

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
МИНЗДРАВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

---

*На правах рукописи*

СЕВЕРИНА

Наталья Александровна

«Анализ мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* у  
больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом»

14.01.21 – Гематология и переливание крови

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук**

Научные руководители:

Д.б.н. Судариков А.Б.

К.м.н Никитин Е.А.

Москва – 2014 г.

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	<b>6</b>
1. Актуальность проблемы .....	6
2. Цель исследования .....	7
3. Задачи исследования.....	7
4. Научная новизна исследования .....	7
5. Научно-практическая ценность .....	7
6. Положения, выносимые на защиту.....	8
7. Объем и структура диссертации.....	8
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>9</b>
1.1 Введение .....	9
1.1.1 В-ХЛЛ, этиология, диагностические критерии .....	11
1.1.2 Классификация .....	13
1.1.3 Гипотезы влияния генетических нарушений на патогенез В-ХЛЛ.....	15
1.1.3 Цитогенетические и молекулярно-биологические маркеры, как факторы прогноза .....	16
1.2 Хромосомные мутации .....	18
1.2.1 Делеция 13 хромосомы.....	18
1.2.2. Делеция 11q хромосомы.....	20
1.2.3. Трисомия 12 хромосомы.....	22
1.2.4. Делеция 17p хромосомы.....	23
1.3. Мутации генов при В-ХЛЛ.....	24
1.3.1. Мутации гена <i>TP53</i> .....	24
1.3.1.1 Показания к исследованию статуса <i>TP53</i> .....	26
1.3.1.2 Клиническое значение обнаружения мутации <i>TP53</i> .....	27
1.3.2. Мутации гена <i>NOTCH1</i> .....	28
1.3.2.1 Клиническое значение мутаций <i>NOTCH1</i> .....	30
1.3.3. Мутации гена <i>SF3B1</i> .....	31
1.3.3.1 Клиническое значение мутаций гена <i>SF3B1</i> .....	32
1.3.4. Мутации гена <i>BIRC3</i> .....	33
1.4. Мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов .....	33
1.4.1 Клиническое значение мутационного статуса генов варибельного региона иммуноглобулинов .....	34
1.5. Бета2-микроглобулин .....	35
1.5.1 Клиническое значение бета2-микроглобулина .....	36
1.6. Анализ свободных легких цепей .....	Ошибка! Закладка не определена.
5.1 Клиническое значение отношения легких цепей .....	Ошибка! Закладка не определена.
1.6. Методы исследования мутаций в генах .....	36
1.6.1. Высоко информативные точные методы анализа .....	36
1.6.2. Скрининговые методы .....	38
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	<b>40</b>
2.1 Материалы и методы для FASAY .....	40
2.1.1 Выделение РНК.....	40
2.2.2. Обратная транскрипция .....	41
2.3.3. Амплификация кодирующей последовательности гена <i>TP53</i> для FASAY.....	41
2.2.4. Подготовка плазмид pSS16 и pLS76 для FASAY .....	41
2.2.5. Рестрикция и очистка плазмиды pSS16 .....	42
2.2.6. Рутинная культивация дрожжей .....	42
2.2.7. Функциональный анализ разделенных аллелей <i>TP53</i> в дрожжах.....	42
2.2. Подготовительные методы для ПЦР .....	44
2.2.1 Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови.....	44
2.2.2 Выделение ДНК из колоний дрожжей для .....	44

проведения подтверждающего секвенирования .....	44
2.2.3 Очистка продуктов амплификации для проведения секвенирования.....	44
<b>2.3 ПЦР-методики и секвенирование .....</b>	<b>45</b>
2.3.1 Скрининг мутаций <i>NOTCH1</i> .....	45
2.3.2 Амплификация последовательностей генов <i>TP53</i> , <i>BIRC3</i> , <i>SF3B1</i> и <i>NOTCH1</i> и секвенирования по Сэнгеру.....	46
<b>2.4 Анализы, проведенные другими исследователями в рамках протокола MLSG08</b>	<b>47</b>
<b>2.6 Статистика .....</b>	<b>48</b>
<b>ГЛАВА 3. Результаты .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Характеристика пациентов.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Порядок оценки эффективности и характеристика вариантов ответа.....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Фаза наблюдения и временные показатели эффективности.....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Сравнительная характеристика больных, принявших участие в протоколе .....</b>	<b>52</b>
<b>3.5 Статистика выявления мутаций .....</b>	<b>53</b>
3.4.2 Мутации в гене <i>NOTCH1</i> .....	58
3.4.2 Мутации в гене <i>TP53</i> .....	54
3.4.2.1 Результаты секвенирования гена <i>TP53</i> .....	54
3.4.2.3 Результаты метода FASAYЭлементы указателя не найдены.....	56
3.4.3 Результаты секвенирования гена <i>SF3B1</i> .....	59
3.4.4 Результаты секвенирования гена <i>BIRC3</i> .....	61
<b>3.5 Анализ мутаций в генах <i>TP53</i>, <i>SF3B1</i>, <i>NOTCH1</i> и <i>BIRC3</i> при нормальном кариотипе .....</b>	<b>61</b>
<b>3.6 Анализ выживаемости.....</b>	<b>62</b>
<b>3.7 Ответ на терапию и прогноз .....</b>	<b>67</b>
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Факторы прогноза при В-ХЛЛ .....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Прогностическое значение мутаций в генах <i>TP53</i>, <i>NOTCH1</i>, <i>SF3B1</i> и <i>BIRC3</i> ..</b> Ошибка! Закладка не определена.	
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>76</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>77</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>80</b>

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

TP53	ген-онкосупрессор молекулярным весом 53kD (tumor supressor protein 53KDa)
<i>NOTCH1</i>	ген, ассоциированный с транслокацией NOTCH гомолог 1 (TRANSLOCATION-ASSOCIATED NOTCH HOMOLOG 1)
BIRC3	ген, бакуловиральный IAP повтор-содержащий белок 3 (baculoviral IAP repeat-containing 3)
SF3B1	ген субъединицы B1 сплайсинг фактора 3 (subunit 1 of the splicing factor 3b)
IWCLL	International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia
FCR	химиотерапевтический режим, содержащий флударабин, циклофосфан и ритуксимаб
FCR-Lite	химиотерапевтический режим, содержащий флударабин, циклофосфан и ритуксимаб с редукцией доз
FASAY	функциональный метод разделенных аллелей в дрожжах (Functional Analysis of Separated Allele in Yeast)
В-ХЛЛ	В-хронический лимфолейкоз
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
CD5	кластер дифференцировки (cluster of differentiation)
Ig M	иммуноглобулин класса М
Ig D	иммуноглобулин класса D
ZAP-70	протеинкиназа, ассоциированная с zeta-цепью Т-клеточного рецептора (zeta-associated protein 70)
aCNA	приобретенные аберрации числа хромосом (acquired genomic copy number aberrations)
del13q14	делеция длинного плеча 13 хромосомы
del17p	делеция короткого плеча 17 хромосомы
miR15a/16-1	микроРНК 15a/16-1
DLEU7	ген делеции при лимфоме 7 (deleted in lymphocytic leukemia, 7)
MBL	моноклональный В-клеточный лимфоцитоз
BCL-2	онкоген В клеточной лимфомы (2 B-cell leukemia)
SNP	однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
MBL	моноклональный В-клеточный лимфоцитоз (monoclonal B-cell lymphocytosis)
RB1	ген ретинобластомы 1 (retinoblastoma-associated 1)
FISH	флуоресцентная in situ гибридизация (fluorescent in situ hybridization)
del11q	делеция длинного плеча 11 хромосомы
NPAT	ген нуклеопротеин атаксии-телеангиэктазия (Nuclear protein, ataxia telangiectasia)
CUL5	ген рецептора АДГ типа V2 (vasopressin-activated calcium-mobilizing receptor 1)
PPP2R1B	ген фосфатазы 2 регуляторная субъединица 2 (protein phosphatase 2, regulatory subunit A)
ATM	ген атаксии-телеангиэктазии (ataxia telangiectasia mutated locus)
INSR	рецептор инсулина (insulin receptor)
IgVH	гены вариабельного региона иммуноглобулинов
tris 12	трисомия 12 хромосомы

BCL-7	ген регулятор апоптоза 7( apoptosis regulator Bcl-7)
MDM-2	ген, амплифицированный на хромосоме типа «double minute» мышинный (mouse double minute chromosome amplified oncogene)
P53	продукт гена TP53
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	(сDNA) – комплементарная ДНК
РНК	рибонуклеиновая кислота
мРНК	матричная РНК;
ERIC	европейская исследовательская инициатива по ХЛЛ (European Research Initiative on CLL)
T-ALL	T клеточный острый лейкоз (T-lineage acute lymphoblastic leukemia)
ЛДГ	фермент лактат дегидрогеназа
МДС	миелодиспластический синдром
мяРНП	малый ядерный рибонуклеопротеид
U-CLL	подгруппа пациентов с немутированными VH-генами (unmutated CLL)
M-CLL	M-CLL - подгруппа пациентов с мутированными VH-генами (mutated CLL)
CAP	стереотипные антигенные рецепторы
B2-M	бета2-микроглобулин
HLA	комплекс гистосовместимости (human leucocyte antigens)
ОЛЦ	отношение легких цепей
NGS	секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing)
SSCP	анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (single-strand conformation polymorphism analysis)
MLSG08	название протокола лечения больных ХЛЛ (Moscow Lymphoma Study Group)
Arg	аминокислота аргинин (arginine)
Pro	аминокислота пролин (Proline)
Ki-67	антиген Ki-67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67)

## ВВЕДЕНИЕ

### 1. Актуальность проблемы

Хронический лимфолейкоз один из самых распространённых видов лейкоза среди взрослого населения, после 60 лет число заболевших возрастает экспоненциально. Клиническое течение В-ХЛЛ значительно различается, время жизни пациентов может варьировать от 1-2 лет до 15 и более. Несмотря на то, что классификации по Rai и Binet [6, 103] остаются достаточно точными для идентификации пациентов с тяжелыми стадиями заболевания, они не могут предсказать успешность терапии. Поиск маркеров тяжести течения и прогноза заболевания до настоящего момента остается актуальной задачей, несмотря на существование таких сильных прогностических факторов как мутационный статус генов иммуноглобулинов (оценка уровня зрелости лейкозной клетки-предшественницы)[35], цитогенетические характеристики [56], уровень бета2-микроглобулина [48] и др. За последнее время было идентифицировано несколько генов-кандидатов, которые могут служить в качестве новых прогностических маркеров в дополнение к нарушению *TP53* – это гены *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3*[101]. Мы располагаем уникальным материалом – генетическим материалом полученным у больных В-ХЛЛ до начала терапии, кроме того все больные получили одно и то же лечение в режиме FCR. Таким образом, мы имеем очень однородную группу пациентов, при исследовании которой можно получить оценку влияния мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* и соотнести их с эффектами терапии.

## **2. Цель исследования**

Изучение связи мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* при В-клеточном хроническом лимфолейкозе и их влияния на прогноз и течение заболевания.

## **3. Задачи исследования**

1. Исследование генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* на наличие мутаций у больных В-ХЛЛ до получения ими медикаментозной терапии режима FCR.

2. Изучение функциональной активности гена *TP53* с помощью скринингового метода FASAY для подтверждения инактивирующего влияния мутаций в гене *TP53* и определения частоты мутантного аллеля.

3. Анализ взаимосвязи мутаций в вышеуказанных генах с прогнозом и течением заболевания, а также с другими прогностическими маркерами при В-ХЛЛ.

4. Определение прогностической значимости мутаций генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* при В-ХЛЛ.

## **4. Научная новизна исследования**

Впервые в России проведено рандомизированное исследование мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* для первичных больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом.

## **5. Научно-практическая ценность**

Ранняя диагностика неблагоприятного течения при В-ХЛЛ на основании наличия мутаций в генах *TP53* и *NOTCH1* позволит выделить группу больных «повышенного риска» до начала лечения. Анализ мутаций в

генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* поможет выявить больных с генетическими аномалиями среди больных с нормальным кариотипом, диагностированным методом FISH.

### **Внедрение в практику**

Все использованные методики внедрены в клиническую практику ФГБУ ГНЦ МЗ РФ и использованы в диагностике.

Материалы диссертации были неоднократно доложены:

1. Конгресс гематологов России, 2-4 июля 2012 г., Москва;
2. IX Российская конференция с международным участием, «Злокачественные лимфомы», 18-19 октября 2012 г., Москва;
3. Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярно-генетические и иммуногенетические методы диагностики в практике врача гематолога», 25-26 апреля 2013 г., Санкт-Петербург.

### **6. Положения, выносимые на защиту**

Проведено первое в России рандомизированное исследование взаимосвязи мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* с неблагоприятным с прогнозом и ответом на терапию у первичных больных В-ХЛЛ. Мутация по крайней мере одного из исследуемых генов выявлена в 45% случаев (у 68 из 155), двух генов одновременно в 3% случаев (у 5 из 155). Частота мутаций гена *TP53* - 10% (16 из 155). Выявлена статистически значимая связь наличия мутации в гене *TP53* с делецией хромосомы 17p ( $p=0,001$ ) и IgVH без мутаций ( $p=0,01$ ). Частота мутации с.7541\_7542delCT гена *NOTCH1* у больных В-ХЛЛ 17% (26 из 155), ассоциирована с трисомией 12 ( $p=0,006$ ), IgVH без мутаций ( $p=0,025$ ), отсутствием мутаций в гене *SF3B1* ( $p=0,04$ ). Частота мутаций гена *SF3B1* - 16% (25 из 155), ассоциирована с отсутствием делеции 17 хромосомы ( $p=0,001$ ). Частота мутаций гена *BIRC3* – 5% (4 из 81). Статистически значимой ассоциации с другими биологическими и прогностическими параметрами не выявлено.



## **7. Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 98 страницах. Содержит 4 рисунка, 6 графиков, 21 таблицу.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Введение**

Хронический В-клеточный лимфолейкоз (В-ХЛЛ) – самый частый вид лейкозов у взрослых. Частота его в Европейских странах составляет 4:100000 в год и непосредственно связана с возрастом. У лиц старше 80 лет она составляет >30:100000 в год [142]. Медиана возраста на момент установления диагноза в Европейских странах составляет 69 лет. В России В-ХЛЛ выявляется реже и медиана возраста на момент установления диагноза меньше, соразмерно меньшей продолжительности жизни россиян [146]. Не исключены и этнические различия, определяющие распространенность В-ХЛЛ в России. Исследование В-ХЛЛ и оптимизации терапии приобретает особую важность с увеличением общей продолжительности жизни людей и сохранении ими трудоспособности. В соответствии с докладом всемирной ассамблеи по старению 2002 года, темпы процесса старения населения являются беспрецедентными, не имеющими аналогов в истории человечества. Доля пожилых людей ежегодно увеличивается на 2%. К 2050 году число пожилых людей в мире впервые в истории превысит общую численность молодежи. В развитых странах такое кардинальное изменение произошло еще в 1998 году [143]. Соответственно этому процессу меняется и отношение медицинского сообщества к пожилому пациенту с онкологическим заболеванием. Многие устоявшиеся каноны прошлого пересматриваются.

В настоящее время стандартом в лечении соматически сохранных больных хроническим лимфолейкозом является режим FCR (флударабин, циклофосфан, ритуксимаб). Эффективность и хорошая переносимость этого

режима продемонстрирована в нескольких клинических испытаниях, как правило требуется проведение 6 курсов [8, 66].

Эффективность FCR настолько высока, что у ряда пациентов полный ответ достигается уже после первых 2 – 3 циклов. Однако имеется несколько проблем при проведении курса терапии. Во-первых, FCR не безопасен. Главными осложнениями этого режима являются иммунодефицит и миелотоксичность. Во-вторых, несмотря на высокую эффективность режима, существует категория больных, у которых это лечение не эффективно и прогноз крайне неблагоприятен. Им необходимы альтернативные варианты терапии, назначаемые в первой линии.

Таким образом, выживаемость больных В-ХЛЛ может варьироваться в широких пределах (от 2 лет до продолжительности жизни, сопоставимой с общепопуляционной). Такое различие в течении болезни, в том числе и у молодых больных демонстрирует большую гетерогенность патогенеза В-ХЛЛ. Речь идет о существовании нескольких болезней в пределах группы, которая сегодня называется «хронический лимфолейкоз». Множество патогенетических путей приводят к одному последствию – накоплению лимфоцитов с характерным, повторяющимся фенотипом [63, 100, 101]. Несмотря на то, что патогенетические пути не ясны, необходимы маркеры, которые позволяли бы стратифицировать пациентов на группы риска. Многие прогностические маркеры, которые были идентифицированы до появления флударабина утратили свое значение в настоящее время.

Эти маркеры не должны быть связаны с массой опухоли, возрастом пациента и другими второстепенными факторами. Они должны отражать истинную биологическую гетерогенность хронического лимфолейкоза.

Выявление факторов, имеющих значение при терапии FCR, подразделение больных на биологически гетерогенные группы риска и создание новой прогностической шкалы является важнейшей задачей исследования В-ХЛЛ.

Согласно данным последних международных исследований при проведении полногеномного секвенирования у больных В-ХЛЛ обнаружены

повторяющиеся мутации нескольких генов, одними из самых часто выявляемых являются мутации генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* [6, 13]. Важно оценить являются ли мутации в этих генах ведущим событием, приводящим к возникновению и/или развитию В-ХЛЛ, проанализировать связь мутаций этих генов с другими молекулярными маркерами, выявляемыми при В-ХЛЛ. Установить значимость выявления мутаций для оценки прогноза течения заболевания, выбора терапии и необходимость проведения данных исследований в рутинной практике врача-гематолога; оценить область применения скрининговых и подтверждающих методов исследования генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3*.

Настоящее исследование посвящено анализу мутаций генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* и оценке информативности и условий применимости данных их мутационного статуса при В-ХЛЛ. В результате будут определены наиболее важные молекулярные маркеры, которые могут влиять на выбор режима терапии и стратифицировать пациентов на группы риска.

### **1.1.1 В-ХЛЛ, этиология, диагностические критерии**

В-ХЛЛ - болезнь, имеющая клинические проявления после 50-60 лет, всего 10% заболевают до 40 лет [146]. Мужчины болеют чаще, чем женщины приблизительно в 2 раза для европейской части населения, среди людей азиатского происхождения характерно иное соотношение, например в Китае оно составляет 3.2/1 [13, 102]. У 40—60% пациентов заболевание диагностируется в асимптомной фазе (лимфоцитоз при рутинном анализе крови) [13], и это должно учитываться при обусловленном различными причинами массовом гематологическом обследовании населения. Чем больше возраст больного В-ХЛЛ, тем неблагоприятнее его прогноз [14, 65, 77, 98]. Однако, у молодых пациентов прогноз нельзя считать удовлетворительным [25]. В обзоре, сделанном IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia) по 454 больным В-ХЛЛ моложе 50 лет, 25% имели стадию 0 по классификации Rai, 21,5% стадию I, 40% - II,

5,5% - III, и 8% - стадию IV. Медиана общей выживаемости составила 12 лет, тогда как ожидаемая медиана выживаемости (получена по контрольной группе здоровых лиц, тождественных по полу, возрасту и другим показателям) - 31,2 г. 10-летняя общая выживаемость составила в стадиях 0 - 76%, в стадиях I - II 45% и в стадиях III - IV - 24% [44].

У мужчин прогноз менее благоприятен, чем у женщин, даже если выборка тождественна по другим факторам прогноза [14, 77]. Причины этого феномена на данный момент не ясны.

Ежегодно в России В-ХЛЛ заболевает 3-3,5 человека на 100 000 жителей, с возрастом число заболевших увеличивается и после 65 лет составляет 20 на 100 000. [144] .

Этиологические причины возникновения В-ХЛЛ не известны, не выявлена связь между воздействием различных канцерогенных, физических, химических факторов и развитием В-ХЛЛ [7, 105, 125, 144]. Существует предположение о влиянии некоторых факторов, в том числе радиации не через мутагенный эффект, а посредством нарушения межклеточных взаимодействий между отдельными субпопуляциями лимфоидных клеток в поликлональной популяции лимфоидных клеток в организме, что рассматривается как характерный компонент предлейкозного состояния при В-ХЛЛ [7, 105, 125, 144].

В ряде исследований продемонстрировано увеличение частоты острых миелоидных лейкозов среди курильщиков, однако большие когортные исследования не показали влияния курения на частоту развития В-ХЛЛ [20]. Всего несколько исследований указывают на возможность развития В-ХЛЛ после воздействия пестицидов [2]. Хронический В-клеточный лимфолейкоз распространен среди родственников по горизонтальной и вертикальной линии, причем в последующем поколении возраст дебюта В-ХЛЛ раньше, чем в предыдущем [36, 52, 137]. Однако исходный генетический дефект, передающийся по наследству и обуславливающий образование клеток В-ХЛЛ, не обнаружен.

Морфологическим субстратом опухолевых клеток является клон лимфоцитов, имеющих размеры и морфологию нормального зрелого лимфоцита и иммунофенотип, соответствующий иммунофенотипу В-лимфоцитов поздних стадий дифференцировки по определению М. А. Волковой [144].

Лимфопротиферация характеризуется накоплением лимфоцитов в крови, костном мозге, лимфатических узлах или других лимфоидных тканях. Диагноз ставится при обнаружении лимфоцитоза свыше  $5 \cdot 10^9$  в периферической крови, часто это происходит на ранних стадиях случайно. Клинические данные должны быть подтверждены лабораторными показателями: обнаружение абсолютного лимфоцитоза свыше  $5 \cdot 10^9$  в периферической крови, пролимфоциты 10%, лимфоцитоз в костном мозге 30%. Клоны имеют иммунофенотип: CD19+, CD20± (слабая), CD22+ (умеренная), CD79a+, CD23+, CD43+, CD5+, отмечается слабая экспрессия поверхностных иммуноглобулинов класса IgM или IgM+IgD (в ряде случаев не обнаруживается), рестрикция легких цепей (κ или λ), вариабельно представлены активационные антигены CD38, CD25, CD71. В редких случаях В-ХЛЛ опухолевые клетки имеют фенотип CD19+, CD5-, CD23+, либо на них отсутствует экспрессия легких цепей иммуноглобулинов. Экспрессия CD38 (маркера клетки-предшественницы) более чем на 20% в CD19+CD5+ клетках ассоциируется с плохим прогнозом. Экспрессия суррогатного маркера мутационного статуса вариабельных участков генов иммуноглобулинов – белка ZAP-70 (70kD zeta-associated protein) в сочетании с мутированным вариантом генов иммуноглобулинов ассоциируется с плохим прогнозом [145].

### **1.1.2 Классификация**

В 1970х гг Rai и Binet создали классификационные системы В-ХЛЛ [6, 103], создана классификация В-ХЛЛ в модификации А. И. Воробьева (2007) [148] табл. 1. Эти классификации позволяют оценить тяжесть течения В-

ХЛЛ. Стратификация больных на группы производится после оценки основных показателей - массы опухоли, её распространения и степени угнетения остальных ростков кроветворения. Последний показатель оказывает большее влияние на продолжительность жизни больных, чем объем опухолевой массы. Для каждой группы подсчитана примерная продолжительности жизни. Наихудший прогноз наблюдается в случаях с угнетением нормального кроветворения (медиана выживаемости менее 2 лет).

Стадии хронического лимфолейкоза по Rai (1975)		Стадии хронического лимфолейкоза по Binet (1981)	
Стадия 0	Только лимфоцитоз в крови более $15,0 \times 10^9$ /л, в костном мозге — более 40%; прогноз — хороший, продолжительность жизни соответствует популяционной	Стадия А	Содержание гемоглобина более 100 г/л, тромбоцитов более $100 \times 10^9$ /л, увеличение лимфатических узлов в 1–2 областях; медиана выживаемости — как в популяции
Стадия I	Лимфоцитоз сочетается с увеличением лимфоузлов; прогноз — промежуточный, медиана выживаемости — 9 лет	Стадия В	Содержание гемоглобина и тромбоцитов выше тех же показателей, но лимфоузлы увеличены в трех и более областях; медиана выживаемости — 7 лет
Стадия II	Лимфоцитоз + спленомегалия и (или) увеличение печени, независимо от размеров лимфоузлов; прогноз — промежуточный, медиана выживаемости — 6 лет	Стадия С	Содержание гемоглобина менее 100 г/л, тромбоцитов — менее $100 \times 10^9$ /л при любом количестве зон с увеличенными узлами и независимо от увеличения селезенки и печени; медиана выживаемости — 2 года
Стадия III	Лимфоцитоз и снижение уровня гемоглобина менее 110 г/л, независимо от увеличения лимфоузлов, селезенки, печени; прогноз — плохой, медиана выживаемости — менее трех лет		
Стадия IV	Лимфоцитоз плюс тромбоцитопения ниже $100 \times 10^9$ /л, независимо от анемии и размеров		

	лимфоузлов, селезенки и печени; прогноз — плохой, медиана выживаемости — 1,5 года		
--	---	--	--

**Таблица.1 Классификация ХЛЛ по А.И. Воробьеву (2007), объединяющая классификации по Rai и Binet**

Работа Binet ближе к онкологии: в частности, она учитывает распространенность поражения лимфоузлов (увеличение менее 3 групп, например, подмышечных и шейных – А; увеличение всех групп, (подмышечных, шейных и паховых) – В и любые клинические показатели + цитопения – стадия С)). Классификация Binet не рассматривает случаи В-ХЛЛ с многолетним стабильным лимфоцитозом, не сопровождающиеся увеличением лимфоузлов. Классификация Rai гораздо шире. В ней выделяется 5 стадий, которые практически учитывают органный характер поражения. Классификация Rai – первое исследование, позволившее охарактеризовать три прогностические группы В-ХЛЛ, принципиально различающиеся по выживаемости (более 10 лет, 7 лет и 1,5 года). Однако существенная гетерогенность даже в пределах клинических стадий требует современных лабораторных и клинических факторов прогноза.

### **1.1.3 Гипотезы влияния генетических нарушений на патогенез В-ХЛЛ**

Каждый генетический дефект имеет свою патогенетическую, клиническую и прогностическую значимость. Существует несколько теорий, описывающих возможный механизм развития В-ХЛЛ в результате хромосомных и генных мутаций.

Хромосомные мутации могут приводить к дерегулированию множества генов-мишеней, или наоборот, вследствие наличия «driver» (ведущей) мутации в одном из генов, происходит нарушение регуляторных и защитных путей в клетке, вследствие чего возникают абберация хромосом. Явление



повышения геномной сложности (хромосомные абберация в клетке В-ХЛЛ) приводит аддитивному эффекту и проявляются в более агрессивном течении В-ХЛЛ и снижении продолжительности жизни [30].

Возможные механизмы, приводящие к развитию В-ХЛЛ в ходе делеции хромосом и генных мутаций:

1. один аллель теряется в ходе делеции хромосомы, а второй несет мутантный ген. Так чаще всего происходит при делеции 17p, когда на оставшихся аллелях содержится мутантный ген *TP53*.
2. По второму механизму аллель с «критическими» генами подвергается делеции, оставшегося генетического материала недостаточно для обеспечения полной функциональности (гапло-недостаточность). Данная теория дает объяснение развития В-ХЛЛ при делеции 11q.
3. В третьем случае теряется один аллель, а оставшийся эпигенетически подавляется. Эта теория еще не доказана.

Существуют корреляционные связи между некоторыми хромосомными и генными мутациями: например, мутация *NOTCH1* часто встречается при трисомии 12 хромосомы, а мутация *MYD88* при делеции 13q14. И, наконец, хромосомные абберация могут затрагивать и многие другие критические гены и, следовательно, пути сигнальные регуляции с их участием, что осложняет понимание патобиологических механизмов развития В-ХЛЛ [76,92].

Ясно, что часть генетических нарушений является спорадическими явлениями, другая – является закономерным процессом, ведущим к развитию В-ХЛЛ. Скорее всего, часто встречающиеся при В-ХЛЛ генетические нарушения должны играть какую-то роль в патогенезе заболевания. Однако, роль ведущего генетического нарушения при В-ХЛЛ так и не определена.

### **1.1.3 Цитогенетические и молекулярно-биологические маркеры, как факторы прогноза**



В-ХЛЛ является генетически гетерогенным заболеванием и включает несколько различных генетических нарушений клинически проявляющихся общими симптомами В-ХЛЛ [16, 17]. Неоднородность биологии В-ХЛЛ выражается в существенных вариациях клинических проявлений от пациента к пациенту, скорости прогрессирования заболевания, ответа на терапию, и, в конечном итоге, выживаемости с момента постановки диагноза [75], что обуславливает необходимость изучения и подбора аналитических маркеров прогноза В-ХЛЛ для выбора оптимальной терапевтической стратегии. Выявлено, что ХЛЛ сопровождается целым спектром цитогенетических и генетических нарушений. Примерно в 80% случаев при ХЛЛ имеются соматические приобретенные геномные aberrации (aCNAs). К ним относят появление дополнительной копии 12 хромосомы (обнаруживается в 15-18% случаев) или делеции хромосом: делеции различной длины 13q14 хромосомы, (встречается в 50% случаев), делеции 11q и 17p хромосом встречаются реже у 10-15% и 7-10% больных ХЛЛ соответственно (таблица 2) [76, 92]. Было установлено, что клональные хромосомные aberrации выявляются примерно в половине случаев хронического В-клеточного лимфолейкоза, с небольшими колебаниями в зависимости от стадии болезни. На ранних стадиях цитогенетические нарушения встречаются реже (20%), на более поздних стадиях чаще, до 70%. Из 50% больных ХЛЛ с клональными хромосомными aberrациями половина имеет одну аномалию, остальные две или более. У больных с нормальным кариотипом прогноз лучше, чем у больных с цитогенетическими аномалиями. Одна хромосомная aberrация прогностически благоприятнее комплексных нарушений кариотипа. Но ни одна из наиболее распространенных при В-ХЛЛ хромосомных aberrаций, по-видимому, не является первичным событием в развитии опухоли.

	Классическая цитогенетика IWCLL/ другие работы	FISH
трисомия 12	19% (17 - 40%)	11,5% - 55%
делеция 13q	10% (7 - 20%)	13q14 > 50%

делеция 11q	8% (7 - 17%)	20%
делеция 6q	6% (3 - 20%)	9%
делеция 17p	4%	10 - 17%

**Таблица 2. Частота наиболее распространенных хромосомных аберраций при В-ХЛЛ: классическая цитогенетика и FISH [44, 98]**

Кроме того, при проведении полногеномного секвенирования у больных В-ХЛЛ выявлены повторяющиеся мутации в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1*, *BIRC3*, которые предположительно связаны с патогенезом и влияют на клиническое течение заболевания [100].

## **1.2 Хромосомные мутации при В-ХЛЛ**

### **1.2.1 Делеция 13 хромосомы**

Наиболее часто встречающийся хромосомной аномалией при В-ХЛЛ, выявляющейся в 50% случаев, является делеция хромосомы 13 (del13q14) [11, 57-59, 70, 73, 80], считается клинически благоприятным признаком в отсутствие других мутаций. Длина делеции может варьировать от 1 до 40 Мб и более, и может быть распространена в направлении центромеры или теломеры. Примерно в 15-20% случаях del13q14 происходит на обеих хромосомах. Это могут быть одинаковые по локализации и протяженности делеции или мозаичная делеция различной длины и локализации [93]. На рис.1 представлена карта делеций del13q14, составленная на основании данных обследования 255 больных В-ХЛЛ [76, 91]. Несмотря на неоднородность del13q14 считается, что делеция затрагивает разные, но перекрывающиеся участки. Было выявлено, что около 60% del13q14 при В-ХЛЛ имеют относительно однородную длину 0,8-1,0 Мб, так называемый тип I. 98% всех del13q14 затрагивает локус, где располагаются *miR15a/16-1* и *DLEU7*, и так же все промежуточные гены [82, 91, 96]. Тем не менее, у людей на хромосоме 3 расположен локус, который кодирует высоко гомологичные *miR15b-* и *16,2* РНК (<http://www.mirbase.org/index.shtml>), которые потенциально могут компенсировать потери *miR15a/16-1* при del13q14. С учетом этого, другие факты подтверждают антионкогенную роль *miR15a/16-*

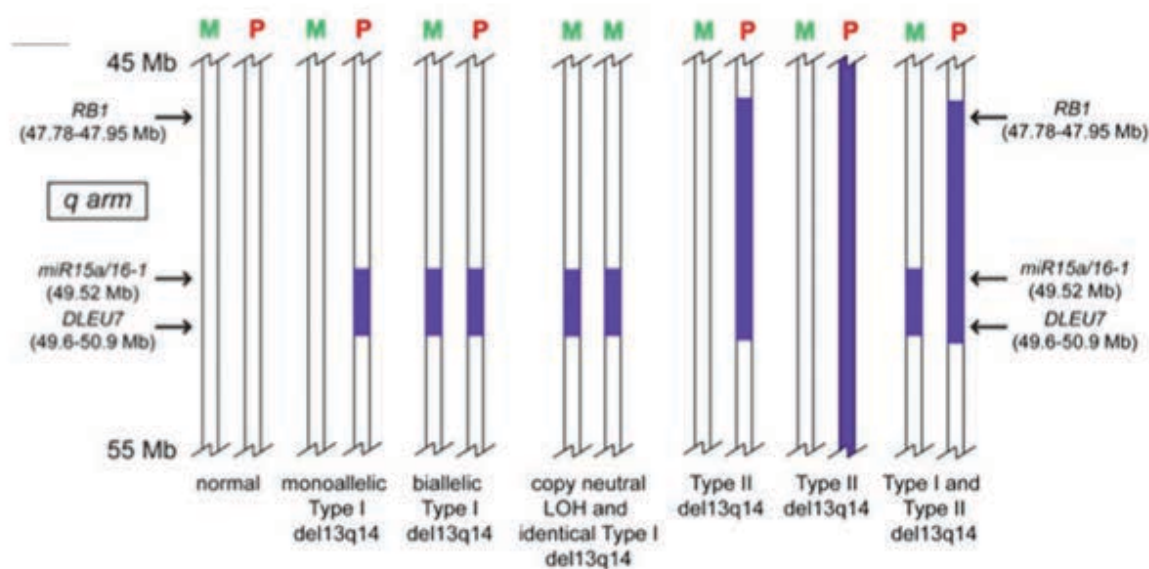
1[51-53]. Наконец, эпигенетическое подавление *miR15a/16-1* иногда обнаруживается при В-ХЛЛ без *del13q1* [80]. Так же предполагается, что *miR15a/16-1* имеет аддитивный эффект при делеции области 13 хромосомы. Мыши, которые имели делецию только *miR15a/16-1* развивали В-ХЛЛ реже, чем мыши имевшие протяженную делецию, подобно тому как это происходит в организме человека [91].

С недавних пор объектом пристального изучения является ген *DLEU7*, делеция которого наблюдается почти во всех случаях *del13q* [47]. В гетерологичных клеточных системах проявляет себя как проонкоген, являясь составной частью сигнальных путей клетки. В семьях с наследственной формой В-ХЛЛ имеется SNP, который расположен в гене *DLEU7* [10, 94]. Таким образом, можно предположить, что делеция *miR15a/16-1* и *DLEU7* являются основными генами-мишенями, потеря которых при *del13q14* способствует развитию В-ХЛЛ.

Делеция *del13q14* - самый частый тип мутаций при В-ХЛЛ, что дает основания считать ее «ведущей» мутацией. Тем не менее, идентичные делеции *del13q14* встречаются и при других типах опухолей, в том числе при множественной миеломе, диффузной В крупноклеточной клеточной лимфоме, остром миелоидном лейкозом, раке простаты и других. С такой же частотой в 50% случаев *del13q14* обнаруживается при МВЛ (моноклональный В-клеточный лимфоцитоз), но только 1% МВЛ случаев трансформируется в В-ХЛЛ ежегодно. Таким образом, *del13q14* самой по себе не достаточно для развития В-ХЛЛ [37, 62]. Наконец, достоверно не установлено как изменяется генная регуляция при *del13q14*, несмотря на многолетнюю историю исследований. Так же в крупномасштабных исследованиях не было найдено ни одной соматической мутации, событийно связанной с делецией 13 хромосомы. Поэтому предполагается, что делеция приводит к гаплонедостаточности или инактивации через эпигенетические механизмы.

При протяженной *del13q14* II типа (около 48 Мб) происходит делеция гена

*RB1* (ген ретинобластомы 1; антионкоген), что проявляется клинически более агрессивным течением заболевания и более короткой выживаемостью, особенно после терапии. Обычным методом FISH не возможно уловить разницу в длине делеции 13q. Важно отметить, что имеется связь между *del13q14* типа II и повышением геномной сложности [22, 71, 82, 91, 96]. Возможно, использование второго FISH зонда для определения делеции с центром в гене *RB1* будет способствовать стратификации риска при В-ХЛЛ. Обнаружение *del13q14* и любой другой хромосомной аномалии связано с более агрессивным течением болезни, чем изолированная *del13q14*.



**Рисунок 1. Схемы различных типов делеции 13q14 при В-ХЛЛ [93]**

М-материнская хромосома, Р-отцовская хромосома. Стрелками обозначено примерное расположение генов *miR15a/16-1*, *DLEU7* и *RB1*. Участки делеции обозначены синим цветом.

### **1.2.2. Делеция 11q хромосомы**

Приблизительно 10% пациентов с В-ХЛЛ имеют делецию короткого плеча 11 хромосомы (*del11q*) на момент постановки диагноза. Данное событие считается прогностически неблагоприятным, характеризуется началом В-ХЛЛ в более молодом возрасте. Большинство *del11q* протяженные, длиной

от нескольких до десятков Мб [38, 87, 115]. При картировании выявлен минимальный район делеции, содержащий такие гены-регуляторы клеточного цикла, как *NPAT*, *CUL5*, *PPP2R1B*, *DDX10* и *ATM*. Все del11q, которые включают локус *ATM*, считаются «классическими», все они связаны с делецией только одного плеча, гомозиготных делеций 11q не обнаружено. Атипичные del11q, в отличие от «классических» del11q меньше по протяженности и расположены ближе к центromере, однако данных об их биологии или клиническом значении нет [43, 92].

Ген *ATM* является геном-супрессором, подавляющим развитие атаксии-телеангиэктазии. Утрата гена *ATM* в результате делеции 11q считается основным фактором, способствующим развитию В-ХЛЛ. В отличие от мутации гена *TP53*, которая сопровождает делецию 17p в 80% случаев, мутации *ATM* при делеции 11q обнаруживаются в 8-30% случаев. Так же не проведено четких различий между соматической и герминальной мутацией гена *ATM* и SNP. Таким образом, имеющиеся данные о патофизиологии В-ХЛЛ при del11q говорят о дефектах в системе репарации двухцепочечных разрывов, за которую отвечает ген *ATM*. К появлению двухцепочечных разрывов ДНК приводят мутации или дисфункция гена *ATM* (гипоактивация) [81]. В дополнение к мутациям гена *ATM* были обнаружены мутации в гене *BIRC3*, расположенном на расстоянии 6 Мб от гена *ATM* [111]. Мутации других генов, расположенных на 11q хромосоме не были обнаружены при проведении крупномасштабных исследований В-ХЛЛ.

Почти все del11q наблюдаются при В-ХЛЛ с немутированным вариантом генов иммуноглобулинов. Эта корреляция остается необъясненной.

Так же было установлено, что в 60-70% случаях del11q связана с повышением уровня экспрессии рецептора инсулина (*INSR*) [115]. Показано, что обработка таких клеток инсулином *ex vivo* ведет к увеличению антиапоптотической активности и усилению воздействия ростовых стимулов. Увеличение уровня экспрессии *INSR* связано с ранним прогрессированием заболевания. В настоящее время считается, что аномальная регуляция *INSR*

происходит из-за моноаллельной делеции одного или нескольких генов, расположенных на 11q, а также других, неизвестных дефектов. Ведутся исследования с целью идентифицировать такие гены-кандидаты и создать дополнительные представления о патогенезе В-ХЛЛ [51].

И, наконец, существует сильная взаимосвязь между повышением геномной сложности и del11q, что может лежать в основе клоновой эволюции и в результате приводить к появлению более агрессивных клонов.

Из имеющихся данных следует, что del11q при В-ХЛЛ характеризует клинически прогрессирующее заболевание или стабилизацию заболевания, требующую начала терапии. Кроме того, В-ХЛЛ с del11q характеризуются короткими ремиссиями, хотя в последнее время было отмечено улучшение ситуации после включения циклофосфида в схемы лечения [124]. Непропорционально увеличенные размеры лимфатических узлов могут быть связаны с делецией 11q и повышенной экспрессией INSR [32].

### **1.2.3. Трисомия 12 хромосомы**

Трисомия 12 (tris 12) хромосомы обнаруживается примерно 15-18% случаев В-ХЛЛ на момент постановки диагноза и коррелирует с атипическими морфологическими вариантами В-ХЛЛ. Механизмы, приводящие к появлению трисомии 12 хромосомы, и роль этого события в патогенезе ХЛЛ не известны. Нет точных данных о корреляции между трисомией 12 хромосомы, мутацией генов IgVH и неблагоприятным прогнозом. При FISH исследовании лишь в 25-75% клеток В-ХЛЛ выявляется трисомия 12 хромосомы, а не во всех, что может свидетельствовать, что трисомия – является следствием, а не причиной возникновения В-ХЛЛ. Достоверно не известны гены, увеличение дозы которых может привести к опухолевой трансформации, хотя в районе удвоения 12 хромосомы располагается ген инсулино-подобного фактора роста-1, фактора роста стволовых клеток *BCL-7* и гена *MDM-2*, являющегося геном-антагонистом *TP53* [26].

Мутации в 34 экзоне гена *NOTCH1* обнаруживаются в 4-6% de novo В-ХЛЛ,

и в 50% мутация *NOTCH1* коррелирует с трисомией 12 хромосомы [3, 72, 117].

Изолированная трисомия 12 хромосомы не относится к прогностически неблагоприятным маркерам в клиническом контексте, пациенты с В-ХЛЛ с изолированной трисомией 12 почти всегда хорошо отвечают на терапию и имеют продолжительные ремиссии [26, 92]. Сильная отрицательная ассоциация трисомии 12 с мутациями *TP53* или повышением геномной сложности, возможно, лежит в основе этого явления.

#### **1.2.4. Делеция 17p хромосомы**

Примерно в 7% впервые выявленных случаев В-ХЛЛ имеется делеция короткого плеча 17 хромосомы (del17p) [31, 114]. Все делеции примерно одной длины в 18-22 Мб и затрагивают короткое плечо в направлении теломеры. Del17p всегда приводит к удалению критического локуса *TP53* одного из аллелей, а второй в 64-100% случаев несет мутацию в гене *TP53* [74, 92, 139]. Однако, данные о проценте выявления мутации *TP53* в 4, 9, и 10 экзонах при делеции 17p различаются, что, возможно, связано с техническими аспектами анализа мутаций *TP53* [74, 81, 92]. На рисунке 2 показана карта делеций 17 хромосомы и аллельные варианты гена *TP53* на оставшемся плече.

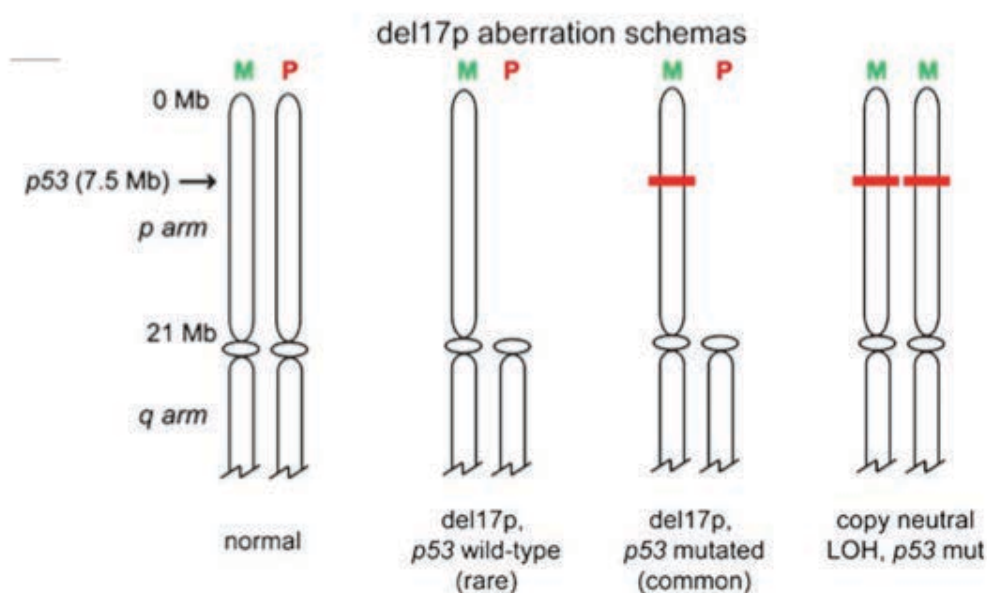
При проведении исследования FISH используется зонд с центром на локусе *TP53* [140], поэтому обнаруживаются все del17p. Однако в некоторых случаях происходит дубликация оставшегося аллеля, что ведет к ложно отрицательному результату при FISH исследовании, т.к. оставшийся аллель несет гомозиготные мутации *TP53* [29]. Некоторые мутации *TP53* происходят без del17p (как правило, их называют моноаллельной мутацией *TP53*), но это довольно редкое явление. Моноаллельные мутации *TP53* связаны с агрессивным течением В-ХЛЛ [28, 114].

Делеция 17p является противопоказанием для терапии аналогами пуринов и алкилирующими агентами, т.к. результат такой терапии зависит от индукции



апоптоза и функциональной активности белка p53 [108]. Таким больным рекомендуется выбор альтернативной терапии, которая подразумевает применение негенотоксичной терапии или трансплантацию костного мозга [97, 119]. Делеция 17p с течением заболевания может возрастать в процентном отношении или возникать, даже если отсутствовала ранее.

Если del17p связана с мутированным вариантом IgVH или ранней стадией заболевания, то болезнь может быть клинически стабильной в течение многих лет [88]. Появление del17p не должно быть использовано как показание для начала терапии в отсутствие иных показаний.



**Рисунок 2. Схемы различных типов делеции 17q при В-ХЛЛ [2]**

М-материнская хромосома, Р-отцовская хромосома. Красным маркером выделен участок, соответствующий расположению гена *TP53*, который в 80% случаев подвергается мутации при делеции плеча 17 хромосомы.

### 1.3. Мутации генов при В-ХЛЛ

#### 1.3.1. Мутации гена *TP53*

Ген *TP53* расположен на коротком плече 17p13.1, протяженность 22 кб, транскрипт представляет собой мРНК длиной 2,2 кб, состоящую из 11 экзонов и кодирующую 393 аминокислоты. Белок p53 – это фосфопротеин, состоящий из 5 консервативных доменов, необходимых для реализации его



онкосупрессивного действия: N-концевой домен, вовлеченный в транскрипционную активацию генов-мишеней, пролинбогатый (его функция до конца не исследована, предположительно участвует в белок-белковом взаимодействии и передаче сигнала), центральный ДНК-связывающий домен (связывается с промоторами генов-мишеней), олигомеризационный домен (ответственен за образование тетрамерного комплекса), С-концевой домен (связывается с ДНК неспецифично и отвечает за распознавание повреждений ДНК) [129]

В норме продукт гена *TP53*, белок p53, предотвращает генетическую нестабильность в клетке и необходим для реализации апоптотической активности в ответ на химиотерапию и радиотерапию. Он активируется в ответ на различные стрессовые воздействия: повреждение ДНК химическими и физическими агентами, нарушение сборки/разборки микротрубочек веретена деления, активацию онкогенов, гипоксию, адгезию и другие стимулы [67]. После воздействия одного из «стрессового» сигнала происходит определенная активация и модификация белка (фосфорилирование, дефосфорилирование, ацетилирование и др.), в результате этого он исполняет одну или несколько своих функций: в случае, если повреждение может быть устранено за счет репаративных процессов, жизненный цикл клетки останавливается в «точке сверки» G2 [12]. В случае тотального повреждения клетки активируется механизм апоптоза [19]. Большинство мутаций (75%) представляют собой инактивирующие миссенс мутации, приводящие к замене одной аминокислоты на другую, которые локализованы в области 5-8 экзона центрального ДНК-связывающего домена [19]. Так же встречаются делеции, вставки и мутации сайтов сплайсинга. Имеются «горячие точки» – несколько положений, в которых мутации выявляются чаще всего. Эти мутации нарушают *TP53*-ДНК взаимодействие («ДНК-контактные мутации», например, в 248 и 273 кодонах) или вызывают конформационные изменения («конформационные мутации», например, в кодонах 175, 245, 249 и 282) [55]. Подавляющее большинство мутаций

значительно ослабляют функцию *TP53* [88]. Однако, при некоторых мутациях функция *TP53* частично сохранна, причем его активность в этой ситуации может быть выборочно специфична для некоторых промоторов. Кроме того, мутантный белок p53 может оказывать доминантно-негативное влияние на белок p53 дикого типа: конечная структура p53 – тетрамер, при включении в него одного из мутантных мономеров p53 происходит потеря функциональности всего комплекса. Некоторые мутации *TP53* могут приводить к приобретению активности, способствующей канцерогенезу [136]. Фенотип p53 с приобретением такой функции описан и в клетках В-ХЛЛ [123].

Мутации *TP53* встречаются при всех типах опухолей, по данным <http://www-p53.iarc.fr> максимальная частота составляет 38-50% при раке яичника, пищевода, прямой кишки, головы, шеи и легкого. Частота выявления мутаций у онкогематологических больных значительно ниже, 5-20% [113, 134]. Мутации чаще выявляются на финальной стадии заболевания или связаны с агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом.

При хроническом В-клеточном лимфолейкозе повреждение функции p53 связано с делецией 17p и/или мутацией гена *TP53* и коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Нарушения в гене *TP53* находят в среднем у 10 - 15% нелеченых пациентов с В-ХЛЛ, однако частота выше (40 - 50%) при флударабин-резистентном В-ХЛЛ [32, 67]. Более 80% больных с делецией 17p имеют мутацию *TP53* во втором аллеле [139]. Было показано, что мутации гена *TP53* без делеции 17p имеются у значительной части пациентов с В-ХЛЛ (5% в первой линии терапии) и связаны с неблагоприятным прогнозом [141].

#### **1.3.1.1 Показания к исследованию статуса *TP53***

Показания к исследованию *TP53* у больных В-ХЛЛ как фактора, влияющего на тактику лечения, даны на Международном семинаре по В-ХЛЛ и ERIC (European Research Initiative on CLL) [44, 99].

Рекомендации основаны на ретроспективных данных и анализе подгрупп

пациентов в клинических испытаниях. Проспективных исследований, в которых было бы показано превосходство одного режима над другим у больных с нарушениями *TP53*, не опубликовано.

В соответствии с рекомендациями ERIC делеции 17p и мутации *TP53* следует оценивать:

- 1) у всех больных, включаемых в клинические испытания;
- 2) вне клинических испытаний у больных, которым показано лечение и возможно проведение альтернативной терапии, в частности, аллогенной трансплантации стволовых клеток или другой интенсивной терапии (например, FCR и BR);
- 3) нарушения *TP53* необходимо оценивать перед началом терапии (результаты, полученные на момент установления диагноза, могут меняться со временем из-за клональной эволюции);
- 4) в рецидиве, перед назначением терапии второй линии. Выявление нарушений *TP53* в рецидиве может повлиять на выбор терапии [99]. В соответствии с рекомендациями ERIC необходимо сочетать FISH метод с анализом *TP53*, так как мутация *TP53* встречается без делеции 17p и наоборот.

### ***1.3.1.2 Клиническое значение обнаружения мутации TP53***

В соответствии с данными, полученными в клинических испытаниях [81, 84] пациенты с нарушениями *TP53* имеют агрессивный характер клинического течения заболевания, требуют более раннего вмешательства из-за прогрессии болезни и клинических симптомов, плохо отвечают на терапию. Пациенты нуждаются в раннем повторном цикле терапии и имеют короткую выживаемость. Однако существуют подгруппы пациентов с делецией 17p (и чаще с мутированными генами IgVH), у которых не происходит прогрессия заболевания в течение многих лет [5]. Среди группы пациентов с прогрессией заболевания частота мутации *TP53* возрастает с 3,7% до 10 - 12% (первая линии терапии) и до 40% (при флударабин-рефрактерном В-ХЛЛ)[67].

Наличие мутации *TP53* требует отнести этих больных к группе повышенного внимания, которым при выраженных клинических симптомах и неудовлетворительном ответе на терапию рекомендован подбор альтернативной терапии (трансплантация костного мозга) или проведение интенсивной терапии [99].

Разрабатываются новые лекарственные препараты с низкой токсичностью, низкомолекулярные соединения, имеющие мишенью *TP53*. Одна группа препаратов в большей степени ориентированная на пациентов с диким вариантом *TP53*, это Nutlins и RITA, которые стабилизируют белок p53, пролонгируют его антионкогенную активность. Другая группа препаратов ориентирована на терапию больных с наличием мутации *TP53*, это TNFSF10 и PRIMA-1, они реализуют свой эффект через другие механизмы или увеличивают активность белка p53 через восстановление его нормальной конформации [27, 84-85]. Исследование статуса *TP53* может стать обязательным анализом с появлением в клинической практике новых препаратов, для назначения которых важна оценка статуса *TP53*.

### **1.3.2. Мутации гена NOTCH1**

*NOTCH1* (TRANSLOCATION-ASSOCIATED NOTCH HOMOLOG; TAN1) – ген, расположенный на 9q34.3 хромосоме, принадлежащий к семейству NOTCH рецепторов, регулирующих дифференцировку клеток в процессе гемопоэза [64]. Участвует в созревании CD4 + и CD8 + клеток в тимусе [121]. Может быть важен для дифференциации в фолликулах. Состоит из 2555 аминокислот, 34 экзонов, молекулярная масса 272 кДа.

*NOTCH1* кодирует трансмембранный белок I класса, представляет собой лиганд-активируемый фактор транскрипции и регуляции дифференцировки, пролиферации и апоптоза клеток. В состоянии покоя, *NOTCH1*-рецептор представляет собой гетеродимерный комплекс, состоящий из двух фрагментов: внеклеточного домена (NEC), который представляет собой рецептор для лигандов, которые обычно экспрессируются на поверхности других клеток, и трансмембранный и внутриклеточный домен (NTM). NTM

выступает в качестве посредника сигнала, он протеолитически отщепляется от NEC после активации рецептора. Эти два фрагмента связаны за счет домена гетеродимеризации (HD), соединенного с помощью С-конца с NEC и N-концом с HTC доменом. Связывание лиганда с компонентом NEC вызывает начальное сайт-специфической катализируемое металлопротеиназой расщепление в области HD. После расщепления остается мембраносвязанная усеченная молекула. Под воздействием гамма-секретазы осуществляется протеолиз *NOTCH1*, что приводит к высвобождению внутриклеточного домена (ICN). Он перемещается в ядро, где взаимодействует с факторами транскрипции *CBF1/RBP-Jk*, что приводит к дерепрессия/активации *CBF1* - зависимых генов. С-конец белка имеет домен PEST (последовательность богатая пролином (P), глутаматом (E), серином (S), и треонином (T)), который ограничивает функцию активированного рецептора путем деградации белка за счет связывания с протеасомным комплексом SCF-FBXW7. Фосфорилирование домена PEST, инициирует сборку холофермента РНК-полимеразы II в транскрипционный комплекс и участвует в передаче сигнала от *NOTCH1* [132, 135]. Активация *NOTCH1* играет важную роль в нормальном развитии Т-клеток. Соматические мутации, поражающие этот белок, были идентифицированы приблизительно у 60 % пациентов с Т-клеточным острым лимфобластным лейкозом (Т-ALL) [39]. Большинство мутаций расположены во внеклеточном HD и/или С-конце домена PEST. Эффект этих двух основных типов мутаций отличается. Мутации HD сосредоточены в "горячих точках", расположенных в области 1,574-1,622 HD-N домена. Они приводят к лиганд-независимой активации рецептора и имеют сильную онкогенную активность, тогда как мутации расположенные в С-концевом домене PEST образуют стоп-кодон, что приводит к образованию укороченной и более стабильной формы белка, которая накапливается в опухолевых клетках, но имеет более низкий онкогенный потенциал. Поэтому делеция *NOTCH1* может суммироваться с другими онкогенными событиями, приводя к трансформации в лейкозные

клетки [100]. Подавляющее большинство *NOTCH1* мутаций при В-ХЛЛ происходят в 34 экзоне *NOTCH1* и приводят к появлению укороченной и более стабильной формы белка [34]. Наиболее частой мутацией при В-ХЛЛ является делеция двух оснований (с.7544\_7545delCT) со сдвигом рамки считывания, которая составляет 85-90% всех мутаций в *NOTCH1* при В-ХЛЛ. Мутации в гене *NOTCH1* приводят к увеличению активности белка и ассоциируются с более агрессивным характером течения заболевания [24]. Также характерно появление синдрома Рихтера [126]. Онкогенный потенциал мутаций *NOTCH1* в В-клетках при В-ХЛЛ еще не достаточно изучен. Первоначальные исследования показали, что *NOTCH1* и *NOTCH2* были постоянно активны в клетках В-ХЛЛ по сравнению с нормальными В-лимфоцитами [126]. *NOTCH* приводит к активации NF-κB и увеличивает выживаемость клеток В-ХЛЛ, в то время как ингибирование сигнала *NOTCH* усиливает апоптоз клеток В-ХЛЛ [106].

Несколько исследований при участии большого количества больных В-ХЛЛ выявили различную частоту мутаций *NOTCH1* от 4 до 12%. Причины этих различий не совсем ясны, но может это быть связано с различными выборками пациентов [24, 34]. Некоторые из этих исследований сосредоточенных только вокруг мутационного анализа наиболее распространенной делеции с.7544\_7545delCT, в то время как другие исследовали весь 34 экзон. Таким образом, комбинация эпидемиологических и технических аспектов может влиять на частоту выявления мутаций *NOTCH1*.

#### **1.3.2.1 Клиническое значение мутаций *NOTCH1***

Клиническое значение мутаций *NOTCH1* связывают с более агрессивным течением В-ХЛЛ. *NOTCH1* мутации более часто встречаются при В-ХЛЛ с немутированным IgVH (20% против 3,5%), и при высокой экспрессии ZAP-70 (30% против 5%) или CD38 (23% против 5%) [24, 34, 41, 90]. Эти пациенты имеют продвинутые стадии болезни, повышенный уровень ЛДГ и бета2-микроглобулина [106, 112, 126]. Мутации *NOTCH1* при В-ХЛЛ реже

коррелируют с делецией 13q, чаще выявляются при трисомии 12 хромосомы, у больных, имеющих сниженную общую и беспрогрессивную выживаемость [113-116]. Подгруппа пациентов с мутациями гена *NOTCH1* и мутированным вариантом IgVH связана с продленным временем до начала терапии [133]. Мутации гена *NOTCH1* также ассоциируют с редкими случаями Т-ОЛЛ, имеющими транслокацию с участием гена *NOTCH1*, хроническим миеломоноцитарным лейкозом, патологией развития клапанов аорты и плоскоклеточным раком шеи и головы [1, 41, 61, 133].

### **1.3.3. Мутации гена SF3B1**

Ген *SF3B1* (субъединица В1 сплайсинг фактора 3) расположен на 2 второй хромосоме в области длинного плеча (2q33.1). Белок, кодирующий SF3B1 состоит из 1304 аминокислот, масса 145 кДа.

Неожиданной находкой при проведении полногеномного секвенирования больных В-ХЛЛ явилось обнаружение мутаций в гене *SF3B1* в 10-15 % случаев В-ХЛЛ, уступающих по частоте только *NOTCH1* [101] или *TP53* [130]. Все мутации представлены миссенс мутациями, расположенными в 12-15 экзонах. Горячими точками мутации являются 700 кодон (57%), 662 (11%) и 666 кодоны (10%). Интересно отметить, что соматические мутации *SF3B1* и других генов РНК сплайсинга были недавно найдены у пациентов с МДС синдромом, а так же у пациентов с рефрактерной анемией [96, 127]. Важно, что никаких мутаций в *SF3B1* гене не было найдено при других типах лимфоидных новообразований [101, 130].

Сплайсинг является механизмом, необходимым для функционирования клеток, и специфические изменения в сплайсинге протонкогенов и опухолевых супрессоров связаны с развитием рака [23]. Сплайсинг РНК осуществляется комплексом сплайсеосомы, состоящим из пяти малых ядерных рибонуклеопротеинов (мяРНП) ( U1, U2, U4/U6 и U5 ). Сборка сплайсеосомы происходит для каждой пре-мРНК, которая содержит специфические последовательности, управляющие и регулирующие этот



процесс. *SF3B1* является составной частью этого комплекса, который активирует связывание U2 [40]. Мутации сайтов сплайсинга или элементов комплексов сплайсеосом могут вызвать отклонения в транскрипции и различные аномалии сплайсинга, в результате чего изменяются белки, кодируемые многими генами. Эти нарушения происходят за счет снижения уровня транскрипции, сохранения интронов, и усечения (или удлинения) экзонов [127].

### ***1.3.3.1 Клиническое значение мутаций гена SF3B1***

*SF3B1* мутации часто обнаруживаются у пациентов при прогрессии заболевания или при повышенном уровне бета2-микроглобулина, немутированном варианте IgHV [6]. Ассоциация мутаций *SF3B1* с делецией 11q была найдена лишь в одном исследовании [112], в других подобной связи не выявлено [101, 109]. Наличие мутации *SF3B1* связано с неблагоприятным прогнозом для пациентов, с более коротким временем беспрогрессивной и общей выживаемости [101, 109]. Эта связь не зависит от других прогностических факторов: таких как экспрессия CD38 или ZAP70. Ассоциация с более короткой общей выживаемостью не зависела от мутационного статуса IgVH в одном исследовании [109], а в другом зависела [101]. Предполагают, что мутации в гене *SF3B1* могут быть связаны с рефрактерностью к терапии флударабином независимо от наличия *TP53* мутаций, так как они чаще выявляются у больных с рефрактерностью к терапии (17-30%), чем на момент постановки диагноза 5-10% [109]. Мутации гена *SF3B1* чаще выявлялись у пациентов с более короткой беспрогрессивной выживаемостью, получавших флударабин и циклофосфамид, медиана выживаемости составила 46 и 29,4 месяца для дикого и мутантного аллеля *SF3B1* соответственно [89]. Все эти данные свидетельствуют, что *SF3B1* мутации связаны с плохим прогнозом и рефрактерностью к терапии флударабином.



#### **1.3.4. Мутации гена *BIRC3***

Бакуловирусный IAP повтор-содержащий белок 3 (так же известный как cIAP2 белок) расположен на 11q22.2 хромосоме, состоит из 11 экзонов. Транслируемыми являются 9 из них, белок содержит 604 аминокислоты, масса - 68 кДа. *BIRC3* принадлежит к семейству ингибиторов апоптоза, препятствующих активации каспаз, является негативным регулятором неканонической передачи сигналов с помощью NF- $\kappa$ B [69]. Инактивирующие мутации гена *BIRC3* чаще встречаются при В-ХЛЛ с рефрактерностью к химиотерапии (24%), чем на момент постановки диагноза (4%) и приводят к сдвигу рамки считывания, появлению стоп-кодона или делеции участка гена [111]. Мутации *BIRC3* не встречаются одновременно с мутациями в *TP53*, являясь дополнительным маркером рефрактерного В-ХЛЛ [71]. Нарушение *BIRC3* чаще выявляются у пациентов с неблагоприятным исходом [21]. Мутации *BIRC3* так же выявляют при некоторых лимфомах: лимфоме мантийной зоны, маргинальной зоны, лимфоме Беркита и др. [83, 107, 110].

#### **1.4. Мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов**

Знание механизмов иммунного ответа и изучение процессов дифференцировки В-лимфоцита позволило сделать предположения о различии происхождения опухолевых лимфоцитов на основании структуры В-клеточного рецептора. В-клеточный ответ опосредован антигенной стимуляцией и реализуется через BCR в нормальных и злокачественных В-клетках. Рецептор В-клеток претерпевает перестройку V, D и J сегментов тяжелой цепи и V-J генов легкой цепи, в ходе которой достигается увеличение разнообразия числа и отбор максимально аффинных рецепторов В-клеток для определенного антигена. В дополнение в комбинаторному разнообразию в ходе перестройки V-D-J сегментов, увеличение разнообразия В-клеточного рецептора достигается за счет процесса соматической гипермутации, который происходит в зародышевом центре фолликулов.

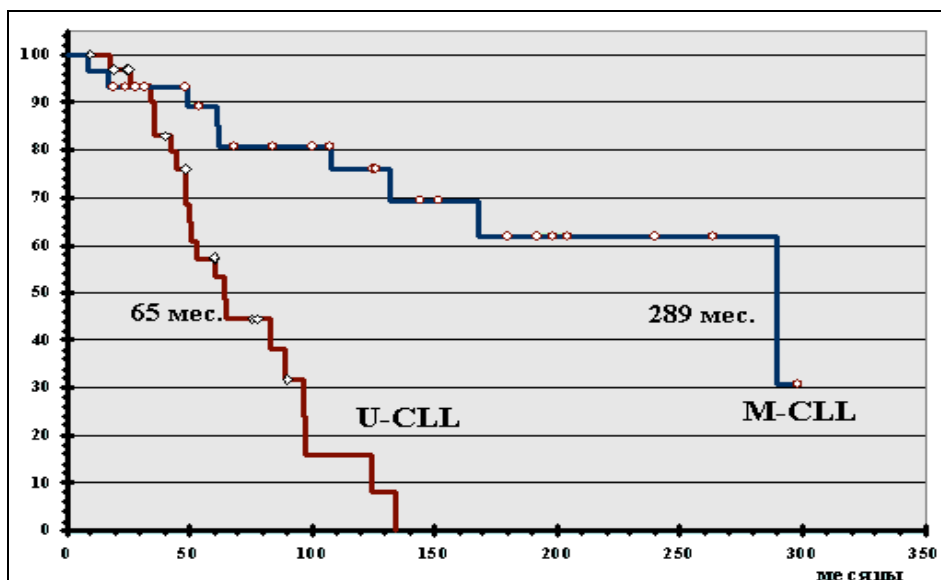
В-ХЛЛ можно разделить на случаях с или без соматической мутации области

вариабельных региона тяжелой цепи иммуноглобулина (IgVH): наличие соматических мутаций в последовательности вариабельного региона свидетельствует, что эта опухоль произошла из клетки, достигшей в своей дифференцировке центра фолликула или дальнейших стадий.

Данные, полученные Никитиным и соавт. [147] свидетельствуют, что хронический лимфолейкоз может происходить из клеток разных стадий дифференцировки В-лимфоцитов. При варианте В-ХЛЛ с мутациями конечное онкогенное событие и опухолевая трансформация происходит на уровне постфолликулярной клетки памяти. При отсутствии мутаций вариабельного региона тяжелой цепи иммуноглобулина наблюдается существенное сужение репертуара VH-, D- и JH-генов, причем этот репертуар не совпадает с репертуаром клеток CD5+ В-клеток, которые, скорее всего, являются предшественниками В-ХЛЛ. Это говорит о том, что клетки В-ХЛЛ группы без мутаций также проходят селекцию антигеном, но их развитие идет по Т-независимому пути, не включающему стадию герминального центра.

#### ***1.4.1 Клиническое значение мутационного статуса генов вариабельного региона иммуноглобулинов***

В группе больных В-ХЛЛ с высокой гомологией герминальным VH-генам (U-CLL – немутированный вариант тяжелой цепи генов иммуноглобулинов) медиана выживаемости меньше и составляет 65 месяцев, по сравнению с группой низкой гомологией (M-CLL) (Рисунок 3).



**Рисунок 3. Кривые выживаемости больных В-ХЛЛ с различным мутационным статусом (U-CLL – вариант без мутаций (unmutated), M-CLL – вариант с мутациями (mutated)) [147]**

Т.о., мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов в опухолевых клетках имеет важное прогностическое значение при хроническом лимфолейкозе. Необходимо отметить, что это независимый прогностический фактор, не связанный со стадиями, и отражающий биологическую гетерогенность заболевания. В настоящее время этот маркер лучше всего предсказывает долгосрочный прогноз течения болезни. Дальнейшее изучение IgVH привело к открытию стереотипных антигенных рецепторов (САР)— рецепторов, у которых совпадает набор использованных VH-, D- и JH-генов [35].

Клетки, несущие САР, обнаружены почти в четверти всех случаев В-ХЛЛ. В случае определенного набора генов – они могут быть мутированные и немутированные. И существуют определенные сабсеты, для которых даже в случае мутированного варианта В-ХЛЛ, прогноз будет хуже, что связано, скорее всего с наличием мутации генов [120].

### 1.5. Бета2-микроглобулин

Бета2-микроглобулин (В2-М) - низкомолекулярный белок, в качестве легкой цепи HLA-комплексом, присутствующий на поверхности всех

ядросодержащих клеток, а так же в сыворотке крови [50]. Это важнейший прогностический фактор при миеломной болезни и зрелоклеточных лимфомах, частично коррелирующий с массой опухоли [78].

В целом ряде работ показано, что он имеет прогностическое значение при В-ХЛЛ. Totterman показал, что спонтанная или индуцированная форболом продукция В2-М лимфоцитами коррелирует с активностью болезни [122]. Nap. и соавт. [49] определили уровень В2-М радиоиммунологическим методом у 65 больных В-ХЛЛ. При уровне более 2,3 мг/л медиана выживаемости составила 37 месяцев; в группе с нормальным уровнем медиана выживаемости не достигнута. Когда за прогностический значимый уровень брали 5 мг/л, то в группах выше и ниже этого уровня медиана выживаемости составляла 19 мес. и 61 мес., соответственно. Авторы не упомянули, получали ли больные лечение до измерения уровня В2-М.

#### ***1.5.1 Клиническое значение бета2-микроглобулина***

Было установлено, что при В-ХЛЛ уровень В2-М в сыворотке крови коррелирует со стадией заболевания [45].

В другой работе выявили, что высокий уровень В2-М четко коррелировал с меньшей продолжительностью жизни больных, не зависимо получали ли они ранее лечение или нет. Кроме того, наблюдалась непосредственная корреляция уровня В2-М и ответом на флударабин [45].

### **1.6. Методы исследования мутаций в генах**

#### **1.6.1. Высоко информативные точные методы анализа**

1. Прямое секвенирование геномной ДНК или комплементарной ДНК по Сэнгеру. Предпочтительнее использовать геномную ДНК, поскольку некоторые нонсенс мутации могут приводить к деградации РНК (нонсенс-зависимая деградация РНК). Рекомендуется секвенировать экзоны в которых содержится 95% всех мутаций гена. Прямое секвенирование по Сэнгеру – относительно простой метод, доступный в большинстве молекулярно-генетических лабораторий. Однако, этот метод не позволяет выявить

мутации, если доля мутантных аллелей невелика (менее 20%), поэтому небольшое количество субклонов с мутациями вряд ли могут быть обнаружены. Секвенирование необходимо проводить с прямого и обратного праймеров.

Преимущества: предоставляет информацию о типе и локализации мутации.

Недостатки: метод длителен и характеризуется низкой чувствительностью (в образце должно быть не менее 20% мутантных аллелей).

2. Чипы (microarray): В настоящее время существуют две платформы: Affymetrix / Roche (GeneChip Arrays и p53 AmpliChip). Технология чипов основана на выявлении уже известных точечных мутаций. На подложке иммобилизован массив аллель-специфичных олигонуклеотидов, содержащих все возможные замены оснований, характеризующихся значительным различием в уровне гибридизации с исследуемой ДНК. Этот подход был использован в первом поколении чипов Affymetrix. Дальнейшее развитие привело к созданию чипа компанией Roche –AmpliChip, который был разработан для диагностики 95% всех известных однонуклеотидных замен и делеций и сайтов сплайсинга и позволяет обнаружить мутантные аллели, представленные в 1-2% клеток.

Преимущества: AmpliChip – быстрый и удобный метод Affymetrix GeneChip – позволяет проводить мутационный анализ нескольких генов параллельно.

Производительность чипов позволяет исследовать статус нескольких генов одновременно и может по своей производительности и набору исследуемых маркеров в какой-то степени заменить FISH. Эти анализы в настоящее время не получили широкого распространения.

3. Секвенирование нового поколения (NGS). На сегодняшний день существует несколько платформ NGS, которые используют технологии детекции встраивания нуклеотидов, основанные на измерении pH, выделении пирофосфата и др. Секвенирование происходит с использованием чипа (array), состоящего из миллионов ячеек. В каждой ячейке генерируется молекулярный клон одной исследуемой последовательности ДНК. ДНК

мечена специальными последовательностями - адапторами, т.е. практически имеет индивидуальный номер. Во всех ячейках одновременно происходит циклический синтез комплементарной цепи. Детектируется каждый встраиваемый нуклеотид, таким образом, происходит считывание последовательности ДНК. Информация обрабатывается программно, на выходе получается структурированный массив данных. Производительность приборов позволяет прочитывать от десятков тысяч до миллионов пар оснований одновременно. Например, за один запуск можно проанализировать 10 участков генома длиной от 200 п.о. десяти пациентов с 500-кратным покрытием, что позволяет выявить редкие соматические мутации, встречающиеся с частотой менее 5%. Так же предлагаются специальные аналитические наборы (Cancer panel), позволяющие проанализировать одновременно до 400 различных онкогенов одного больного.

Значительно увеличилась чувствительность, производительность и информативность. За один запуск возможно составить мутационный профиль образца опухолевой ткани, выявить минорные мутации, недоступные для обнаружения при секвенировании по Сэнгеру, отличить соматические и герминальные мутации, возникшие de novo. К недостаткам можно отнести высокую стоимость оборудования.

### **1.6.2. Скрининговые методы**

Это простые быстрые методы, позволяющие провести предварительную оценку без использования сложного оборудования. Данные о наличии мутаций, полученные с помощью скрининговых методик, должны быть обязательно подтверждены в ПЦР-реакции и/или секвенировании по Сэнгеру.

1. Скрининговые методы, такие как денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (DHPLS) или анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК (SSCP) дают ответ на вопрос есть мутация или нет. Принцип метода DHPLS основан на различии

во времени удерживания мутантной ДНК (гетеродуплекс) и ДНК дикого типа (гомодуплекс). Для обнаружения гомозиготных мутаций ПЦР продукт смешивают с контрольным образцом дикого типа. Принцип метода SSCP основан на различии в электрофоретической подвижности амплифицированных в ходе ПЦР и денатурированных фрагментов мутантной ДНК по отношению к ДНК дикого типа. Образцы с отличной от нормы электрофоретической подвижностью подвергают секвенированию по Сэнгеру для установления типа мутации. К преимуществам относят скорость, простоту, экономичность и сравнительно высокую чувствительность, позволяющую диагностировать новые мутации. DHPLS позволяет анализировать фрагменты до 1,5 Кб. Недостатки: не предоставляют данные о типе мутации и ее локализации.

2. Проточная цитометрия и иммуноблоттинг. Отражают уровень экспрессии искомого гена в клетке. Так например, в норме белок *TP53* не обнаруживается иммунохимическими методами в большинстве клеток из-за короткого периода полураспада. Мутантный *TP53* обладает более длительным периодом полувыведения и обнаруживается с помощью анти-р53 моноклональных антител. Иммунологические методы просты, позволяют определить гетерогенность экспрессии в популяции клеток. Существенным недостатком является то, что часто продукт исследуемого гена имеет ряд изоформ, с которыми антитела могут не реагировать. Эти методы просты, но лишь косвенно позволяют судить о наличии мутаций.

3. Аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из методов прямой детекции известных точечных мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов. В основе метода лежит неспособность *Taq* ДНК-полимеразы к амплификации фрагмента при наличии несоответствия (*mismatch*) между переменным нуклеотидом на матричной ДНК и 3'-концом одного из олигопраймеров. При известных точках мутации подбираются праймеры к дикому и мутантному аллелям. По результату прохождения ПЦР реакции можно узнать о наличии или отсутствии

искомого SNP. Преимуществом метода является его высокая чувствительность, простота, скорость и дешевизна. Однако для подтверждения наличия мутации необходимо проведение секвенирования.

4. Биологические (функциональные) методы. В ряде случаев разработаны биологические тест-системы, исследующие функциональную активность генов. Метод функционального анализа разделенных аллелей в дрожжах (FASAY) используется для диагностики функциональной активности *TP53* [118]. Преимущества метода: скорость, дешевизна, отсутствие необходимости в специальном оборудовании, высокая чувствительность. Метод позволяет выявить мутации если 10% копий ДНК в образце содержат мутации. Исследуются оба аллеля одновременно, есть возможность отличить частично инактивирующие мутации от полностью инактивирующих.

Недостатки: метод не позволяет выявлять мутации, ведущие к нонсенс-зависимой деградации РНК. Температура роста дрожжей ниже 37<sup>0</sup>С, что может не позволить детектировать некоторые мутации, приводящие к температурной чувствительности *TP53*.

## **Глава 2. Материалы и методы**

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ ГНЦ МЗ РФ (зав. лаб. – д.б.н. Судариков А.Б.).

### **2.1 Методы, используемые для FASAY**

#### **2.1.1 Выделение РНК**

Мононуклеары периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте Ficoll-Нураque [9]. После выделения их мгновенно замораживали в жидком азоте и помещали на хранение при -70<sup>0</sup>С. Тотальную мРНК из замороженных образцов клеток выделяли методом экстракции с гуанидин-тиоцианатом фенолом и хлороформом [18], спектрофотометрически определяли концентрацию.



### **2.2.2. Обратная транскрипция**

В реакцию обратной транскрипции добавляли по 2 мкг РНК каждого образца. кДНК синтезировали в течении 1 часа +37<sup>0</sup>С с использованием 1 мкл 10 мМ случайных праймеров в качестве затравки и обратной транскриптазы М-MLV (Promega).

### **2.3.3. Амплификация кодирующей последовательности гена TP53 для FASAY**

На полученной кДНК TP53 была амплифицирована кодирующая последовательность гена - регион между 4 и 10 экзоном (кодон 42 - 374, соответствующие центральному домену). Праймеры для ПЦР реакции P3 и P4 были взяты из статьи [53]. P3 (5'-ATT-TGA-TGC-TGT-CCC-CGG-ACG-ATA-TTG-AA(S)C-3'), и P4 5'-ACC-CTT-TTT-GGA-CTT-CAG-GTG-GCT-GGA-GT(S)G-3'), где S - тиофосфатная связь предохраняет праймер от деградации полимеразой, обладающей 3'-5'-экзонуклеазной активностью. Реакция проводилась с полимеразой PFU (Promega). Реакция проводилась в объеме 25 мкл: 2,5 мкл разведенной в 5 раз кДНК, полученной в ходе обратной транскрипции, 125нМ специфичных праймеров, 125нМ смеси нуклеотидов, 2,5 мкл стандартного буфера (Promega). Реакцию готовили на льду, пробирки ставили в предварительно прогретый до 95<sup>0</sup>С амплификатор C1000 (BioRad). Условия реакции включали в себя первоначальную денатурацию (92<sup>0</sup>С, 2,5 мин) и последующие 35 циклов: 92<sup>0</sup>С 30 сек, 57<sup>0</sup>С 30 сек, 72<sup>0</sup>С 240 сек, 72<sup>0</sup>С 15 мин.

При работе в оптимальных условиях PFU полимеразы допускает минимальное количество ошибок по сравнению с другими термостабильными полимеразы.

### **2.2.4. Подготовка плазмид pSS16 и pLS76 для FASAY**

Плазмидные вектора, любезно предоставленные нашей лаборатории Prof. RNDr. J. Smardova (Department of Pathology, University Hospital, 625 00 Brno, Czech Republic), были трансфецированы методом электропорации в ячейке Bio-Rad в штамм E. Colli MGS109, обладающий устойчивостью к пенициллину. Трансформанты высевали на селективную среду содержащую

ампициллин. Полученные отдельные колонии бактерий были выращены в среде LB до  $D_{600}=1$ . Из полученной культуры были выделены плазмиды pSS16 и pLS76 методом щелочного лизиса. Выделенная ДНК очищена центрифугированием в градиенте CsCl<sub>2</sub> и разбавлена в воде до концентрации 1 мг/мл.

#### **2.2.5. Рестрикция и очистка плазмиды pSS16**

Рестрикцию плазмиды pSS16 осуществляли рестриктазами HindIII и PseI в буфере W компании СибЭнзим, плаزمида несет концевые участки, гомологичные концам амплифицированного фрагмента гена *TP53*. для создания сайтов рекомбинации. После рестрикции проводили электрофорез в 1% LMP агарозе (Sigma). Нужный фрагмент вырезали и очищали с помощью фенол-хлороформной экстракции (щелочной фенол (pH=7)). Полученный после очистки материал готов для использования в FASAY.

#### **2.2.6. Рутинная культивация дрожжей**

Культивация дрожжей *S. cerevisiae* штамма y1G397, имеющего генотип MATaade2-1 leu2-3, 112trp1-1his3-11,15can1-100ura3-1 URA3 3xRGC::pCYC1::ADE. производили на среде YPD с избытком аденина (200 мкг/мл) во избежание появления спонтанных мутаций.

#### **2.2.7 Функциональный анализ разделенных аллелей TP53 в дрожжах**

Трансформацию производили с помощью линейного вектора pSS16, содержащего LEU2 - маркер положительной селекции по лейцину, методом литий-ацетатной трансформации. Дрожжевые клетки с помощью гомологичной рекомбинации встраивают участок *TP53* в вектор pSS16, содержащий в себе обе концевые последовательности гена *TP53*. Клетки 2-3 дня культивировали при температуре 30<sup>0</sup>C на среде YNB с добавлением гистидина, триптофана, урацила 20 мкг/мл и добавлением аденина до 5 мкг/мл. Экспрессия в дрожжевых клетках функционально-активного *TP53* приводит к активации транскрипции гена *ADE2*, т.к. ген *TP53* связывается с промотером гена *ADE2* и активировывает синтез аденина, необходимого для

роста дрожжевых клеток. Соответствующие дрожжевые колонии в этом случае бесцветны. Экспрессия мутантного *TP53* приводит к окрашиванию колоний в красный цвет: функция мутантного белка P53 нарушена, и выработка аденина за счет транскрипции гена *ADE2* не происходит. Запускается иной путь синтеза аденина, где промежуточный продукт обмена имеет красный цвет, он накапливается в клетке, придавая ей соответствующую окраску. Соотношение бесцветных и красных колоний демонстрирует количество функционально активных/мутантных *TP53*. Схема метода представлена на рисунке 4. Красные клетки хорошо отличимы от белых колоний, но максимум насыщенности приобретают после дополнительных 2 дней культивации при температуре 4°C. При наличии более 15% красных колоний проводили секвенирование гена *TP53* для подтверждения наличия мутации.



А. Схема метода FASAY



В. Пример чашек с трансформантами

#### **Рисунок. 4 Иллюстрация метода FASAY**

### **2.2. Подготовительные методы для ПЦР**

#### **2.2.1 Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови**

Мононуклеары периферической крови выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте Ficoll-Нураque (Sigma). Клетки лизировали добавлением WCLB-лизирующего буфера, после этого насыщенным раствором аммония хлорида (1/4 объема) осаждали белки, а нуклеиновые кислоты оставались в водном растворе. ДНК осаждали добавлением 3х объемов этанола. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при A260 нм.

#### **2.2.2 Выделение ДНК из колоний дрожжей для**

#### **проведения подтверждающего секвенирования**

Для анализа брали 5 красных колоний. Изолировано растущую колонию стерильной зубочисткой снимали с чашки Петри и суспендировали в 100 мкл воды, после 3 минутного кипячения остужали до комнатной температуры и добавляли 100 мкл водного хлороформа, перемешивали. Суспензию центрифугировали 5 минут, супернатант отбирали и добавляли по 5-10 мкл в повторную ПЦР реакцию (см. «Аmplификация кодирующей последовательности гена *TP53* для FASAY»). Полученные продукты красных колоний секвенировали для подтверждения наличия мутации в гене *TP53*.

#### **2.2.3 Очистка продуктов амплификации для проведения секвенирования**

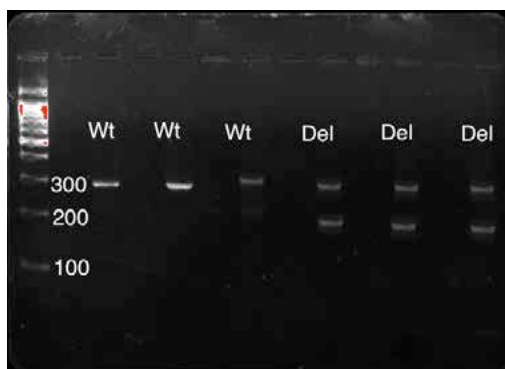
Аmplифицированный участок гена вносили в 1% агарозный гель и подвергали электрофорезу при 100В. Вырезали участок геля, содержащий необходимый продукт, ДНК выделяли с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля фирмы (Диа-М, Россия).

## 2.3 ПЦР-методики и секвенирование

### 2.3.1 Скрининг мутаций *NOTCH1*

Наличие делеции с.7544\_7545delCT, составляющей 80% всех мутаций в гене *NOTCH1* (34 экзон, домен PEST) было исследовано с помощью аллель-специфичной ПЦР (ARMS-PCR). Праймеры FW\_*NOTCH1*-5'-GTGACCGCAGCCCAGTT-3', FM\_*NOTCH1*-5'-TCCTCACCCCGTCCCGA-3', R*NOTCH1*-5'-AAGGCTTGGGAAAGGAAGC-3'. В реакцию объемом 25 мкл добавляют 2 мкл 50нг/мкл геномной ДНК, 0,1 мМ FW праймера, 0,5 мМ FM\_*NOTCH1* праймера и 0,3 мМ праймера R*NOTCH1*, 2,5-кратный буфер, 2,5-кратные dNTP, 2,5-кратный магний, 0,2 мкл Tag полимеразы (Синтол, Россия). Параметры реакции: 92 °С, (2,5 мин) и последующие 35 циклов из 95 °С 30сек, 57 °С 30сек, 72 °С 40 сек, 72 °С 10 мин.

Чувствительность данного метода позволяет выявить наличие делеции даже при 10% мутантных аллелей. Наличие делеции подтверждалось секвенированием по Сэнгеру. На рисунке 5 показан результат электрофореза в 2% агарозе продуктов аллель-специфичной ПЦР, дикий вариант гена *NOTCH1* (Wt) имеет 1 полосу напротив контрольной полосы 300 bp маркера молекулярного веса. При наличии делеции в гене *NOTCH1* происходит амплификация с обоих прямых праймеров, что при проведении электрофореза визуализируется, как появление дополнительной полосы продукта чуть ниже 200 bp маркера молекулярного веса (Del).



**Рисунок 5. Результат электрофореза продуктов аллель-специфичной ПЦР**

При наличии делеции в гене *NOTCH1*, выявленной с помощью аллель-специфичной ПЦР на электрофорезе визуализируется полоса продукта размером в 183 нуклеотида и располагается ниже полосы дикого аллеля. Продукт амплификации дикого аллеля имеет размер 283 нуклеотидов и располагается на уровне 300 относительно маркера молекулярного веса и служит положительным контролем прохождения ПЦР реакции.

### 2.3.2 Амплификация последовательностей генов TP53, BIRC3, SF3B1 и NOTCH1 и секвенирование по Сэнгеру

Последовательности генов *BIRC3* (экзоны 6-9, RefSeq NM\_001165.3), *TP53* (экзоны 4-8, RefSeq NM\_000546.4), *NOTCH1* (PEST домен; RefSeq NM\_017617.2) и *SF3B1* (экзоны 14-16, RefSeq NM\_012433.2) были амплифицированы с помощью ПЦР (условия представлены в таблице 3), очищены с помощью BigDye X terminator (Promega) и исследованы методом секвенирования по Сэнгеру с помощью Sanger ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Полученные последовательности генов были сопоставлены с соответствующими референсными последовательностями. При анализе был использован программный пакет Mutation Surveyor Версия (SoftGenetics). Синонимные мутации, полиморфизмы, (dbSNP13, базы данных Ensembl), были исключены из анализа. Молекулярные исследования проводились вслепую относительно клинических данных.

	Последовательность праймеров	Состав ПЦР реакции	Условия ПЦР	
<b>Ген <i>BIRC3</i></b>				
6 экзон	F -CCT AAT ATg TgT TAA ATT CTT TgT TCC	Общий объем -25 мкл ДНК - 100 ng	1. 3 мин – 95 <sup>0</sup> С	
	R -AgA CTg ATA TCA AAT CCT TAT gAA AAT		2. 30 с – 95 <sup>0</sup> С	
7 экзон	F -Tgg AAg gAA gTT TgT gAg CA	Магний - 1.5 mM Нуклеотиды - 0.1 mM	3. 40с - 58 <sup>0</sup> С	
	R -AAg AgC gTA TTT TCA ATT gAC TTA gA		4. 40с - 72 <sup>0</sup> С	
8 экзон	F -TCA TAg TAA TgC TTT TTC TTT TTC TCC	Полимераза Tag -0.25 Праймеры - 167 nM (каждый)	2.-4.- повтор 40 раз	
	R -Agg CAg TTT gCT TCT TCA gTg		5. 10 мин - 72 <sup>0</sup> С	
9 экзон	F -TgA AGA AgC AAA CTg CCT TTT AT			
	R- AAA gTT TAg ACg ATg TTT Tgg TTC			
<b>Ген <i>TP53</i></b>				
4 экзон	F-TgA ggA CCT ggT CCT CTg AC	Общий объем -25 мкл ДНК - 50 ng	1. 3 мин - 95 <sup>0</sup> С	
	R-AgA ggA ATC CCA AAg TTC CA		2. 30 с - 95 <sup>0</sup> С	
5-6 экзон	F-TgT TCA CTT gTg CCC TgA CT	Магний - 1,8 mM Нуклеотиды - 0.1 mM	3. 40с - 62 <sup>0</sup> С	
	R-TTA ACC CCT CCT CCC AgA gA		4. 40с - 72 <sup>0</sup> С*	
7 экзон	F-CTT gCC ACA ggT CTC CCC AA	Полимераза Tag -0.25 Праймеры - 167 nM	5. 30 с - 95 <sup>0</sup> С	
	R-A ggg gTC AgA ggC AAg CAg A		6. 40с - 60 <sup>0</sup> С	
			Снижение на 0,5 <sup>0</sup> С каждые 3 цикла до 60 <sup>0</sup> С	
			5.-7. – повтор 30	



8 ЭКЗОН	F-ТТg ggA gTA gAT ggA gCC T	(каждый)	7. 40с - 72 <sup>0</sup> С	раз
	R-AgT gTT AgA CTg gAA ACT TT		8. 10 мин - 72 <sup>0</sup> С	
<b>Ген <i>SF3B1</i></b>				
14 ЭКЗОН	F – Tgg AAA gAA ATg gTT gAA gA	Общий объем -25 мкл ДНК - 100 ng	1. 3 мин - 95 <sup>0</sup> С	
	R – AAg ACC CTg TCT CCT AAA gAA AAA		2. 30 с – 95 <sup>0</sup> С	2.-4. - повтор 30 раз
15 ЭКЗОН	F – TgC AgT TTg gCT gAA TAg TTg	Магний - 1,2 mM Нуклеотиды - 0.1 mM	3. 40с - 58 <sup>0</sup> С	
	R – CCA ATA gCC TTC AAg AAA gCA g		5. 10 мин - 72 <sup>0</sup> С	
16 ЭКЗОН	F – CAC TTT AAA ATT CTg TTA gAA CCA TgA	Полимераза Tag -0.25 Праймеры - 167 nM		
	R – gCT gAA gCA gCA ACT CCT TA			
<b>Ген <i>NOTCH1</i> (PEST домен)</b>				
34 ЭКЗОН	F-TCC ACC AgT TTg AAT ggT CA	Общий объем -25 мкл ДНК - 100 ng Магний - 1,8 mM Нуклеотиды - 0.1 mM Полимераза Tag- 0.25 Праймеры - 167 nM	1. 3 мин - 95 <sup>0</sup> С	
	R-AAg gCT Tgg gAA Agg Aag C		2. 30 с – 95 <sup>0</sup> С	2.-4. - повтор 42 раза
		3. 40с - 60 <sup>0</sup> С	4. 40с - 72 <sup>0</sup> С	
		5. 10 мин - 72 <sup>0</sup> С		

**Таблица 3. Последовательность праймеров и условия ПЦР для амплификации генов *TP53*, *BIRC3*, *SF3B1* и *NOTCH1***

#### **2.4 Анализы, проведенные другими исследователями в рамках протокола MLSG08**

В рамках протоколов MLSG08 проводились следующие исследования:

Мутационный статус генов варибельного региона иммуноглобулинов. Исследование проводилось в лаборатории Сударикова А.Б. старшим научным сотрудником Бидерман Б.В.

1. Цитогенетические aberrации исследовались методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с зондами LSI ATM, LSI p53, LSI D13S319, LSI 13q34 и Сер 12. - Зав. лаб. кариологии Обуховой Т.Н.

2. Исследование уровня бета-2-микроглобулина и соотношения легких цепей определялись методами белкового электрофореза с иммунофиксацией (Free Light Chain Assay).

3. Исследование минимальной остаточной болезни для оценки эффективности терапии проводили методами 4-цветной проточной цитофлуориметрии, а также с помощью аллель-специфичной ПЦР сотрудниками кафедры клинической лабораторной диагностики

Российской медицинской академии последипломного образования.

4. Иммунофенотипирование с целью первичной диагностики проводили на базе кафедры клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последипломного образования, благодарим за помощь в проведении исследования профессора Луговскую С.А.

## 2.6 Статистика

Непараметрические данные сравнивали с помощью двустороннего  $\chi^2$ -критерия с поправкой Йейтца. Различия считали достоверными при  $P=0,05$ . Кривые беспрогрессивной выживаемости и общей выживаемости строили по методу Каплан-Мейера и сравнивали с помощью лог-ранк метода. Многофакторный анализ проведен с помощью регрессионного анализа Кокса. Статистический анализ был выполнен с помощью программы STATISTICA 6.0.

## ГЛАВА 3. Результаты

### 3.1 Характеристика пациентов

Оценка эффективности различных режимов терапии проводилась для первичных больных В-ХЛЛ старше и моложе 60 лет. Пациенты В-ХЛЛ <60 лет, а также больные в возрасте от 60 до 70 лет с индексом коморбидности 6 и менее получали лечение FCR. Больных В-ХЛЛ старше 70 лет, а также пациентов в возрасте от 60 до 70 лет с индексом коморбидности 7 и более рандомизировали на группы с менее токсичным лечением по схеме FCR-Lite (вариант FCR с редукцией доз флударабина и циклофосфана). Схемы лечения представлены в табл. 4.

FCR

Циклофосфамид 250 мг/м<sup>2</sup> в дни 1–3

Флударабин 40 мг/м<sup>2</sup> в дни 1–3

Ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> в день 0 или 1 на 1 курсе; 500 мг/м<sup>2</sup> в день 0 или 1 на



курсах 2–6

FCR-Lite

Циклофосфамид 150 мг/м<sup>2</sup> в дни 1–3

Флударабин 32 мг/м<sup>2</sup> в дни 1–3

Ритуксимаб 375 мг/м<sup>2</sup> в день 0 или 1 на 1 курсе; 500 мг/м<sup>2</sup> в день 0 или 1 на курсах 2–6

#### **Таблица 4. Режимы терапии**

В рамках исследования до начала терапии была проведена оценка следующих прогностических маркеров: цитогенетических аберрацией методом FISH (флуоресцентная гибридизация *in situ*), мутационного статуса генов варибельного региона иммуноглобулинов, уровня бета-2-микроглобулина. Для выборки из 155 физически сохранных и молодых пациентов (до 60 лет) протокола MLSG08, получавших лечение по протоколу FCR, было проведено исследование генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* на наличие мутаций. Анализ экзонов генов, наиболее важных в функциональном отношении, был проведен путем секвенирования по Сэнгеру: в гене *TP53* (4-9 экзоны), *SF3B1* (14-16 экзоны), *BIRC3* (6-9 экзоны). Исследование гена *TP53* было так же проведено с помощью метода FASAY, скринингового метода позволяющего оценить функциональную активность гена *TP53* и выявить процентное соотношения мутантного и дикого аллеля. Исследование наиболее частой мутации гена *NOTCH1* - делеции c.7544\_7545delCT (34 экзон, домен PEST), составляющей 80% всех мутаций в этом гене при В-ХЛЛ, было проведено с помощью аллель-специфичной ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру для подтверждения наличия мутации. Данные результатов терапии были не известны до окончания исследования. Данные о прогностических маркерах (IgVH, уровне бета2-микроглобулина) и мутациях генов (*BIRC3*, данные FASAY) были доступны не для всех больных (точно число указано в описании исследования генов и соответствующих таблицах).

В большинстве случаев лечение проводилось амбулаторно. Качественные и количественные оценки течения заболевания, стадии, показаний к началу терапии, результатов лечения и качество ответа были сделаны к.м.н. Никитиным Е.А. Исходное обследование, промежуточная и финальная оценка эффекта проводились в ГНЦ. Качество ремиссии оценивали в соответствии с критериями международной рабочей группы по изучению хронического лимфолейкоза 2008 года [131].

### **3.2 Порядок оценки эффективности и характеристика вариантов ответа**

Эффект терапии оценивался по физикальным данным и анализу крови перед каждым следующим курсом. Финальная оценка проводилась дважды – в срок 1 и 3 месяц терапии, считая от даты последнего курса. У больных, у которых на фоне терапии была достигнута клиническая полная ремиссия (исчезновение лимфоузлов, снижение количества лимфоцитов в костном мозге <30%), исследовали минимальную остаточную болезнь. При промежуточной оценке минимальной остаточной болезни количество лейкозных клеток исследовали после бго цикла в крови и костном мозге. Компьютерная томография рекомендовалась всем больным в клинической полной ремиссии.

Под полной ремиссией понимали исчезновение всех проявлений болезни. Под частичной - сокращение опухоли более, чем на 50%. Прогрессию констатировали, если имелась отрицательная динамика со стороны, по крайней мере, одного проявления опухоли (рост лимфоцитоза, рост лимфоузлов, рост селезенки). Наконец, к стабилизации относили случаи, при которых ответ на терапию был в пределах от -49% до +49%. Графическая демонстрация критериев эффективности приведена на рисунке 6.



**Рисунок 6. Графическая демонстрация критериев эффективности терапии**

### **3.3 Фаза наблюдения и временные показатели эффективности**

После завершения терапии пациентов наблюдали 1 раз в 3 месяца на протяжении 5 лет. Временные показатели эффективности:

Беспрогрессивная выживаемость: интервал от первого дня терапии до одного из следующих событий:

- рецидива после полной или частичной ремиссии
- появления признаков прогрессии на фоне терапии
- назначения нового варианта терапии по поводу рецидива
- смерти (от В-ХЛЛ, осложнений В-ХЛЛ или осложнений терапии)

Продолжительность ответа: интервал от последнего дня последнего цикла до рецидива (показатель учитывался только у больных с полной и частичной ремиссией)

Общая выживаемость - интервал от первого дня терапии до смерти или последнего визита.

Под первичной резистентностью к флударабину понимали прогрессию на фоне лечения или рецидив в течение 24 месяцев от начала лечения.

Рецидив констатировали только у больных, достигших полной или частичной ремиссии. Критерии рецидива совпадали с критериями прогрессии.

### 3.4 Сравнительная характеристика больных, принявших участие в протоколе

Характеристика	Всего, n=155	Мужчины, n=102 (66%)	Женщины, n=53 (34%)	P	Отношение частот муж/жен
Медиана возраста (разброс)	59 (33-79)	58	60	-	
Стадии Binet: A	13 (8%)	11(10%)	2(4%)	0,03	1:5
B	114(73%)	81(80%)	33(62%)	0,4	2,5:1
C	27(17%)	19(9%)	8(15%)	0,84	2,3:1
Цитогенетика					
Нормальный кариотип (FISH)	29(18%)	21(21%)	8(15%)	0,6	2,6:1
del13q14	76(49%)	49(48%)	27(51%)	0,3	1,8:1
tris12	21(14%)	16(16%)	5(9%)	0,4	3:1
del11q23	30(19%)	22(22%)	8(15%)	0,9	2,7:1
del17p	12(8%)	10(10%)	2(4%)	0,5	5:1
IgVHmt/ IgVH unmt	82(53%)/ 43(27%)	89(88%)/ 28(27%)	45(85%)/ 15(28%)	0,9	2:1/2:1
mt TP53	16(10%)	10(10%)	6(11%)	1	1,5:1
mt NOTCH1	26(17%)	20(20%)	6(11%)	0,3	3,3:1
mt SF3B1	25(16%)	18(18%)	7(13%)	0,6	2,5:1
mt BIRC3	4(5%) из 81	4(5%) из 81	0(0%)	0,3	-
B2-M>4 (n=132)	81 (61%)	59 (58%)	23 (43%)	0,6	2,7:1

**Таблица 5. Распределение прогностических маркеров у больных В-ХЛЛ, среди мужчин и женщин**

\*Данные по мутационному статусу и уровню бета2-микроглобулина были доступны не для всех пациентов

Распределение основных прогностических параметров соответствует выборке первичных больных, имеющих показания к началу терапии (табл. 5). Медиана возраста больных составила 59 лет (от 39 до 79 лет). В исследование приняло участие 66% мужчин и 34% женщин. Стадия А была констатирована у 8% (13 из 155) больных, стадия В у 73% (114 из 155), стадия С у 21% (27 из 155). Частота распределения хромосомных нарушений также типична для В-ХЛЛ: del13q14 - 49% (76 из 155), трисомия 12 хромосомы – 14% (21 из 155), делеция 11q – 19% (12 из 155) и делеция 17p–8%(12 из 155)), нормальный кариотип – 18% (29 из 155). Высокий уровень бета-2-микроглобулина (>4 мг/л) был выявлен у 61%

больных, 53% (82 из 125) больных имели вариант без мутаций вариабельного региона генов иммуноглобулинов.

Для констатации факта прошедшей соматической гипермутации в клетках В-ХЛЛ использовалась граница гомологии 98%. Если последовательность клонального VH-гена на 98% и более совпадала с последовательностью одного из герминальных VH-генов, считали, что соматической гипермутации не было. Если сходство последовательности клонального VH-гена было менее 97,9%, считали, что клетка предшественница клона В-ХЛЛ у данного больного подвергалась соматической гипермутации. Граница в 98% гомологии установлена исходя из возможного аллельного полиморфизма герминальных VH-генов.

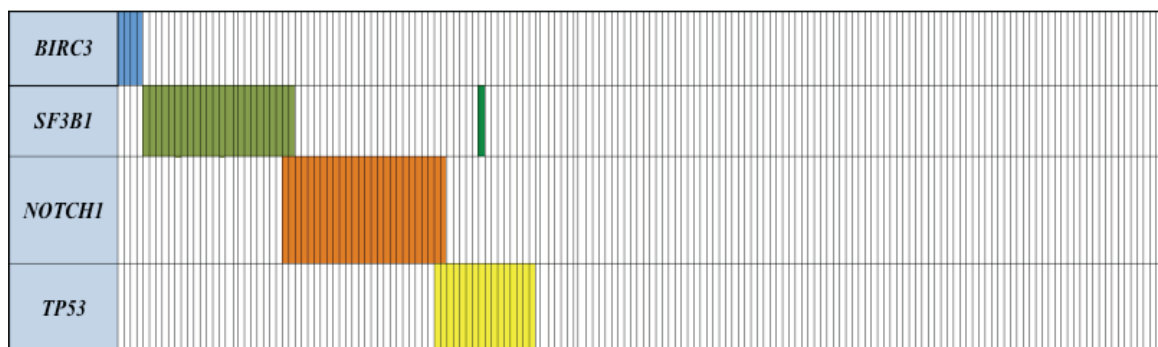
По данным многочисленных исследований показано, что мужчины в болеют в 2 раза чаще, чем женщины. Чтобы оценить репрезентативность выборки и оценить влияние пола на распределение прогностических маркеров, мы провели сравнение выборки мужчин и женщин (табл. 4).

Статистически значимые различия выявлены в стадии заболевания на момент начала терапии: женщин в стадии А больше, чем мужчин на 25%. Частота распределения остальных прогностических маркеров характерна для В-ХЛЛ выполняется условие, что частота всех клинико-лабораторных показателей выше у мужчин, чем у женщин, так как заболеваемость среди женского пола ниже, и не связаны с полом.

### **3.5 Статистика выявления мутаций**

Выявлено 73 мутации в исследуемых генах. Мутация хотя бы в одном из исследуемых генов выявлена в 45% случаев (68 из 155), двух генов одновременно в 3% случаев (у 5 из 155) (таблица 6). Мутации представлены миссенс мутациями 61% (43 из 73) и в 41% делециями (30 из 73), расположенными в экзонах или сайтах сплайсинга. Полиморфизмы генов или синонимные мутации (за исключением полиморфизма 72 кодона гена *TP53*) были исключены из анализа. Все обнаруженные мутации являются гетерозиготными. Миссенс-мутация в 30 случаев произошла за

счет транзиции в 10 случаях за счет трансверзии. Делеции в основном представлены утратой 2-х оснований (ген *NOTCH1*), в одном случае - одного основания (ген *BICR3*), в одном случае выявлена протяженная делеция (ген *TP53*). В таблице 7 представлены данные ассоциации мутаций генов с клинико-лабораторными показателями.



**Таблица 6. Статистика выявленных мутаций**

Характеристика	Всего, n=155	Мужчины, n=102 (66%)	Женщины, n=53 (34%)	P	Отношение частот муж/жен
mt <i>TP53</i>	16(10%)	10(10%)	6(11%)	1	1,5:1
mt <i>NOTCH1</i>	26(17%)	20(20%)	6(11%)	0,3	3,3:1
mt <i>SF3B1</i>	25(16%)	18(18%)	7(13%)	0,6	2,5:1
mt <i>BIRC3</i>	4(5%) из 81	4(5%) из 81	0(0%)	0,3	-

**Таблица 7. Распределение выявленных мутаций среди мужчин и женщин**

Мы провели сравнение распределения мутаций среди мужчин и женщин, из таблицы видно, что частота встречаемости мутаций так же выше среди мужчин, чем среди женщин в 1,5-3,3 раза.

### **3.4.1 Мутации в гене TP53**

#### ***3.4.1.1 Результаты секвенирования гена TP53***

При секвенировании гена *TP53* (4-9 экзоны) выявлены мутации у 16 из 155 (10%) больных. В 15 случаях – это миссенс-мутации, расположенные в ДНК-связывающем домене, в 1 случае - протяженная делеция. В четвертом экзоне была выявлена мутация у одного пациента (p.R110L), у 1 пациента выявлена мутация в 6 экзоне (p.E224A), в 7 экзоне выявлена мутация у 6 больных (p.E244K, p.R248G, p.I255F, p.M237I,

p.G245D, 1 протяженная делеция) и мутации у 8 больных выявлены в 8-9-ом экзонах (p.R282G №2, p.C283F, p.C283S, p.R283C, p.V272M, p.R273H, p.C275F). Сеймсенс мутации p.R213R №3 в 6 экзоне и p.P309P №1 в 9 экзоне были исключены из анализа данных (табл. 8).

Вид мутации	4 экзон		5 экзон		6 экзон		7 экзон		8 экзон		9 экзон	
Миссенс-мутации, n=12	p.R110L	1	Нет		p.E224A	1	p.E244K	1	p.G242D	1	Нет	
							p.R248G	1	p.V272P	1		
							p.I255F	1	p.R282G	2		
							p.G245D	1	p.R283C	1		
							p.I255F	1	p.C283F	1		
							p.M237I	1	p.C283S	1		
									p.C275F	1		
Сеймсенс мутации, n=4					p.R213R	3						p.P309P

**Таблица 8. Статистика выявленных мутаций в гене TP53**

При исследовании ассоциации с другими клинико-лабораторными показателями В-ХЛЛ выявлена статистически значимая связь наличия мутации в гене TP53 с делецией хромосомы 17p (p=0,001) и IgVH без мутаций (p=0,01), повышенным уровнем бета2-микроглобулина (p=0,01) - таблица 9.

Характеристика	Всего, n=155	TP53 mt, n=16	TP53 wt, n=139	P
Медиана возраста (разброс)	59 (33-79)	60 (44-79)	59 (33-77)	-
Мужчины/ Женщины	105/50	10/6	91/44	0,77
Стадии Binet: А	12	1 (6%)	10 (8%)	0,78
В	114	12 (75%)	100 (72%)	0,93
С	27	3 (19%)	23 (17%)	0,4
Нормальный кариотип	29	3 (19%)	29 (21%)	0,75
del13q14	76	7 (44%)	68 (49%)	0,37
tris12	21	0 (0%)	21 (15%)	0,13
del11q23	30/13	1 (11%)	28 (20%)	0,34
del17p	12	9 (56%)	2 (1%)	<b>0,001</b>
IgVHmt/ IgVHunmt	82/43	11 / 3 (69% / 19%)	71 / 39 (51% / 24%)	<b>0,01</b>
mt TP53	16	-	-	-
mt NOTCH1	26	3 (19%)	23 (17%)	0,07

mt <i>SF3B1</i>	25	1 (6%)	24 (17%)	0,23
mt <i>BIRC3</i>	4 из 81	0 (0 %)	4 (3 %)	0,46
B2-M>4	81 из 132	9 из 9	70 из 119	<b>0,01</b>

**Таблица 9. Корреляция мутаций гена *TP53* с другими прогностическими маркерами**

#### **3.4.1.2 Результаты метода FASAY**

Для исследования функциональной активности и определения частоты мутантного аллеля было проведено исследование гена *TP53* с помощью метода FASAY. Исследование проведено у 38 пациентов из 155, что связано с доступностью РНК, выделенной до начала терапии, только для этих пациентов. При исследовании мутаций *TP53* методом FASAY в качестве границы, дискриминирующей положительный или отрицательный результат использовали 15% красных колоний. Данное рубажное значение было получено экспериментально при исследовании 30 образцов РНК крови здоровых доноров, при этом количество красных колоний не превышало 10-13%.

В 25 случаях из 38 процент красных колоний не превышал рубажного значения, в среднем составлял 8% (6%-13%), для этих образцов не были выявлены мутации в гене *TP53* и/или делеции 17p хромосомы (таблица 10). В 13 случаях процент красных колоний превышал рубажное значение, однако наличие мутации при помощи секвенирования было подтверждено в 11 случаях из 13. Отсутствие мутации в 2-х случаях скорее всего связано с деградацией РНК в процессе хранения, либо функциональным дефектом, обусловленным мутациями за пределами секвенированного района гена. Так же необходимо отметить, что процент делеции 17p, если она выявлена при помощи FISH-исследования, близок в численном выражении проценту красных колоний, что свидетельствует об общности механизмов делеции и мутации 17 хромосомы и гена *TP53*.

<b>№</b>	<b>FASAY, % красных колоний</b>	<b><i>TP53</i>, мутации</b>	<b>FISH del17p</b>
1	94%	8 экзон p.R282G	92%



2	88%	7 экзон p.M237I	91%
3	78%	7 экзон p.I255F	81%
4	73%	8 экзон p.R282G	84%
5	73%	7 экзон p.G245D	93%
6	57%	8 экзон p.C283F	Нет
7	48%	7 экзон p.E224A	Нет
8	36%	8 экзон p.R283C	Нет
9	25%	8 экзон p.C275F	23%
10	23%	6 экзон p.E224A	Нет
11	23%	8 экзон p.V272M	Нет данных
12	17%	Нет	Нет
13	16%	Нет	Нет
14-38	6%-13%	Нет	Нет

**Таблица 10. Результаты метода FASAY, данные секвенирования и FISH анализа.**

### **3.4.1.3 Анализ полиморфизма 72 кодона гена TP53**

В гена *TP53* идентифицировано порядка 10 полиморфизмов. Считается, что полиморфизм 72 кодона может оказывать влияние на течение заболевания за счет более сильной апоптогенной активности одного из вариантных состояний аллеля. Данный SNP расположен в 72 кодоне (4 экзон). В результате замены цитозина на гуанин кодируется или аргинин (Arg) или пролин (Pro). Таким образом могут транслироваться один или два варианта белка. Считается, что аргинин в 72 кодоне более эффективен в отношении активации апоптоза за счет проникновения в митохондрии и высвобождения цитохрома C. Вариант с содержанием пролина более эффективен в отношении запуска механизмов репарации и остановки клеточного цикла в G2 фазе клеточного цикла. Таким образом, полиморфизм этого кодона возможно оказывает влияние на течение заболевания: находясь в гомозиготном состоянии усиливает апоптоз за счет 100% вклада только в один из механизмов защиты клетки от мутации. Или гетерозиготное состояние может давать некоторые преимущества за счет равноценной работы обоих механизмов.

Полученные нами данные характеризуют преобладание гомозиготного состояния Arg/Arg - 57%, Arg/Pro – 35%, Pro/Pro – 8%, частоты

распределения характерны для европейской популяции. Сравнение биологических и клинических показателей В-ХЛЛ при гомозиготном и гетерозиготном состоянии аллеля 72 кодона статистически значимых различий не выявило, кроме повышенного уровня бета2-микроглобулина при сравнении гетеро- и гомозиготного состояний аллеля (табл 11).

	1	2	3	P1	P2
Характеристика	Arg/Arg, n=48	Arg/Pro, n=29	Pro/Pro, n=7	(1 vs 3)	(1 vs. 2)
Медиана возраста (разброс)	55	55,5	54	0,91	0,94
Мужчины/Женщины	33(68%) - 15(31%)	22(76%) – 7(24%)	5(71%) – 2(30%)	0,66	0,69
Стадии Binet: A	5(10%)	2(7%)	0 (0%)	0,27	0,71
B	33(69%)	23(79%)	6(85%)	0,27	0,65
C	9(19%)	3(10%)	1(14%)	0,53	0,51
Нормальный кариотип	9(19%)	9(31%)	1(14%)	0,46	0,15
del13q14	25(52%)	10(35%)	5(71%)	0,18	0,07
tris12	8(17%)	5(17%)	0(0%)	0,79	0,75
del11q14	10(21%)	3(10%)	2(29%)	0,24	0,19
del17p	4(8%)	2(7%)	0(0%)	0,52	0,85
IgVHmt / IgVHunmt	24(50%)	16(55%)	4(57%)	0,85	0,96
mt <i>TP53</i>	7(15%)	3(10%)	0(0%)	0,62	0,83
mt <i>NOTCH1</i>	3(6%)	4(14%)	1(14%)	0,41	0,72
mt <i>SF3B1</i>	10(21%)	7(24%)	3(43%)	0,98	0,85
mt <i>BIRC3</i>	0(0%)	1(3%)	0(0%)	0,46	0,46
B2-M >4 мг/л	27(56%)	9(31%)	5(71%)	0,15	<b>0,03</b>

**Таблица 11. Полиморфизм 72 кодона гена *TP53* и его корреляция с прогностическими маркерами**

### **3.4.2 Мутации в гене *NOTCH1***

Наиболее часто встречающаяся мутация в гене *NOTCH1* у больных В-ХЛЛ расположена в PEST-домене, представляет собой делецию 2-х нуклеотидов (с.7541\_7542delCT), была выявлена с помощью аллель-специфичной ПЦР у 26 пациента из 155. Все образцы были так же проанализированы с помощью секвенирования по Сэнгеру, которое подтвердило наличие мутации.

В группе больных с мутацией в гене *NOTCH1* чаще выявляется трисомия 12 хромосомы (10/26 vs 11/117, p=0,006), немутированный вариант генов иммуноглобулинов (25/26 vs 53/117, p=0,025), отсутствие мутаций в гене *SF3B1* (1/26 vs 21/117, p=0,04), таблица 12.

Характеристика	Всего, n=155	<i>NOTCH1</i> mt, n=26	<i>NOTCH1</i> wt, n=129	P
Медиана возраста (разброс)	59 (33-79)	62 (47-79)	59 (33-74)	-
Мужчины/ Женщины	105/50	16/10	77/40	0,03
Стадии Binet: А	12	2 (6%)	10 (9%)	0,97
В	114	18 (71%)	96 (76%)	0,5
С	27	6 (23%)	21 (15%)	0,42
Норм. кариотип	29	5 (26%)	24 (21%)	0,94
del13q14	76	9 (36%)	63 (54%)	0,18
tris12	21	10 (32%)	11 (9%)	<b>0,001</b>
del11q23	30/13	4 (23%)	24 (17%)	0,87
del17p	12	1 (6%)	7 (7%)	0,73
IgVHmt / IgVHunmt	82/43	21 – 4 (81-15%)	61-39 (61-39%)	<b>0,03</b>
mt <i>TP53</i>	16	3 (12%)	13 (10%)	0,72
mt <i>NOTCH1</i>	26	-	-	-
mt <i>SF3B1</i>	25	1 (3%)	24 (19%)	<b>0,04</b>
mt <i>BIRC3</i>	4 из 81	0 (0%)	4 (3 %)	0,71
B2-M>4	81 из 139	16 из 21	62 из 104	0,8

**Таблица 12. Сравнение распределения прогностических маркеров у больных с мутациями в гене *NOTCH1* и без мутаций.**

### **3.4.3 Результаты секвенирования гена *SF3B1***

Исследование гена *SF3B1* проведено у 155 больных при помощи секвенирования. Мутации были обнаружены у 25 (16%). Мутации *SF3B1*, выявленные в данном исследовании расположены в 14 – 16 экзонах, в области консервативного региона гена в пределах 4 – 9-ого мотивов повторов HEAT. Мутации во всех случаях были представлены миссенс-мутациями: в 14 экзоне выявлено 7 миссенс-мутаций из 25 (28%), в 15 экзоне 14 (56%), в 16 экзоне - 4 (16%). Наиболее часто выявляемая мутация

p.E700K в 15 экзоне (9 из 25) и p.G742D в 16 экзоне (4 из 25), таблица 13.

Мутация гена *SF3B1* ассоциирована с отсутствием делеции 17 хромосомы (0/24 vs 10/122 p=0,001). Статистически значимой ассоциации с другими биологическими и прогностическими параметрами не выявлено (табл. 14).

Вид мутации	Кол-во	<i>SF3B1</i>					
		14 экзон		15 экзон		16 экзон	
Миссенс-мутации	25	p.K666E	4	p.K700E	10	p.G742D	3
		p.L674P	1	p.G740E	1	p.I774T	1
		p.T663I	1	p.T703I	3	-	
		p.R625H	1	-		-	
Сеймсенс мутации	1	p.L644L	1	-		-	
Миссенс мутации сайта сплайсинга	2			32910G>A	2		
Делеции	0	-		-		-	

**Таблица 13. Статистика выявленных мутация в гене *SF3B1***

Характеристика	Всего, n=155	<i>SF3B1</i> mt, n=25	<i>SF3B1</i> wt, n=130	P
Медиана возраста (разброс)	59 (33-79)	58 (41-67)	59 (33-77)	-
Мужчины/ Женщины	105/50	18/7	84/40	0,3
Стадии Binet: А	12	0	12 (9%)	0,09
В	114	19 (76%)	95 (73%)	0,8
С	27	6 (24%)	21 (16%)	0,16
Норм. кариотип	29	10 (40%)	26 (20%)	0,11
del13q14	76	12 (48%)	63 (49%)	0,9
tris12	21	1 (4%)	20 (15%)	0,13
del11q23	30/13	4 (16%)	26 (20%)	0,64
del17p	12	0 (0%)	12 (9%)	<b>0,001</b>
IgVHmt/ gVHunmt	82/43	14/ 5 (56-20%)	68 / 37 (52-28%)	0,62
<i>mt TP53</i>	16	0 (0%)	16 (12%)	0,07
<i>mt NOTCH1</i>	26	1 (4%)	25 (19%)	0,06
<i>mt SF3B1</i>	25	-	-	
<i>mt BIRC3</i>	4 из 81	0 (0%)	4 (3%)	0,35
B2-M>4	81 из 139	11 из 21	69 из 106	0,3

**Таблица 14. Корреляция мутаций гена *SF3B1* с другими прогностическими маркерами.**

#### **3.4.4 Результаты секвенирования гена *BIRC3***

Мутация в гене *BIRC3* выявлена у 4 из 81 пациента (5%).

Делеция в гене *BIRC3* выявлена у 1 больного в 7 экзоне, повторяющаяся миссенс-мутация Q529L обнаружена у 3х больных из 81 в 8 экзоне. Формально проведено статистическое исследование наличия связи мутации в гене *BIRC3* с другими прогностическими маркерами при В-ХЛЛ, однако, в виду малого количества выявленных мутаций оценки не являются статистически достоверными, таблица 15.

<b>Характеристика</b>	<b>Всего, n=155</b>	<b><i>BIRC3</i> mt, n=4</b>	<b><i>BIRC3</i> wt, n=77</b>	<b>P</b>
Медиана возраста (разброс)	59 (33-79)	60 (49-62)	55 (40-72)	-
Мужчины/ Женщины	105/50	4/0	58/21	0,77
Стадии Binet: А	12	0 (0%)	7 (9%)	0,78
В	114	3 (75%)	59 (77%)	0,93
С	27	1 (25%)	12 (16%)	0,4
Норм. кариотип	29	2 (50%)	15 (20%)	0,75
del13q14	76	2 (50%)	39 (51%)	0,37
tris12	21	0 (0%)	13 (17%)	0,08
del11q23	30/13	0 (0%)	15 (20%)	0,34
del17p	12	0 (0%)	6 (8 %)	<b>0,001</b>
IgVHmt/IgVHunmt	82/43	3 – 1 (75-25%)	40-22 (56-29%)	0,2
mt <i>TP53</i>	16	0 (0%)	9 (12%)	-
mt <i>NOTCH1</i>	26	0 (0%)	10 (13%)	0,07
mt <i>SF3B1</i>	25	0 (0 %)	18 (24 %)	0,23
mt <i>BIRC3</i>	4 из 81	-	-	0,46
B2-M>4	81 из 139	2 из 3	39 из 66	1

**Таблица 15. Корреляция мутаций гена *BIRC3* с другими прогностическими маркерами.**

### **3.5 Анализ мутаций в генах *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3* при**

### нормальном кариотипе

Мы провели оценку взаимосвязи наличия мутаций генов *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3* в отсутствие хромосомных aberrаций (табл. 16). Из 29 больных с нормальным кариотипом по данным FISH мутации генов были обнаружены у 19. В одном случае мутации были обнаружены в 2х генах одновременно, во всех остальных случаях мутации были выявлены только в одном из исследуемых генов. Чаще всего мутации были идентифицированы в генах *SF3B1* (9 из 19) и *NOTCH1* (6 из 19). В гене *TP53* всего у 3 из 19 пациентов, в гене *BIRC3* – у 1 из 19. У 6 из 29 больных с нормальным кариотипом была выявлена первичная рефрактерность к проводимой терапии, рецидив заболевания у 15 из 29, хотя отсутствие хромосомных aberrаций считается прогностически благоприятным признаком, хотя отсутствие хромосомных aberrаций считается прогностически благоприятным признаком. Однако, молекулярный анализ генов позволяет в этих случаях выявить наличие иных генных аномалий, которые могут быть важны для прогноза течения заболевания и назначения терапии.

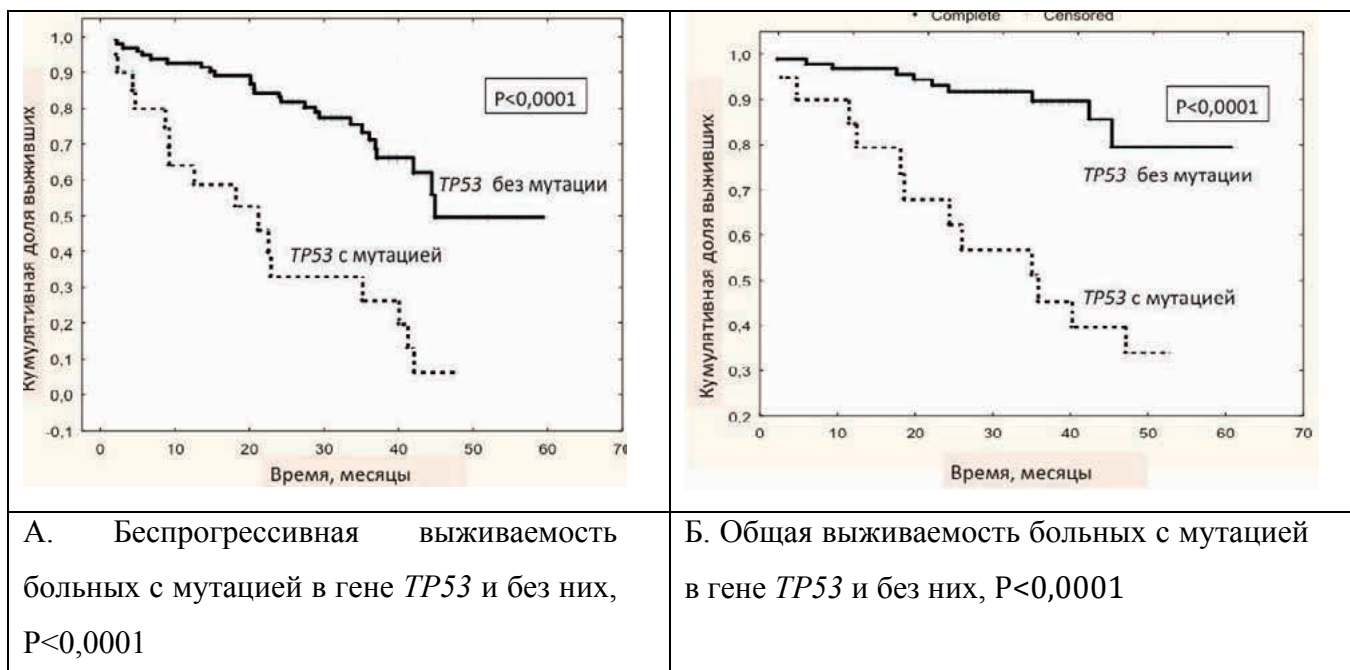
Ген	кол-во мутаций	Пол		Вариант IgHV		В2-М,
		муж	жен	IgVHmt	IgVHunmt	
<i>BIRC3</i>	1	1	-	-	1	1
<i>TP53</i>	3	1	2	3	0	2
<i>SF3B1</i>	9	7	2	6	2	3
<i>NOTCH1</i>	6	2	4	6	0	2

**Таблица 16. Распределение прогностических маркеров и мутаций в генах *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3* в группе пациентов с нормальным кариотипом**

### 3.6 Анализ выживаемости

График 1 демонстрирует, что общая и беспрогрессивная у больных с мутациями *TP53* достоверно хуже остальной группы пациентов. При медиане срока наблюдения за больными 34 месяца в группе больных *TP53* с мутациями умерло 12 пациентов из 16 (69%), все смерти были связаны с

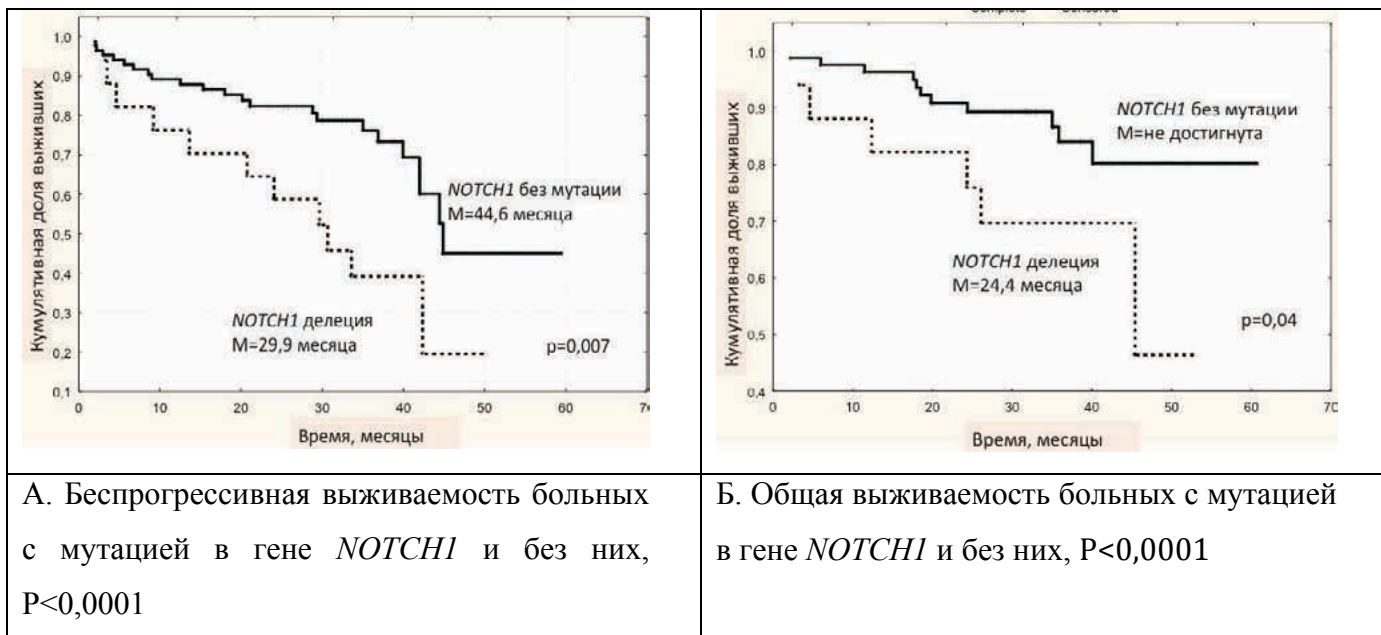
прогрессией. У пациентов только с мутациями TP53 без делеции 17p (данные на графике не представлены) прогноз благоприятнее: в группе больных с только с мутациями TP53 умерло 3 больных из 5, все больные с делециями и мутациями или только с делецией 17p умерли. Более благоприятное течение в группе только с мутациями TP53 свидетельствует о том, что клетки В-ХЛЛ в этом случае сохраняют большую химиочувствительность при терапии второй и последующих линий.



**График 1. Беспрогрессивная (А) и общая (Б) выживаемость больных В-ХЛЛ с мутациями в гене TP53**

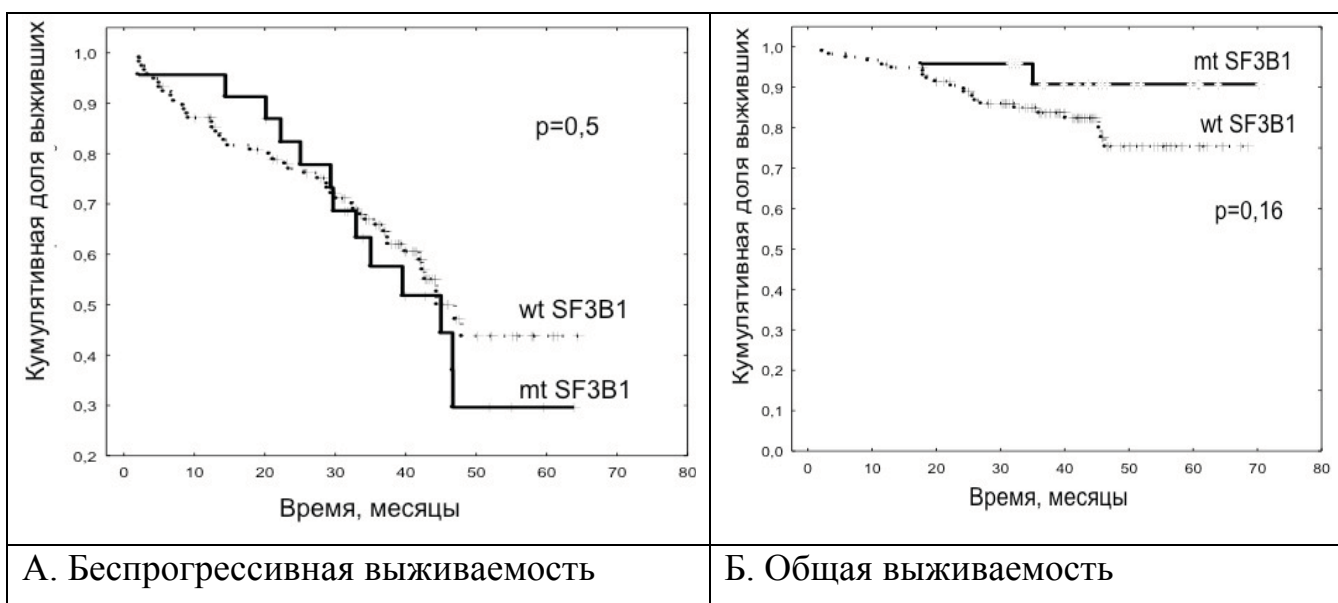
При исследовании общей выживаемости видно, что прогноз в группе пациентов с мутациями в гене *NOTCH1* был более благоприятный, чем в группе с мутациями TP53. Беспрогрессивная и общая выживаемость в группе пациентов с мутациями в гене *NOTCH1* была достоверно хуже остальной группы пациентов. При медиане срока наблюдения за больными 30 месяцев из 26 пациентов с мутацией гена *NOTCH1* умерло 6 больных – 23%, причем 1 больной имел мутации в генах *NOTCH1* и TP53 одновременно. 4 смерти из 6 были связаны с прогрессией. Однако у 10 из 20 (50%) выживших пациентов был рецидив заболевания. Кривые выживаемости представлены на графике 2.





**График 2. Беспрогрессивная (А) и общая (Б) выживаемость больных, получавших FCR, в зависимости от хромосомных нарушений и мутаций в гене *NOTCH1***

Анализ не выявил различий в общей и беспрогрессивной выживаемости для больных с мутациями в гене *SF3B1* (график 3).

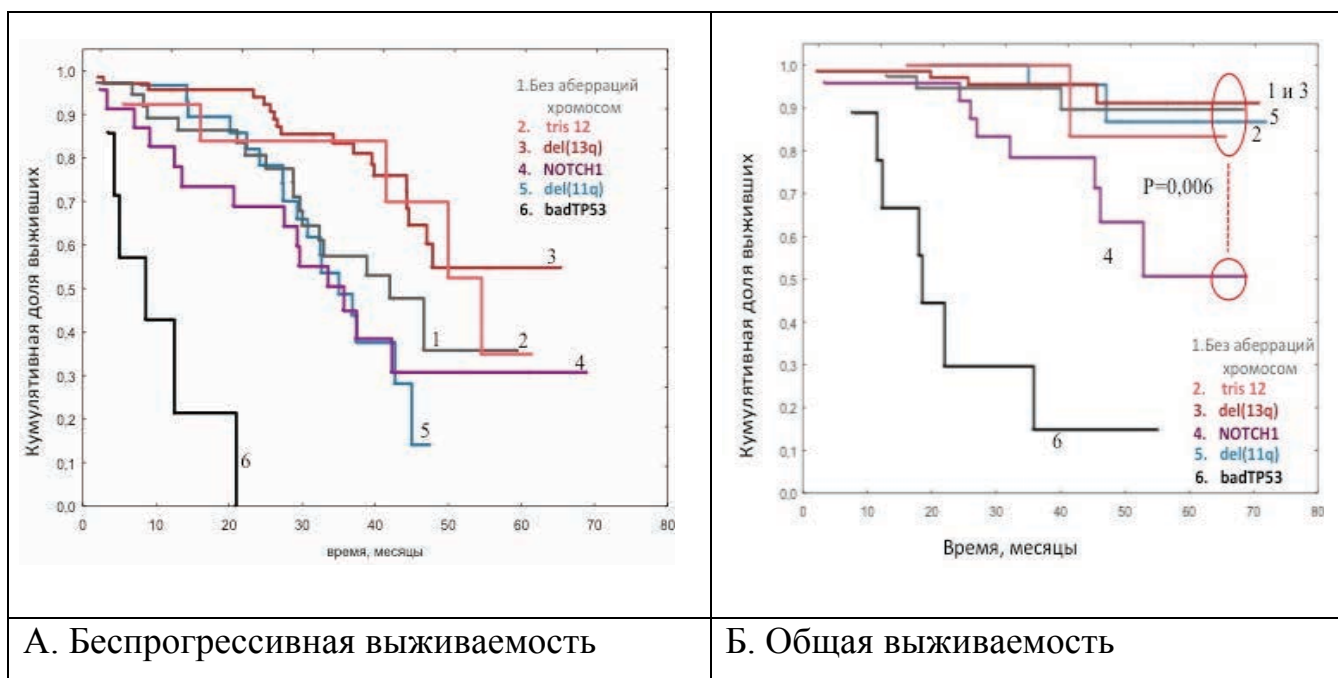


**График 3. Беспрогрессивная (А) и общая (Б) выживаемость больных, получавших FCR, в зависимости от хромосомных нарушений и мутаций в гене *SF3B1*.**

В виду малого количества случаев выявления мутаций гена *BIRC3* оценки связи с выживаемостью не являются статистически достоверными (графики не приведены).



По сравнению с группой наихудшего прогноза, пациенты с делецией 17p и мутациями *TP53* (*badTP53*), при исследовании беспрогрессивной выживаемости установлено, что наиболее благоприятный прогноз (график 4 (А)) у больных с *del13q* и трисомией 12. Группа больных без хромосомных aberrаций, с делецией 11q (при любых прочих данных) и с мутациями *NOTCH1* (при любых прочих данных) характеризуются промежуточным прогнозом. Наконец, Анализ общей выживаемости показал, что группа больных с мутациями *NOTCH1* наряду с нарушениями (кривая 4, график , Б) характеризуется более короткой выживаемостью по сравнению с остальными прогностическими параметрами. *NOTCH1* характеризует пациентов с первичной рефрактерностью к FCR, в соответствии с современным определением рефрактерности.



**График 4. Беспрогрессивная (А) и общая (Б) выживаемость больных, получавших FCR, в зависимости от хромосомных нарушений и мутаций в гене *NOTCH1* и *TP53*.** Больные с мутацией гена *TP53* и делецией 17 хромосомы на графике объединены в группу *badTP53*. Отдельные кривые для генов *SF3B1* и *BIRC3* не представлены, т.к. мутации этих генов достоверно не влияли на выживаемость больных.

### Многовариантный анализ

С учетом данных по выживаемости, полученных при анализе исследуемых генов мы провели многовариантный анализ. В тестируемой модели рассматривались только генетические маркеры, ассоциированные с прогнозом. В модели, сравнивающей различные маркеры, имеющие прогностическое значение рассматривались отсутствие делеции 13q, отсутствие трисомии 12 хромосомы, наличие делеции 11q, наличие делеции 17p и/или мутаций *TP53*, наличие мутаций *NOTCH1*, а также мутационный статус генов IgVH. При анализе беспрогрессивной выживаемости с отрицательным прогнозом ассоциировались делеция 17p, отсутствие делеции 13q, мутации *NOTCH1* и вариант В-ХЛЛ без мутаций IgVH. При анализе общей выживаемости прогностическое значение сохраняли только делеция 17p/мутации *TP53* и мутации *NOTCH1*. Таким образом, мутации *NOTCH1* выступают вторым фактором после повреждения *TP53*, определяющем прогноз (таблицы 17 и 18).

Параметр	Отношение рисков (95% ДИ)	P
Отсутствие Делеция Del(13q)	0,5 (0,37 – 0,67)	0,017
Отсутствие трисомии 12 хромосомы	0,5 (0,33 – 0,74)	0,08
Делеция Del(11q)	1,1 (0,82 – 1,48)	0,7
Делеции 17p/мутации <i>TP53</i>	5,6 (4,1 – 7,6)	0,000001
Мутации <i>NOTCH1</i>	0,53 (0,39 – 0,72)	0,038
Мутационный статус генов IgVH	0,35 (0,25 – 0,49)	0,001

**Таблица 17. Модель многовариантного анализа, основанная на беспрогрессивной выживаемости**

Параметр	Отношение рисков (95% ДИ)	P
Отсутствие Делеция Del(13q)	0,52 (0,29 – 0,95)	0,28
Отсутствие трисомии 12 хромосомы	0,91 (0,44 – 1,89)	0,9

Делеция Del(11q)	1,33 (0,71 – 2,46)	0,64
Делеции 17p/мутации <i>TP53</i>	13,09 (8,13 – 21,1)	0,000001
Мутации <i>NOTCH1</i>	0,4 (0,25 – 0,64)	0,05
Мутационный статус генов IgVH	0,31 (0,14 – 0,64)	0,11

**Таблица 18. Модель многовариантного анализа, основанная на общей выживаемости**

### 3.7 Ответ на терапию и прогноз

У 3 из 16 больных с мутацией гена *TP53* ответ на терапию оценивался как полная ремиссия, с последующим рецидивом у 1 больного. Частичная ремиссия была так же у 3 из 16, у всех в дальнейшем произошел рецидив. У 9 больных ответа на терапию не было. В группе больных с мутацией гена *SF3B1* (таблица 19) частота полных ремиссий составила 28% (7 случаев из 25), рецидив заболевания произошел у 1 больного из 7 с полной ремиссией (14%). Частичная ремиссия была у 15 больных из 25, у четырех наблюдался последующий рецидив. Прогрессия заболевания без ответа на терапию была у 1 больного. Среди 26 больных с мутацией гена *NOTCH1* полная ремиссия после полученной терапии была у 9 больных, рецидив заболевания произошел у 4 из 9. Частичная ремиссия была у 8 больных с последующим рецидивом у 3. Прогрессия – у 6 больных. В группе больных с мутацией гена *BIRC3* частичная ремиссия у 2 из 4, полная ремиссия у 1 больного, данные о дальнейшем состоянии больных нет. Прогрессия заболевания была у 1 больного из 4. В группе больных без мутаций в исследуемых генах полных ремиссий было 47% (42 из 89) с последующим рецидивом у 3. Частичная ремиссия у 36% (32 из 89), рецидив у 22% (7 из 32). Прогрессия заболевания была у 4 больных.

Группы больных	Больные с мутацией <i>SF3B1</i>	Больные с мутацией <i>NOTCH1</i>	Больные с мутацией <i>TP53</i>	Больные с мутацией <i>BIRC3</i>	Больные без мутации генов
Число больных	N = 25	N = 26	N = 16	N = 4	N = 89
Частичная ремиссия/ рецидив	15/4	8/3	3/3	2/?	32/7

Полная ремиссия/ рецидив	7/1	9/4	3/1	1/?	42/3
Первичная рефрактерность к флударабину	1	6	9	1	4

**Таблица 19. Сравнение ответа на терапию у больных с мутациями в генах *NOTCH1*, *TP53*, *SF3B1* и *BIRC3***

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Факторы прогноза при В-ХЛЛ

Появление технологии полногеномного секвенирования позволило изучить не просто отдельные мутации отдельных генов, а провести секвенирование семи целых геномов и более 200 целых экзотов у больных В-ХЛЛ [6, 142-143, 146]. Это дало нам понимание объема мутационного процесса и спектра нарушений сигнальных путей в клетке В-ХЛЛ, гены которых изменяются в результате мутаций. Показано, что геном при В-ХЛЛ может содержать до тысячи соматических мутаций на опухолевую клетку в неповторяющихся регионах генома. Эта мутационная нагрузка соответствует в среднем 0,9 мутации на 1.000.000 п.о. и 10 – 20 несинонимных мутаций на случай (разброс от 2 до 76). Повторяющихся мутаций, обнаруживаемых более, чем 2х в геномах больных В-ХЛЛ, около ста, они встречаются с частотой 3-5%. И только мутации нескольких генов выявляются в 10-15% случаев. Выявить доминирующий ген, мутация которого однозначно приводила бы к развитию В-ХЛЛ, не удалось. Мутации генов при В-ХЛЛ в нашем исследовании 2х видов: однонуклеотидные замены (миссенс-мутации), которые могут происходить во время репликации ДНК за счет ошибок встраивания ДНК-полимеразы, или миссенс-мутации, делеции (происходящие под воздействием мутагенов).

Анализ значения малочисленных мутаций представляет собой глобальную задачу. В этой работе мы сконцентрировались на исследовании мутаций 4 генов *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3*, которые, по предварительным данным, выявляются в клетках ХЛЛ относительно часто -

более, чем в 5% случаев. В ходе проведенного нами исследования было обнаружено 68 мутаций хотя бы одного из генов у 155 первичных больных ХЛЛ, нуждающихся в начале терапии. Это составляет 44%, что выше, чем в ряде подобных исследований. Данный факт может быть связан с нашей выборкой пациентов: (первичные больные, которым необходимо начало лечения/популяционные особенности), а так же с подходом к учету результатов. Мы констатировали мутацию в случае ее подтверждения в двух повторах при секвенировании гена с прямого и обратного праймера. Так же мы использовали ПЦР-диагностику, которая более чувствительна, чем секвенирование по Сэнгеру). Одна часть выявленных мутаций представлена миссенс-мутациями, приводящими к однонуклеотидной замене с изменением аминокислоты в функционально значимом домене генов. Однозначного понимания влияния мутаций данных генов на патогенез В-ХЛЛ нет.

Предполагают, что мутации гена *SF3B1* могут участвовать в развитии ХЛЛ за счет нарушения работы механизма сплайсинга или нарушения взаимодействия продукта гена *SF3B1* с другими белками. В результате нарушения сплайсинга могут изменяться структура и функции многих других белков сигнальных путей клетки. Мутации в гене *TP53* снижают функциональную активность белка p53, что приводит к нарушению механизмов репарации клетке или накоплению лимфоцитов с поврежденной ДНК, однако не подверженных гибели (или в меньшей степени подверженных) гибели в результате апоптоза.

Второй частый вид мутаций, выявленной в ходе исследования, – делеция двух или нескольких нуклеотидов. Мутации гена *NOTCH1*, представленные делецией 2-х оснований, расположены в домене PEST, приводят к накоплению в клетке стабильной активированной формы продукта гена *NOTCH1*. Стимуляция клеток ХЛЛ лигандами NOTCH увеличивает выживаемость клеток, а подавление сигнального пути NOTCH ускоряет спонтанный апоптоз клеток В-ХЛЛ [106]. Инактивирующие мутации в гене *BIRC3* приводят к сдвигу рамки считывания и появлению

стоп-кодонах или делеции участка гена. Ген *BIRC3*, наряду с *TRAF2* и *TRAF3*, входит в белковый комплекс, который негативно регулирует MAP3K14 серин-треонинкиназу - центральный неканонический активатор пути NF- $\kappa$ B [138]. Мутации в гене *BIRC3* приводят к неканонической активации пути NF- $\kappa$ B, что рассматривается как возможный механизм устойчивости к эрадикации болезни. Специфическое взаимодействие между защитными нишами микроокружения и лейкозными клетками активирует сигнальный путь NF- $\kappa$ B, что, в свою очередь, обеспечивает сигналы для выживания лейкоэмического клона через активацию ряда антиапоптотических генов [50].

В нашем исследовании мутации в гене *TP53* были выявлены у 10% больных (16 из 155), мутации в гене *NOTCH1* были найдены у 17% (у 26 пациентов из 155). Мутации в гене *SF3B1* были выявлены у 16% больных (у 25 из 155), мутации гена *BIRC3* только у 5% больных (4 из 81).

При секвенировании гена *TP53* (4-9 экзоны) выявлены мутации у 16 из 155 (10%) больных. При исследовании ассоциации с другими клинико-лабораторными показателями В-ХЛЛ нами и другими исследователями выявлена статистически значимая связь наличия мутации в гене *TP53* с делецией хромосомы 17p ( $p=0,001$ ) [8, 28, 74, 100] и IgVH [8, 11, 31, 54, 79, 113] без мутаций ( $p=0,01$ ), повышенным уровнем бета2-микроглобулина ( $p=0,01$ ) [111]. Не было выявлено ассоциации полиморфизма 72 кодона гена *TP53* с другими клинико-биологическими показателями или мутациями других генов. В исследовании Dong HJ и соавт. выявили корреляцию между высокой частотой мутаций *TP53* и гомозиготным состоянием пролина в 72 кодоне [46]. Данные исследования FASAY подтверждают инактивирующее влияние мутаций на функцию *TP53*, позволяют оценить частоту мутантного аллеля и могут быть использованы в скрининговых исследованиях. К недостаткам метода можно отнести трудоемкость подготовительных работ для его проведения и учета результатов, ограниченность применения для длительно хранимых образцов РНК [53, 118].

Ответ на терапию у больных с мутацией гена *TP53* был наихудший:

рецидив заболевания у 3 больных, первичная рефрактерность к лечению у 9 из 16. Так же короткая беспрогрессивная и общая выживаемость ( $p < 0,0001$ ). Данные о неблагоприятном прогнозе для больных с мутацией или делецией *TP53* подтверждены неоднократно. Анализ мутации гена *TP53* наряду с FISH исследованием позволит дополнительно выявить больных с первичной рефрактерностью к терапии, особенно в группе с нормальным кариотипом по данным FISH.

Частота мутаций *SF3B1* составила 16% (25 из 155), часто выявляемая мутация - p.E700K (9 из 25) и p.G742D (4 из 25). Мы не выявили ассоциации мутаций гена *SF3B1* ни с какими хромосомными нарушениями, хотя мутация *SF3B1* чаще встречалась у пациентов с делецией 13 хромосомы (12 из 25), чем у пациентов с делецией 11 хромосомы (4 из 26). У 10 из 25 пациентов была обнаружена мутация гена *SF3B1* в отсутствие хромосомных аберраций. Мутации гена *SF3B1* в 1 из 25 случаев была выявлена в комбинации с мутацией гена *TP53*. У пациентов с мутациями гена *SF3B1* были с более тяжелые стадии (В и С) по Binet. По данным зарубежных исследований, имеются данные об ассоциации *SF3B1* с немутированным вариантом генов иммуноглобулинов [79, 90, 101], с делецией 11 хромосомы [54], отсутствием хромосомных аберраций [54] и отсутствие ассоциация с делецией 13 хромосомы и трисомией 12 [90, 131]. Рецидив или прогрессия заболевания была у 6 больных из 25. Различий в общей и беспрогрессивной выживаемости для больных с мутацией гена *SF3B1* не выявлено. По литературным данным

Данные Chieretti S. и соавт. [15] подтверждают высокую частоту мутаций гена *SF3B1* у пациентов, нуждающихся в проведении терапии (16%), что больше, чем при первичном обследовании больных В-ХЛЛ 10-12%, и ближе к частоте у пациентов с рефрактерностью к терапии или прошедших первый курс терапии [34, 90]. Это, возможно, связано с большей устойчивостью клеток, несущих мутацию *SF3B1* к проводимой терапии и возникновению мутаций *SF3B1* de novo. Таким образом, наши данным отличаются от данных проводимых другими исследователями, что может



быть связано с меньшим количеством больных или особенностью исследуемой выборки. Например, в исследовании Strefford JC и соавт. [120], установлено, что прогноз у больных со стерiotипными рецепторами иммуноглобулинов подгруппы #2 неблагоприятный и связан с мутацией гена *SF3B1*, тогда как в Российской популяции подгруппа #2 практически не встречается.

Частота мутации с.7541\_7542delCT гена *NOTCH1* составила 17% (26 из 155). Среди них в 3 случаях обнаруживались в комбинации с мутацией гена *TP53*, с геном *SF3B1* в 1. Мутации гена *BIRC3* не были комбинированы с мутацией в других генах. Мутация гена *NOTCH1* ассоциирована с трисомией 12 хромосомы ( $p=0,001$ ) и немутированным вариантом генов иммуноглобулинов ( $p=0,003$ ), что согласуется с данными, полученными другими исследователями [8, 26, 54]. По данным зарубежных исследователей частота *NOTCH1* варьирует от 10-16%. Частота выявления мутаций зависит от чувствительности методов исследования (ПЦР или секвенирование) и выборки больных. Мутации *NOTCH1* реже обнаруживаются на ранних стадиях В-ХЛЛ [34, 100]. В нашем исследовании мы получили сравнительно высокую частоту мутаций *NOTCH1*, что может быть связано с тем, что выборка представлена пациентами, имеющими показания к началу терапии.

При исследовании ответа на терапию среди 26 больных с мутацией гена *NOTCH1* полная ремиссия после полученной терапии была у 9 больных, рецидив заболевания произошел у 4 из 9. Частичная ремиссия была у 8 больных с последующим рецидивом у 3. Прогрессия – у 6 больных. Так же достоверно хуже была беспрогрессивная и общая выживаемость, наши данные согласуются с литературными [8, 26, 54].

Мутация в гене *BIRC3* выявлена у 4 из 81 пациента (5%).

Делеция в гене *BIRC3* выявлена у 1 больного в 7 экзоне, повторяющаяся миссенс-мутация p.Q529L обнаружена у 3х больных из 81 в 8 экзоне. Формально проведено статистическое исследование наличия связи мутации в гене *BIRC3* с другими прогностическими маркерами при В-ХЛЛ,

однако, в виду малого количества выявленных мутаций оценки не являются статистически достоверными. По нашим данным у больных с мутацией гена *BIRC3* частичная ремиссия у 2 из 4, полная ремиссия у 1 больного, прогрессия заболевания была у 1 больного из 4. Не было различий в общей и беспрогрессивной выживаемости, так же оценки являются недостоверными. Однако, по данным Rossi D и соавт. [111] инактивирующих мутаций и/или делеции гена *BIRC3* были найдены у 12 из 49 больных В-ХЛЛ с рефрактерностью к терапии флударабином (24%). Не встречаются случаи с нарушениями сразу в двух генах: *TP53* и *BICR3* аномалии (мутации или делеции). В отличие от группы флударабин-рефрактрных больных В-ХЛЛ, в группе больных с прогрессивным течением заболевания, но поддающимся лечению флударабином не было выявлено не одного случая с мутацией *BIRC3* [111]. Возможно, дальнейшее увеличение выборки позволит подтвердить или опровергнуть это наблюдение.

Актуальность данного исследования обусловлена необходимостью внедрения в практическое здравоохранение новых маркеров прогноза В-ХЛЛ. Перечень клиничко-биологических показателей, предложенный для оценки прогноза В-ХЛЛ разнообразен. Для удобства, мы суммировали прогностические факторы и их значение в таблице 20.

Фактор прогноза	Значение
Стадии (по Rai или Binet)	Множество факторов
Возраст	Соматический статус
Время удвоения лимфоцитов	Пролиферативная активность
Экспрессия Ki-67	
Уровень лактатдегидрогеназы	
Уровень бета-2-микроглобулина	Масса опухоли
Отношение легких цепей	
Цитогенетические аберрации	Онкогенез
Мутационный статус генов	Происхождение клетки

<p>вариабельного региона иммуноглобулинов</p>	<p>предшественницы В-ХЛЛ</p>
---	------------------------------

**Таблица 20. Наиболее значимые факторы прогноза В-ХЛЛ**

Большинство показателей, перечисленных в таблице, носят динамический характер, то есть зависят от срока болезни и от скорости прироста опухолевых клеток, например, уровне бета2-микроглобулина: клетки В-ХЛЛ секретируют этот белок в небольших количествах, но чем больше масса опухоли, тем выше уровень бета2-микроглобулина. Только цитогенетические aberrации и мутационный статус являются статичными: они не меняются со временем. Именно эти показатели являются наиболее ценными, потому что они позволяют выявить неблагоприятные категории больных уже в дебюте заболевания. Это важно в связи с тем, что появилось несколько препаратов, вызывающих полные ремиссии при В-ХЛЛ: флударабин, мабтера, кэмпас, зевалин, бендамустин. Следует отметить, что эти препараты довольно токсичны. Поэтому применение их у всех пациентов не оправданно.

#### **4.2 Прогностическое значение мутаций в генах *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3***

В данной работе мы исследовали гены *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* на наличие мутаций в них и их корреляцию с другими прогностическими маркерами, течением заболевания и прогнозом у больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом, нуждающихся в начале терапии.

Из четырех исследуемых генов наиболее важное значение в прогностическом отношении имеет ген *TP53*. По данным мировых исследований мутации этого гена всегда связаны с прогрессией и финальной стадией заболевания, а так же могут появляться с течением времени или на фоне терапии.

В случае наличия мутации в *TP53* лечение в режиме FCR не

эффективно, так как развивается рефрактерность к терапии или прогрессия и/или стабилизация заболевания, приводящая к гибели пациентов. Полученные данные свидетельствуют о том, что утрата функции *TP53* происходит по аналогии с классической двух-ударной моделью Кнудсона. Так у большинства пациентов утрата функции *p53* происходит за счет мутации на одном аллеле и делеции на другом. Мутация в гене *TP53* в большинстве случаев совпадает с делецией 17p хромосомы. Утрата функции *TP53* при мутации одного из аллелей объясняется несколькими феноменами – доминантным негативным эффектом, приобретенной однородительской дисомией, гаплонедостаточностью. Доминантный негативный эффект обусловлен тем, что белок *p53* представляет собой тетрамер, состоящий из 4 идентичных цепей. При мутации одного аллеля большинство образующихся тетрамеров, содержащих хотя бы одну мутантную цепь, не обладают функциональной активностью. Учитывая лучший ответ на лечение в группе больных с мутациями *TP53*, небольшого количества сохранного *p53*, по-видимому, достаточно для реализации *p53*-зависимого апоптоза в ответ на повреждение ДНК. Следующим по прогностической важности является ген *NOTCH1*, мутации в котором так же прогнозируют короткую общую и беспрогрессивную выживаемость больных В-ХЛЛ после проведения лечения в режиме FCR. У 13 из 20 пациентов развился ранний рецидив. Так же была выявлена связь мутации в гене *NOTCH1* с IgHV без мутаций ( $p=0,01$ ) и трисомией 12 хромосомы ( $p=0,001$ ). Это может свидетельствовать о роли этого гена в патогенезе В-ХЛЛ и о том, что делеция в *NOTCH1* до прохождения лимфоцитом дифференцировки в зародышевом центре приводит к клинически неблагоприятному варианту В-ХЛЛ.

Проведение аллель-специфичной ПЦР для скрининга мутаций гена *NOTCH1* у пациентов В-ХЛЛ является простым и быстрым методом надежно идентифицирующим делецию этого гена. Так же при модификации метода в Real-time ПЦР возможно будет повысить чувствительность и оценить процент мутантного аллеля в гене *NOTCH1*.

Несмотря на довольно большой процент больных, у которых была выявлена мутация в гене *SF3B1*, различия в клиническом течении заболевания у больных с мутациями и без них не выявлено. Так же количество выявленных мутаций в гене *BIRC3* не позволило сделать выводы о его прогностической применимости и оценить влияние на течение В-ХЛЛ.

Таким образом, анализ в данном исследовании позволил оценить различных маркеров на прогноз и течение заболевания у больных В-ХЛЛ, наиболее важные из них представлены в таблице 21.

Маркеры и прогноз	Комментарий
М-ХЛЛ - отсутствие рецидива при медиане наблюдения 34 месяца	Это правило выполнялось для 26 из 28 обследованных больных. У пациента с рецидивом в одном случае была мутация <i>TP53</i> , во втором рефрактерность, что совпало с нормальным кариотипом и мутацией в гене <i>BIRC3</i>
В2-М менее 4 мг/л - отсутствие рецидивов	В 32 случаях из 35 независимо от вариантов IgHV, наличия мутаций в генах <i>SF3B1</i> и <i>NOTCH1</i> , что возможно связано с тем, что масса опухоли находится на уровне хорошо корректируемом с помощью режима FCR
Нарушение гена <i>TP53</i> (мутация и/или делеция 17p хромосомы)	Рефрактерность к терапии FCR и/или ранний рецидив
Делеция <i>NOTCH1</i>	Ранний рецидив, короткая общая и беспрогрессивная выживаемость

**Таблица 21. Наиболее предсказательные маркеры при В- или их сочетание**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в России проведено исследование мутаций в генах *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3* в рамках рандомизированного протокола применения режима

FCR у 155 больных хроническим В-клеточным лимфолейкозом. Образцы ДНК больных были получены до начала терапии, исследование проводилось вслепую. Медиана возраста больных составила 59 лет (68% мужчин и 32% женщин). Различий по распределению прогностических маркеров среди мужчин и женщин не выявлено. Медиана наблюдения за больными составила не менее 34 месяцев. Мутации хотя бы в одном из исследуемых генов были обнаружены у 48% больных (у 68 из 155), большая часть из них представлена миссенс-мутациями, расположенными в функционально значимых регионах генов. Мутации в гене *TP53* были выявлены у 16 больных (10%), мутации в гене *NOTCH1* были найдены у 17% (у 26 пациента из 155). Мутации в гене *SF3B1* были выявлены у 16% больных (у 25 из 155), мутации гена *BIRC3* только у 5% больных (4 из 81).

Однозначной связи между феноменом или патогенезом В-ХЛЛ, с учетом обнаруженных мутаций в генах *TP53*, *SF3B1*, *NOTCH1* и *BIRC3* не установлено. Не выявлена ассоциация мутации в генах с тем, что женщины болеют реже, чем мужчины и возрастом возникновения заболевания. У 35% (у 6 из 29) больных не выявлены мутации при отсутствии хромосомных аббераций, что свидетельствует о наличии повреждения других механизмов/генов, приводящих к развитию В-ХЛЛ.

Достоверная корреляция между мутациями в гене *TP53* и рефрактерностью к флударабину, а так же наличием делеции в гене *NOTCH1* и худшей общей выживаемостью позволяют нам выявлять группу пациентов с неблагоприятным прогнозом. Возможно, при накоплении большего числа данных мы сможем более точно оценить влияние мутаций в генах *SF3B1* и *BIRC3* на прогноз и течение заболевания у больных В-ХЛЛ.

## **ВЫВОДЫ**

1. Мутация по крайней мере в одном из исследуемом гене *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* была обнаружена в 45% случаев (у 68 из 155), в том числе в 66% (у 19 из 29) больных с нормальным кариотипом по данным FISH.

2. Мутации гена *TP53* выявляются у 10% (16 из 155) больных и коррелируют с рефрактерностью к флударабин-содержащим режимам, более короткой беспродвинутой и общей выживаемостью. Секвенсирование мутаций гена *TP53* рекомендовано проводить всем пациентам с диагнозом В-ХЛЛ до начала терапии.

3. Мутации гена *NOTCH1* выступают вторым фактором после мутаций *TP53* и делеций 17 хромосомы, определяющим прогноз. Выявляются у 17% (26 из 155) больных В-ХЛЛ, ассоциируются с худшей общей и беспродвинутой выживаемостью и с другими маркерами неблагоприятного прогноза. Скрининг мутации с.7544\_7545delCT гена *NOTCH1* рекомендовано проводить всем пациентам с диагнозом В-ХЛЛ до начала терапии.

4. Мутации в гене *SF3B1* были выявлены у 16% больных (25 из 155). Мутации гена *BIRC3* выявлены только у 5% (4 из 81) больных. Статистически значимой ассоциации с прогнозом течения заболевания установить не удалось.

### **Благодарности**

Выражаю искреннюю благодарность моим научным руководителям д.б.н. Сударикову А.Б. и к.м.н. Никитину Е.А. за помощь и поддержку и кропотливую работу по анализу лабораторных и клинических данных, а также всем сотрудникам ФГБУ ГНЦ МЗ РФ и ГКБ им. С.П. Боткина, принимавшим участие в проведении исследований.

### **Печатные работы:**

1. «Нарушение гена *TP53* у больных хроническим лимфолейкозом». Е.А. Никитин, Н.А. Северина, Т.Н. Обухова, Б.В. Бидерман, Д.Г. Кисиличина, Е.В. Наумова, С.А. Луговская, Е.Ю. Варламова, И.Б.



Капланская, Ю.В. Сидорова, М.Е. Почтарь, Е.В. Домрачева, В.Л. Иванова, Л.Г. Ковалева, В.В. Птушкин, А.Б. Судариков. Журнал "Клиническая онкогематология", том 5, №.4, стр. 316-322, 2012 г.

2. «Мутации генов при ХЛЛ: новые аспекты патогенеза, открытые с помощью технологий полногеномного секвенирования» авторы Северина Н.А., Бидерман Б.В., Никитин Е.А., Судариков А.Б. Журнал «Гематология и трансфузиология», том 59, №3, стр. 40-48, 2014 г.

### **Тезисы:**

1. «Мутации *TP53* без делеции 17p могут быть связаны с рефрактерностью к терапии». Журнал «Гематология и трансфузиология», материалы «Конгресса гематологов России», приложение, том 57, №3, стр. 76-77, 2012 г.

2. «Low Frequency Of IGHV4-39/IGHD6-13/IGHJ5 Rearrangement With Stereotyped HCDR3 (subset #8) In Russian and Ukrainian Chronic Lymphocytic Leukemia Patients». Bella Biderman, Nadiia Bilous, Nataliya Severina, Andrey Sudarikov, Eugene Nikitin, Iryna Kryachok, Iryna Abramenko and Anatoliy Chumak. Bloodjournal.hematologylibrary.org Blood October 21, 2013 vol. 122 no. 21 5276 (ASH2013)

3. «Анализ мутаций генов *TP53*, *NOTCH1*, *SF3B1* и *BIRC3* у больных хроническим лимфолейкозом», Северина Н.А., Никитин Е.А., Обухова Т.Н., Бидерман Б.В., Меликян А.Л., Судариков А.А. Гематология и трансфузиология, материалы «II Конгресса гематологов России», приложение 1, том 59, стр. 117, 2014 г.

4. «Значение повреждения гена *TP53* у больных хроническим лимфолейкозом». Северина Н.А., Никитин Е.А., Обухова Т.Н., Кисиличина Д.Г., Наумова Е.В., Варламова Е.Ю., Капланская И.Б., Сидорова Ю.В., Почтарь М.Е., Домрачева Е.В., Иванова Л.В., Ковалева Л.Г., Птушкин В.В., Судариков А.А. Вестник гематологии, том 9, №2, стр. 47-48, 2013 г.

## Доклады:

1. Конгресс гематологов России, 2-4 июля 2012 г., Москва.
2. IX Российская конференция с международным участием, «Злокачественные лимфомы», 18-19 октября 2012 г., Москва.
3. Всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярно-генетические и иммуногенетические методы диагностики в практике врача гематолога», 25-26 апреля 2013 г., Санкт-Петербург.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agrawal, N., Frederick, M. J., Pickering, C. R., Bettegowda, C., Chang, K et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333: 1154-1157, 2011
2. Alavanja M. C., Blair a., Masters M. N. Cancer mortality in the U. S. flour industry // *J. nat. Cancer Inst.* 1990. Vol. 82, No 10. P. 840–848.
3. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood*. 2012;119(2):329–31.
4. Best OG, Gardiner AC, Davis ZA, Tracy I, Ibbotson RE, Majid A, et al. A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IGHV genes have stable disease. *Leukemia*. 2009;23(1):212–4.
5. Best OG, Gardiner AC, Davis ZA, Tracy I, Ibbotson RE, Majid A, et al. A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IGHV genes have stable disease. *Leukemia*. 2009;23(1):212–4.
6. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, Charron D, D'Athis P, et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*. 1977; 40(2):855-64
7. Boice J.D., Lubin J.H. occupational and environmental radiation and cancer // *Cancer Causes Control*. 1997. Vol. 8, No 3. P. 309–322.
8. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G et al. Minimal residual disease quantification is an independent predictor of progression-free and overall survival in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis from the randomized GCLLSG CLL8 trial. *J Clin Onc*
9. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow // *Scand.J.Clin.Lab.Investig.*-1968.-Vol.21-Suppl.97.p.1-9
10. Brown JR, Hanna M, Tesar B, Pochet N, Vartanov A, Fernandes SM, et al. Germline copy number variation associated with Mendelian inheritance of CLL in two families. *Leukemia*. 2012;26(7):1710

11. Bullrich F, Veronese ML, Kitada S, Jurlander J, Caligiuri MA, Reed JC, et al. Minimal region of loss at 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1996;88(8):3109–15.
12. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282: 1497-1501, 1998..
13. Cancer Incidence in five Continents / D.M. Parkin, S. L. Whelan, J. ferlay [et al.]. Vol. 7. IARC Scientific Publication Number 143. Lyon, france, 1997. P. 12–24.
14. Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol*. 1989; 72(2):141-9.
15. Chiaretti S, Marinelli M, Del Giudice I, Bonina S, Piciocchi A et. all. NOTCH1, SF3B1, BIRC3 AND TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia patients undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leuk Lymphoma*. 2014 Mar 6.
16. Chiorazzi N, Ferrarini M. Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. *Blood*. 2011;117(6):1781–91. .
17. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005;352 (8):804–15.
18. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
19. Chumakov, A. M., Miller, C. W., Chen, D. L., Koeffler, H. P. Analysis of p53 transactivation through high-affinity binding sites. *Oncogene* 8: 3005-3011, 1993.
20. Cigarette smoking and leukemia: results from the Lutheran Brotherhood Cohort Study / M. S. Linet, J. K. McLaughlin, a.W. Hsing [et al.] // *Cancer Causes Control*. 1991. Vol. 2, No 6. P. 413–417.
21. Cortese D, Sutton LA, Cahill N, Smedby KE, Geisler C, Gunnarsson R, Juliusson G, Mansouri L, Rosenquist R. On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):710-3. doi: 10.1038/leu.2013.333.
22. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50(8):633–43.
23. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev*. 2010;24:2343–64.
24. De Keersmaecker K, Michaux L, Bosly A, et al. Rearrangement of NOTCH1 or BCL3 can independently trigger progression of CLL. *Blood*. 2012;119:3864–6.

25. De Rossi G, Mandelli F, Covelli A, Luciani M, Martelli M, et al. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) in younger adults: a retrospective study of 133 cases. *Hematol Oncol.* 1989; 7(2):127-37.
26. Del Giudice I, Rossi D, Chiaretti S, Marinelli M, Tavolaro S, Gabrielli S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica.* 2012;97(3):437–41.
27. di Iasio MG, Zauli G. The non-genotoxic activator of the p53 pathway Nutlin-3 shifts the balance between E2F7 and E2F1 transcription factors in leukemic cells. *Invest New Drugs.* 2013 Apr;31(2):458-60.
28. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Nakao A, Patten N, Wu L, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* 2009;23(1):117–24.
29. Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, et al. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood.* 1995;85(6):1580–9.
30. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26): 1910–6.
31. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26): 1910–6.
32. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood.* 1997;89(7):2516–22.
33. Dong HJ, Fang C, Wang L, Fan L, Xu J et al. TP53 Pro72 allele potentially increases the poor prognostic significance of TP53 mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol.* 2014 Apr;31(4):908.
34. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med.* 2011;208:1389–401.
35. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valletto A, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest.* 1998; 102:1515-25
36. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies /M. R. Yuille, E. Matutes, a. Marossy [et al.] // *British journal of haematology.* 2000. Vol. 109, No 4. P. 794–799.
37. Fazi C, Scarfo L, Pecciarini L, Cottini F, Dagklis A, Janus A, et al. General population low-count CLL-like MBL persists over time without clinical progression, although carrying the same cytogenetic abnormalities of CLL. *Blood.* 2011;118(25):6618–25.
38. Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D.

- Karyotypic evolution in CLL: identification of a new subgroup of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia*. 1995;9(12):2003–8.
39. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;353–61.
  40. Folco EG, Coil KE, Reed R. The anti-tumor drug E7107 reveals an essential role for SF3b in remodeling U2 snRNP to expose the branch point-binding region. *Genes Dev*. 2011;25:440–4.
  41. Garg, V., Muth, A. N., Ransom, J. F., Schluterman, M. K., Barnes, R., King, I. N., Grossfeld, P. D., Srivastava, D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature* 437: 270-274, 2005.
  42. Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia*. 2010;24(1):211–5.
  43. Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, et al. Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia: a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia*. 2010;24(1):211–5.
  44. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guideline
  45. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1996; 22(5-6):439-47
  46. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111(12):5446-5456
  47. Hammarsund M, Corcoran MM, Wilson W, Zhu C, Einhorn S, Sangfelt O, et al. Characterization of a novel B-CLL candidate gene—DLEU7—located in the 13q14 tumor suppressor locus. *FEBS Lett*. 2004;556(1–3):75–80.
  48. Han T, Bhargava A, Henderson ES, et.al. Prognostic significance of beta-2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Proc Amer Soc Clin Oncol*. 1989; 8: 270 (abstr 270).
  49. Han T, Bhargava A, Henderson ES, et.al. Prognostic significance of beta-2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's



- lymphoma. *Proc Amer Soc Clin Oncol*. 1989; 8: 270 (abstr 270).
50. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117(2):563-574
  51. Herling M, Patel KA, Weit N, Lilienthal N, Hallek M, Keating MJ, et al. High TCL1 levels are a marker of B-cell receptor pathway responsiveness and adverse outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009;114(21):4675–86.
  52. Horwitz M., Goode E. L., Jarvik G. P. Anticipation in familial leukemia // *amer. J. Hum. Genet*. 1996. Vol. 59, No 5. P. 990–998.
  53. J.-M. Flaman, T. Frebourg, A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1995 Apr 25;92(9):3963-7.
  54. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):108-17.
  55. Joerger A.C., Fersht A.R. . Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu. Rev. Biochem*. 2008; 77: 557 - 582.
  56. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, Elonen E, Gahrton G. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med*. 1990 Sep 13;323(11):720-4
  57. Kalachikov S, Migliazza A, Cayanis E, Fracchiolla NS, Bonaldo MF, Lawton L, et al. Cloning and gene mapping of the chromosome 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics*. 1997;42(3):369–77.
  58. Kapanadze B, Makeeva N, Corcoran M, Jareborg N, Hammarsund M, Baranova A, et al. Comparative sequence analysis of a region on human chromosome 13q14, frequently deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia, and its homologous region on mouse chromosome 14. *Genomics*. 2000;70(3):327–34.
  59. Kitamura E, Su G, Sossey-Alaoui K, Malaj E, Lewis J, Pan HQ, et al. A transcription map of the minimally deleted region from 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia as defined by large scale sequencing of the 650 kb critical region. *Oncogene*. 2000;19(50):5772–80.
  60. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2010;17(1):28–40.
  61. Klinakis, A., Lobry, C., Abdel-Wahab, O., Oh, P., Haeno, H., Buonamici, S., van De Walle, I., Cathelin, S., Trimarchi, T., Araldi, E., Liu, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Efstratiadis, A., Taghon, T., Michor, F., Levine, R. L., Aifantis, I. A novel tumour-suppressor function for the

- Notch pathway in myeloid leukaemia. *Nature* 473: 230-233, 2011.
62. Lanasa MC, Allgood SD, Slager SL, Dave SS, Love C, Marti GE, et al. Immunophenotypic and gene expression analysis of monoclonal B-cell lymphocytosis shows biologic characteristics associated with good prognosis CLL. *Leukemia*. 2011;25(9):1459–66.
  63. Landau, D.A., et al., Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 2013. 152(4): p. 714-26.
  64. Larsson, C., Lardelli, M., White, I., Lendahl, U. The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 24: 253-258, 1994..
  65. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*. 1987; 69(3):929-36.
  66. Lepretre S, Jäger U, Janssens A, Leblond V, Nikitin E, Robak T, Wendtner CM. The value of rituximab for the treatment of fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: a systematic review and qualitative analysis of the literature. *Leuk Lymphoma*. 2012 May;53(5):820-9.
  67. Levine, A. J., Momand, J., Finlay, C. A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456, 1991.
  68. Lia M, Carette A, Tang H, Shen Q, Mo T, Bhagat G, et al. Functional dissection of the chromosome 13q14 tumor-suppressor locus using transgenic mouse lines. *Blood*. 2012;119(13):2981–90.
  69. Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horva, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349-353, 1996.
  70. Liu Y, Hermanson M, Grander D, Merup M, Wu X, Heyman M, et al. 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood*. 1995;86(5):1911–5.
  71. Liu Y, Szekely L, Grander D, Soderhall S, Juliusson G, Gahrton G, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene: evidence for a role of an adjacent locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(18):8697–701.
  72. Lopez C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(9):881–9.
  73. Mabuchi H, Fujii H, Calin G, Alder H, Negrini M, Rassenti L, et al. Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8, novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 2001;61(7):2870–7.
  74. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA



- damage. *Blood*. 2009;114(26):5307–14.
75. Malek S. Clinical utility of prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia [review]. *ASCO Education Book* 2010;2010:263–7.
  76. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32(23):2805–17.
  77. Mandelli F, De Rossi G, Mancini P, Alberti A, Cajozzo A, et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. *J Clin Oncol*. 1987; 5(3):398-406.
  78. Manolov, G., Manolova, Y., Kieler, J. Cytogenetic investigation of assignment of locus for beta-2-microglobulin in K562 leukemia and Namalwa and Daudi Burkitt lymphoma cells. (Abstract) *Cytogenet. Cell Genet*. 25: 182 only, 1979.
  79. Messina M, Del Giudice I, Khiabani H, Rossi D, Chiaretti S et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemorefractoriness. *Blood*. 2014 Apr 10;123(15):2378-88.
  80. Migliazza A, Bosch F, Komatsu H, Cayanis E, Martinotti S, Toniato E, et al. Nucleotide sequence, transcription map, and mutation analysis of the 13q14 chromosomal region deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2001;97(7):2098–104.
  81. Mohr J, Helfrich H, Fuge M, Eldering E, Buhler A, Winkler D, et al. DNA damage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing. *Blood*. 2011;117(5):1622–32.
  82. Mosca L, Fabris S, Lionetti M, Todoerti K, Agnelli L, Morabito F, et al. Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5641–53.
  83. Murga Penas EM, Kawadler H, Siebert R, Frank M, Ye H, et al. A novel fusion of the MALT1 gene and themicrotubule-associated protein 4 (MAP4) gene occurs in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 Sep;45(9):863-73.
  84. Nahi H, Lehmann S, Mollgard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG, Paul C, Merup M. Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukaemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol*. 2004 Nov;127(3):285-91
  85. Nahi H, Selivanova G, Lehmann S, Möllgård L, Bengtzen S, Concha H, Svensson A, Wiman KG, Merup M, Paul C. Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia. *Br J Haematol*. 2008 May;141(4):445-53.
  86. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, et al. Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997;11(11):1929–32.
  87. Neilson JR, Auer R, White D, Bienz N, Waters JJ, Whittaker JA, et al.

- Deletions at 11q identify a subset of patients with typical CLL who show consistent disease progression and reduced survival. *Leukemia*. 1997;11(11):1929–32.
88. Oren M., Rotter V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2(2): 001107a.
  89. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2012;121(3):468–75.
  90. Oscier DG, Rose-Zerilli MJ, Winkelmann N, et al. The clinical significance of NOTCH1 and SF3B1 mutations in the UK LRF CLL4 trial. *Blood*. 2012;121(3):468–75.
  91. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Li C, Shedden K, et al. The prognostic significance of various 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2011;17: 6778–90.
  92. Ouillette P, Collins R, Shakhan S, Li J, Peres E, Kujawski L, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(11): 3051–61.
  93. Ouillette P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*. 2008;68(4):1012–21.
  94. Palamarchuk A, Efanov A, Nazaryan N, Santanam U, Alder H, Rassenti L, et al. 13q14 deletions in CLL involve cooperating tumor suppressors. *Blood*. 2010;115(19):3916–22.
  95. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365:1384–95.
  96. Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, Chaplin T, Wade R, Gardiner A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2011;25(3):489–97.
  97. Pettitt AR, Jackson R, Carruthers S, Dodd J, Dodd S, Oates M, et al. Alemtuzumab in combination with methylprednisolone is a highly effective induction regimen for patients with chronic lymphocytic leukemia and deletion of TP53: final results of the national cancer research institute CLL206 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30(14):1647–55.
  98. Pines A, Ben-Bassat I, Modan M, Blumstein T, Ramot B. Survival and prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 1987; 38(2):123-30.
  99. Pospisilova S., Gonzalez D., Malcikova J., Trbusek M., Rossi D et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26(7): 1458-1456.
  100. Puente, X.S., et al., Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 2011. 475(7354): p. 101-5.
  101. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic

- lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2012;44:47–52.
102. Rai K.R., Patel D.V. *Haematology, Basic Principles and Practice*, Churchill Livingstone Inc.N. Y.; London, 1997. P. 308– 1322.
  103. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Paternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1975; 46:219-234
  104. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin YC, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood.* 2007;109(12):5079–86.
  105. Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: Evidence from epidemiology. *Radiat. Res.* 1998. Vol. 150. P. 530–541.
  106. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood.* 2009;113:856–65.
  107. Rosebeck, S., Madden, L., Jin, X., Gu, S., Apel, I. et al. Cleavage of NIK by the API1-MALT1 fusion oncoprotein leads to noncanonical NF-kappa-B activation. *Science* 331: 468-472, 2011. Note: Erratum: *Science* 332, 421 only, 2011.
  108. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, Wiestner A, Alizadeh AA, Arthur DC, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood.* 2004;104(5):1428–34.
  109. Rossi D, Brusca A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood.* 2011;118:6904–8.
  110. Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T et. al. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-κB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood.* 2011 Nov 3;1
  111. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, Vaisitti T, Monti S, Cresta S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119(12):2854–62.
  112. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2012;119:521–9.
  113. Rossi D., Cerri M., Deambrogi C., Sozzi E., Cresta S., Rasi S. et al. . The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin. Cancer. Res.* 2009; 15(3): 995 - 1004.
  114. Saddler C, Ouillette P, Kujawski L, Shangary S, Talpaz M, et al. Comprehensive biomarker and genomic analysis identifies p53 status as the major determinant of response to MDM2 inhibitors in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;111(3): 1584–93.
  115. Saiya-Cork K, Collins R, Parkin B, Ouillette P, Kuizon E, et al. A pathobiological role of the insulin receptor in chronic lymphocytic leukemia.

- Clin Cancer Res. 2011;17(9):2679–92.
116. Sgambati M. t., Linet M. S., Devesa S. S. Chronic Lymphoid Leukemias. N. Y.: Marsel Dekker, Inc. 2001. P. 33–62.
  117. Shedden K, Li Y, Ouillette P, Malek SN. Characteristics of chronic lymphocytic leukemia with somatically acquired mutations in NOTCH1 exon 34. *Leukemia*. 2012;26(5):1108–10.
  118. Smardova, J. FASAY: a simple functional assay in yeast for identification of p53 mutation in tumors. *Neoplasma* 1999; 46(2): 80-88.
  119. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, Buhler A, Schlenk RF, 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.
  120. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, Agathangelidis A, Malčíková J, et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia*. 2013 Nov;27(11):2196-9.
  121. Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., et al. Regulation of alpha-beta/gamma-delta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20: 611-622, 2004.
  122. Totterman TH, Nilsson K, Simonsson B. Phorbol ester-induced production of beta-2-microglobulin in B-CLL cells: relation to IgM secretory response and disease activity. *Br J Haematol*. 1986; 62(1):95-103.
  123. Trbusek M., Smardova J., Malcikova J., Sebejova L., Dobes P., Svitakova M. et al. . Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemi. *J. Clin. Onco.l* 2011; 29(19): 2703 - 2708.
  124. Tsimberidou AM, Tam C, Abruzzo LV, O'Brien S, Wierda WG, Lerner S, et al. Chemoimmunotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 2009;115(2): 373–80.
  125. Utterback D. f., Rinsky R. a. Benzene exposure assessment in rubber hydrochloride workers: a critical evaluation of previous estimates // amer.J. Ind. Med. 1995. Vol. 27, No 5. P. 661–667.
  126. Villamor N, Conde L, Martinez-trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia*. 2013;27(5):1100–6. doi:10.1038/leu.2012.357.
  127. Visconte V, Makishima H, Jankowska A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012;26:542P5.
  128. Vogelstein, B., Kinzler, K. W. p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992. Harris, C. C., Hollstein, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New Eng. J. Med*. 329: 1318-1327, 1993.

129. Vogelstein, B., Kinzler, K. W. X-rays strike p53 again. *Nature* 370: 174-175, 1994.
130. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365:2497–506.
131. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011; 365: 2497–2506.
132. Wang, J., Shelly, L., Miele, L., Boykins, R., Norcross, M. A., Guan, E. Human Notch-1 inhibits NF-kappa-B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain. *J. Immun.* 167: 289-295, 2001.
133. Weng, A. P., Ferrando, A. A., Lee, W., Morris, J. P., IV, Silverman, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306: 269-271, 2004.
134. Xu-Monette Z.Y., Medeiros L.J., Li Y., Orlowski R.Z., Andreeff M., Bueso-Ramos C.E., Greiner T.C., McDonnell T.J., Young K.H. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 2012; 119(16): 3668-3683.
135. Yamamoto, S., Charng, W.-L., Rana, N. A., Kakuda, S., Jaiswal, M., et al.. A mutation in EGF repeat-8 of Notch discriminates between Serrate/Jagged and Delta family ligands. *Science* 338: 1229-1232, 2012.
136. Yoon, H., Liyanarachchi, S., Wright, F. A., Davuluri, R., Lockman, J. C., de la Chapelle, A., Pellegata, N. S. Gene expression profiling of isogenic cells with different TP53 gene dosage reveals numerous genes that are affected by TP53 dosage and identifies CSPG2 as a direct target of p53. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 15632-15637, 2002.
137. Yuille M.R., Houlston R.S., Catovsky D. Anticipation in familial chronic lymphocytic leukemia families // *Leukemia*. 1998. Vol. 12. P. 1696–1698.
138. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 2008;9(12):1371-1378.
139. Zenz T, Habe S, Denzel T, Mohr J, Winkler D, Buhler A, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood.* 2009;114(13):2589–97.
140. Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):
141. Zenz T., Eichhorst B., Busch R., Denzel T., Häbe S., Winkler D. TP53 mutation and survival in chronic lymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 10(28): 4473-4479.



142. Zenz T., Mertens D., Kuppers R., Dohner H., Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10(1): 37 - 50.
143. Доклад второй Всемирной ассамблеи по проблемам старения, Мадрид, 8-12 апреля 2002 года, стр 2-12.
144. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / под ред. проф. М. А. Волковой (2-е изд.). М.: ОАО Изд-во Медицина. 2007. 1120 с.
145. Луговская С.А., Почтарь М.Е. Гематологический атлас, Москва, 2008, стр. 140-142.
146. Никитин Е.А., Н.М., Байков В.В., Бакиров Б.А., Бессмельцев С.С., Загоскина Т.П., Ковригина А.М. и др. Российские клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического лимфолейкоза (версия 2012 г). *Современная онкология*, 2012(4): р. 10 - 14.
147. Никитин ЕА, Лорие ЮЮ, Меликян АЛ, Самойлова РС, Булычева ТИ, и др. Факторы неблагоприятного прогноза у больных хроническим лимфолейкозом: ретроспективный анализ 206 случаев. *Тер архив*. 2003; 7: 38 – 47
148. Руководство по гематологии / под ред. академика А. И. Воробьева (4-е изд.). М: Ньюдиамед. 2007. 1275 с.