

Е.А.СТАДНИК
А.М.РУМЯНЦЕВ

РОЛЬ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА VН-ГЕНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ПОДХОДАХ К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Методические рекомендации

ROHS

РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ОНКОГЕМАТОЛОГОВ

Санкт-Петербург
Москва
2020

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России)

Федеральное государственное бюджетное учреждение
Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
(ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова)

УТВЕРЖДЕНО

Решением заседания
цикловой методической комиссии
ФПО ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова
Минздрава России
«25» февраля 2020 г.

**Е.А. СТАДНИК,
А.М. РУМЯНЦЕВ**

РОЛЬ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА VH-ГЕНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ И ПОДХОДАХ К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Методические рекомендации

Москва
Санкт-Петербург
2020

УДК 616
ББК 55.6:54.11
С76

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

проректор по лечебной работе и международному сотрудничеству
ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, заведующая кафедрой онкологии
и паллиативной медицины, академик РАН, профессор, д.м.н. *Поддубная И.В.*
руководитель отделения гематологии и трансплантации костного мозга
ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, профессор, д.м.н. *Османов Е.А.*

Стадник Е.А., Румянцев А.М.

С76 Роль мутационного статуса VH-генов в патогенезе и подходах к терапии хронического лимфолейкоза / Е.А. Стадник, А.М. Румянцев; ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова; ФГБУ НМИЦ им. В.А. Алмазова МЗ РФ. – М.: Изд-во «Экон-Информ», 2020. – 39 с.
ISBN 978-5-907233-71-3

Методическое пособие посвящено актуальной молекулярно – биологической проблеме при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ) – определению мутационного статуса генов, кодирующих вариабельные регионы иммуноглобулинов В-клеточного рецептора. На протяжении многих лет гетерогенность клинического течения ХЛЛ была не объяснима. В последние десятилетия стало очевидным, что клетки при этом заболевании имеют разные молекулярно – биологические характеристики. Появилось понятие «мутационного статуса», и ХЛЛ был разделен на «мутированный» и «немутированный» варианты. С появлением таргетных препаратов данная проблема стала особенно актуальной, так как теперь это может влиять на тактику выбора терапии первой линии, что в свою очередь, позволит увеличить продолжительность жизни пациентов.

В пособии представлено современное представление о структуре В- клеточного рецептора, обзор исследований, в которых изучалось ее влияние на выживаемость пациентов при историческом контроле и на разных режимах терапии.

Большое внимание уделено методике определения мутационного статуса VH- генов и ее значению в реальной клинической практике. Приведены данные международных исследований, которые демонстрируют важность назначения таргетных препаратов при ХЛЛ в случае наличия немутированного вариантаIGHV. Данное учебное пособие разработано и подготовлено в соответствии с системой стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу.

Методическое пособие предназначено для врачей онкологов, гематологов, а также ординаторов и слушателей циклов повышения квалификации и профессиональной переподготовки системы дополнительного образования по специальности «Онкология», «Гематология».

Рубрикация по МКБ-10: Класс II. Новообразования C00-Д48. Класс IV. Болезни лимфоидной ткани E00-E90.

УДК 616
ББК 55.6:54.11

ISBN 978-5-907233-71-3

© Стадник Е.А., Румянцев А.М., 2020

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) – злокачественная пролиферация CD 5+ В лимфоцитов, характеризующаяся накоплением малых опухолевых В-клеток в костном мозге, крови и вторичных лимфоидных органах и тканях. Одним из важных факторов развития ХЛЛ является генетическая предрасположенность. Так, заболевание наиболее часто встречается в странах Европы и Америки (0,06% от популяции) и, достаточно редко, в странах Азии (менее 0,01% от популяции). Риск развития ХЛЛ в два раза выше у мужчин, чем у женщин и увеличивается с возрастом. Медиана возраста на момент постановки диагноза составляет 70–72 года. По своему клиническому поведению ХЛЛ делится на два подтипа. Они отличаются по наличию или отсутствию соматической гипермутации генов, кодирующих вариабельные регионы иммуноглобулинов В-клеточного рецептора (IGHV). Клетки при немутированном варианте ХЛЛ не подверглись дифференцировке в герминативном центре лимфоуза и имеют «префолликулярное» происхождение. Клетки с наличием соматической гипермутации подвергались контакту с антигеном и переродились на более позднем этапе развития В-лимфоцита, после выхода его из герминативного центра.

В основе жизнедеятельности клетки лежит стимуляция ее рецепторного аппарата – набора молекул на поверхностной мембране. В случае В-лимфоцита – это В-клеточный рецептор (BCR). Нормальная клетка не может выживать без получения антигенной стимуляции. Этот же закон распространяется и на опухолевые клетки, в частности, при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ). Для того, чтобы понимать патогенез заболевания, особенности поведения опухоли, необходимо рассмотреть, как устроены сигнальные пути В-клеточного рецептора и чем они отличаются при разных вариантах течения заболевания.

В структуру В-клеточного рецептора входит три молекулы – это поверхностный иммуноглобулин, который непосредственно реагирует с антигеном и два нековалентно связанных с ним интегрин – альфа и бета (они же CD79A и CD79B). Интегрины необходимы, поскольку у иммуноглобулина нет большой цитоплазматиче-

ческой части, и они «помогают» проведению сигнала внутрь клетки [1]. Строение BCR представлено на рис. 1.

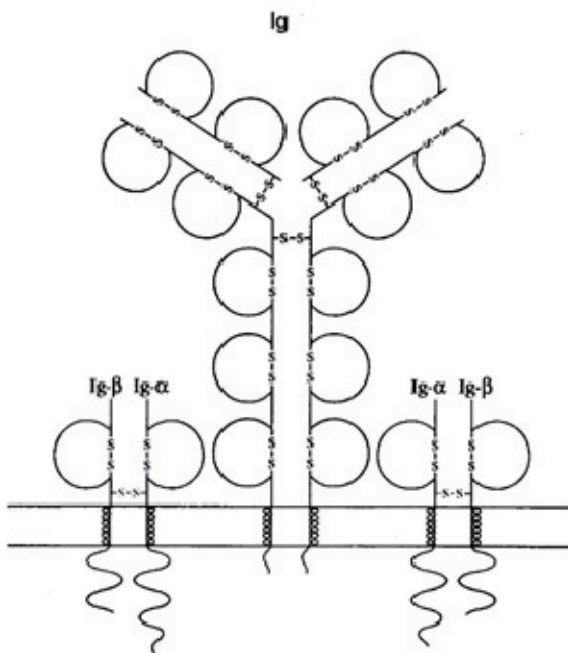


Рисунок 1. Строение В-клеточного рецептора.
Представлена молекула иммуноглобулина (Ig),
и нековалентно связанные с ней интегрины – альфа и бета.

Молекула иммуноглобулина состоит из двух одинаковых тяжелых (H) цепей и двух одинаковых легких (L) цепей. Обе цепи H и L содержат переменную область (VH и VL, соответственно) и константную область (CH и CL). Именно переменные (они могут называться также «гиперпеременные») участки образуют антиген-связывающий центр. Область VH кодируется V, D и J генами, в то время как область VL кодируется только генами V и J (рис. 2). Область VH состоит из четырех относительно стабильных каркасных участков: VH FR1, VH FR2, VH FR3 и VH FR4, поддерживающих структуру домена, и трех гиперпеременных участков, определяющих комплементарность (сродство к антигену): VH CDR1, VH

CDR2 и VH CDR3. При этом VH FR1-3, VH CDR1 и VH CDR2 кодируются генами IGHV; VH FR4 – генами IGHJ. Ген, кодирующий VH CDR3, расположен на стыке IGHV-IGHD-IGHJ, в связи с чем VH CDR3 является наиболее вариабельным участком. Последовательность нуклеиновых кислот в генах, кодирующих гипервариабельные участки, и, соответственно, аминокислот непосредственно самих этих участков, определяет специфичность и аффинность BCR к антигенным детерминантам и является уникальной молекулярной характеристикой каждой В-клетки [2].

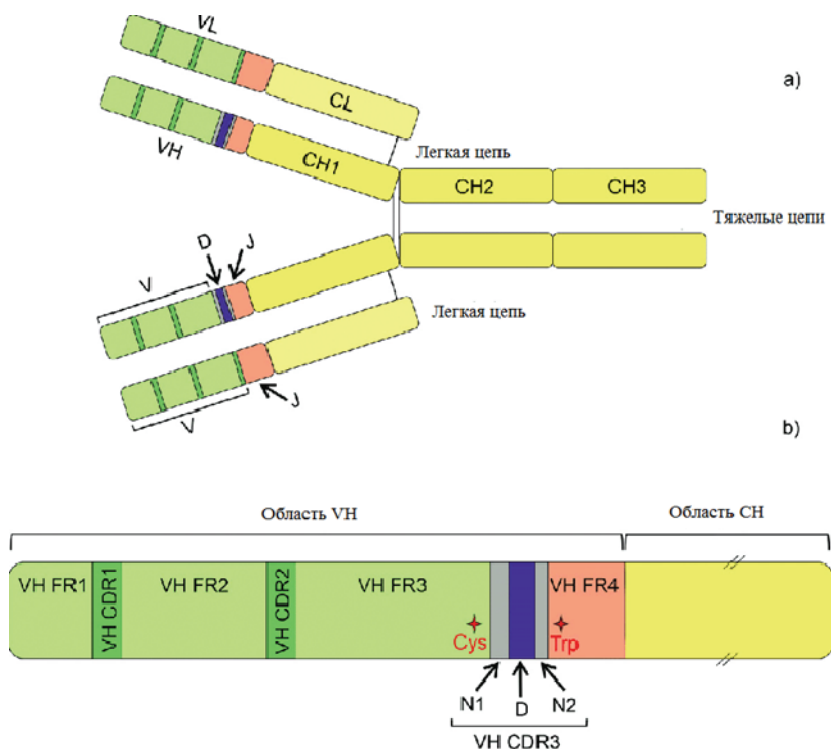


Рисунок 2. Схематическое изображение молекулы иммуноглобулина [2].

(а) молекулы IG состоят из двух идентичных тяжелых (H) цепей и двух идентичных легких (L) цепей. Обе цепи H и L содержат вариабельную область (VH и VL, соответственно) и константную область (CH и CL, соответственно). Область VH кодируется перегруппированными сегментами гена V, D и J, тогда как VL кодируется перегруппированными сегментами гена V и J.

(б) VH-область состоит из четырех каркасных областей (VH FR1, VH FR2, VH FR3 и VH FR4) и трех гипервариабельных областей, определяющих комплементарность (VH CDR1, VH CDR2 и VH CDR3). VH FR1-3, VH CDR1 и VH CDR2 полностью кодируются геномным сегментом IGHV; FR4 VH кодируется сегментом гена IGHD. VH CDR3 расположен на стыке IGHV-IGHD-IGHJ и включает в себя аминокислоты между консервативным цистеином (кодон 104) в FR3 и консервативным триптофаном (кодон 118) в FR4. Области N1 и N2 создаются путем случайного добавления и удаления нуклеотидов во время соединения IGHV-IGHD и IGHD-IGHJ.

При связывании с антигеном, В-лимфоцит получает сигнал, который проводится через внутриклеточный сигнальный каскад и приводит к активации различных транскрипционных факторов. Эти факторы регулируют дифференцировку, пролиферацию и продолжительность жизни нормальных В-клеток. Аналогичные процессы происходят при злокачественных В-клеточных лимфо-пролиферативных заболеваниях. Современные таргетные противоопухолевые препараты могут нарушать передачу сигнала, воздействуя на различные молекулы каскада.

Наиболее хорошо изучена «активная» форма нормального сигналинга, при которой гипервариабельные участки иммуноглобулина В-клеточного рецептора распознают определенный антиген. Это запускает быстрый каскад проксимального фосфорилирования молекул внутри клетки. В нём работает большое количество киназ и адапторных молекул, включая семейство киназ Src (главным образом, LYN), тирозинкиназы селезенки (SYK), тирозинкиназу Брутона (BTK) и PI3K (рис. 3) [3].

Также в нормальных В-клетках может происходить «тонический», антиген-независимый сигналинг. Он может иметь большое значение при развитии злокачественных В-клеточных заболеваний. После реаранжировки генов, кодирующих IgH, у ранних предшественников В-лимфоцитов в костном мозге на поверхности клетки экспонируется пре-BCR, состоящий из IgH с суррогатной легкой цепью, CD79A и CD79B. Этот пре-BCR генерирует антиген-независимые сигналы, передаваемые через молекулу ITAM, которые опосредуют дальнейшее развитие и жизненный цикл клетки (рис. 4).

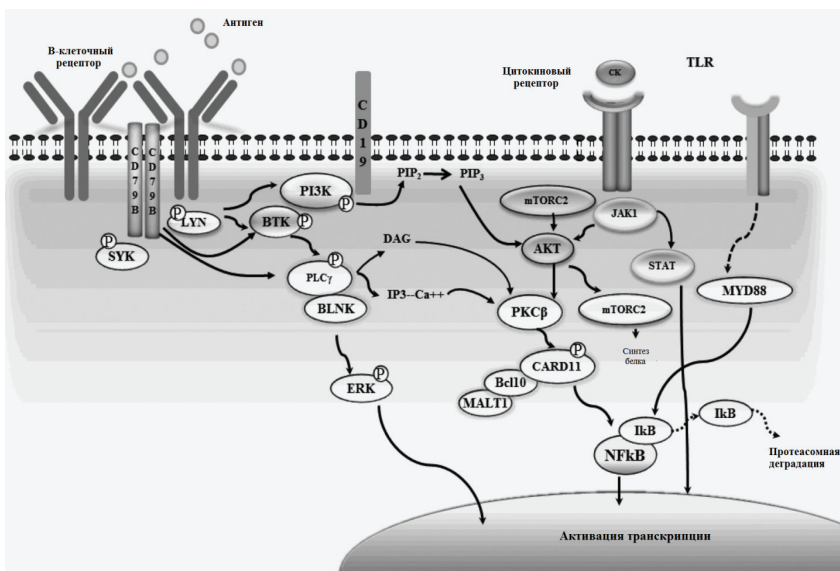


Рисунок 3. Передача сигнала через В-клеточный рецептор [3].

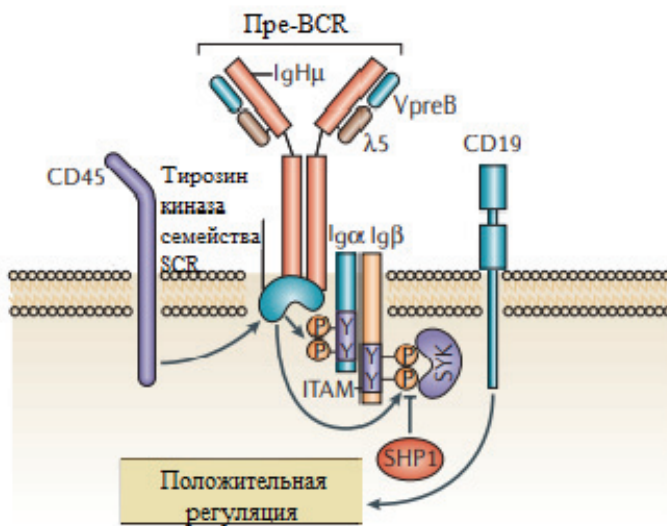


Рисунок 4. Схема тонического сигналинга BCR.

В периферических лимфоидных органах зрелые В-клетки могут оставаться зависимыми от тонического сигналинга BCR, особенно до контакта с антигеном, поэтому в роли мишени для терапии В-клеточных заболеваний должны выступать молекулы, задействованные как в «активной», так и в «тонической» передаче сигнала.

Дифференцировка В-клеток является сложным процессом, который можно разделить на 2 этапа (рис. 5). Первый этап происходит в костном мозге (и печени плода) и является антиген-независимым. Он включает сборку генов V, D и J, кодирующих вариабельную область, посредством реаранжировки ДНК (V-D-J реаранжировка), что приводит к появлению поверхностного иммуноглобулина на мембране В-лимфоцита [4].

Нормальные наивные В-лимфоциты подвергаются успешной V(D)J рекомбинации и экспонируют функциональный В-клеточный рецептор, способный связываться с антигеном при взаимодействии с CD4+ Т-клетками и поддерживающими клетками. Агрегируя, эти клетки формируют фолликулы, которые становятся герминативными центрами. Каждый герминативный центр имеет темную зону с быстро делящимися В-клетками и светлую зону, где находятся В-клетки вместе с фолликулярными дендритными клетками (ФДК), макрофагами и Т-хелпер клетками (T_Hcell). В темной зоне герминативного центра В-клетки быстро пролиферируют и подвергаются соматической гипермутации (СГМ) в генах, кодирующие вариабельный регион тяжелой цепи Ig(IGHV) и легкой цепи (IGVL). Направлению в светлую зону и дальнейшей дифференцировке подвергаются В-лимфоциты с наибольшей аффинностью В-клеточного рецептора к антигену, также такие В-лимфоциты могут претерпеть рекомбинацию с переключением класса иммуноглобулина (рис. 5). При немутированном статусе ХЛЛ опухолевая трансформация происходит на уровне CD5+ наивного В-лимфоцита, в то время как при мутированном статусе ХЛЛ трансформация происходит на уровне клеток герминативного центра, т.е. подвергшихся СГМ [5]. Также в опухолевых клетках может произойти рекомбинация с переключением класса иммуноглобулина и

следовательно смена изотипа иммуноглобулина на отличный от IgM и IgD, например, на IgG или IgA. Другое подмножество опухолевых клеток характеризуется ограниченной СГМ с участием IGHV3-21/IGLV3-21 генов, которые обладают 97% гомологией к унаследованному IGHV3-21/IGLV3-21 в наивных В-лимфоцитах.

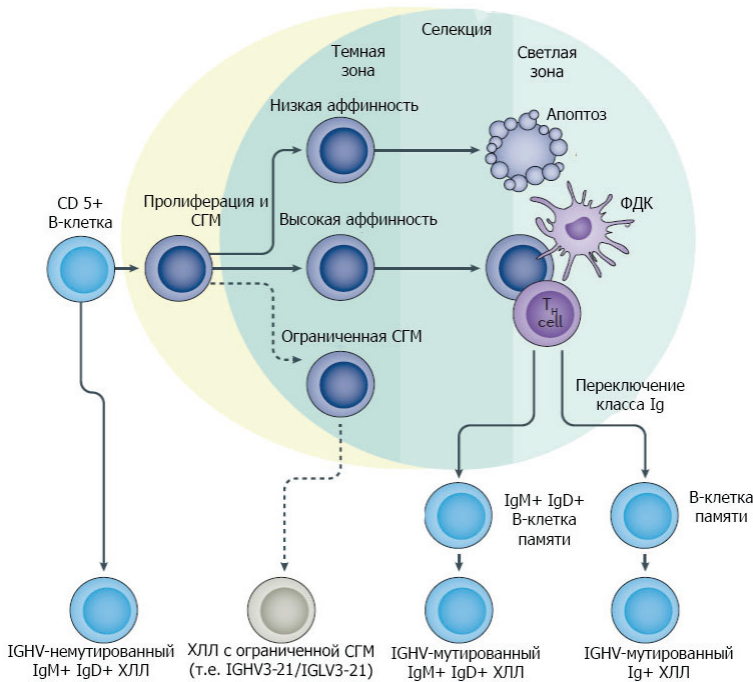


Рисунок 5. Дифференцировка В- лимфоцита и клеточное происхождение ХЛЛ.

V-D-J реаранжировка представляет собой тонко организованный процесс, который можно разделить на 4 этапа (рис. 6).

1) Формирование комплекса RAG1-RAG2 (RAG-recombination activating gene), связанного с последовательностями рекомбинационного сигнала (RS), и образование петли ДНК. RAG1-RAG2 комплекс ответственен за распознавание RS и начального расщепления ДНК. Последующие шаги контролируются белком NHEJ.

Ku70 и Ku80 белки активируют каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы. Последняя активирует белок Artemis для отщепления концов шпильки ДНК, образованной RAG ферментами.

2) RAG1 делает единичный надрез нити ДНК на границе между кодирующей последовательностью и гептамером RS.

3) Образовавшиеся концы на границе RS либо лигируются напрямую, без каких-либо дальнейших изменений, либо подвергаются обширной модификации. Модификация заключается в: (а) удалении нескольких нуклеотидов экзонуклеазами, (б) добавлении палиндромного комплементарного хвоста и (с) добавление новых нуклеотидов (N). Полимеразы Pol μ и Pol λ достраивают последовательности на концах ДНК. Вставка нуклеотидов осуществляется ферментом TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*). Активность этого фермента наиболее выражена на ранних стадиях развития В-клеток, что объясняет, почему он более активен при образовании кодирующих последовательностей тяжелой цепи, а не легкой.

4) На завершающем этапе нити ДНК объединяются и лигируются. Этому способствует ферментативный комплекс, включающий X-RCC4 (*X-ray repair cross-complementing factor 4*) белок, ДНК-лигазу IV и белок Cernunnos. Белки XRCC4 и Cernunnos работают совместно с ДНК-зависимой протеинкиназой, выравнивают образовавшиеся концы ДНК друг с другом, и также помогают в работе фермента TdT, который случайным образом присоединяет нуклеотиды к открытым концам ДНК, что приводит к образованию липких концов. Полимеразы Pol μ и Pol λ присоединяют нуклеотиды, необходимые для комплементарности липких концов друг другу. ДНК-лиагаза IV окончательно сшивает липкие концы друг с другом, завершая процесс присоединения сегментов друг к другу [7-11].

В случае неудачной перестройки гена, есть еще одна попытка, которая будет проходить на второй аллели. Если и в этом случае образуется нефункциональный ген, в клетках запускаются механизмы апоптоза, и эти клетки уничтожаются в дальнейшем

макрофагами [8]. 55–75% В-клеток, образующихся в костном мозге, имеют рецепторы к собственным аутоантигенам. Распознавание аутоантигенов служит сигналом для «редактирования» BCR. Этот процесс также заключается в повторной перестройке V-генов. При успешном редактировании В-клетка теряет активность к аутоантигенам, а если нет, то подвергаются апоптозу.

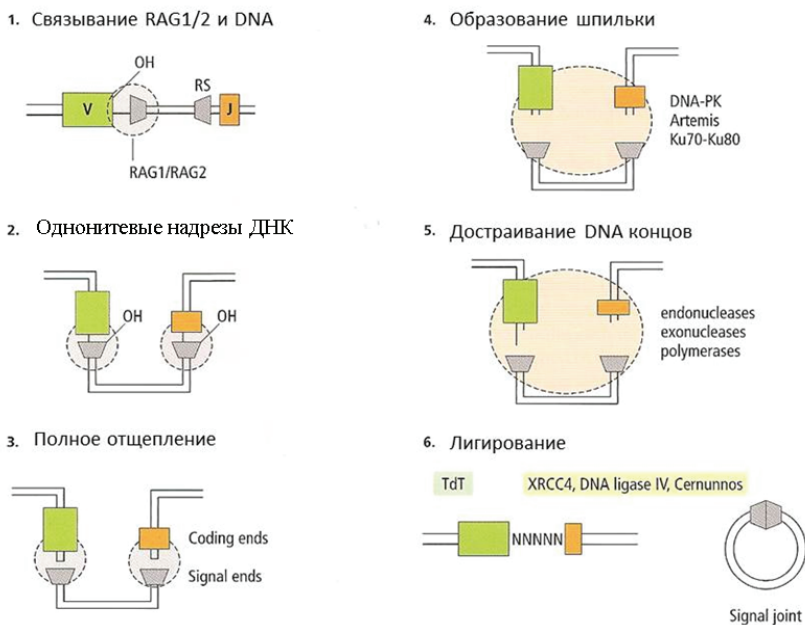


Рисунок 6. Схема основных этапов реаранжировки генов тяжелой цепи иммуноглобулина [6].

Реаранжировка последовательностей нуклеотидов, кодирующих легкие цепи иммуноглобулинов (рис. 7), каппа (κ) и лямбда (λ), сходна с таковой для тяжелых цепей, за исключением того, что в легких цепях не хватает сегмента D. Другими словами, первый шаг рекомбинации для легких цепей включает присоединение V и J генов, что дает VJ комплекс перед добавлением константных генов [9].

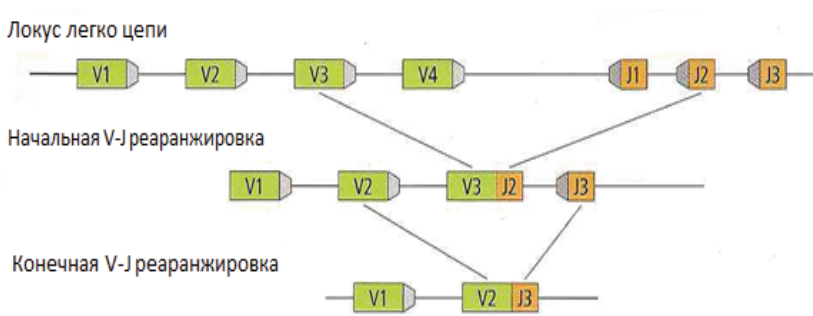


Рисунок 7. Схема прохождения реарранжировки генов легкой цепи иммуноглобулинов.

Таким образом, из костного мозга в периферическую кровь В – лимфоцит выходит в виде «наивной» В – клетки, с полностью собранным В – клеточным рецептором, содержащим в своем составе IgM. Он не имеет уникальной антигенной специфичности и погибнет через два дня в результате апоптоза, если не произойдет второй этап его развития – антиген – зависимая трансформация и дифференцировка.

Второй этап происходит на периферии во вторичных лимфоидных органах, в которых «наивные» В-клетки встречаются с антигеном и активируются. При этом в участках IgV этих клеток происходит так называемая соматическая гипермутация. Соматическая гипермутация происходит с частотой $\sim 10^{-13}$ на деление клетки, что примерно в $\sim 10^6$ раз выше, чем скорость спонтанной мутации во всех других клетках. Гипермутации могут быть подвергнуты обе последовательности, кодирующие цепи иммуноглобулинов. Мутагезис затрагивает преимущественно V-домен, а именно – гипервариабельный участок тяжелых цепей CDR3, что определяет взаимодействие с антигеном. В прохождении гипермутации ключевую роль играет фермент – цитидиндезаминаза, кодируемая геном AID (*Activation-induced cytidine deaminase*). Этот фермент дезаминирует остатки цитидина в одноцепочечной ДНК, превращая его в дезоксиуридин, что в дальнейшем приводит к замене нуклеотида С на Т. Таким образом приобретается уникальная антигенная специфичность (рис. 8) [12].

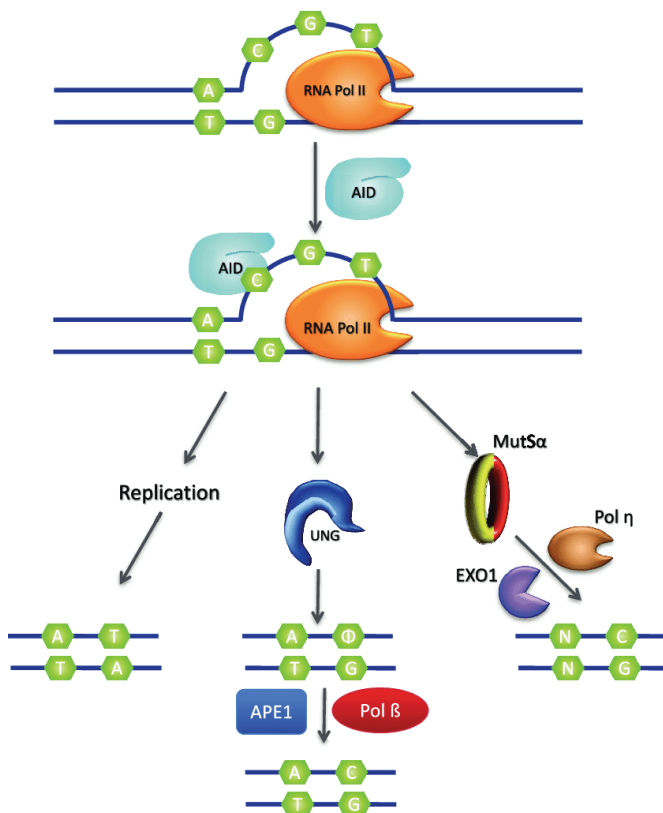


Рисунок 8. Молекулярный механизм соматической гипермутации (SHM) [12]. Субстратом AID служит одноцепочечная ДНК. Поэтому процесс дезаминирования сопряжён с транскрипцией осуществляемой РНК-полимеразой II (RNA Pol II). AID дезаминирует цитозин с образованием урацила. Далее могут происходить различные процессы. 1) Репликация последовательности содержащей урацил приводит к закреплению изменений и переходу С в Т в данном положении (а комплементарного нуклеотида G в A). 2) Обработка урацила ДНК-гликозилазой (UNG) генерирует абазический сайт (Φ), который расщепляется апуриновой/апиридиновой эндонуклеазой (APE1). Она удаляет этот сайт, а затем полимеразы Polβ синтезируют ДНК и застраивают его. 3) Поскольку нуклеотиды U и G некомплементарны, это несоответствие распознаётся белками MutSα. Нуклеаза Exo1 расщепляет некомплементарный участок, который затем застраивается полимеразой Polη. Данная полимеразы имеет низкую точность и может привести к внесению нуклеотидных замен (обозначенных как «N»). 4) Возможно также исправление повреждения, вносимого AID за счёт работы системы эксцизионной репарации оснований (basic excision repair, BER) и системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair, MMR). При этом происходит безошибочное восстановление исходной последовательности.

Соматическая гипермутация сопровождается дополнительной модификацией других генов, кодирующих иммуноглобулин В-клеточного рецептора, в результате чего происходит переключение классов синтезируемых иммуноглобулинов. Этот процесс называется switch – рекомбинаций или «сдвигом изотипа». Появляются клетки, в состав BCR которых входит не только IgM, как у «наивного» В- лимфоцита, но и IgG, IgA и других классов. Это увеличивает разнообразие антител и делает возможным продукцию антитела более высокой специфичности [38]. В дальнейшем, после трансформации В-клеток в плазматические клетки происходит переключение на синтез секреторных Ig.

Определение мутационного статусаIGHV в клинике

На протяжении всей истории изучения хронического лимфолейкоза было известно, что для этого заболевания характерна крайняя гетерогенность клинического течения. Этот факт до 1994 года объяснения не имел. У одной группы пациентов отмечалась бурная прогрессия, плохой ответ на специфическое лечение, другие же пациенты могли десятилетиями жить без терапии и чувствовали себя хорошо.

Перелом в понимании патогенеза ХЛЛ произошел после появления работы Schroeder H.W. и Dighiero G. (1994) [13]. Они впервые рассмотрели вопрос о возможной роли мутационного статуса IGHV в патогенезе. До этого считалось, что опухолевая трансформация клеток происходит до контакта с антигеном, на уровне «наивного» В- лимфоцита. После того, как этими учеными были проанализированы образцы крови 75 пациентов, оказалось, что у 36 больных ХЛЛ (48%) отмечаются признаки соматической гипермутации IGHV. Таким образом, было показано, что ХЛЛ является гетерогенным заболеванием на молекулярном уровне, что сказывается на его клиническом поведении. Появилось понятие «мутированного» и «немутированного» варианта ХЛЛ (рис. 9)

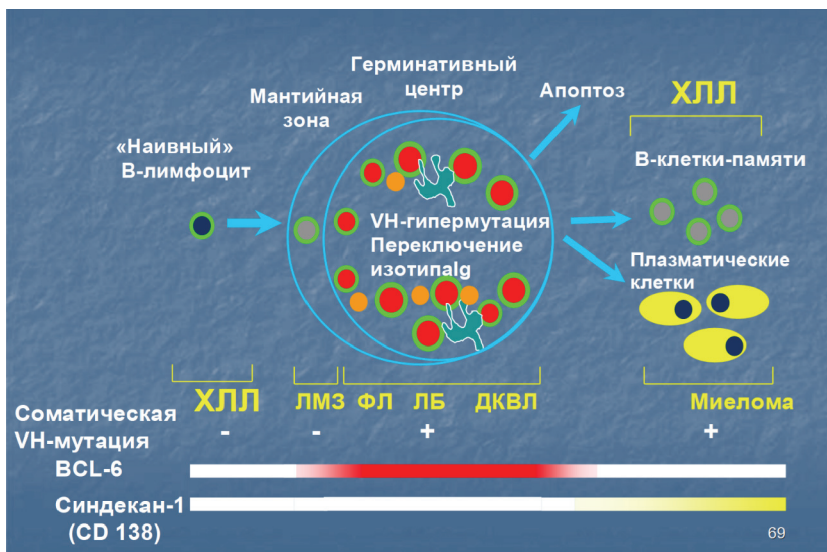


Рисунок 9. Опухолевая трансформация при ХЛЛ на различных этапах развития В- лимфоцитов. Мутированный и немутированный вариант хронического лимфолейкоза.

В дальнейшем, возможность использования мутационного статуса IGHV как прогностического фактора была исследована в работах Damle и соавт. (1999) и Hamblin и соавт. (1999) [14-15]. В анализ Damle и соавт. было включено 47 пациентов с ХЛЛ, из которых 23 пациента имели мутированный статус IGHV, и 24 пациента – немутированный. Авторы показали, что у пациентов с немутированным статусом IGHV наблюдался плохой ответ на химиотерапию с применением различных схем (включая флударабин), тогда как пациентам с мутированным статусом IGHV проводилось минимальное лечение или химиотерапия не требовалась вовсе. При этом пациенты с мутированным статусом IGHV показали достоверно более высокую общую выживаемость в сравнении с пациентами с немутированным статусом (медиана ОВ не была достигнута в сравнении с медианой ОВ 9 лет; $p = 0,0001$) (рис. 10) [14].

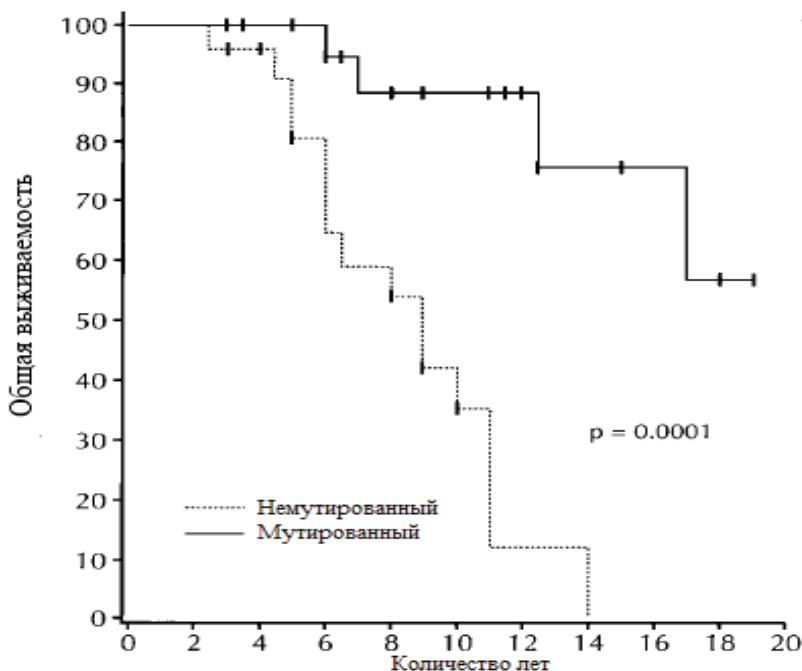


Рисунок 10. Кривые выживаемости по Каплану-Майеру для пациентов с мутированным и немутированным статусом IGTV в исследовании Damle et al. [14]

Namblin и соавт. проанализировали выживаемость 84 пациентов с ХЛЛ: 46 пациентов с мутированным статусом IGTV и 38 пациентов с немутированным статусом. В рамках этого исследования, в зависимости от наличия показаний к началу терапии, пациенты либо не получали лечение, либо получали хлорамбуцил в качестве терапии первой линии и флударабин в качестве терапии второй линии. В этом исследовании также было продемонстрировано достоверное различие в показателях общей выживаемости в пользу пациентов с мутированным статусом (медиана ОВ 117 месяцев у пациентов с немутированным статусом и 293 месяца у пациентов с мутированным статусом, $p=0,001$) (рис. 11) [15].

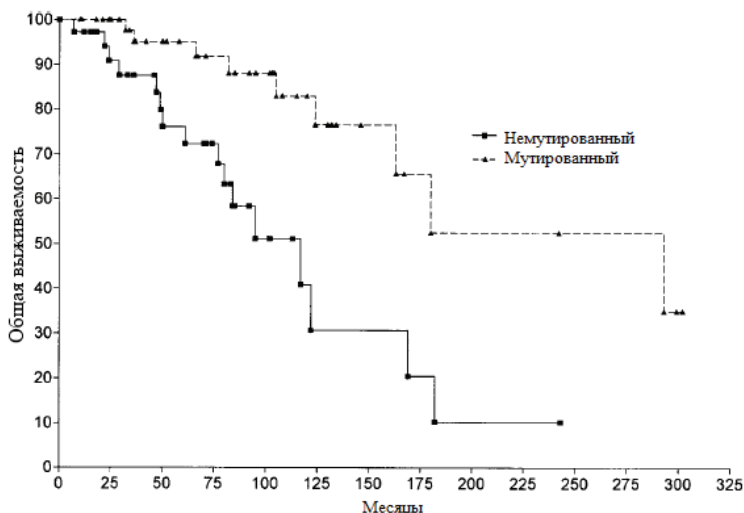


Рисунок 11. Кривые выживаемости по Каплану-Майеру для пациентов с мутированным и немутированным статусом IGHV в исследовании Hamblin et al. [15]

В дальнейшем было проведено несколько других исследований, которые подтверждали эти результаты. Ретроспективный анализ, выполненный Parikh SA и соавт. (2016), подтвердил лучшие показатели БПВ у пациентов с мутированным статусом IGHV, составившие от 9,2 до 18,9 лет, в сравнении с пациентами с немутированным статусом, у которых показатели БПВ находились в диапазоне от 1 до 5 лет [16]. Аналогичным образом, показатели ОВ составляли от 17,9 до 25,8 лет у пациентов с мутированным вариантом в сравнении с диапазоном от 3,2 до 10 лет у пациентов с немутированным статусом.

В большинстве случаев благоприятный цитогенетический профиль сочетается с мутированным статусом IGHV, а неблагоприятный хромосомные aberrации – с немутированным статусом IGHV. Интересно отметить, что в случае разнонаправленных прогностических характеристик показано, что мутационный статус может иметь большее прогностическое значение для общей выживаемости [17-18].

В 2016 году Международной рабочей группой CLL-IPI был предложен международный прогностический индекс (МПИ, IPI) для пациентов с ХЛЛ, который включает данные касательно стадии заболевания, его биологических свойств, а также факторы, связанные с пациентом. Эта прогностическая шкала была разработана на основании ретроспективного анализа 8 клинических исследований фазы 3, проводившихся на территории Европы и США в период с 1997 по 2007 г., в которых приняли участие в общей сложности 3472 пациента, ранее не получавших лечение по поводу ХЛЛ [19]. В прогностическую шкалу IPI были включены пять факторов, определенные как независимые предикторы более низкой выживаемости (табл. 1).

Таблица 1.

Международный прогностический индекс

Параметр	Значение	Баллы
TP53 (17p)	Делеция/мутация	4
СтатусIGHV-генов	Немутированный	2
β2-микроглобулин, мг/л	>3,5	2
Стадия	В/С по Binet и/или I-IV по Rai	1
Возраст	>65 лет	1

На основании анализа этих пяти факторов, включенных в итоговую прогностическую шкалу, были выделены 4 группы риска с достоверными различиями в общей выживаемости (табл. 2, рис. 12).

Таблица 2.

Стратификация пациентов на основании IPI

Группа риска	Балл	5-летняя ОВ
Низкая	0-1	93,2%
Промежуточная	2-3	79,4%
Высокая	4-6	63,6%
Очень высокая	7-10	23,3%

Кроме того, показано, что международный прогностический индекс, включающий мутационный статус IGHV, возраст, клиническую стадию, мутации гена TP53 и уровень бета-2 микроглобулина в

сыворотке крови, позволяет прогнозировать время до начала лечения и ОВ у пациентов с ХЛЛ [19-21]. В этой многофакторной модели относительный риск мутационного статуса IGHV в два раза превышает относительный риск возраста и клинической стадии и уступает по значимости только del17p/мутации TP53. Более упрощенные прогностические шкалы, включающие только мутационный статус IGHV и TP53, аналогичным образом показали способность прогнозировать выживаемость у пациентов с ХЛЛ [22].

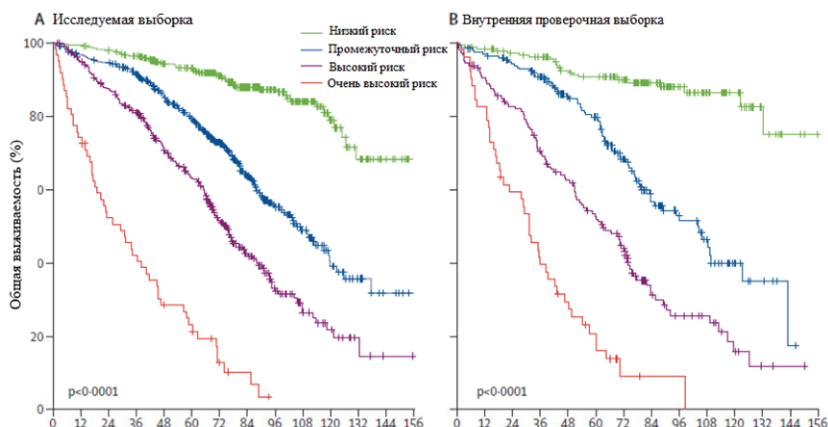


Рисунок 12. Общая выживаемость в соответствии с группами риска IPI.

В последние годы стала более ясной значимость мутационного статуса IGHV для прогнозирования длительности ответа на стандартную иммунохимиотерапию. В 2016 году Fischer K. и соавт. опубликовали отдаленные результаты проспективного рандомизированного исследования CLL8, в котором приняли участие 817 пациентов с ХЛЛ, случайным образом распределенных в группы терапии в режиме FC или FCR в качестве первой линии [23]. Статус IGHV был известен для 622 пациентов в исследуемой популяции, из которых 63% имели немутированный статус IGHV. Анализ отдаленных результатов показал, что немутированный статус являлся независимым неблагоприятным прогностическим фактором в отношении как общей выживаемости (ОВ), так и бес-

прогрессивной выживаемости (БПВ). При этом в группе пациентов с мутированным статусом IGHV, получавших терапию в режиме FCR, отмечалась достоверно большая длительность БПВ, чем у пациентов, получавших терапию в режиме FC (медиана БПВ в группе FCR не достигнута; в группе FC – 41,9 месяцев, ОР 0,47; 95% ДИ 0,33-0,68; $P < 0,001$; рис. 10). Медиана ОВ в группах мутированного и немутированного статуса достигнута не была (ОР 0,62; 95% ДИ 0,34-1,11; $P = 0,1$; рис. 13).

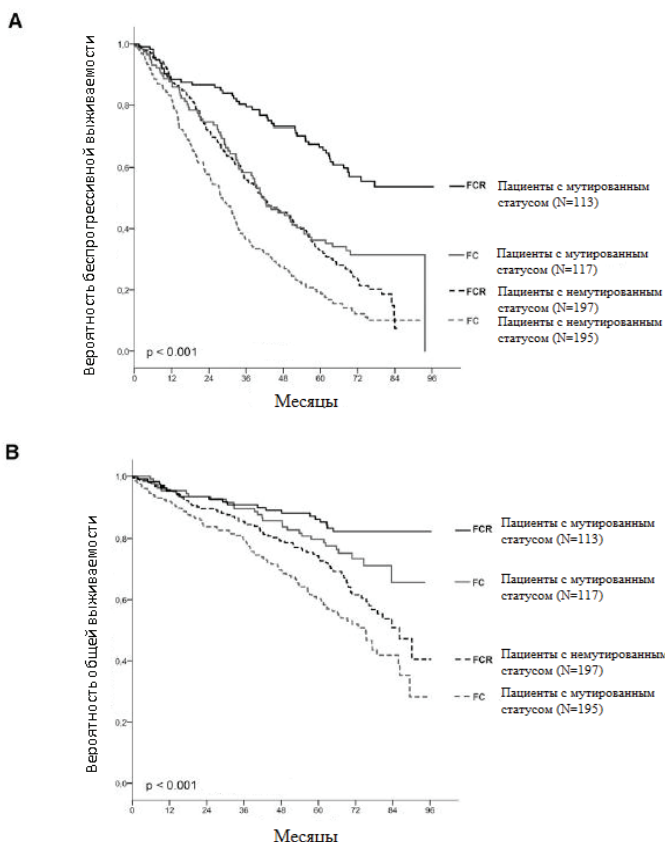


Рисунок 13. БПВ и ОВ в группах лечения FCR и FC у пациентов с мутированным и немутированным статусом IGHV в исследовании CLL8.
 (А) БПВ в обеих группах лечения (FCR и FC, все пациенты, N = 622);
 (В) ОВ в обеих группах лечения (FCR и FC, все пациенты, N = 622).

Thompson и соавт. в 2016 году опубликовали результаты исследования частоты достижения МОБ-отрицательного статуса у пациентов, получавших терапию в режиме FCR [24]. Из пациентов, включенных в анализ, немутированный статус IGHV отмечался у 126 пациентов, тогда как мутированный статус – у 88 пациентов. При многофакторном анализе немутированный статус IGHV был ассоциирован с достоверно меньшей БПВ (ОР 3,37 [2,18-5,21]; $P < 0,001$) и ОВ (ОР 2,87 [1,70-4,84]; $P < 0,001$). Медиана БПВ была не достигнута для пациентов с мутированным статусом IGHV и составила 4,2 года для пациентов с немутированным статусом IGHV ($P < 0,001$); 12,8-летняя БПВ составила 53,9% для пациентов с мутированным статусом IGHV и 8,9% для пациентов с немутированным статусом. Общая выживаемость была значимо ниже у пациентов с немутированным статусом IGHV в сравнении с пациентами с мутированным статусом (медиана ОВ 9,4 лет и не достигнута; 12,8-летняя выживаемость 32,2% и 65,5% соответственно; $P < 0,001$). Кумулятивная частота рецидивов при медиане последующего наблюдения 12,8 лет составила 34,5% и 85,3% у пациентов с мутированным и немутированным статусом IGHV соответственно ($P < 0,001$) (рис. 14).

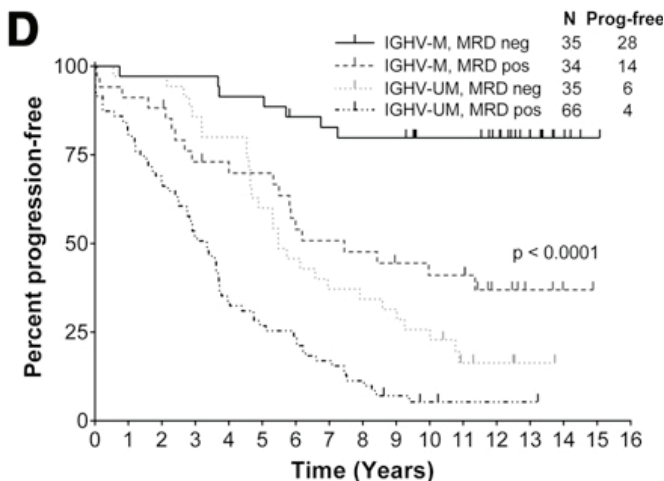


Рисунок 14. Беспрогрессивная выживаемость в зависимости от сочетания МОБ и мутационного статуса

Несмотря на несомненную прогностическую значимость мутационного статуса IGHV в эру стандартной иммунохимиотерапии, биологический механизм, объясняющий разное поведение опухолевых клеток, до конца не выяснен. Одна из гипотез заключается в том, что клетки с немутированным вариантом IGHV в большей степени подвержены апоптозу и что более быстрая кинетика роста клеток ХЛЛ, а не более высокая устойчивость к клеточной смерти, может обуславливать меньшую длительность ответа на традиционное лечение [25]. Кроме того, полное секвенирование экзома при ХЛЛ показало более высокую частоту драйверных мутаций при ХЛЛ с немутированным IGHV в сравнении с мутированным [26].

После появления таргетных препаратов, в частности, ингибиторов внутриклеточного проведения сигнала, отношение к мутационному статусу и его прогностическому значению, кардинально изменилось. Результаты многих крупных международных исследований продемонстрировали, что при терапии ибрутинибом нет различий ни в общей, ни в беспрогрессивной выживаемости в зависимости от мутационного статуса IGHV. .

Впервые эффективность терапии ибрутинибом у пациентов с немутированным вариантом IGHV при ХЛЛ была показана в исследовании PCYC-1102/1103, которое включало 132 пациентов: 31 пациента в возрасте ≥ 65 лет с нелеченным ХЛЛ и 101 пациента с рефрактерным/рецидивирующим ХЛЛ [27]. Данные 7-летнего наблюдения в рамках этого исследования показали, что ибрутиниб демонстрирует высокую эффективность у пациентов с рефрактерным/рецидивирующим ХЛЛ как с мутированным, так и с немутированным статусом IGHV, при этом медиана БПВ в обеих группах составила 63 мес. и 52 мес. соответственно, а медиана ОВ составила 63 мес. и не была достигнута соответственно (рис. 15).

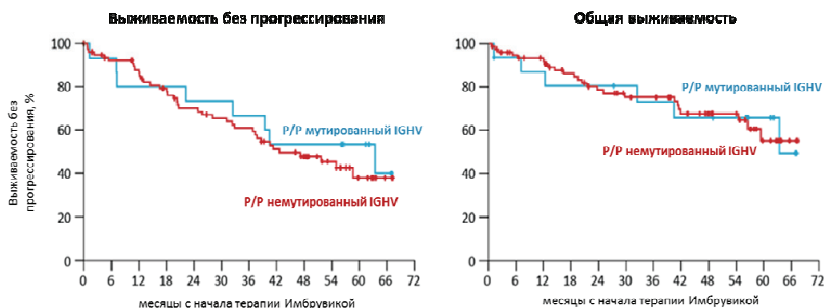


Рисунок 15. БПВ и ОВ у пациентов с рефрактерным/рецидивирующим ХЛЛ с мутированным и немутированным статусом IGHV в исследовании PCYC-1102/1103

В 2016 году также были впервые представлены данные о результатах таргетной терапии в первой линии ХЛЛ (исследование Resonate-2) [28]. Всего в исследование было включено 269 пациентов с ХЛЛ/ЛМЛ с активным заболеванием в возрасте ≥ 65 лет, которые были случайным образом распределены в группы терапии ибрутинибом или хлорамбуцилом (с переходом на ибрутиниб в случае прогрессии заболевания). Немутированный статус IGHV в группах ибрутиниба и хлорамбуцила имели 43% и 45% пациентов соответственно. В этом исследовании также было показано, что эффективность терапии ибрутинибом не имеет достоверных различий у пациентов с различным мутационным статусом IGHV (рис. 16)

В 2018 году были показаны промежуточные результаты исследования ECOG1912, в рамках которого ранее нелеченным пациентам с ХЛЛ в возрасте ≤ 70 лет с показаниями к началу терапии проводилась терапия в режиме IR (ибрутиниб + ритуксимаб) или FCR (флударабин + циклофосфамид + ритуксимаб) [29]. Всего в группе IR 210 пациентов имели немутированный статус IGHV и 70 пациентов – мутированный статус, тогда как в группе FCR немутированный и мутированный статус имели 71 и 44 пациента соответственно. Аналогичным образом, было показано, что мутационный статус IGHV не влиял на БПВ у пациентов, получавших ибрутиниб (рис. 17).

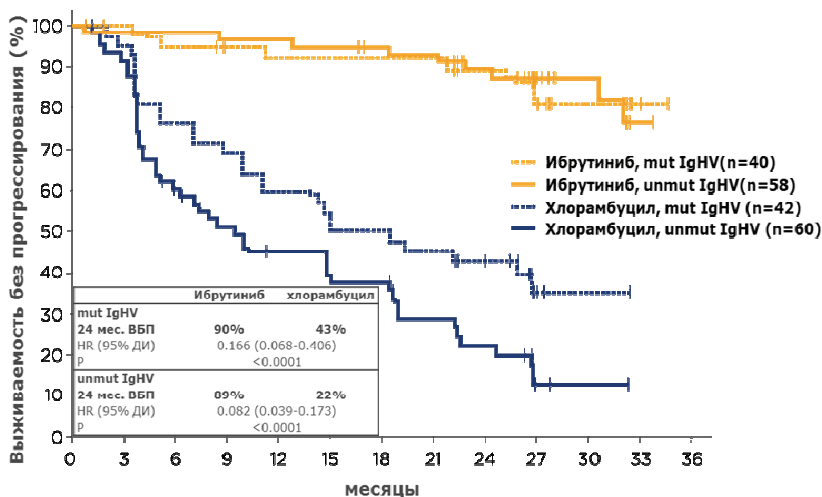


Рисунок 16. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с различным мутационным статусом IGHV, получавших ибрутиниб или хлорамбуцил в исследовании Resonate-2

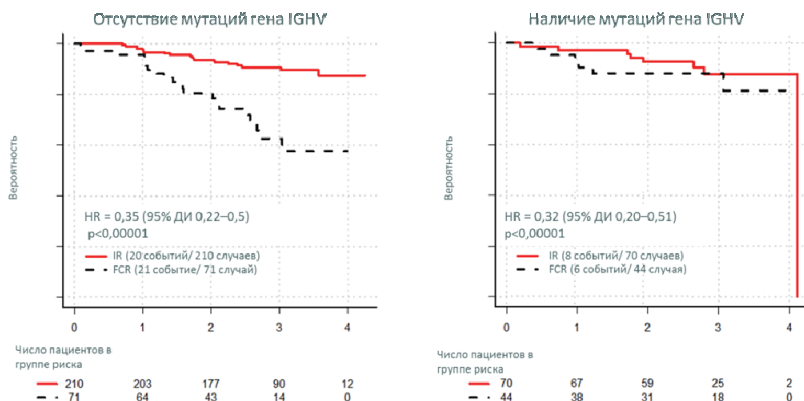


Рисунок 17. Беспрогрессивная выживаемость у пациентов в группах IR и FCR в зависимости от мутационного статуса IGHV в исследовании ECOG1912

В исследовании ILLUMINATE проводилось сравнение терапии в режиме ибрутиниб + обинутузумаб vs. хлорамбуцил + обинутузумаб в первой линии лечения ХЛЛ [30]. По результатам этого исследова-

дования также была показана сходная эффективность терапии ибру-
тинибом + обинутузумабом у пациентов низкого и высокого риска
(к группе высокого риска были отнесены пациенты с немутирован-
ным IGHV, делецией 11, делецией 17p и TP53) (рис. 18).

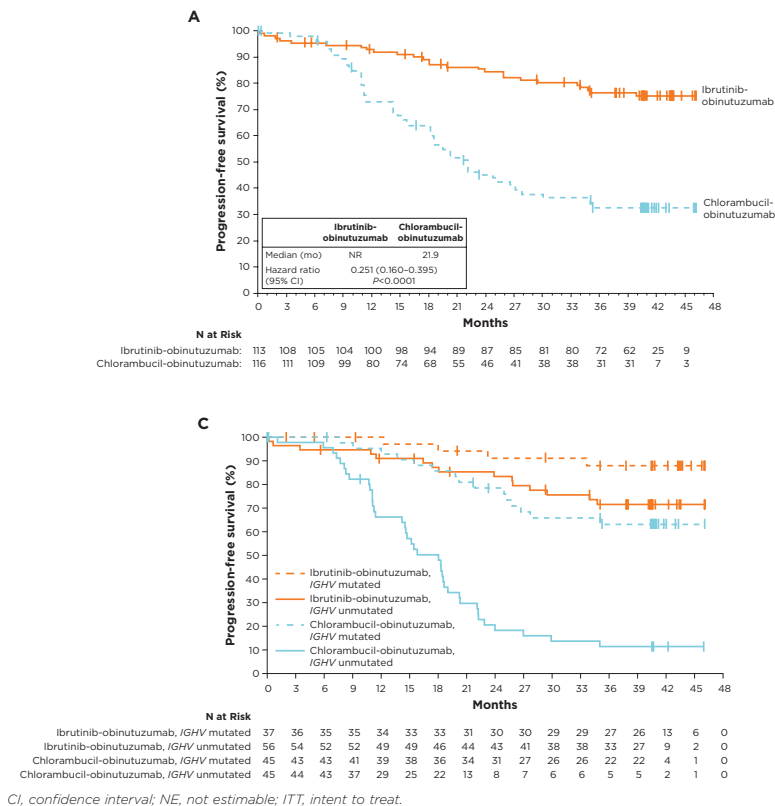


Рисунок 18. Беспрогрессивная выживаемость у пациентов в группах ибрутиниб + обинутузумаб vs. хлорамбуцил + обинутузумаб в исследовании ILLUMINATE

В исследовании HELIOS было проведено сравнение режимов терапии ибрутиниб + BR и BR у пациентов с ХЛЛ/ЛМЛ, ранее получавших лечение [31]. Немутированный статус IGHV имели 81,1% и 80,0% пациентов в группах ибрутиниб + BR и BR соответственно. Режим терапии ибрутиниб + BR показал сходную эффек-

тивность у пациентов с мутированным и немутированным статусом IGHV (рис. 19).

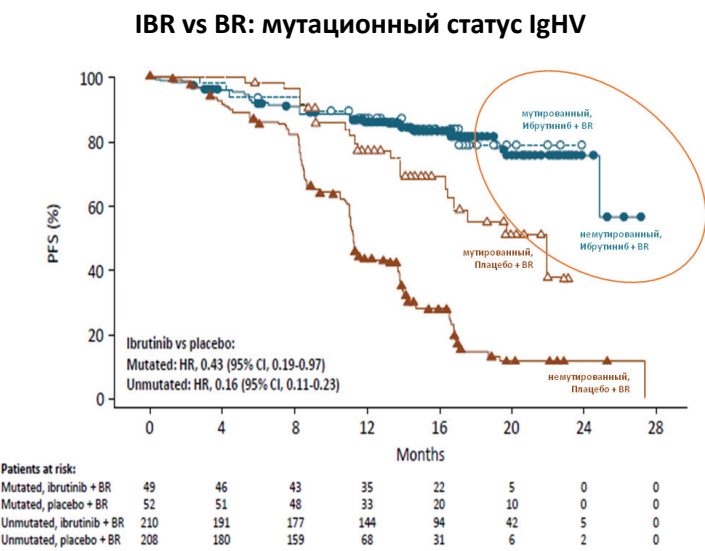


Рисунок 19. Беспрогрессивная выживаемость у пациентов в группах ибрутиниб + BR и BR в исследовании HELIOS

В 2018 году были впервые представлены результаты исследования таргетного препарата венетоклак у пациентов с рецидивирующим/рефрактерным течением ХЛЛ (исследование MURANO) [32]. В рамках этого исследования пациенты получали терапию в режиме венетоклак + ритуксимаб или бендамустин + ритуксимаб. Немутированный статус IGHV имели 68% пациентов в обеих группах лечения. Терапия в режиме венетоклак + ритуксимаб была одинаково эффективна у пациентов с мутированным и немутированным статусом IGHV (в обеих группах медиана БПВ не достигнута).

С учетом прогностической значимости мутационного статуса IGHV и возможности влияния результатов этого анализа на лечение, важно понимать, как определяется мутационный статус, а также ограничения этого исследования.

Технические аспекты анализа мутационного статуса IGHV

В связи с важностью мутационного статуса IGHV для прогностических целей, исследователи из Европейской инициативы по изучению ХЛЛ (ERIC) разработали рекомендации по минимальным требованиям для надежного и воспроизводимого анализа на мутационный статус IGHV [33]. В настоящее время мутационный статус IGHV определяют путем амплификации транскрипта IGHV методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), определение нуклеотидной последовательности гена методом секвенирования по Сэнгеру и сравнения транскрипта с известными генами зародышевой линии, доступными в базах данных иммуноглобулинов [33-34].

Образцы для анализа. Поскольку лимфоциты присутствуют и в периферической крови, и в костном мозге, для анализа может использоваться любой источник. Образцы следует помещать в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) или тринатрия цитрат/пиридоксаль-5'-фосфат/трис (СРТ). Следует избегать использования гепарина, поскольку он может взаимодействовать с ДНК-полимеразой и обратной транскриптазой [33]. Обычно требуется 3 мл периферической крови или 1 мл костного мозга.

При выборе РНК в качестве исходного материала следует помнить о меньшей её стабильности по сравнению с ДНК. Для выделения РНК требуется либо использовать свежие образцы крови, либо при необходимости длительного хранения и транспортировки добавлять к образцам специальные стабилизаторы.

Выделение нуклеиновых кислот. На первом этапе анализа производят выделение нуклеиновых кислот. Для выделения геномной ДНК (гДНК) разработаны разнообразные методики и доступно множество наборов [35]. Для выделения РНК обычно используют модификации метода гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции [36], либо методы, основанные на сорбции нуклеиновых кислот, реализуемые в ряде коммерческих наборов. Использо-

вание ДНК сравнительно проще, чем РНК в связи с большей стабильностью молекул ДНК и отсутствием дополнительного этапа обратной транскрипции. В свою очередь использование РНК позволяет проводить амплификацию преимущественно продуктивных реаранжировок IGHV генов.

Амплификация генов IGHV. Поскольку РНК не может быть непосредственно использована в качестве матрицы для ПЦР, при её применении проводят синтез кодирующей ДНК (кДНК) методом обратной транскрипции. гДНК или кДНК используют для ПЦР-амплификации последовательностей генов IGHV. Ранее при этом широко применяли 5' праймеры VH FR1 [37]. Однако согласно последним рекомендациям следует использовать праймеры к лидерным последовательностям, например, представленные в работах [38, 39]. В качестве 3' праймеров используются IGHN или реже IGHC [37]. Возможно проведение мультиплексной ПЦР, когда в смеси присутствуют все праймеры к основным семействам V генов человека. В случае амплификации нескольких фрагментов, соответствующих разным реаранжировкам генов IGHV рекомендовано проведение отдельных ПЦР реакций (для каждого из 5' праймеров).

Результаты ПЦР обычно анализируют с помощью методов электрофореза. Ранее для этого широко использовали агарозные гели. Однако сейчас рекомендовано использование полиакриламидных гелей в связи с их большей разрешающей способностью [33].

Секвенирование генов IGHV и анализ полученных результатов. После прохождения электрофореза амплифицированные фрагменты, соответствующие реаранжировкам генов IGHV, выделяют из геля и используют для проведения секвенирования по методу Сэнгера. При этом рекомендовано секвенирование обеих цепей ДНК [33]. В ходе секвенирования обычно применяются те же праймеры, что использовались при проведении ПЦР. Следует отметить, что в случае применения мультиплексной ПЦР на предыдущем этапе, неизвестно, какой из 5' праймеров участвовал в амплификации. Поэтому секвенирование придётся проводить в

два этапа – сначала с 3' праймером, а затем, после анализа результатов – с соответствующим 5' праймером. Постановка отдельных ПЦР реакций (для каждого из 5' праймеров) требует больших затрат, но позволяет сэкономить время, поскольку на стадии анализа результатов ПЦР с помощью электрофореза становится понятно, какой из 5' праймеров участвует в амплификации.

Из полученных в ходе секвенирования последовательностей генов IGHV необходимо исключить последовательности использованных праймеров. Рекомендуется выровнять результаты секвенирования обеих цепей ДНК, например, с использованием сервиса Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). В случае обнаружения различий в результатах секвенирования следует проанализировать исходные хроматограммы и выбрать наиболее достоверное прочтение.

Полученные последовательности генов IGHV исследуют на предмет наличия сдвигов рамок считывания и образования стоп-кодонов и сравнивают с последовательностями герминальных (немутированных) генов иммуноглобулинов, депонированных в базе данных IMGT (IMGT/V-QUEST; www.imgt.org).

Сравнительный анализ показывают процент дивергенции последовательности от исходной герминальной последовательности, депонированной в базе. В целом, если различия между анализируемой последовательностью и представленной в базе данных исходной немутированной последовательностью больше 2%, то ген IGHV принимается за мутированный (М). А если различие составляет меньше 2% (или равно 2%), то за немутированный (UM). Отдельно рекомендовано отмечать «пограничные» случаи, когда процент отличий находится в диапазоне 2,1-3%. Выявление нескольких реаранжировок и другие события могут так же повлиять на результат. Подробные рекомендации по анализу таких сложных случаев представлены в работе [40].

Примерно у 30% пациентов с ХЛЛ наблюдается стереотипия В-клеточного рецептора [41]. В процессе реаранжировки

генов иммуноглобулинов принимают участие гены *IGHV*, *IGHD* и *IGHJ*. Их объединение создает уникальную структуру 3-го комплементарного региона (HCRD3) – важной части молекулы иммуноглобулина, определяющей аффинность к антигену. Учитывая количество функциональных *IGHV*- (50), *IGHD*- (около 30), *IGHJ*-генов (6), вероятность получения одинаковых HCRD3 последовательностей ничтожно мала, однако у 30%-35% больных ХЛЛ, проживающих в разных странах, отмечено совпадение HCRD3 областей, что расценивают как доказательство антигенной селекции опухолевого клона. Такие случаи ХЛЛ со стереотипными (или гомологичными) HCRD3 последовательностями объединены в кластеры, количество которых неуклонно возрастает [42].

На сегодня только в отношении отдельных кластеров и использованных в реаранжировке *IGHV*-генов имеются данные об их прогностическом значении (Таблица 3) [43,44]. Прежде всего, это касается экспрессии *IGHV3–21/IGVL3–21* принадлежащего к кластеру 2 с аминокислотной последовательностью HCRD3 DANGMDV. В 60% случаях данная экспрессия связана с мутированным статусом ХЛЛ, в 40% – с немутированным. По данным большинства исследователей, экспрессия *IGHV3–21/IGVL3–21* является негативным маркером прогноза независимо от мутационного статуса [45].

Стереотипия распространяется на общие соматические мутации, сходный генетический и эпигенетический профиль опухолевых клонов, сходные антигенсвязывающие свойства и пути передачи сигнала через В-клеточный рецептор и другие иммунные рецепторы, а также характеризуется аналогичными клиническими исходами [46].

В связи с этим, помимо определения мутационного статуса следует провести анализ стереотипии полученных последовательностей генов *IGHV*. Для этого доступен сервис ARResT/AssignSubsets (<http://tools.bat.infspire.org/arrest/assignsubsets/>) [47].

Таблица 3.

**Прогностическое значение
кластеров стереотипии #1, #2, #4 и #8**

Стереотипиче-ские кластеры	Кластер#1	Кластер#2	Кластер#4	Кластер#8
частота	2.4%	2.8%	1%	0.5%
IGHV/IGVL ген	Clan I IGHV genes/ IGHD6–19 / IGHJ4/IGKV1 [D]–39	IGHV3–21/ IGHJ6/ IGLV3–21	γ-switched IGHV4–34/IGHJ6/ IGKV2–30	γ-switched IGHV4–39/ IGHD6–13/ IGHJ5/ IGKV1[D]–39
Мутационный статус	Немут.	Мут(60%), немут (40%)	Мут.	Немут.
Свойства сигнала ВКР	активный	активный	тонический	активный
Генетические aberrации у первичных пациентов	Del11q, del17p, NOTCH1, NFKBIE мутации	Del11q, del13q, SF3B1 мутация	Del13q	Трисомия 12, NOTCH1 мутация
Клиническое течение/ риск трансформации	Агрессивное (медиана времени до начала терапии 1.6 года)	Агрессивное (медиана времени до начала терапии 1.9 года)	Индолентное (медиана времени до начала терапии 11 лет)	Агрессивное (медиана времени до начала терапии 1.5 года), ассоциирован с высоким риском трансформации в синдром Рихтера

В последние годы в качестве альтернативного метода было введено таргетное экзомное секвенирование или геномное секвенирование нового поколения (NGS), позволяющее секвенировать всю последовательность V-D-J, включая высоковариабельный участок CDR3 [48]. Сравнение анализа методом NGS с традиционными методиками позволяет предположить, что NGS может обеспечивать более точные результаты. Кроме того, в одном исследовании показано, что NGS позволяет идентифицировать множественные продуктивные, клонально независимые реаранжировки IGHV, которые наблюдались у 24% пациентов с ХЛЛ [49].

Применение результатов анализа

Уровень мутаций, отличающийся на $>2\%$ от зародышевой линии, соответствует мутированному статусу, а уровень мутаций $\leq 2\%$ – немутированному статусу. Порог 98% был выбран с целью исключения возможных полиморфных вариантов последовательностей [14-15]. Для врачей важно помнить, что это значение является математическим порогом, особенно при интерпретации пограничных результатов анализа мутационного статуса. Следует с осторожностью относиться к «пограничным» случаям, (когда процент отличий находится в диапазоне $2,1-3\%$). В сложных случаях, в частности при выявлении нескольких реаранжировок для интерпретации и определения прогностической группы могут быть использованы дополнительные прогностические маркеры. Например, делеция $11q$, определенная методом FISH, с большей вероятностью ассоциирована с немутированным статусом [50-51].

Следует отметить, что в отличие от цитогенетического анализа методом FISH, результаты которого могут изменяться в процессе клональной эволюции, мутационный статус в целом считается стабильным прогностическим маркером IGHV, в связи с чем повторные анализы, как правило, не требуются. Однако имеются сообщения об изменениях мутационного статуса, что может быть связано с появлением субклонов [52]. Поскольку мутационный статус IGHV предоставляет важную прогностическую информацию, которая может повлиять на рекомендации для пациента или наблюдение за ним, в целом рекомендуется определять этот показатель в ближайшее время после постановки диагноза ХЛЛ. Однако статус IGHV, как правило, не является основным фактором в принятии решения о том, начинать ли терапию. В принятии решения о начале терапии следует по-прежнему руководствоваться критериями Международной рабочей группы по ХЛЛ [53]. Мутационный статус IGHV может оказывать влияние на выбор варианта терапии, при этом пациенты с мутированным вариантом являются лучшими кандидатами на проведение иммунохимиотерапии, тогда как для пациентов с немутированным вариантом, предпочтительно использовать новые препараты. Продолжающиеся проспективные исследования предоставят дополнительные данные относительно применения такого подхода.

РЕЗЮМЕ

Что представляет собой анализ?

В ходе анализа на мутационный статус IGHV оценивается процент вариабельности нуклеотидных последовательностей между V-областью гена тяжелых цепей иммуноглобулинов в клональной популяции клеток ХЛЛ в сравнении с гомологичной последовательностью V-области зародышевой линии.

Как проводится анализ?

Мутационный статус IGHV определяют путем амплификации экспрессированного клонального транскрипта IGHV методом ПЦР с секвенированием гена методом секвенирования по Сенгеру и сравнением транскрипта с известной последовательностью зародышевой линии.

Каким является диапазон нормальных значений?

Мутированный статус IGHV определяется как $>2\%$ мутаций в сравнении с зародышевой линией. Немутированный статус IGHV соответствует $\leq 2\%$ мутаций в сравнении с зародышевой линией.

Для какого заболевания или типов заболеваний используется этот показатель?

Определение IGHV является полезным прогностическим средством для пациентов с ХЛЛ. Статус IGHV может также иметь прогностическое значение при других лимфомах, таких как фолликулярная лимфома и лимфома из клеток зоны мантии.

Какие анализы полезно выполнять для получения более полной картины?

Кроме определения мутационного статуса IGHV, у пациентов с ХЛЛ следует выполнять цитогенетическое исследование методом FISH. Этот метод позволяет выявлять хромосомные аномалии, которые могут иметь значение для прогноза и лечения заболевания. Например, делеции хромосомы 17p или 11q ассоциированы с неблагоприятным клиническим исходом, тогда как делеции 13q позволяют предположить более благоприятное клиническое течение заболевания.

Как этот анализ влияет на лечение?

Хотя мутационный статус IGHV является мощным прогностическим средством, решение о начале терапии продолжает основываться на руководствах IWCLL 2008 года, согласно которым лечение следует проводить только пациентам с распространенным или симптомным заболеванием. Однако статус IGHV может учитывать при консультировании и определении соответствующих интервалов последующего наблюдения. Статус IGHV может также влиять на выбор терапии первой линии, поскольку пациенты с ХЛЛ с мутированным статусом IGHV могут иметь более продолжительный ответ на иммунохимиотерапию. В отличие от этого, пациенты с немутированным статусом IGHV должны рассматриваться как кандидаты на терапию новыми таргетными препаратами, которые демонстрируют одинаковую эффективность независимо от статуса IGHV.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merlo L.M.F., Mandik-Nayak L., Cancer Immunotherapy: Chapter 3-Adaptive Immunity: B Cells and Antibodies. London: Academic Press; 2 edition. 2013; pp. 25–40.
2. Karan-Djurasevic T., Pavlovic S., Somatic Hypermutational Status and Gene Repertoire of Immunoglobulin Rearrangements in Chronic Lymphocytic Leukemia. Lymphocyte Updates: Cancer, Autoimmunity and Infection. 2017.
3. Fowler N., Davis E., Targeting B-cell receptor signaling: changing the paradigm. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013; 2013 (1): 553–560.
4. Chiorazzi N., Ferrarini M., Cellular origin(s) of chronic lymphocytic leukemia: cautionary notes and additional considerations and possibilities. Blood. 2011; 117(6):1781–91.
5. Kipps T., Stevenson F., Wu C., Croce C., Packham G., O'Brien S., Gribben J., Rai K., Chronic lymphocytic leukaemia. Nature Reviews Disease Primers. 2017.
6. Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 109(2 SUPPL. 1), S45-S55.
7. Jund D, Giallourakis C, Mostoslavsky R et al. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:541-70.
8. Van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D et al. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J Immunol*. 2005 Nov 1;175(9):5912-22.
9. Nemazee D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):728-40.
10. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261-92.
11. Schlissel MS. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol*. 2003 Nov;3(11):890-9.
12. Sepulveda Yanez J., Seija N., Oppezso P., Navarrete M. The Antigen Receptor as a Driver of B-Cell Lymphoma Development and Evolution. Provisional chapter. 2018.

13. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994 Jun;15(6):288-94.
14. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94(6):1840–1847.
15. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999; 94(6):1848–1854.
16. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2016; 127(14):1752–1760.
17. Gladstone DE, Swinnen L, Kasamon Y, et al. Importance of immunoglobulin heavy chain variable region mutational status in del(13q) chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2011; 52(10): 1873–1881.
18. Gladstone DE, Blackford A, Cho E, et al. The importance of IGHV mutational status in del(11q) and del(17p) chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012; 12(2):132–137.
19. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2016;17(6):779-790.
20. Molica S, Shanafelt TD, Giannarelli D, et al. The chronic lymphocytic leukemia international prognostic index predicts time to first treatment in early CLL: Independent validation in a prospective cohort of early stage patients. *Am J Hematol*. 2016; 91(11):1090–1095.
21. Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index: analysis of 1364 newly diagnosed patients. *Blood*. 2016; 128(16):2093-2095.
22. Delgado J, Doubek M, Baumann T, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am J Hematol*. 2017; 92(4):375–380.

23. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127:208-15.
24. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(3):303–9. doi: 10.1182/blood-2015-09-667675.
25. Davids MS, Deng J, Wiestner A, et al. Decreased mitochondrial apoptotic priming underlies stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012; 120(17): 3501–3509.
26. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015; 526(7574):525–530.
27. O'Brien S, et al. ASH 2016, Abstract and oral presentation (#223).
28. Barr P et al. ASH 2016, Abstract and oral presentation (#234).
29. Shanafelt et al. ASH 2018; abstract LBA4.
30. Moreno C. et al. Poster presented at the XVIII International Workshop on CLL (iwCLL) Meeting; 20-23 September 2019; Edinburgh, United Kingdom.
31. Fraser et al., iwCLL 2015.
32. Seymour J.F. et al. Venetoclax-Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2018;378:1107-20
33. Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*. 2017; 31(7):1477–1481. doi:10.1038/leu.2017.125
34. Szankasi P, Bahler DW. Clinical laboratory analysis of immunoglobulin heavy chain variable region genes for chronic lymphocytic leukemia prognosis. *The Journal of molecular diagnostics: JMD*. 2010; 12(2):244–249.
35. Chacon-Cortes D, Griffiths L Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal*

of Biorepository Science for Applied Medicine. 2014. Volume 2014:2
Pages 1–9

36. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9

37. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, et al. Euro-Clonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012;26(10):2159–2171. doi:10.1038/leu.2012.246

38. Campbell M. J., Zelenetz A. D., Levy S., Levy R. (1992). Use of family specific leader region primers for PCR amplification of human heavy chain variable region gene repertoire. *Mol. Immunol.* 29 193–203.

39. René C, Prat N, Thuizat A, Broctawik M, Avinens O, Eliaou J-F. Comprehensive characterization of immunoglobulin gene rearrangements in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2014;18(6):979-990. doi:10.1111/jcmm.12215.

40. Langerak AW, et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia.* 2011 Jun; 25(6):979-84.

41. Agathangelidis A. et al. (2012) Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood,* 119, 4467–4475.

42. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood.* 2012;119:4467–75.

43. Ten Hacken, E., Gounari, M., Ghia, P., & Burger, J. A. (2019). The importance of B cell receptor isotypes and stereotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia,* 33(2), 287–298.

44. Stamatopoulos, K., Agathangelidis, A., Rosenquist, R. et al. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 31, 282–291 (2017) doi:10.1038/leu.2016.322

45. Stamatopoulos B, Smith T, Crompton E, Pieters K, Clifford R, Mraz M, et al. The light chain IgLV3–21 defines a new poor prognostic subgroup in chronic lymphocytic leukemia: results of a multicenter study. *Clin Cancer Res*. 2018;24:5048–57.
46. Sutton LA, Young E, Baliakas P, Hadzidimitriou A, Moysiadis T, Plevova K, et al. Different spectra of recurrent gene mutations in subsets of chronic lymphocytic leukemia harboring stereotyped B-cell receptors. *Haematologica*. 2016;101:959–67.
47. Bystry V., Agathangelidis A., Bikos V., Sutton L.A., Baliakas P., Hadzidimitriou A., Stamatopoulos K., Darzentas N., ERIC, the European Research Initiative on CLL. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy, *Bioinformatics*, V. 31,23, 2015, P. 3844–3846
48. Blachly JS, Ruppert AS, Zhao W, et al. Immunoglobulin transcript sequence and somatic hypermutation computation from unselected RNA-seq reads in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(14):4322–4327.
49. Stamatopoulos B, Timbs A, Bruce D, et al. Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017. 31(4): 837-45.
50. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003; 101(12):4944–4951.
51. Trbusek M, Malcikova J, Smardova J, et al. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*. 2006; 20(6):1159–1161.
52. Osman A, Gocke CD, Gladstone DE. Change in IgHV Mutational Status of CLL Suggests Origin From Multiple Clones. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017; 17(2):97–99.
53. Hallek M, Cheson BD, 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.

Учебное издание

**Е.А.СТАДНИК,
А.М.РУМЯНЦЕВ**

**РОЛЬ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА
VH-ГЕНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ
И ПОДХОДАХ К ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО
ЛИМФОЛЕЙКОЗА**

Методические рекомендации

Подписано в печать 08.05.2020 г. Формат 60х90 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 2,5. Заказ 3184. Тираж 1000 экз.

Отпечатано ООО «Издательство «Экон-Информ»
129329, Москва, ул. Кольская, д. 7, стр. 2. Тел. (499) 180-9407
www.ekon-inform.ru; e-mail: eer@yandex.ru