

# ЭКСПРЕССИЯ ОСНОВНЫХ ГЕНОВ ВНЕШНЕГО ПУТИ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В СРАВНЕНИИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ

С.Г. Захаров<sup>1</sup>, А.К. Голенков<sup>1</sup>, А.В. Мисюрин<sup>2</sup>, Е.В. Катаева<sup>1</sup>, А.А. Рудакова<sup>2</sup>, М.А. Барышникова<sup>2</sup>, Т.А. Митина<sup>1</sup>, Е.В. Трифонова<sup>1</sup>, Л.Л. Высоцкая<sup>1</sup>, Ю.Б. Черных<sup>1</sup>, Е.Ф. Клинушкина<sup>1</sup>, К.А. Белоусов<sup>1</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>2</sup>, В.А. Мисюрин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2, корпус 1;

<sup>2</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

**Контакты:** Сергей Геннадьевич Захаров [hematologymoniki@mail.ru](mailto:hematologymoniki@mail.ru)

**Введение.** Приведенные данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ) свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов при данном заболевании. Важным является изучение выраженности клинических проявлений болезни в зависимости от экспрессии изучаемых генов, модулирующих апоптоз.

**Цель работы** – сравнить активность генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок PRAME с клиническими проявлениями болезни у первичных больных В-ХЛЛ.

**Материалы и методы.** У 23 больных с впервые выявленным В-ХЛЛ был определен уровень экспрессии проапоптотических генов FAS, TRAIL, TNFR2, DR4/5 и DR3, а также генов HSP27, XIAP, блокирующих апоптоз. Кроме того, была изучена экспрессия генов TP53 и P21 и раково-тестикулярного гена PRAME.

**Результаты.** Согласно данным многофакторного регрессионного анализа, наибольшее влияние на клиническую характеристику болезни оказал уровень экспрессии гена FAS в дебюте заболевания. В связи с этим больные были разделены на группы с нормальным (I группа) и низким уровнем гена (II группа). Низкий уровень экспрессии FAS (Me 387 %) был ассоциирован со II стадией заболевания ( $p = 0,03$ ), большим количеством лимфоцитов ( $p = 0,001$ ), меньшим количеством эритроцитов ( $p = 0,08$ ) и меньшим уровнем экспрессии генов TNFR2 ( $p = 0,08$ ), высоким уровнем экспрессии XIAP, HSP27 и P21. В целом антиапоптотический потенциал у больных II группы был выше, что сопровождалось более выраженными клиническими проявлениями болезни.

**Заключение.** Повышенный антиапоптотический потенциал опухолевых лимфоцитов при впервые выявленном В-ХЛЛ сопровождается большей массой опухоли и более выраженными клинико-гематологическими проявлениями болезни.

**Ключевые слова:** гены внешнего пути апоптоза, модуляторы апоптоза, хронический лимфолейкоз

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46

## EXPRESSION OF THE APOPTOSIS-RELATED GENES IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN CLINICAL DATA CONTEXT

S.G. Zakharov<sup>1</sup>, A.K. Golenkov<sup>1</sup>, A.V. Misyurin<sup>2</sup>, E.V. Kataeva<sup>1</sup>, A.A. Rudakova<sup>2</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>2</sup>, T.A. Mitina<sup>1</sup>, E.V. Trifonova<sup>1</sup>, L.L. Vysotskaya<sup>1</sup>, Yu.B. Chernykh<sup>1</sup>, E.F. Klinushkina<sup>1</sup>, K.A. Belousov<sup>1</sup>, Yu.P. Finashutina<sup>2</sup>, V.A. Misyurin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MONIKI; bldg. 1, 61/2 Shchepkina St., Moscow 129110, Russia;

<sup>2</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

**Introduction.** The given data of fundamental studies of apoptosis processes in B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL) testifies about the complexity and variety of mechanisms affecting the kinetics of normal cells and tumor lymphocytes in this disease. It is important to study the severity of clinical manifestations of the disease depending on the expression of the genes that modulate apoptosis.

**The purpose** of the study is to compare the activity of genes encoding apoptosis modulators, the cell cycle and cancer-testicular PRAME protein with clinical manifestations of the disease in primary patients with B-CLL.

**Materials and methods.** The level of expression of the proapoptotic genes FAS, TRAIL, TNFR2, DR4/5 and DR3, as well as the HSP27, XIAP genes, blocking apoptosis was determined in 23 patients with newly diagnosed chronic B-CLL. In addition, expression of genes TP53 and P21 and cancer-testis gene PRAME are tested.

**Results.** According to the multivariate regression analysis, the FAS gene expression in the onset of the disease had the greatest impact on the clinical characteristics of the disease. In this connection, the patients were divided into groups with normal (group) and low gene

level (group II). A low level of FAS expression (Me 387 %) was associated with stage II disease ( $p = 0.03$ ), a large number of lymphocytes ( $p = 0.001$ ), fewer erythrocytes ( $p = 0.08$ ), and a lower level of TNFR2 gene expression ( $p = 0.08$ ), high level of expression of XIAP, HSP27, P21. Overall, the anti-apoptotic potential in Group II patients was higher, which was accompanied by more pronounced clinical manifestations of the disease.

**Conclusions.** The increased anti-apoptotic potential of tumor lymphocytes in newly diagnosed B-CLL is accompanied by a larger tumor mass and greater clinical and hematological manifestation of the disease.

**Key words:** genes of the external apoptotic pathway, modulators of apoptosis, chronic lymphocytic leukemia

## Ведение

В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) относится к лимфопролиферативным заболеваниям и характеризуется вовлечением в патологический процесс костного мозга, крови, лимфатических узлов, печени и селезенки.

Опухолевые клетки при В-ХЛЛ имеют aberrантный иммунофенотип ( $CD19^+/CD5^+/CD23^+/CD20^{low^+}/CD22^{low^+}$ ) и характеризуются низкой пролиферативной активностью. Многие авторы подтвердили снижение интенсивности апоптоза при В-ХЛЛ на основании иммунофенотипического анализа FAS-рецептора на поверхности опухолевых клеток [1, 2], а также при изучении экспрессии белков семейства BCL2, каспазы-3 [3] и цитокинов семейства TNF [4].

Опубликованные фундаментальные исследования по данной проблеме [5–9] позволяют охарактеризовать несколько рецепторзависимых (внешних) сигнальных путей апоптоза, которые могут быть моделью для изучения в опухолевых клетках при В-ХЛЛ.

Взаимодействие FAS-лиганда и FAS-рецептора с последующей активацией каспаз через внутриклеточный адаптер и дальнейшая инициация апоптоза через каспазу-8 и каспазу-3 является основным механизмом активности апоптоза.

Второй внешний путь активации апоптоза осуществляется за счет взаимодействия TNF и TNF-рецептора (TNFR1-2). Взаимодействие лиганд – рецептор сопровождается изменением конформации внутриклеточных адаптерных белков и передачи активирующего сигнала каспазе-8 и к каспазе-3, после чего осуществляется апоптоз. TNF-, TL1A- и TRAIL-зависимые системы, в отличие от FAS-, способны также подавлять апоптоз путем активации сигнального пути NF- $\kappa$ B.

Взаимодействие TRAIL с его рецепторами семейства DR (DR4/5) может вызывать как активацию апоптоза, так и его торможение за счет активации NF- $\kappa$ B.

К внешнему сигнальному пути активации апоптоза относится взаимодействие рецептора DR3 с лигандом TL1A, который по структуре не имеет принципиальных отличий от других лигандов семейства TNF. Важно подчеркнуть, что система TL1a-DR3 контролирует как апоптотический, так и антиапоптотический сигнальные пути [10, 11].

Кроме рецепторов внешнего пути апоптоза существует множество других факторов, имеющих значение в выживании опухолевой клетки. Прежде всего это белок p53, «страж генома», распознающий повреждения и запускающий программу по их репарации или самоустраниению клетки. Во время исправления повреждений p53 активирует белок p21, ингибирующий циклинзависимую киназу 1A и предотвращающий деление клетки. Следует отметить, что увеличение уровня экспрессии генов *TP53* и *P21* при В-ХЛЛ связано с прогрессированием [12]. При этом взаимодействие *TP53* и *P21* с генами внешнего пути апоптоза при В-ХЛЛ пока никем не проверялось.

Другими факторами, потенциально значимыми в патогенезе В-ХЛЛ, могут быть гены *HSP27* и *XIAP*. Белок Hsp27 представляет собой шаперон, защищающий другие белки клетки от тепловой денатурации. Экспрессия Hsp27 позволяет опухолевой клетке проявлять большую устойчивость к стрессу. Вследствие этого прогноз онкологического заболевания ухудшается [13]. Белок XIAP представляет собой ингибитор каспаз 3, 7 и 9. Это один из значимых маркеров неблагоприятного прогноза при онкологических и онкогематологических заболеваниях [14]. Особенности экспрессии XIAP при В-ХЛЛ остаются неустановленными.

Наконец, раково-тестикулярный белок PRAME также может быть значимым неблагоприятным признаком при В-ХЛЛ. Известно только, что активность данного маркера наблюдается чаще при более продвинутых стадиях заболевания [15]. Особое внимание следует уделить тому факту, что ген *PRAME* находится в локусе гена  $\lambda$ -цепи иммуноглобулина, что может нарушать его синтез при L-клональности В-ХЛЛ, что улучшает прогноз болезни [16]. Приведенные данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при В-ХЛЛ свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов при данном заболевании. Исходя из проведенного анализа важно также сравнение экспрессии генов рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза у здоровых людей и больных со впервые выявленным В-ХЛЛ, а также генов, блокирующих апоптоз. Важным является изучение выраженности клинических проявлений

болезни в зависимости от экспрессии изучаемых генов, модулирующих апоптоз.

**Цель работы** — сравнить активность генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок PRAME с клиническими проявлениями болезни у первичных больных В-ХЛЛ.

### Материалы и методы

Изучение экспрессии проапоптотических и антиапоптотических генов и клинической характеристики у 23 больных с впервые выявленным В-ХЛЛ проведено в рамках проспективного клинического исследования. Был проведен исходный анализ экспрессии генов *FAS*, *TRAIL*, *TNFR2*, *DR4/5*, *DR3*, а также *HSP27*, *XIAP*, *TP53*, *P21* и *PRAME*. Контрольную группу составили 14 здоровых людей.

Среди исследуемых больных было 16 мужчин и 7 женщин в возрасте от 47 до 77 лет (средний возраст 64 года). Стадию болезни оценивали по Rai [17]. В I стадии были 4 больных, во II стадии — 12, в III стадии — 1, в IV стадии — 6. Установление диагноза выполняли в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по хроническому лимфолейкозу (IWCLL, 2008) [17].

Для проведения топографической характеристики распространенности опухолевого процесса использовали метод ультразвукового исследования с исследованием 6 зон: области шеи, подмышечной области, средостения, паховой области, брюшной полости и забрюшинного пространства, размеров печени и селезенки. Внутригрудное поражение оценивали методом компьютерной томографии.

Для сравнительного анализа вводили понятия балльной оценки, где 1 зону поражения с обеих сторон принимали за 2 балла, с одной стороны — за 1 балл. Для оценки распространенности вычисляли сумму баллов. Поражение печени и селезенки оценивали баллами, где 0 — отсутствие поражения, 1 — размеры печени и селезенки меньше 5 см из-под края реберной дуги, 2 — размеры более 5 см.

**Выделение общей рибонуклеиновой кислоты из клеток крови и синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты.** Перед выделением рибонуклеиновой кислоты (РНК) 5 мл крови смешивали с 45 мл 0,9 % раствора  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и инкубировали в течение 10 мин. После этого проводили центрифугирование в течение 10 мин при 600g для осаждения лейкоцитов. Удаляли супернатант и клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 600g. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК по классическому протоколу [18]. Клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4М тиоционата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия,

0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 8000g и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000g, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора. Для синтеза комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) брали 2 мкг матричной РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления матричной РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизованной воды.

**Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.** Количественную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили с использованием двукратной реакционной смеси (40 мМ трис- $\text{HCl}$ , 100 мМ  $\text{KCl}$ , 4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, по 250 нМ прямого и обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с помощью программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *HSP27*, *XIAP*, *TP53*, *P21* и *PRAME*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °С. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Перед секвенированием ампликон, полученный в результате ПЦР с праймерами, разработанными для анализа экспрессии генов, был обработан наборами BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) и BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

**Статистический анализ данных.** Для поиска связи уровня экспрессии изучаемых генов и клинических характеристик больных применялся многофакторный регрессионный анализ. Поскольку непрерывные данные имели ненормальное распределение, для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Для исследования связи уровня экспрессии генов с качественными и количественными параметрами использовали критерии  $\chi^2$  и  $U$ -критерий Манна–Уитни соответственно. Для анализа величины изменения таких признаков, как количество лимфоцитов, размер лимфатических узлов, печени и селезенки, а также уровня экспрессии исследованных генов использовали критерий Уилкоксона. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Количественные данные представлены в виде медианы значения и граничными значениями, охваченными доверительным интервалом 0,95.

### Результаты

Для многофакторного регрессионного анализа в качестве независимых переменных были включены данные по уровню экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *PRAME*, *TP53*, *P21*, *HSP27* и *XIAP*, а в качестве зависимой переменной – уровень лимфоцитов и другие клинические параметры. При сопоставлении активности генов *FAS*, *DR4/5* и *PRAME* у больных и у здоровых людей было установлено их значимое различие (табл. 1).

Поскольку у больных наблюдался большой разброс уровня экспрессии гена *FAS*, для дальнейшего исследования выборка была разделена на группы. В группу 1 были включены больные, имеющие уровень экспрессии гена *FAS*, близкий к уровню, наблюдаемому у здоровых доноров, обозначенный нами как нормальный уровень экспрессии. В группу 2 были включены все остальные больные. В качестве нижней границы нормального уровня экспрессии *FAS* использовался 25-й перцентиль, наблюдаемый у здоровых доноров.

При анализе показателей экспрессии генов в 2 группах больных в зависимости от значений гена *FAS*

**Таблица 1.** Уровень экспрессии генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок *PRAME* у 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом и 14 здоровых людей

Ген	Уровень экспрессии гена (Ме), %		p-значение (U-критерий)
	у здоровых	у больных	
<i>DR3</i>	41 (3,9–124)	166 (0,3–862)	0,1272
<i>DR4/5</i>	335 (171–951)	744 (341–1215)	0,0009
<i>FAS</i>	7052 (3430–12980)	857 (112–12980)	0,0012
<i>TNFR2</i>	5138 (1535–15010)	2343 (559–11140)	0,0890
<i>TRAIL</i>	7151 (2186–12360)	6702 (434–19670)	0,5469
<i>PRAME</i>	0	0,05 (0–0,21)	0,0163
<i>TP53</i>	1252 (453–2728)	1648 (210–9177)	0,9025
<i>P21</i>	2293 (757–7301)	1870 (16–4817)	0,3165
<i>HSP27</i>	1904 (578–6869)	4750 (16–96880)	0,2223
<i>XIAP</i>	1334,5 (279–5610)	1997 (41–6765)	0,3436

по некоторым результатам были выявлены статистически значимые различия (табл. 2).

**Таблица 2.** Сопоставление активности генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок *PRAME* у 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом в зависимости от интенсивности экспрессии гена *FAS*

Параметр	Показатель у больных		p-значение (U-критерий)
	с нормальным уровнем экспрессии <i>FAS</i> , $n = 7$ (группа 1)	с низким уровнем экспрессии <i>FAS</i> , $n = 16$ (группа 2)	
<i>DR3</i>	21 (0,3–178)	322 (1,2–1075)	0,0372
<i>DR4/5</i>	752 (341–1603)	811 (428–1215)	0,6816
<i>FAS</i>	10540 (4817–16200)	387 (113–1025)	0,0009
<i>TNFR2</i>	8988 (1622–74960)	1759 (559–5050)	0,0187
<i>TRAIL</i>	10180 (2111–34250)	2593 (436–15310)	0,0335
<i>PRAME</i>	0,065 (0,0–1)	0 (0–0,01)	0,1912
<i>TP53</i>	1107,5 (528–7934)	2196,5 (210–9177)	0,8366
<i>P21</i>	444 (363–1318)	2719 (16–22130)	0,0372
<i>HSP27</i>	301 (16–668)	6966 (650–17130)	0,0372
<i>XIAP</i>	453 (41–479)	2409,5 (100–5642)	0,0063

Экспрессия генов *DR3*, *P21*, *HSP27*, *XIAP* была статистически значимо выше в группе с низким уровнем экспрессии *FAS*. Экспрессия генов *TNFR2* и *TRAIL* в этой же группе была статистически значимо ниже, чем в группе с нормальным уровнем экспрессии гена *FAS*. Таким образом, в группе 2 была

**Таблица 3.** Клиническая характеристика 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом, имеющих различный уровень экспрессии генов *FAS*

Параметр	Показатель у больных		<i>p</i> -значение ( <i>U</i> -критерий)*; $\chi^2$ **
	с нормальным уровнем экспрессии генов <i>FAS</i> , <i>n</i> = 7	с низким уровнем экспрессии генов <i>FAS</i> , <i>n</i> = 16	
Возраст, лет	67 (63–75)	62,5 (47–78)	0,1845*
Мужчины, %	86	69	0,3939**
Степень поражения лимфатических узлов, баллы	6 (6–10)	7 (2–12)	0,4423*
Степень поражения печени, баллы	0 (0–1)	1 (0–1)	0,0399*
Степень поражения селезенки, баллы	1 (0–2)	1 (0–2)	0,1508*
Количество лимфоцитов, $10^9$ /л	6,05 (2,96–15)	69,7 (5,51–216)	0,0011*
Концентрация гемоглобина, г/л	137,8 (122–149)	122 (74–167)	0,0883*
Количество эритроцитов, $10^{12}$ /л	4,39 (4,2–4,97)	3,88 (2,27–5,43)	0,0884*
Количество клеток с иммунофенотипом CD19 <sup>+</sup> /CD5 <sup>+</sup> , % от всех ядерных клеток	54,2 (0,9–82,4)	64 (6,7–94,6)	0,866*
Экспрессия CD38, % от общего числа клеток	3,92 (0,7–7,5)	7,25 (0,8–89,3)	0,7459*
I–II стадия заболевания, %	100	56	0,0359**

противоположная динамика значений генов *DR3*, *P21*, *HSP27* и *XIAP* относительно гена *FAS* и совпадающая динамика значений генов *TNFR2* и *TRAIL*. Следующим этапом исследования было изучение экспрессии генов, модулирующих апоптоз в сравнении с клиническими данными (табл. 3).

В результате установлено, что в группе больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* было статистически значимо большее поражение печени, большее количество лимфоцитов крови ( $p = 0,001$ ), близкое к значимому снижение Hb и количества эритроцитов. Число больных I и II стадии болезни было статистически значимо ниже в группе с низкой экспрессией гена *FAS*.

### Обсуждение

Проведенное исследование было посвящено изучению экспрессии генов внешних путей апоптоза, а также генов, блокирующих апоптоз при впервые выявленном В-ХЛЛ. Была изучена экспрессия генов, обеспечивающих чувствительность к внешнему пути апоптоза *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, а также генов-модуляторов апоптоза *TP53*, *P21*, *HSP27* и *XIAP*, и раково-тестикулярного гена *PRAME*, клиническое значение которых при В-ХЛЛ в настоящее время недостаточно хорошо изучено. Следует подчеркнуть, что предпринятый подход в изучении

процессов апоптоза при В-ХЛЛ с позиции функциональной характеристики основных генов внешнего пути представляется достаточно новым и важным.

Построение регрессионной модели позволило установить наиболее значимые факторы, влияющие на клинические параметры первичных больных. Это были гены *FAS* и *XIAP*.

На основании активности гена *FAS* были выделены 2 группы больных с нормальной (1-я группа) и низкой (2-я группа) его активностью. При сравнительном анализе отмечается статистически значимое снижение активности проапоптотических генов во 2-й группе больных. Это относится к генам *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* с одновременным повышением экспрессии антиапоптотического гена *XIAP*. Установленное сочетание активности свидетельствует о повышенном генетическом потенциале, направленном на блокирование апоптоза в этой группе больных. В рамках этой концепции следует рассматривать повышение экспрессии гена *P21*, блокирующего пролиферацию ( $p = 0,03$ ) и повышение экспрессии *HSP27*, снижающего активность апоптоза ( $p = 0,03$ ). При этом затруднена оценка достоверного повышения экспрессии гена *DR3* во 2-й группе больных в связи с его вариабельным влиянием на процессы апоптоза. Экспрессия гена *PRAME* в исследуемой группе больных В-ХЛЛ была диагностически незначима.

### Заключение

Сравнительный анализ экспрессии генов, модулирующих апоптоз, в 2 группах больных, разделенных по уровню экспрессии гена *FAS*, показал более выраженный антиапоптотический потенциал в группе с низкой активностью этого гена. Проведенный сравнительный клиничко-генетический анализ позволил выявить более выраженные проявления болезни во 2-й группе больных с большим антиапоптотическим потенциалом опухолевых лимфоци-

тов. Это касается большей инфильтрации печени ( $p = 0,03$ ), лимфоцитоза ( $p = 0,001$ ), сниженного уровня Hb ( $p = 0,08$ ) и количества эритроцитов ( $p = 0,08$ ), а также продвинутой стадии болезни ( $p = 0,03$ ). В целом проведенная работа показала, что повышенный антиапоптотический потенциал опухолевых лимфоцитов при впервые выявленном В-ХЛЛ сопровождается большей массой опухоли и большими клиничко-гематологическими проявлениями болезни.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышников А. Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук 2004;24(2):59–63. [Baryshnikov A. Yu. Principles and practice of vaccinotherapy for cancer. Byulleten Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii medicinskih nauk = Bulletin of the Siberian Division of Russian Medical Sciences Academy 2004;24(2):59–63. (In Russ.)].
2. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. FAS/APO-1 антиген — молекула, опосредующая апоптоз. Гематология и трансфузиология 1995;6:35–8. [Baryshnikov A. Yu., Shishkin Yu. V. FAS/APO-1 antigen — apoptose condensing molecula. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 1995;6:35–8 (In Russ.)].
3. Kitada S., Andersen J., Akar S. et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. Blood 1998;91(9):3379–89.
4. Jablonska E., Kiersnowska-Rogowska B., Rogowski F. et al. TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Neoplasma 2008;55(1):51–4. DOI: 10.1080/10428190500158789.
5. Aggarwal B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nature Rev. Immunol. 2003; 3(9):745–56. DOI: 10.1038/nri1184.
6. Chakrabandhu K., Huault S., Garmy N. The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. Cell Death Differ. 2008;15(12):1824–37. DOI: 10.1038/cdd.2008.115.
7. Ea C. K., Deng L., Xia Z. P. et al. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. Mol. Cell. 2006;22(2):245–57. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.026.
8. Falschlehner C., Ganten T. M., Koschny R. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. Adv. Exp. Med. Biol. 2009;647:195–206. DOI: 10.1007/978-0-387-89520-8\_14.
9. LeBlanc H. N., Ashkenazi A. Apo2L/ TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ. 2003;10(1):66–75. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401187.
10. Meylan F., Richard A. C., Siegel R. M. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. Immunol Rev. 2011;244(1):188–96. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01068.x.
11. Wen L., Zhuang L., Luo X., Wei P. TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. J. Biol. Chem. 2003;278(40):39251–8. DOI: 10.1074/jbc.M305833200.
12. Halina A., Artur P., Barbara M. K. et al. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 expression associated with progression in B-CLL. Folia Histochem Cytobiol. 2010;48(4):534–41. DOI: 10.2478/v10042-010-0048-5.
13. Sarto C., Binz P. A., Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. Electrophoresis 2000;21(6):1218–26. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1218::AID-ELPS1218>3.0.CO;2-H.
14. Deveraux Q. L., Reed J. C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. Genes Dev. 1999;13(3):239–52.
15. Paydas S., Tanriverdi K., Yavuz S., Seydaoglu G. PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature. Leuk Res. 2007;31(3):365–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.06.022.
16. Gunn S. R., Bolla A. R., Barron L. L. et al. Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene. Leuk Res. 2009;33(9):1276–81. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.10.010.
17. Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D. 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 guidelines. Blood 2008;111(12):5446–56. DOI: 10.1182/blood-2007-06-093906.
18. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on. Nat Protoc. 2006;1(2):581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.