МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЗЕНЦІЙНОЇ РОБОТИ

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЙ ГЕНІВ *TP53* І *SF3B1* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ: ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ, ГРУПИ РИЗИКУ

(методичні рекомендації)

Київ – 2017

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЗЕНЦІЙНОЇ РОБОТИ

УЗГОДЖЕНО
Начальник лікувально-організаційного управління
НАМН України, д-р мед. наук, проф.
І.Д.Мікробанець
„11" 01 2017 р.

УЗГОДЖЕНО
В.о. директора медичного департаменту
МОЗ України
А.О.Гаврилюк
„___" _____ 2017 р.

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАЦІЙ ГЕНІВ *TP53* І *SF3B1* У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ: ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ, ГРУПИ РИЗИКУ

(методичні рекомендації)

Київ – 2017

Установа-розробник:

ДУ „Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України" (ННЦРМ)

Укладачі:

Чумак Анатолій Андрійович, д.м.н., проф.,	
засл. діяч науки і техніки України	(044) 452-00-24;
Абраменко Ірина Вікторівна, д.м.н., проф.	(044) 451-82-63;
Дягіль Ірина Сергіївна, д.м.н.	(044) 451-82-12.
Білоус Надія Іванівна, к.б.п.	(044) 451-82-63;
Мартіна Зоя Володимирівна, к.м.н.	(044) 451-82-12.

Рецензент: Т.П. Перехрестенко, д-р.мед.наук, ст.н.с., пров. н. співробітник відділення захворювань системи крові ДУ „Інститут гематології та трансфузіології НАМН України"

Рішення проблемної комісії «Гематологія та трансфузіологія», протокол № від „ 16 " листопада 2016 р.

Голова проблемної комісії «Гематологія та трансфузіологія» МОЗ та НАМН України чл-кор. НАМН України, д-р мед.наук, проф. В.Г.Бебешко

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів 5

Вступ 6

1 Визначення мутацій генів *TP53* і *SF3B1* 8

2 Прогностичне значення мутацій генів *TP53* і *SF3B1* у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію 10

3 Групи ризику хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію по розвитку мутацій генів *TP53* і *SF3B1* 13

Висновки 15

Перелік рекомендованої літератури 16

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ЕДТА	етилендиамінотетраоцтова кислота
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
п.н.	пари нуклеотидів
ХЛЛ	хронічна лімфоцитарна лейкемія
HR	відношення ризиків (hazard ratio)
IGHV гени	гени варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів (immunoglobulin heavy chain variable region)
М *IGHV* гени	мутовані гени варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів
OR	співвідношення шансів (odds ratio)
CD	кластери диференціювання гемопоетичних клітин (claster of differentiation)
OS	загальне виживання (overall survival)
PFS	безрецидивне виживання (progression-free survival)
SNP	поліморфізм заміни одного нуклеотида (single nucleotide polymorphism)
UM *IGHV* гени	немутовані гени варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів

ВСТУП

Хронічна лімфоцитарна лейкемія (ХЛЛ) - одне з найбільш поширених онкогематологічних захворювань дорослого населення європейських країн. За останній час досягнуто значних успіхів в лікуванні хворих на ХЛЛ завдяки розумінню питань патогенезу захворювання та розробці нових лікарських засобів (моноклональні антитіла, спрямовані проти антигенів поверхневих мембран лейкемічних клітин, інгібітори тирозинкіназ, задіяні у внутрішньоклітинній передачі сигналів тощо). Розроблені принципи диференційованого підходу до лікування пацієнтів, які базуються на врахуванні молекулярно-генетичних ознак клітин, віку пацієнтів, наявності супутніх захворювань та їх важкості [1]. Встановлено, що ефективність лікування пацієнтів суттєво залежить від наявності в лейкемічних клітинах певних генетичних аномалій. До останніх, насамперед, належать порушення гена *TP53* внаслідок делеції хромосоми 17p13.1 та поєднаних з нею або ізольованих мутацій *TP53*. Частота виявлення делецій 17p складає приблизно 3–8% у первинних пацієнтів та збільшується до 30% у хворих, резистентних до лікування. Делеція одної алелі гена *TP53* у 75-80% супроводжується появою мутацій гена *TP53* іншої алелі. За відсутності делеції 17p13 мутації гена *TP53* зустрічаються у 5-10% випадків [2].

У 2011 р. були виявлені нові прогностично несприятливі мутації, а саме: мутації гена *SF3B1*, який кодує рибонуклеопротеїн, задіяний в процесах утворення зрілої мРНК. Частота мутацій становить 4-7% серед первинних хворих на ХЛЛ та збільшується до 17-20% при розвитку хіміорезистентності [3].

Визначення прогностично несприятливих мутацій має важливе значення для вибору методу лікування, тому що за їх наявності типові для більшості хворих на ХЛЛ схеми лікування (комбінація пуринових аналогів, циклофосфаміду з ритуксимабом; інших анти-CD20 моноклональних антитіл з хлорамбуцилом або бендамустином) неефективні. Такі пацієнти потребують призначення принципово інших лікарських засобів.

В представлених методичних рекомендаціях, які базуються на результатах дослідження мутацій генів *TP53* і *SF3B1* у 261 хворого на ХЛЛ, які лікувались в гематологічному відділенні ННЦРМ, проаналізовано їх вплив на перебіг захворювання та фактори ризику, асоційовані з появою таких мутацій. Робота була виконана в рамках НДР „Дослідити ризик виникнення прогностично несприятливих генетичних аномалій у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію, постраждалих внаслідок Чорнобильської аварії, залежно від поліморфізмів генів p53-опосередкованого апоптозу".

Методичні рекомендації призначені для використання лікарями-гематологами, онкологами, трансплантологами обласних медичних установ і науково-дослідних інститутів, які займаються діагностикою та лікуванням цієї групи хворих, а також для спеціалістів з молекулярної біології діагностичних лабораторій медичних установ України. Дані, викладені в методичних рекомендаціях, опубліковані вперше.

1 Визначення мутацій гена *TP53* і *SF3B1*

Матеріалом для дослідження слугують зразки венозної крові хворих на ХЛЛ (2-3 мл), відібрані в пробірки, що містять антикоагулянт - етилендиамінотетраоцтову кислоту (ЕДТА) або гепарин. Стандартні концентрації гепаринату натрію складають 10-20 ОД/мл зразка крові, натрієвої або калієвої солі ЕДТА – 1,2-2 мг/мл. Час з моменту взяття крові до початку молекулярно-генетичних досліджень не повинен перевищувати 24 год.

Хід методики. До 1 мл зразка крові додають 5 мл лізуючого розчину, який складається з амонію хлориду, NH_4Cl - 8,26 г; калію бікарбонату ($KHCO_3$) – 1 г; трилону Б (Na_2ЕДТА) —0,037 г та дистильованої води – до 1 л, ретельно перемішують, проводять інкубацію протягом 30 хв. при кімнатній температурі та центрифугують 10 хв. при 1500 об/хв. Отриманий осад клітин використовують для виділення ДНК або заморожують при -20^0С та зберігають для подальшого дослідження.

Отримання ДНК проводять колонковим методом (Quigen, Macherey-Nagel та ін.), згідно інструкції виробників наборів.

Дослідження мутацій доцільно проводити у так званих „гарячих точках", де зустрічається найбільша кількість мутацій, а саме: в 3-10 екзонах гена *TP53* і у 14-16 екзонах гена *SF3B1* [3, 4].

Проводиться полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) з використанням 50 нг геномної ДНК в 25 мкл реакційної суміші, до складу якої входить: 0,3 мкл прямого та 0,3 мкл зворотного праймера, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,8 mM суміші нуклеотидів та 0,125 одиниць полімерази AmpliTaqGold DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Перелік використаних праймерів наведений у табл. 1.

Умови проведення ПЛР однакові при ампліфікації всіх, за винятком однієї, послідовностей: ініціація: 95°С, 3 хв., потім 35 циклів ампліфікації (95°С – 30 сек., 60°С – 30 сек., 72°С – 30 сек.), фінальна елонгація 72°С – 10 хв. Тільки при ампліфікації 3-4-го екзонів гена *TP53* температуру відпалювання праймерів зменшують від 60°С до 58°С.

Продукти ПЛР секвенують на секвенаторі (в роботі була використана модель ABI PRISM 3180 DNA sequence analyzer; Applied Biosystems). Отримані нуклеотидні послідовності порівнюють з референтними послідовностями немутованих генів (*TP53:* NC_000017.10; *SF3B1*: NG_032903.2) і валідизують за допомогою доступних баз даних:

- IARC *TP53* Mutation Database (http://p53.iarc.fr/) і UMD *TP53* Mutation Database (http://p53.fr/) для *TP53* гена;
- COSMIC database (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/) для *SF3B1* гена.

Таблиця 1 – Праймери для ампліфікації нуклеотидних послідовностей генів *TP53* і *SF3B1*

Ген	Прямий праймер (5`->3`)	Зворотній праймер (5`->3`)
TP53 ген		
екзон 3-4	CAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAA	CTTTGGGACAGGAGTCAGAGATCA
екзон 5-6	TCCTGAGGTGTAGACGCAACTCT	AGTTAAACCCATTTACTTTGCACATCTCA
екзон 7	GAGCTTGCAGTGAGCTGAGATCA	ACTGAGTGGGAGCAGTAAGGAGATT
Екзон 8-9	CACCTACCTGGAGCTGGAGCTTA	TAGCTACAACCAGGAGCCATTGTCTT
Екзон 10	TCAGCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAGTT	CTGAGGCAAGAATGTGGTTATAGGATT
SF3B1 ген		
Екзон 14	AAAGAAATGGTTGAAGATTAATATTACCAA	AAGACCCTGTCTCCTAAAGAAAAAAAA
Екзон 15	TGCAGTTTGGCTGAATAGTTGAT	CCAATAGCCTTCAAGAAAGCAG
Екзон 16	AGGAAAGGTAAATCCACCAATTACC	AACCATGAAACATATCCAGTTTACATTAAC

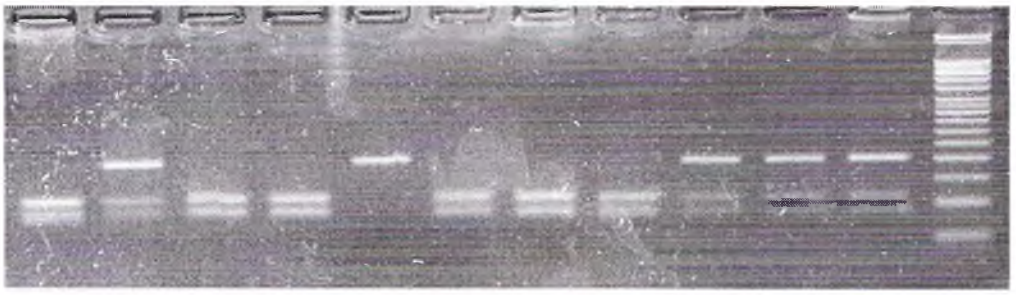
Для визначення факторів ризику щодо появи мутацій генів *TP53* і *SF3B1* доцільно проводити визначення поліморфізму rs1042522 гена *TP53* методом ПЛР з наступною рестрикцією продуктів реакції за Hirata et al. [5].

ПЛР проводиться з використанням 50 нг геномної ДНК в 20 мкл реакційної суміші, до складу якої входить: 0,5 мкл прямого (5`-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3`) та 0,5 мкл зворотного праймеру (5`-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3`), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,8 mM суміші нуклеотидів та 0,125 одиниць *Taq* ДНК полімерази (Thermo Scientific). Умови проведення ПЛР: ініціація: 95°C, 3 хв., потім 35 циклів ампліфікації (95°C – 30 сек., 57°C – 30 сек., 72°C – 30 сек.), фінальна елонгація 72°C – 10 хв.

Ампліфікований продукт (199 п.н.) інкубують з рестриктазою *Bst*UI (Thermo Scientific) згідно інструкції виробника.

Продукти рестрикції візуалізують в ультрафіолетовому світлі при розгонці в 3% агарозному гелі, який містить етидій бромід. За наявності алелі 72G (Arg, аргінін у складі білка) амплікон розщеплюється на продукти 113 п.н. і 86 п.н. За наявності алелі 72C (Pro, пролін у складі білка) рестрикції ампліфікованого продукту не відбувається (рис. 1).

Інший прогностичний чинник - мутаційний статус генів варіабельних дільниць важких ланцюгів імуноглобулінів (*IGHV*). Принцип його визначення детально описаний нами раніше [6].



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 50 bp

Рисунок 1 - Результати визначення поліморфізму rs1042522 гена *TP53* методом ПЛР з наступною рестрикцією продуктів реакції рестриктазою BstUI. 1, 3, 4, 6, 7, 8 - генотип Arg/Arg; 2, 9, 10, 11 - генотип Arg/Pro; 5 – генотип Pro/Pro.

2 Прогностичне значення мутацій генів *TP53* і *SF3B1* у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію

Методичні рекомендації базуються на обстеженні хворих на ХЛЛ В-клітинного походження, які проходили лікування в ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (ННЦРМ), згідно протоколу, затвердженого Комітетом з медичної етики ННЦРМ. Діагноз встановлювали за клінічними ознаками, морфологією та імунофенотиповими характеристиками лімфоїдних клітин. Стадію захворювання визначали за класифікаціями Binet і Rai [7, 8].

Показники загального виживання визначали як період часу від постановки діагнозу до загибелі пацієнта або останньої дати спостереження, оцінювали за методом Каплан-Майера та порівнювали за допомогою log-rank тесту. Для верифікації незалежного впливу парамстрів на прогноз використовували уніваріантну та мультиваріантну модель регресії Кокса.

Визначення мутацій обох генів (*TP53* і *SF3B1)* було проведено у 244 хворих. Крім того, у 17 хворих були визначені лише мутації гена *TP53*.

Мутації гена *TP53* були виявлені у 28 з 261 обстеженого хворого (10,7%). Частота мутацій була мінімальною при діагностиці захворювання (5 із 129 пацієнтів, 3,9%) та зростала у хворих, які були обстежені перед початком терапії або в рецидиві захворювання (23 із 109 хворих, 17,5%; p=0,001). Мутації гена *SF3B1* були присутні у 23 з 244 обстежених хворих (9,4%), їх частота зростала у хворих в рецидиві захворювання (20% порівняно з 6,6% при діагностиці захворювання; p=0,035) (рис. 2).

У первинних пацієнтів мутації *TP53 і SF3B1* зустрічались ізольовано одна від одної, але у 5 пацієнтів, обстежених в рецидиві захворювання, мутації обох генів були виявлені одночасно.

Рисунок 2. Частота мутація генів *TP53* і *SF3B1* у обстежених хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію

Частота мутацій *TP53* і *SF3B1*, виявлених при діагностиці ХЛЛ і пізніше в динаміці захворювання, була однаковою у чоловіків і жінок, не залежала від віку, рівня лейкоцитозу (табл. 2).

Більшість первинних хворих з присутністю мутацій *TP53* й *SF3B1* перебували на ранніх стадіях захворювання. Так, серед 5 первинних хворих з мутаціями *TP53* четверо були діагностовані в стадії А, один - в стадії В; серед 8 первинних хворих з мутаціями *SF3B1* семеро діагностовані в стадії А, один - в стадії В. Таким чином, по клінічних показниках неможливо було передбачити наявність прогностично несприятливих мутацій при діагностиці захворювання.

Мутаційний статус *IGHV* генів був визначений у 239 із 244 хворих (97,9%), в яких досліджувались мутації обох генів (*TP53 і SF3B1*). У хворих з немутованими (UM) *IGHV* генами порівняно з експресуючими мутовані (M) *IGHV* гени дещо частіше знайдені мутації *TP53* та/або *SF3B1*: 21,9% і 11,4%, відповідно, p=0,042 (окремо частота мутацій гена *TP53* - 12,3% проти 6,5%; p=0,138; частота мутацій гена *SF3B1* - 11,3% проти 5,7%; p=0,149). Однак, це стосувалось тільки частоти мутацій *SF3B1* у первинних хворих: вони були виявлені тільки за UM *IGHV* генів у 12,1% випадків і були відсутні за експресії M *IGHV* генів (p=0,005). Частота мутацій гена *TP53* у первинних хворих за M і UM *IGHV* генів не розрізнялась: 4,5% і 3,3%, p=0,714.

У хворих, обстежених в динаміці захворювання, різниці в частоті мутацій генів *TP53* (11,1% і 17,6%, p=0,413) і *SF3B1* (19,2% і 10,8%, p=0,250) за M і UM *IGHV* генів не виявлено.

Таблица 2. Характеристика обстежених хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію

Показник		Кількість осіб (%) з наявністю мутацій генів *TP53* і/або *SF3B1* серед			
		первинних хворих		обстежених перед початком терапії та в рецидиві ХЛЛ	
		є мутації, n=13	мутацій немає, n=109	є мутації, n=33	мутацій немає, n=89
Чоловіки		9 (69,2)	75 (68,8)	28 (84,8)	70 (78,7)
Жінки		4 (30,8)	34 (31,2)	5 (15,2)	19 (21,3)
Вірогідність		0,975		0,44	
Вік, роки		61,84 ± 2,27	59,16 ± 0,94	57,63 ± 1,66	55,73 ± 0,98
Вірогідність		0,347		0,322	
Стадія за Binet	A	11 (84,6)	80 (73,4)	10 (30,3)	26 (29,2)
	B	2 (15,4)	25 (22,9)	19 (57,6)	40 (44,9)
	C	0	4 (3,7)	4 (12,1)	23 (25,8)
Вірогідність		0,615		0,240	
Лейкоцитоз, Г/л		28,54 ± 7,82	28,88 ± 2,83	71,61 ± 13,62	61,74 ± 8,18
Вірогідність		0,968		0,534	
M *IGHV* гени		3 (25,0)	59 (54,6)	7 (22,8)	19 (21,6)
UM *IGHV* гени		9 (75,0)	49 (45,4)	24 (77,4)	69 (78,4)
Вірогідність		0,051		0,909	

Наявність мутацій генів *TP53* і *SF3B1* мала негативний вплив на тривалість загального (OS) та безрецидивного (PFS) виживання хворих. Так, за умов наявності тільки мутацій *TP53* медіана тривалості OS склала 69 міс. (середні значення 64,8 ± 10,4 міс.), тільки мутацій *SF3B1* – 61 міс. (82,1± 14,6 міс.), мутацій в обох генах – 19 міс. (34,2 ± 11,9 міс.), без наявності мутацій – 106 міс. (126,3 ± 10,7 міс), p=0,005. Відповідно, медіана тривалості PFS становила: 52 міс. (57,1 ± 9,2 міс.) , 43 міс. (45,6 ± 5,9 міс.), 7 міс. (12,6 ± 5,9 міс.) і 64 міс. (83,2 ± 6,6 міс.); p=0,0001.

З урахуванням інших відомих прогностичних чинників (вік хворих понад 65 років, ініціальний лейкоцитоз вище за 20 Г/л, UM *IGHV* гени, розгорнута стадія захворювання) прогностичне значення наявності мутацій зберігалось *TP53* і *SF3B1* (табл. 3).

Таблица 3. Вплив прогностичних чинників на тривалість загального та безрецидивного виживання хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію

Показники	OR	95% довірчий інтервал	Вірогідність
Загальне виживання			
Стадія	2,02	1,545-2,64	0,0001
Вік ≥ 65 років	2,104	1,363-3,248	0,001
Лейкоцитоз ≥ 20 Г/л	2,085	1,281-3,150	0,0001
UM *IGHV* гени	2,135	1,358-3,357	0,001
Мутації *TP53* і *SF3B1*	1,838	1,19-2,84	0,006
Безрецидивне виживання			
Стадія	1,983	1,533-2,565	0,0001
Вік ≥ 65 років	-	-	0,134
Лейкоцитоз ≥ 20 Г/л	1,572	1,051-2,351	0,028
UM *IGHV* гени	2,488	1,577-3,923	0,0001
Мутації *TP53* і *SF3B1*	2,053	1,352-3,117	0,001

3 **Групи ризику хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію по розвитку мутацій генів *TP53* і *SF3B1***

За результатами визначення значної кількості генетичних чинників, які впливають на процеси репарації ДНК, чутливості до індукції апоптозу, проліферативну активність клітин (досліджувались поліморфізми генів репарації ДНК: *XRCC1*, rs25487; *XPD*, rs13181; *XRCC3*, rs861539; генів, асоційованих з розвитком апоптозу: rs1042522 *TP53*, rs1801270 *p21*, rs2279744 (SNP309) *MDM2;* поліморфізм rs6449182 гена *CD38*, що впливає на проліферативні властивості лейкемічних клітин), встановлено, що для формування груп ризику хворих по розвитку прогностично несприятливих мутацій *TP53* і *SF3B1* доцільно проводити визначення тільки поліморфізму rs1042522 гена *TP53* в комплексі з аналізом мутаційного статусу та експресією окремих *IGHV* генів.

Нижче підсумовані отримані нами результати, що свідчать про асоціацію зазначених чинників з частотою розвитку мутацій генів *TP53* і *SF3B1* (табл.4).

Таблиця 4 – Частота мутацій генів *TP53* і *SF3B1* у хворих на ХЛЛ, носіїв окремих генотипів гена *TP53* за поліморфізмом rs1042522, з урахуванням мутаційного статусу та експресії окремих *IGHV* генів

Генотипи *TP53* за поліморфізмом rs1042522	Частота мутацій генів *TP53* і *SF3B1*(%)		
	без урахування мутаційного статусу *IGHV* генів	мутаційний статус *IGHV* генів	
		мутовані	немутовані
Pro/Pro, n=28	42,9	33,3 проти 7,9 за інших генотипів; p=0,010	46,7 проти 19,1 за інших генотипів; p=0,014
	Асоціації експресії окремих *IGHV* генів з частотою мутацій генів *TP53* і *SF3B1*не знайдено		
Arg/Arg і Arg/Pro, n=216	15,7 (вірогідно менше порівняно з генотипом Pro/Pro; p=0,001)	7,9 31,3 за експресії генів *IGHV4-59*, *IGHV3-30* і *IGHV3-21* порівняно з 1,7% за експресії інших *IGHV* генів (p=0,001)	19,1 (вірогідно вище порівняно з М *IGHV* генами, p=0,029) Асоціації експресії окремих *IGHV* генів з частотою мутацій генів *TP53* і *SF3B1*не знайдено

Так, у носіїв генотипу Pro/Pro порівняно з носіями інших генотипів частота розвитку прогностично несприятливих мутацій значно збільшена, причому як при діагностиці ХЛЛ, так і у хворих, обстежених перед початком терапії і в рецидиві

. У первинних хворих вона збільшена за рахунок мутацій гена *SF3B1*, тоді як частота мутацій гена *TP53* однакова у носіїв різних генотипів. У хворих, обстежених перед початком терапії і в рецидиві за генотипу Pro/Pro переважно підвищується частота мутацій гена *TP53*, і менш виразно - частота мутацій гена *SF3B1*.

За генотипів Arg/Arg і Arg/Pro ризик розвитку мутацій *TP53* і *SF3B1* в значній мірі залежить від мутаційного статусу і експресії окремих *IGHV* генів. Частота мутацій мінімальна при мутованих *IGHV* генах та відсутності експресії генів *IGHV4-59*, *IGHV3-30* і *IGHV3-21*. В нашому дослідженні тільки у одного з 60 хворих з такими характеристиками була виявлена мутація гена *SF3B1* (1,7%), яка розвинулась в рецидиві ХЛЛ.

Проміжну групу по ризику розвитку мутацій генів *TP53* і *SF3B1* становлять хворі з експресією немутованих *IGHV* генів та генотипів Arg/Arg і Arg/Pro. В цій групі хворих мутації генів *TP53* і *SF3B1* виявлені у 19,1% випадків, а саме у 13% хворих при

діагностиці захворювання і 23,2% у хворих, обстежених перед початком терапії або в рецидиві (p=0,138).

Хворі з генотипами Arg/Arg і Arg/Pro та експресією мутованих *IGHV4-59*, *IGHV3-30* і *IGHV3-21* генів за частотою розвитку мутацій *TP53* і *SF3B1* не відрізняються від носіїв генотипу Pro/Pro. В цій підгрупі частота мутацій становила 31,3% (20% у первинних хворих і 50% серед обстежених перед початком терапії або в рецидиві).

Таким чином, вже на етапі первинного обстеження хворих на ХЛЛ шляхом визначення двох показників – поліморфізму rs1042522 гена *TP53* і *IGHV* генів можна відокремити групу пацієнтів підвищеного ризику, в яких збільшена вірогідність розвитку прогностично несприятливих мутацій генів *TP53* і *SF3B1*.

ВИСНОВКИ

1. Мутації генів *TP53* і *SF3B1* мають негативний самостійний вплив на перебіг хронічної лімфоцитарної лейкемії. За їх наявності скорочується період безрецидивного та загального виживання хворих, незалежно від інших прогностичних чинників (вік хворих, ініціальний лейкоцитоз, стадія захворювання, немутований статус *IGHV* генів).
2. Визначення мутацій *TP53* і *SF3B1* доцільно проводити при первинному обстеженні хворих на ХЛЛ та перед призначенням терапії.
3. Групою ризику по розвитку мутацій генів *TP53* і *SF3B1* є носії генотипу Pro/Pro, незалежно від мутаційного статусу та експресії окремих *IGHV* генів.
4. За генотипів Arg/Arg і Arg/Pro і при мутованих *IGHV* генах ризик розвитку мутацій *TP53* і *SF3B1* генів підвищений у хворих тільки за експресії генів *IGHV4-59, 3-30* і *3-21* (порівняно з хворими, в яких виявлена експресія інших мутованих *IGHV* генів).
5. За генотипів Arg/Arg і Arg/Pro у хворих на ХЛЛ, в яких не виявлено експресії генів *IGHV4-59, 3-30* і *3-21*, ризик розвитку мутацій вище при немутованих *IGHV* генах, ніж при мутованих *IGHV* генах.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Herling, C.D. Complex karyotypes, KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil based chemo- or chemoimmunotherapy / C.D. Herling, M. Klaumunzer, C. Krings Rocha et al. // Blood. – 2016. – Vol. 43, N3. – P. 320-227..
2. Tausch, E. Genomic Features: Impact on Pathogenesis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia / E. Tausch, D. Mertens, S. Stilgenbauer // Oncol Res Treat. – 2016. – Vol. 39, N1-2. – P. 34-40.
3. Wang, L. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia / L. Wang, M.S. Lawrence, Y. Wan et al. // N Engl J Med. - 2011. - Vol. 36. - P. 2497-2506.
4. Malcikova, J. TP53 mutation analysis in clinical practice: lessons from chronic lymphocytic leukemia / J. Malcikova, S. Pavlova, K.S. Rozubik et al. // Hum Mutat. - 2014. - Vol.35, N6. - P. 663 - 671.
5. Hirata, H. MDM2 SNP309 polymorphism as risk factor for susceptibility and poor prognosis in renal cell carcinoma / H. Hirata, Y. Hinoda, N. Kikuno et al. // Clin Cancr Res. - 2007. - Vol.13, N14. - P. 4123-4129.
6. Чумак, А.А. Прогностичне значення перебудови В-клітинного рецептора лейкемічних клітин у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (методичні рекомендації) / А.А. Чумак, І.В. Абраменко, Н.І. Білоус на ін. // Київ. - 2011. - 17 с.
7. Binet, J.L. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis / J.L. Binet, A. Auguier, G. Dighiero [et al.] // Cancer. – 1981. – Vol. 48. – P. 198-205.
8. Rai, K.R. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia / K.R. Rai, A. Sawitzky, E.P. Cronkite [et al.] // Blood. – 1975. – Vol. 46. – P. 219-234.