано, что у части пациентов с del17p13 болезнь может протекать бессимптомно в течение длительного периода. Авторы сделали вывод, что потеря 17p13 является предиктором только прогрессирования заболевания, но не выживаемости больных.

При первичном FISH-анализе нами было установлено, что у 5 из 8 пациентов с del17p13 частота аберрантных клеток была высокой (74 % и выше), а у 3 больных – низкой (не более 20 %) (табл. 1). У 2 из 8 пациентов (П1 и П3) del17p13 была единственной, у остальных – сочеталась с del13q14. Кроме того, у па-

циента П4 была выявлена и нехарактерная для ХЛЛ моносомия хромосомы 12 в 78 % клеток.

У всех больных с высокой частотой клеток с del17p13 были клинические показания к безотлагательному началу цитостатической терапии. Пациенту П5 лечение не проводили из-за сопутствующих заболеваний. У этого пациента частота клеток с del17p13 через 8 мес со времени 1-го FISH-исследования не отличалась от первоначальной (74 и 80 % соответственно), а еще через 5 мес больной умер от прогрессии ХЛЛ. Продолжительность жизни этого пациента со времени установления диагноза ХЛЛ составила 13 мес (табл. 2).

Пациентам П1, П2, П4 после завершения терапии 1-й линии было выполнено повторное I-FISH-исследование. У всех больных наблюдалось снижение количества клеток с del17p13: у пациента П2 – на 30 %, у пациентов П1 и П4 – до нормальных значений. Пациенту П3 I-FISH проводили сразу по завершении лечения и через 13 и 24 мес в связи с прогрессированием ХЛЛ. После лечения 1-й линии все цитогенетические маркеры оказались в пределах нормальных значений, при 1-й прогрессии частота клеток с del17p13 достигла первоначального уровня (96 %), при 2-й – несколько снизилась (72 %), еще через 2 мес у больного была констатирована трансформация ХЛЛ в В-клеточную диффузную крупноклеточную лимфому.

Непосредственными причинами смерти большинства пациентов с ХЛЛ являются инфекционные и аутоиммунные осложнения (аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунная тромбоцитопения). Лишь у небольшой части больных (2–8 %) ХЛЛ трансформируется в более агрессивную В-клеточную диффуз-

Таблица 1. Результаты динамического молекулярно-цитогенетического наблюдения за больными с делецией 17p13

Код пациента	Пол	Возраст, лет	Выявленная маркерная абберрация <sup>1</sup>	Частота клеток с маркерной абберрацией в разные сроки обследования, % (время от постановки диагноза)			
				FISH 1	FISH 2	FISH 3	FISH 4
П1	Ж	49	del17p13	93,0 ± 1,8* (30 мес)	Норма <sup>2**</sup> (38 мес)	–	–
П2	М	60	del17p13 del13q14	89,0 ± 3,1* 82,0 ± 3,8* (28 мес)	62,0 ± 3,4** 43,0 ± 3,5** (32 мес)	–	–
П3	М	49	del17p13	88,0 ± 2,3 (0 мес)	Норма <sup>2**</sup> (3 мес)	95,5 ± 1,5* (13 мес)	71,5 ± 3,2* (24 мес)
П4	М	47	del17p13 del13q14	77,5 ± 3,0* 13,0 ± 2,4* (28 мес)	Норма <sup>2**</sup> Норма <sup>2**</sup> (33 мес)	–	–
П5	М	76	del17p13 del13q14	73,5 ± 3,2 72,5 ± 3,2 (0 мес)	79,5 ± 2,9 82,0 ± 2,7 (8 мес)	–	–
П6	М	57	del17p13 del13q14:	18,0 ± 2,7 89,0 ± 2,2 (7 мес)	75,5 ± 3,0* 84,0 ± 2,6* (53 мес)	–	–
П7	Ж	70	del17p13 del13q14	11,5 ± 2,3 58,0 ± 3,5 (128 мес)	Норма* 77,5 ± 3,0* (160 мес)	–	–
П8	Ж	59	del17p13 del13q14	8,5 ± 2,0 72,5 ± 3,2 (0 мес)	9,3 ± 1,7 77,0 ± 3,0 (31 мес)	Норма 76,5 ± 3,0 (48 мес)	–

<sup>1</sup>Частота достоверно превышает нормальные значения ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup>del17p13 < 7%, del13q14 < 6%; \*рецидив/прогрессирование; \*\*после лечения.

ную крупноклеточную лимфому (синдром Рихтера) [11]. В нашем исследовании событием, приведшим к смерти пациентов П1 и П4, были аутоиммунные осложнения, пациентов П2 и П3 – синдром Рихтера. Продолжительность жизни этих больных после установления диагноза ХЛЛ составила 42, 41, 40 и 33 мес соответственно (см. табл. 2). Таким образом, выживаемость больных ХЛЛ с большей долей клеток с del17p13 не превысила 42 мес.

Низкая (не более 20 %) частота клеток с del17p13 при первичном I-FISH-анализе была зарегистрирована у 3 пациентов (П6, П7 и П8) (см. табл. 1). Необходимость начала терапии у пациента П6 была определена через 20 мес от даты установления диагноза, у пациента П7 – с момента установления диагноза.

У пациента П6 при первичном I-FISH-анализе, проведенном через 7 мес со времени установления диагноза ХЛЛ, частота клеток с del17p13 составляла 18 %, при повторном I-FISH-анализе, выполненном через 46 мес в связи с рецидивом ХЛЛ, увеличилась до 76 %, в то время как частота клеток с сопутствующей del13q14, преимущественно биаллельной, не изменилась, составив 89 и 84 % соответственно. Таким образом, у этого больного мы наблюдали клональную эволюцию, при которой потенциально несущественный субклон клеток с del17p13 стал значимым. Клональная эволюция свидетельствует об ухудшении прогноза в процессе прогрессирования заболевания [12, 13].

Первый FISH-анализ у пациента П7 был выполнен через 128 мес со времени установления диагноза, повторный – при прогрессировании, спустя 32 мес. Было обнаружено, что процент клеток, имеющих del17p13, снизился с 11,5 % до нормальных значений, а клеток с сопутствующей del13q14 достоверно увеличился с 58 до 78 % ( $p < 0,05$ ). Через 3 мес у больного было констатировано прогрессирование ХЛЛ, приведшее к смерти (период наблюдения – 163 мес) (см. табл. 2).

У пациента П8 клинические показания к началу терапии отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения, в процессе которого I-FISH-анализ был выполнен трижды: при установлении диагноза и спустя 31 и 48 мес. При первых 2 обследованиях частота клеток с del17p13 была достоверно выше контрольного уровня, составляя 8,5 и 9,3 % соответственно ( $p < 0,05$ ). При последнем I-FISH-анализе у пациента наблюдалось достоверное снижение этого показателя до нормального уровня ( $p < 0,05$ ), а частота клеток с сопутствующей del13q14 оставалась постоянной на протяжении всего периода наблюдения, находясь в пределах 73–77 %. Спонтанное исчезновение клона с небольшой частотой del17p13 наблюдали и авторы работы [12].

Таким образом, больные ХЛЛ, имеющие низкую долю клеток с del17p13, могут быть отнесены к подгруппе неблагоприятного прогноза, однако при адекватной терапевтической тактике это обстоятельство не приводит к сокращению общей выживаемости.

#### Делеция 11q22

Делеция 11q22 также считается неблагоприятным прогностическим фактором. Это нарушение наблюдается у 13–31 % больных ХЛЛ [14, 15]. По данным литературы [3] у 50 % больных с del11q22 необходимость начала лечения возникает в течение 24 мес от времени установления диагноза ХЛЛ, а медиана выживаемости составляет 78 мес. Как и в случае с del17p13, на время до начала лечения и выживаемость больных влияет количество клеток с этим нарушением. В работе [16] было показано, что через 3 года наблюдения после проведения первичного FISH-анализа в группе больных, имевших менее 25 % aberrантных клеток с del11q22, 66 % пациентов все еще не нуждались в лечении. В то же время в группе больных с частотой aberrантных клеток, превышавшей 25 %, 73 % пациентов уже получали лечение. В этих группах медиана времени до начала терапии составила 40 и 14 мес со-

Таблица 2. Данные по времени начала терапии, числу рецидивов, времени наблюдения и общей выживаемости больных с делецией 17p13

Код пациента	Частота делеций, % (время от постановки диагноза)	Время до начала терапии, мес	Число рецидивов/ прогрессирований	Время наблюдения, мес	Общая выживаемость, мес
П1	93,0 ± 1,8* (30 мес)	0	2	42	42
П2	89,0 ± 3,1* (28 мес)	0	2	40	40
П3	88,0 ± 2,3 (0 мес)	0	2	33	33
П4	77,5 ± 3,0* (28 мес)	0	1	41	41
П5	73,5 ± 3,2 (0 мес)	Лечение не проводилось	–	13	13
П6	18,0 ± 2,7 (7 мес)	20	1	58	Н
П7	11,5 ± 2,3 (128 мес)	0	2	163	163
П8	8,5 ± 2,0 (0 мес)	Лечение не требовалось	0	80	Н

**Примечания.** \*Рецидив/прогрессирование; Н – не может быть оценена, так как выживаемость рассчитывается от даты начала лечения до смерти от любой причины или до даты последней явки больного.

ответственно. В исследовании [17], проведенном на 196 первичных больных с del11q22, частота aberrантных клеток, явившаяся пограничной относительно различия как по времени до начала лечения, так и по общей выживаемости, составила 58 %.

В нашем исследовании у всех больных, у которых del11q22 была основным патогенетическим маркером, частота aberrантных клеток колебалась в пределах 55–98 % (табл. 3). Необходимость начала лечения по клиническим показаниям определена у всех больных, причем у 7 из 8 пациентов, имевших более 73 % клеток с del11q22, лечение было начато в течение 5 мес со времени установления диагноза (табл. 4), у больного П16, имевшего 55 % клеток с del11q22, — спустя 21 мес. Следует отметить, что при первичном I-FISH-анализе только у 2 из 8 пациентов (П15 и П16) del11q22 была единственной, у остальных — сочеталась с del13q14.

Пациенту П9 первое I-FISH-исследование было выполнено после окончания очередного курса лечения (40 мес после установления диагноза ХЛЛ), при этом частоты всех молекулярно-цитогенетических маркеров были в пределах нормальных значений. Повторно I-FISH провели через 21 мес, при констатации прогрессии ХЛЛ, далее еще 2 анализа с интервалами в 3 мес — после завершения курса лечения и при оче-

редном прогрессировании заболевания. Частота клеток с del11q22 составила 98, 68 и 93 % соответственно, а одновременно выявленная частота клеток с del13q14–90, 70 и 89 % соответственно. Еще через 3 мес больной умер от прогрессирования ХЛЛ. Продолжительность жизни составила 69 мес после установления диагноза ХЛЛ.

У пациента П10 I-FISH-анализ был выполнен 3 раза, при возникновении рецидивов заболевания, — через 88, 101 и 111 мес от времени установления диагноза. Обнаружено, что частота клеток с del11q22 была высокой при всех обследованиях и составляла 90, 82 и 81 % соответственно, тем не менее при повторных обследованиях была достоверно ниже, чем при первом ( $p < 0,05$ ). В то же время частота клеток с del13q14 достоверно увеличивалась, составляя 23, 42 и 56 % соответственно ( $p < 0,05$ ). Продолжительность жизни этого пациента со времени установления диагноза ХЛЛ составила 121 мес.

У пациента П11 первичный I-FISH-анализ был проведен при установлении диагноза ХЛЛ, повторный — через 44 мес, при возникновении рецидива. Частота клеток с del11q22 достоверно снизилась с 83 до 58 % ( $p < 0,05$ ), в то время как доля клеток с del13q14 достоверно увеличилась с 28 до 44 % ( $p < 0,05$ ), т. е. соотношение между субклонами изменилось. Пациенту был

Таблица 3. Результаты динамического молекулярно-цитогенетического наблюдения за больными с делецией 11q22

Код пациента	Пол	Возраст, лет	Выявленная маркерная aberrация <sup>1</sup>	Частота клеток с маркерной aberrацией в разные сроки обследования, % (время от постановки диагноза)				
				FISH 1	FISH 2	FISH 3	FISH 4	FISH 5
П9	М	59	del11q22 del13q14	Норма <sup>2**</sup> Норма <sup>**</sup> (40 мес)	98,4 ± 0,8* 90,4 ± 1,9* (61 мес)	67,5 ± 3,7** 70,0 ± 3,6** (64 мес)	92,5 ± 1,9* 88,5 ± 2,3* (67 мес)	—
П10	М	50	del11q22 del13q14	89,5 ± 2,2* 23,0 ± 3,0* (88 мес)	82,0 ± 2,7* 42,0 ± 3,5* (101 мес)	80,5 ± 2,8* 56,5 ± 3,5* (111 мес)	—	—
П11	М	54	del11q22 del13q14	82,5 ± 2,7 28,0 ± 3,2 (0 мес)	58,0 ± 3,5* 44,0 ± 3,5* (44 мес)	—	—	—
П12	Ж	68	del11q22 del13q14	81,5 ± 2,7* 94,0 ± 1,7* (18 мес)	80,5 ± 2,8* 84,0 ± 3,7* (42 мес)	—	—	—
П13	Ж	75	del11q22 del13q14 del13q34	81,0 ± 2,8 79,0 ± 2,9 51,5 ± 3,5 (0 мес)	Норма <sup>**</sup> Норма <sup>**</sup> Норма <sup>**</sup> (7 мес)	Норма Норма Норма (34 мес)	—	—
П14	М	67	del11q22 del13q14	76,5 ± 3,0* 78,0 ± 2,9* (63 мес)	15,5 ± 2,6** 15,5 ± 2,6** (73 мес)	80,5 ± 2,8* 67,0 ± 3,3* (83 мес)	28,0 ± 3,2** 32,5 ± 3,3** (131 мес)	61,0 ± 3,4** 74,5 ± 3,1** (137 мес)
П15	М	66	del11q22 del13q14	72,5 ± 3,2 Норма (0 мес)	76,5 ± 3,0* 14,5 ± 2,5* (31 мес)	—	—	—
П16	М	50	del11q22	55,0 ± 3,5 (0 мес)	25,0 ± 3,5 (12 мес)	—	—	—

<sup>1</sup>Частота достоверно превышает нормальные значения ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup>del11q23 < 4 %, del13q14 < 6 %, del13q34 < 9 %; \*рецидив/прогрессирование; \*\*после лечения.

Таблица 4. Данные по времени начала терапии, числу рецидивов, времени наблюдения и общей выживаемости больных с делецией 11q22

Код пациента	Частота делеций, % (время от постановки диагноза)	Время до начала терапии, мес	Число рецидивов/ прогрессиваций	Время наблюдения, мес	Общая выживаемость, мес
П9	98,4 ± 0,8* (61 мес)	0	4	69	69
П10	89,5 ± 2,2* (88 мес)	0	3	121	121
П11	82,5 ± 2,7 (0 мес)	0	1	80	Н
П12	81,5 ± 2,7* (18 мес)	5	3	52	Н
П13	81,0 ± 2,8 (0 мес)	3	0	43	Н
П14	76,5 ± 3,0* (63 мес)	0	3	145	Н
П15	72,5 ± 3,2 (0 мес)	5	1	38	Н
П16	55,0 ± 3,5 (0 мес)	21	0	48	Н

**Примечания.** \*Рецидив/прогрессирование; Н – не может быть оценена, так как выживаемость рассчитывается от даты начала лечения до смерти от любой причины или до даты последней явки больного.

проведен курс противоопухолевой терапии, и при последнем наблюдении (80 мес после установления диагноза) он находился в ремиссии заболевания. По данным литературы, при ХЛЛ клональная эволюция может быть неоднородной: от одиночных клонов, стабильных в течение продолжительного времени, до переключения доминантности соотношения между субклонами опухолевых клеток после проведения терапии [13].

Пациенту П12 I-FISH-анализ был выполнен дважды, при возникновении рецидивов, – через 18 и 42 мес от времени установления диагноза. Частота клеток с del11q22 оставалась постоянной (82 и 81 % соответственно), а частота клеток с del13q14 (преимущественно биаллельной) была высокой, но достоверно ниже первоначальной – 94 и 84 % соответственно ( $p < 0,05$ ). В настоящее время (спустя 52 мес от даты установления диагноза ХЛЛ) больной находится в процессе проведения противорецидивной терапии.

У пациента П13 первичный I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза: частота клеток с del11q22 составила 81 %, а с del13q14 – 79 %. Повторные I-FISH-анализы, выполненные через 7 и 34 мес – после окончания курса лечения и в постклиническом периоде, – показали, что все молекулярно-цитогенетические маркеры ХЛЛ находились в пределах нормальных значений. При последнем визите (через 43 мес после установления диагноза ХЛЛ) у больного констатировано сохранение ремиссии.

У пациента П14 I-FISH анализ проводился 5 раз. Первое исследование было выполнено спустя 63 мес после установления диагноза, при развитии рецидива. Доля клеток с del11q22 и del13q14 составила 77 и 78 % соответственно. После проведенной терапии произошло достоверное снижение обоих показателей до 16 % ( $p < 0,05$ ). Третье исследование проведено при наступлении очередного рецидива ХЛЛ. Частота клеток с del11q22 и del13q14 составила 81 и 67 % соответственно, т. е. показатели достоверно выросли по срав-

нению с предыдущим исследованием ( $p < 0,05$ ). По сравнению с первичными данными частота клеток с del11q22 вернулась к своему первоначальному значению, а частота клеток с del13q14 достоверно уменьшилась ( $p < 0,05$ ). Четвертый I-FISH анализ был выполнен спустя 48 мес после окончания очередного курса терапии. Доля клеток с del11q22 и del13q14 вновь достоверно снизилась, составив 28 и 33 % соответственно ( $p < 0,05$ ). Пятое I-FISH-исследование было выполнено в процессе терапии при очередном прогрессировании заболевания, при этом частота клеток с del11q22 и del13q14 составила 61 и 75 % соответственно, что достоверно превышало результаты предыдущего исследования ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, в разные сроки обследования у получавшего лечение пациента может меняться не только доля клеток с маркерными aberrациями, но и соотношение между ними. Аналогичные данные были получены и другими исследователями, наблюдавшими леченых больных ХЛЛ в течение длительного периода [12, 13].

У пациента П15 1-й I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза ХЛЛ, 2-й – через 31 мес, при развитии рецидива: доля клеток с del11q22 составила 73 и 77 % соответственно. Доля клеток с del13q14 была в пределах нормы при 1-м исследовании, при повторном составила 15 %, т. е. достоверно превысила норму ( $p < 0,05$ ), что свидетельствовало о появлении нового субклона опухолевых клеток. В настоящее время больной проходит очередной курс терапии по поводу прогрессирования заболевания.

У пациента П16 1-й I-FISH-анализ был выполнен при установлении диагноза, повторный – через год. В течение этого периода противоопухолевое лечение не проводилось. Установлено, что частота клеток с del11q22 в качестве единственного нарушения достоверно снизилась с 55 до 25 %, оставаясь выше нормальных значений ( $p < 0,05$ ). В настоящее время пациент после курса терапии ХЛЛ находится в ремиссии. Таким образом,

у больных, не получавших противоопухолевое лечение, также могут наблюдаться существенные колебания частоты клеток с маркерными абберациями хромосом.

### Заключение

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие предварительные выводы:

- высокая частота (более 70 %) клеток с del17p13 является цитогенетическим маркером неблагоприятного течения ХЛЛ и низкой продолжительности жизни;
- низкая частота клеток с del17p13 может быть предиктором прогрессирования ХЛЛ, что при эффективном лечении не отражается на выживаемости больных;
- высокая частота (более 70 %) клеток с del11q22 свидетельствует о необходимости раннего начала лечения;
- частота абберантных клеток с del17p13 или del11q22 после лечения достоверно снижается, а при рецидиве и/или прогрессировании, как правило, достигает первоначального уровня;

- при отсутствии лечения ХЛЛ частота абберантных клеток может существенно меняться или даже снижаться до контрольного уровня;
- соотношение между субклонами клеток с различными маркерными нарушениями в процессе лечения и после его окончания может меняться, возможно появление новых субклонов лейкозных клеток.

Таким образом, проведение FISH-исследования при ХЛЛ может дать больше полезной информации, чем просто отнесение больного к определенной группе прогноза при постановке диагноза, поскольку на прогноз течения заболевания могут влиять не только качественные показатели (есть или нет нарушения), но и количественные (% клеток с нарушением). Динамическое молекулярно-цитогенетическое наблюдение за больными ХЛЛ позволяет отслеживать изменения в характере течения заболевания. Учитывая широкий спектр вариантов течения ХЛЛ и возможность клональной эволюции, выполнение динамического FISH-анализа может быть полезным инструментом при данном заболевании.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Eichhorst B., Dreyling M., Robak T. et al. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2011;22(Suppl 6):vi50–4. DOI: 10.1093/annonc/mdr377.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2015. 236 с. ПЕРЕВОД
- Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343(26):1910–6.
- Davids M.S., Vartanov A., Werner L. et al. Controversial fluorescence *in situ* hybridization cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia: new insights from a large cohort. *Br J Haematol* 2015;170(5):694–703. DOI: 10.1111/bjh.13498.
- Delgado J., Espinet B., Olivera A.C. et al. Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Br J Haematol* 2012;157(1):67–74. DOI: 10.1111/j.1365–2141.2011.09000. x.
- Stilgenbauer S., Zenz T., Winkler D. et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27(24):3994–4001. DOI: 10.1200/JCO.2008.21.1128.
- Catovsky D., Richards S., Matutes E. et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370(9583):230–9.
- Oscier D., Wade R., Davis Z. et al. Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation. *Haematologica* 2010;95(10):1705–12. DOI: 10.3324/haematol.2010.025338.
- Tam C.S., Shanafelt T.D., Wierda W.G. et al. *De novo* deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M.D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009;114(5):957–64. DOI: 10.1182/blood-2009-03-210591.
- El-Ghazzam A.M., Abdelwahed E., Mostafa N.N., Mansour D.A. *De novo* deletion 17p13.1 as a predictor for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Exp Med* 2015;15(4):493–9. DOI: 10.1007/s10238-014-0317-2.
- Müller-Hermelink H.K., Montserrat E., Catovsky D. et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO classification of tumour of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. P. 179–82.
- Janssens A., Van Roy N., Poppe B. et al. High-risk clonal evolution in chronic B-lymphocytic leukemia: single-center interphase fluorescence *in situ* hybridization study and review of the literature. *Br J Haematol* 2012;89(1):72–80. DOI: 10.1111/j.1600–0609.2012.01790. x.
- Ojha J., Secreto C., Rabe K. et al. Monoclonal B-cell lymphocytosis is characterized by mutations in CLL putative driver genes and clonal heterogeneity many years before disease progression. *Leukemia* 2014;28(12):2395–8. DOI: 10.1038/leu.2014.226.
- Lai Y.Y., Huang X.J. Cytogenetic characteristics of B cell chronic lymphocytic leukemia in 275 Chinese patients by fluorescence *in situ* hybridization: a multicenter study. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(16):2417–22.
- Yang S.M., Li J.Y., Gale R.P., Huang X.J. The mystery of chronic lymphocytic leukemia (CLL): Why is it absent in Asians and what does this tell us about etiology, pathogenesis and biology. *Blood Rev* 2015;29(3):205–13. DOI: 10.1016/j.blre.2014.12.001.
- Marasca R., Maffei R., Martinelli S. et al. Clinical heterogeneity of *de novo* 11q deletion chronic lymphocytic leukemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol* 2013;31(2):88–95. DOI: 10.1002/hon.2028.
- Jain P., Keating M., Thompson P.A. et al. High fluorescence *in situ* hybridization percentage of deletion 11q in patients with chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of adverse outcome. *Am J Hematol* 2015;90(6):471–7. DOI: 10.1002/ajh.23978.