

## ЛИМФОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## Мутации гена *TP53* в опухолевых клетках у пациентов с агрессивными В-клеточными лимфомами

А.Е. Мисюрина<sup>1</sup>, С.К. Кравченко<sup>1</sup>, В.А. Мисюрин<sup>2</sup>,  
А.М. Ковригина<sup>1</sup>, А.У. Магомедова<sup>1</sup>, Е.А. Барях<sup>3</sup>,  
Ф.Э. Бабаева<sup>1</sup>, А.В. Мисюрин<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

<sup>3</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52 ДЗМ», ул. Пехотная, д. 3, Москва, Российская Федерация, 123182

<sup>4</sup> ООО «ГеноТехнология», ул. 800-летия Москвы, д. 11, Москва, Российская Федерация, 127247

## РЕФЕРАТ

**Актуальность.** Наличие мутаций в гене *TP53* затрудняет апоптоз в клетках и приводит к возникновению в них дополнительных онкогенных событий, способствующих прогрессированию опухоли.

**Цель.** Оценить частоту мутаций гена *TP53* у пациентов с В-клеточными лимфомами высокой степени злокачественности «double-hit» (HGBL DH) и неуточненной (HGBL NOS); проанализировать связь с прогнозом заболевания.

**Материалы и методы.** Проанализирован ретроспективный материал из архива 10 больных с HGBL DH и 26 — с HGBL NOS. Медиана наблюдения составила 26,5 мес. (диапазон 0,6–160,9 мес.). Отбор выполняли по принципу наличия доступного биологического материала (парафиновые блоки) для проведения секвенирования по Сэнгеру последовательности гена *TP53* с 5-го по 8-й экзон (кодирующих ДНК-связывающий домен гена *TP53*). Всем больным выполняли FISH-исследование опухоли с целью выявить транслокации с участием локусов генов *c-MYC/8q24*, *BCL2/18q21* и *BCL6/3q27*. Для анализа различий между группами использовались тесты  $\chi^2$  и Манна—Уитни. Для оценки влияния молекулярных маркеров на прогноз заболевания проведен однофакторный событийный анализ (критерий Каплана—Мейера, лог-ранговый тест) и многофакторный регрессионный анализ Кокса.

**Результаты.** Мутации гена *TP53* в клетках лимфомы выявлены у 13 (36 %) из 36 больных, 10 (77 %) из 13 — патогенные. У 8 из 10 больных с мутациями *TP53* обнаружена транслокация с участием локуса гена *c-MYC/8q24*. Группы с диким (*TP53-WT*) и мутантным (*TP53-MUT*) типами гена *TP53* были сопоставимы по основным клиническим характеристикам. Больные с *TP53-MUT* в опухолевых

## LYMPHOID TUMORS

## *TP53* Gene Mutations in Tumor Cells of Patients with Aggressive B-Cell Lymphomas

AE Misyurina<sup>1</sup>, SK Kravchenko<sup>1</sup>, VA Misyurin<sup>2</sup>,  
AM Kovrigina<sup>1</sup>, AU Magomedova<sup>1</sup>, EA Baryakh<sup>3</sup>,  
FE Babaeva<sup>1</sup>, AV Misyurin<sup>4</sup>

<sup>1</sup> National Medical Hematology Research Center, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

<sup>2</sup> NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

<sup>3</sup> Municipal Clinical Hospital No. 52, 3 Pekhotnaya str., Moscow, Russian Federation, 123182

<sup>4</sup> GenoTehnologiya, 11 800-letiya Moskv str., Moscow, Russian Federation, 127247

## ABSTRACT

**Background.** *TP53* gene mutations impede cell apoptosis and lead to additional oncogenic events contributing to tumor progression.

**Aim.** To assess *TP53* gene mutation rate in patients with high-grade B-cell lymphoma double-hit (HGBCL DH) and not otherwise specified (HGBL NOS); to analyse its relationship with disease prognosis.

**Materials & Methods.** Retrospective materials from medical data of 10 HGBL DH and 26 HGBL NOS patients were analyzed. Median follow-up was 26.5 months (range 0.6–160.9 months). Selection was based on the presence of available biological materials (paraffin blocks) for Sanger sequencing of *TP53* gene from exon 5 to exon 8 (encoding DNA-binding domain of *TP53* gene). FISH analysis of the tumor was performed in all patients to identify translocations involving *c-MYC/8q24*, *BCL2/18q21*, and *BCL6/3q27* gene locus. To analyze differences between groups  $\chi^2$  and Mann-Whitney tests were applied. Univariate event analysis (Kaplan-Meier and log-rank tests) and Cox regression analysis were used to assess the influence of molecular markers on the disease prognosis.

**Results.** *TP53* gene mutations in lymphoma cells were found in 13 (36 %) out of 36 patients, 10 (77 %) out of 13 mutations were pathogenic. In 8 out of 10 patients with *TP53* mutations *c-MYC/8q24* gene translocation was identified. Groups with wild (*TP53-WT*) and mutant (*TP53-MUT*) types of *TP53* gene were similar in terms of main clinical characteristics. Patients with *TP53-MUT* in tumor cells showed worse 3-year overall survival (OS) compared with the group without *TP53-MUT* (30 % vs. 73 %;  $p = 0.026$ ) as well as higher probability of disease progression in the period of 3 years (66 % vs. 15 %;  $p = 0.004$ ). In multivariate analysis significant OS predictor was the presence of *TP53* mutation ( $p = 0.006$ ). Relapse/

клетках имели худшие показатели 3-летней общей выживаемости (ОВ) в сравнении с группой без *TP53-MUT* (30 vs 73 %;  $p = 0,026$ ) и более высокую вероятность прогрессирования заболевания в течение 3 лет (66 vs 15 %;  $p = 0,004$ ). При многофакторном анализе значимым фактором в отношении ОВ было наличие мутации гена *TP53* ( $p = 0,006$ ). Вероятность развития рецидивов/прогрессирования повышалась при сочетании мутаций гена *TP53* и транслокации с участием локуса гена *c-MYC* ( $p = 0,0003$ ).

**Заключение.** Сочетание транслокации с участием локуса гена *c-MYC/8q24* и мутации гена *TP53* в клетках опухоли при HGBL DH и HGBL NOS позволяет стратифицировать больных на группы риска рецидивов/прогрессирования лимфомы.

**Ключевые слова:** В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit», В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности, неуточненная, мутация *TP53* в опухолевых клетках, транслокация с участием локуса гена *c-MYC*.

**Получено:** 25 января 2019 г.

**Принято в печать:** 3 июня 2019 г.

*Для переписки:* Анна Евгеньевна Мисюрина, канд. мед. наук, Новый Зыковский пр-д, д. 4а, Москва, Российская Федерация, 125167; тел.: +7(909)637-32-49; e-mail: anna.lukina1@gmail.com

*Для цитирования:* Мисюрина А.Е., Кравченко С.К., Мисюрин В.А. и др. Мутации гена *TP53* в опухолевых клетках у пациентов с агрессивными В-клеточными лимфомами. Клиническая онкогематология. 2019;12(3):263–70.

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-263-270

progression probability was higher in combined cases of *TP53* mutation and translocation involving *c-MYC* gene locus ( $p = 0.0003$ ).

**Conclusion.** Translocation involving *c-MYC* gene along with *TP53* gene mutation in tumor cells can serve as a criterion for dividing HGBL DH and HGBL NOS patients into different lymphoma relapse/progression risk groups.

**Keywords:** high-grade B-cell lymphoma double-hit, high-grade B-cell lymphoma not otherwise specified, *TP53* mutation in tumor cells, translocation involving *c-MYC* gene locus.

**Received:** January 25, 2019

**Accepted:** June 3, 2019

*For correspondence:* Anna Evgen'evna Misyurina, MD, PhD, 4a Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167; Tel.: +7(909)637-32-49; e-mail: anna.lukina1@gmail.com

*For citation:* Misyurina AE, Kravchenko SK, Misyurin VA, et al. *TP53* Gene Mutations in Tumor Cells of Patients with Aggressive B-Cell Lymphomas. Clinical oncohematology. 2019;12(3):263–70 (In Russ).

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-263-270

## ВВЕДЕНИЕ

Ген *TP53* человека расположен на коротком плече хромосомы 17 (17p13.1) и состоит из 11 экзонов [1–3]. Белок, кодируемый геном *TP53*, является ключевым опухолевым супрессором, опосредующим остановку клеточного цикла, репарацию ДНК, апоптоз [4, 5]. Мутации *TP53* приводят к нарушению структуры и функции белка p53, а также служат главным механизмом инактивации *TP53* при многих видах опухолей. Посредством координированной работы генов *TP53* и *c-MYC*, кодирующего мощный транскрипционный фактор, осуществляется регуляция клеточной пролиферации и проапоптотических стимулов, препятствующих злокачественной трансформации [6]. Так, ген *c-MYC* активирует сигнальный каскад p19(ARF)-MDM2-TP53, нарушение одного или нескольких звеньев которого может служить пусковым фактором развития лимфомы.

Дисфункция *TP53* является одной из причин, способствующих развитию и прогрессированию лимфоидных опухолей [7, 8]. ДНК-связывающий домен белка p53, кодируемый экзонами 4–8 гена *TP53*, представляется наиболее важным в связи с тем, что с его помощью реализуется программа защиты организма от опухолевой трансформации его клеток [9, 10].

Проанализировав опубликованные данные о мутациях гена *TP53* в опухолевых клетках, становится очевидно, что большинство из них вызывает нарушение взаимодействия *TP53* и ДНК, что приводит к частичной или полной потере его функциональности [11–13]. В то время как инактивирующие мутации большинства генов-супрессоров опухолевого роста обуславливают отсутствие или укорочение белкового продукта, более 80 % мутаций гена *TP53* являются миссенс-мутациями, которые приводят к синтезу стабильного белка обычной длины [14]. Часто аминокислотная замена происходит в центральной части — ДНК-связывающем домене гена *TP53*, что вызывает нарушение связывания p53 с ДНК и невозможность активировать транскрипцию целевых генов.

Различные мутации имеют разные последствия в отношении функции белка p53 [15, 16]. Некоторые мутации связаны с потерей функции, в то время как другие — с ее усилением. По этой причине прогностическое значение мутаций *TP53* в опухолевых клетках оказывается противоречивым в зависимости от исследуемого типа опухоли, методов определения, вариантов мутаций *TP53*, применяемой терапии, многообразия механизмов, приводящих к инактивации функции гена *TP53*, а также дополнительных генетических событий [9, 17, 18].

Наиболее ранним исследованием, в котором проанализирована роль мутаций гена *TP53* в клетках опухоли у больных В-клеточными лимфомами, была работа К.Н. Young и соавт. [19]. У 21,4 % больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) были выявлены мутации в экзонах 5–9, 66 % из которых произошли в нуклеотидных последовательностях, которые являются ключевыми в связывании ДНК [19–21]. Наличие мутаций *TP53* в ДНК-связывающем домене было независимым прогностическим фактором, связанным с более низкой выживаемостью больных ДВКЛ, получавших терапию СНОР, R-СНОР-21, согласно данным Р. Peroja и соавт. [22].

А. Clipson и соавт. в 2015 г. показали, что прогноз больных ДВКЛ с транслокацией с участием локуса гена *c-MYC* зависит от присутствия дополнительных генетических нарушений [23]. В частности, наиболее негативным сочетанием было выявление транслокации с участием локуса гена *c-MYC* и мутации гена *TP53* в клетках лимфомы. Это оказалось даже более неблагоприятным фактором в отношении показателей общей выживаемости (ОВ), чем выявление транслокаций с участием локусов генов *c-MYC* и *BCL2/BCL6*. Прогностической значимости наличия мутации гена *TP53* в опухолевых клетках при ДВКЛ в отсутствие транслокации с участием локуса гена *c-MYC* не получено.

Ранее, в 2014 г., S.M. Aukema и соавт. показали, что «single-hit» лимфомы характеризуются столь же плохим прогнозом, как и «double-hit» лимфомы в условиях применения схемы R-СНОР-21 [24]. Это может объясняться тем, что помимо выявления транслокации с участием локуса гена *c-MYC* в клетках опухоли возможно присутствие и других генетических нарушений, в частности мутации гена *TP53*, которые не определялись в данном исследовании. Кроме того, объяснением может служить тот факт, что терапия по схеме R-СНОР-21 не является оптимальной у больных с реаранжировкой гена *c-MYC*.

Известно, что среди агрессивных В-клеточных лимфом наиболее трудно поддается лечению группа «double-hit» лимфом (в классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения 2017 г. — High-grade B-cell lymphoma double-hit, HGBL DH, — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit») [25]. Лишь половине больных удается преодолеть медиану ОВ в 24 мес. Группа больных с В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности, не уточненной (High-grade B-cell lymphoma not otherwise specified, HGBL NOS) является более гетерогенной по составу и результатам лечения. Так, у части больных при цитогенетическом исследовании может выявляться транслокация с участием локуса гена *c-MYC*.

Прогностическое значение обнаружения мутации гена *TP53* в опухолевых клетках у больных HGBL NOS и HGBL DH ранее не было исследовано. В 2015 г. опубликованы данные секвенирования гена *TP53* в образцах опухоли больных HGBL DH (экзоны 4–11) [26]. N. Gebauer и соавт. показали, что чаще мутации гена *TP53* в биоптатах опухоли встречаются у больных с *MYC+/BCL2+*, чем у больных с *MYC+/BCL6+* «double-hit» лимфомой. Прогностическое значение выявления

мутаций гена *TP53* в клетках лимфомы у исследуемой группы пациентов не изучалось. Авторы предполагают, что мутации *TP53* в опухолевых клетках могут быть ранним событием развития лимфомы «double-hit», т. к. они чаще выявлялись у больных с фолликулярной лимфомой в анамнезе.

В контексте обсуждения роли мутаций *TP53* следует подчеркнуть различия между терминами «мутация» и «делеция». Так, в ряде случаев при цитогенетическом исследовании опухолевого образца может выявляться делеция короткого плеча хромосомы 17, приводящая к моносомии гена *TP53/17p13* (потере гетерозиготности гена *TP53*). Прогностическая роль этого события неоднозначна. По данным имеющихся публикаций, аллельная делеция *TP53/17p13* сама по себе не связана с плохим прогнозом при ДВКЛ [27], т. к. может быть компенсирована функцией нормальной копии гена. Возможно, потеря гетерозиготности гена *TP53* происходит вслед за появлением мутации гена *TP53*, которая, в свою очередь, предрасполагает к иммортализации опухолевых клеток и дальнейшему прогрессированию заболевания. Другими же авторами была опубликована работа о прогностической значимости аномалий гена *TP53* у больных ДВКЛ без учета механизма ее возникновения (мутация либо делеция), однако правомочность такого объединения представляется спорной [28].

Таким образом, мутации в гене *TP53* (*TP53-MUT*) приводят к усилению жизнеспособности опухолевых клеток и возникновению в них дополнительных онкогенных событий, способствующих опухолевой прогрессии.

**Цель настоящего исследования** — оценить частоту мутаций гена *TP53* у пациентов с HGBL NOS и HGBL DH, проанализировать связь с прогнозом заболевания.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами проанализирован ретроспективный материал из архива 10 больных HGBL DH и 26 больных HGBL NOS. Отбор осуществляли по принципу наличия доступного биологического материала (парафиновые блоки) для проведения секвенирования по Сэнгеру гена *TP53* с 5-го по 8-й экзон. Выделение ДНК из парафиновых блоков биоптатов опухоли проводилось с помощью набора Extra-DNA («ГеноТехнология», Россия) по инструкции, предоставленной разработчиками. Амплификация последовательности гена *TP53* выполнялась с помощью пар праймеров TGTTCACTTGTGCCCTGACT и GGAGGGCCACTGACAACCA (экзоны 5–6), ACTGGCCTCATCTTGGGCCT и GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT (экзон 7), TAAATGGGACAGGTAGGACC и TCCACCGCTTCTTGTCTCTGC (экзон 8). Секвенирование полученных ампликонов проводилось на генетическом анализаторе ABPrizm 310 (Applied Biosystems, США) в полном соответствии с протоколами, предоставленными разработчиками. Всем больным выполнялось цитогенетическое исследование методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) на биопсийном материале с целью выявить транслокации с участием локуса генов *c-MYC/8q24*, *BCL2/18q21* и

*BCL6/3q27*. У 2 больных не удалось определить статус гена *c-MYC* ввиду низкого качества парафинового материала. Стандартное цитогенетическое исследование проведено в дебюте заболевания 8 больным с целью установить развернутый кариотип опухолевых клеток. Диагнозы HGBL NOS и HGBL DH подтверждены в референсной лаборатории ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2017 г. Из анализа исключены пациенты, у которых опухоль возникла в результате трансформации фолликулярной лимфомы. Было получено информированное согласие пациентов на анализ клинических данных, результатов лечения и проведения дополнительной лабораторной диагностики биологического материала опухолевой ткани из архива.

### Статистический анализ

Анализ клинических характеристик в группах больных проводился с помощью критериев  $\chi^2$  и Манна—Уитни. Для оценки влияния мутаций гена *TP53* в клетках лимфомы на параметры ОБ и вероят-

ность рецидивов/прогрессирования заболевания проведен однофакторный событийный анализ (критерий Каплана—Мейера, лог-ранговый тест) и многофакторный регрессионный анализ Кокса (STATISTICA 10).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Медиана наблюдения за больными составила 26,5 мес. (диапазон 0,6–160,9 мес.). Клиническая характеристика пациентов с HGBL NOS и HGBL DH в дебюте заболевания представлена в табл. 1. Больные были сопоставимы по основным клиническим характеристикам, которые отражали агрессивные варианты В-клеточных лимфом.

Из 10 больных HGBL DH 4 имели транслокации *c-MYC/BCL6*, 6 — *c-MYC/BCL2*. У 7 больных HGBL NOS выявлена транслокация с участием локуса гена *c-MYC/8q24*. Секвенирование по Сэнгеру экзонов 5–6, 7 и 8 гена *TP53* выполнено всем больным. У всех пациентов получены результаты секвенирования хотя бы по двум регионам (экзонам 5–6, и/или 7, и/или 8 гена *TP53*). У 13 (36 %) больных выявлены миссенс-мутации гена *TP53* (*TP53-MUT*) в опухолевых клетках. У 10 (77 %) из 13 пациентов *TP53-MUT* были патогенные, согласно базе данных COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) (табл. 2). При HGBL DH патогенные мутации *TP53* выявлены в клетках опухоли у 3 (30 %) из 10 больных, при HGBL NOS — у 7 (27 %) из 26. Ввиду небольшого объема выборки трудно экстраполировать наши данные на частоту обнаружения *TP53-MUT* у больных HGBL NOS и HGBL DH, тем не менее она оказалась выше, чем при ДВКЛ (20 %). В анамнезе у пациентов и их родственников не было первично-множественных опухолей, что косвенно может свидетельствовать об отсутствии синдрома Ли—Фраумени.

Группы больных с диким типом гена *TP53* (*TP53-WT*) и *TP53-MUT* в опухолевых клетках были сопоставимы по основным клиническим характеристикам (табл. 3). У большинства больных выявлялись распространенная стадия заболевания по класси-

Таблица 1. Клиническая характеристика больных

Показатель	HGBL NOS, n = 26	HGBL DH, n = 10	p
Соотношение мужчин/женщин	14:12	4:6	0,46
Медиана (диапазон) возраста, лет	46 (25–77)	46 (30–69)	0,97
III–IV стадия по классификации Ann Arbor	22/26 (85 %)	9/10 (90 %)	0,67
Статус по шкале ECOG $\geq 2$ баллов	21/26 (81 %)	9/10 (90 %)	0,50
Поражение > 1 экстранодальной области	18/26 (69 %)	8/10 (80 %)	0,51
Вовлечение ЦНС	3/25 (12 %)	2/10 (20 %)	0,54
Вовлечение костного мозга	9/26 (35 %)	6/10 (60 %)	0,17
В-симптомы	11/26 (42 %)	7/10 (70 %)	0,14
Активность ЛДГ выше нормы	22/26 (85 %)	8/9 (89 %)	0,75

ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group; HGBL DH — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit»; HGBL NOS — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit», неутонченная; ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

Таблица 2. Характеристика мутаций гена *TP53* в опухолевых клетках

Пациент №	Тип лимфомы	Мутация ДНК, доля мутантного аллеля	Аминокислотные замены в белке	Тип мутации	Тип функциональности согласно COSMIC, (баллы)	Когда-либо подтверждена как соматическая
1	HGBL DH	c.487T>A, 25,2 %	p.Y163N	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Да
2	HGBL DH	c.524G>C, 15,6 %	p.R175P	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Нет
3	HGBL DH	c.770T>A, 32,4 %	p.L257Q	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Да
4	HGBL NOS	c.541C>T, 29 %	p.R181C	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Да
5	HGBL NOS	c.523C>T, 10,1 %	p.R175C	Замена — миссенс	Патогенная (0,97)	Да
6	HGBL NOS	c.535C>T, 45,6 %	p.H179Y	Замена — миссенс	Патогенная (1,00)	Да
7	HGBL NOS	c.824G>A, 75 %	p.C275Y	Замена — миссенс	Патогенная (1,00)	Да
8	HGBL NOS	c.713G>A, 87,7 %	p.C238Y	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Да
9	HGBL NOS	c.517G>A, 22,4 %	p.V173M	Замена — миссенс	Патогенная (0,99)	Да
10	HGBL NOS	c.745A>G, 31,9 %	p.R249G	Замена — миссенс	Нейтральная (0,41)	Да
11	HGBL NOS	c.639A>G, 41,8 %	p.R213R	Замена — молчащая	Нейтральная (0,19)	Да
12	HGBL NOS	c.639A>G, 48,5 %	p.R213R	Замена — молчащая	Нейтральная (0,19)	Да
13	HGBL NOS	c.743G>A, 75,6 %	p.R247Q	Замена — миссенс	Патогенная (0,98)	Да

HGBL DH — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit»; HGBL NOS — В-клеточная лимфома высокой степени злокачественности «double-hit», неутонченная.



**Таблица 3.** Клиническая характеристика больных с TP53-MUT и TP53-WT

Показатель	TP53-MUT, n = 13	TP53-WT, n = 23	p
Соотношение мужчин/женщин	7:6	11:23	0,18
Медиана (диапазон) возраста, лет	37 (25–62)	51 (23–77)	0,51
III–IV стадия по классификации Ann Arbor	12/13 (92 %)	19/23 (83 %)	0,42
Статус по шкале ECOG $\geq 2$ баллов	10/13 (77 %)	20/23 (87 %)	0,44
Поражение > 1 экстранодальной области	11/13 (85 %)	15/23 (65 %)	0,21
Вовлечение ЦНС	2/12 (17 %)	3/23 (13 %)	0,77
Вовлечение костного мозга	4/13 (31 %)	11/23 (48 %)	0,32
В-симптомы	9/13 (69 %)	9/23 (39 %)	0,08
Активность ЛДГ выше нормы	13/13 (100 %)	17/23 (74 %)	0,05
«Double-hit» лимфома	3/12 (25 %)	7/22 (32 %)	0,68
Транслокация с участием локуса гена <i>c-MYC/8q24</i>	3/12 (25 %)	4/22 (18 %)	0,64

ECOG — Eastern Cooperative Oncology Group; TP53-MUT — мутантный тип TP53; TP53-WT — дикий тип TP53; ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

кации Ann Arbor, отягощенный соматический статус, поражение более одной экстранодальной области. Активность ЛДГ была повышена у больных с TP53-MUT ( $p = 0,05$ ).

У 2 больных HGBL DH с наличием TP53-MUT в опухолевых клетках выявлены транслокации с участием локусов генов *c-MYC/8q24* и *BCL6/3q27*, у 1 — *c-MYC/8q24* и *BCL2/18q21*. У 3 пациентов из группы HGBL NOS с TP53-MUT обнаружена транслокация с участием локуса гена *c-MYC*. Из 8 больных, которым выполнялось комплексное исследование кариотипа, делеция 17p13 была у 2, у 1 — дериват хромосомы 17, у 1 — дополнительный сигнал от хромосомы 17.

При оценке влияния TP53-MUT на параметры ОБ и вероятность развития рецидивов/прогрессирования заболевания учитывались только патогенные мутации (10 из 13).

Лечение проводилось по интенсифицированным программам большинству пациентов. Так, лишь 4 (12 %) из 33 больных с TP53-WT в опухолевых клетках получили лечение по схеме R-CHOP-21, 8 (24 %) — по схеме R-DA-EPOCH, 21 (64 %) — ЛБ-М-04 с ритуксимабом. Соотношение в группах больных с TP53-MUT и TP53-WT по видам терапии было сопоставимо. У 6 (60 %) из 10 больных с TP53-MUT отмечено раннее прогрессирование заболевания (2 — HGBL DH и 4 — HGBL NOS) в сравнении с 4 (17 %) из 23 с TP53-WT (из них 1 — HGBL DH и 3 — HGBL NOS). Летальный исход от осложнений произошел у 1 (10 %) из 10 и 1 (4 %) из 23 больных с TP53-MUT и TP53-WT соответственно. Трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) выполнена всего 9 больным: 3 (30 %) из 10 в группе с TP53-MUT и 6 (26 %) из 23 — с TP53-WT ( $p \geq 0,05$ ). В группе TP53-MUT 3 из 10 больных HGBL DH, которым проведена аутоТГСК, остаются под наблюдением в ремиссии. У 2 из 10 больных из группы TP53-WT отмечались рецидивы/прогрессирование заболевания, несмотря на аутоТГСК. Мы не наблюдали неудач аутоТГСК в группе TP53-MUT. Тем не менее возможность реализовать аутоТГСК была только у больных, достигших полной ремиссии.

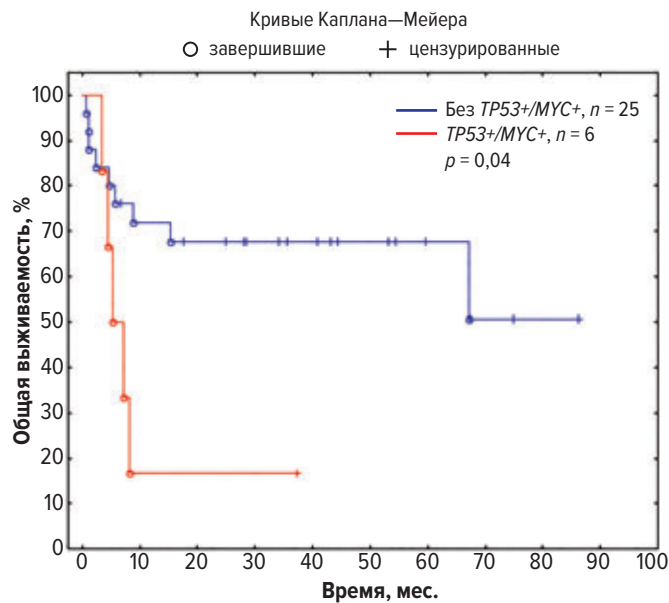
По результатам однофакторного анализа больные с TP53-MUT имели худшие показатели ОБ и более высокую вероятность прогрессирования HGBL DH и HGBL NOS в сравнении с пациентами из группы с TP53-WT. Так, 3-летняя ОБ больных с TP53-MUT в сравнении с группой TP53-WT составила 30 vs 73 % ( $p = 0,026$ ), вероятность рецидивов/прогрессирования заболевания в течение 3 лет — 66 vs 15 % соответственно ( $p = 0,004$ ). Сочетание двух генетических аномалий в клетках лимфомы MYC+/TP53+ оказывало негативное влияние на ОБ и вероятность рецидивов/прогрессирования заболевания в течение 3 лет наблюдения (3-летняя ОБ составила 17 и 68 % в группах больных с MYC+/TP53+ и без сочетания указанных аномалий,  $p = 0,04$ ; вероятность рецидивов/прогрессирования заболевания — 83 и 18 % соответственно,  $p = 0,002$ ) (рис. 1 и 2).

По результатам анализа влияния мутации гена TP53 в опухолевых клетках у больных с транслокацией с участием локуса гена *c-MYC* мы получили данные о том, что ее наличие значительно повышает вероятность рецидивов/прогрессирования HGBL DH и HGBL NOS (83 % в группе MYC+/TP53+ vs 20 % в группе с MYC-/TP53-;  $p = 0,01$ ) и имеет тенденцию к прогностической значимости в отношении влияния на 3-летнюю ОБ (17 vs 71 % соответственно;  $p = 0,06$ ). Многофакторный анализ проведен путем пошаговой селекции. Исходно в анализ были включены такие факторы, как транслокация с участием гена *c-MYC*, «double-hit» лимфома, мутация гена TP53 в клетках лимфомы, сочетание мутации гена TP53 и транслокации гена *c-MYC* (MYC+/TP53+), мутации гена TP53 в сочетании со статусом «double-hit», аутоТГСК. При регрессионном анализе Кокса единственным значимым фактором, влияющим на ОБ у больных HGBL DH и HGBL NOS, была мутация гена TP53, выявляемая в биоптате опухолевой ткани ( $p = 0,04$ ). На вероятность рецидивов/прогрессирования HGBL DH и HGBL NOS влияло сочетание мутации гена TP53 и транслокации с участием локуса гена *c-MYC* (MYC+/TP53+) ( $p = 0,002$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

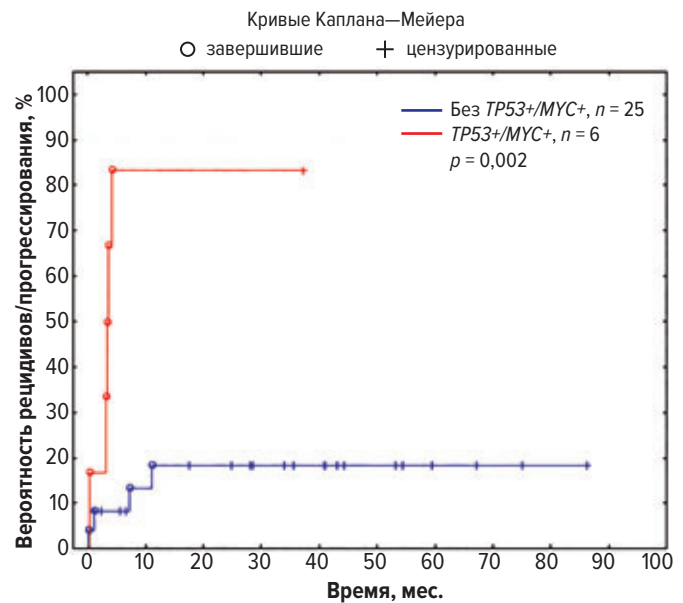
Мутации TP53 в клетках ДВКЛ выявляются в 20 % случаев и статистически значимо связаны с худшими показателями ОБ как в ABC-(non-GCB), так и GCB-подгруппе при лечении по схеме R-CHOP-21 [19, 27, 29].

В исследовании, проведенном Z.Y. Xu-Monette и соавт. в 2012 г., показано, что у больных ДВКЛ с транслокацией гена *c-MYC* с высокой частотой обнаруживаются мутации гена TP53 в опухолевых клетках. Показатели ОБ больных с транслокацией гена *c-MYC* и мутацией TP53 даже хуже, чем у пациентов с MYC+/BCL2+ ДВКЛ, что обосновывает необходимость выявления мутации гена TP53 с целью определить группу риска неблагоприятного исхода у этих больных. В проведенном нами исследовании впервые оценена частота обнаружения мутаций у больных HGBL DH и HGBL NOS. Мутация TP53 в клетках опухоли выявлена с одинаковой частотой в группах больных с реаранжировкой гена *c-MYC* и без нее (7/18 и 5/16;  $p = 0,64$ ).



**Рис. 1.** Общая выживаемость в группах больных с сочетанием мутации гена  $TP53$  и транслокации с участием локуса гена  $c-MYC$  ( $TP53+/MYC+$ ) в опухолевых клетках и отсутствием  $TP53+/MYC+$

**Fig. 1.** Overall survival in combined cases of  $TP53$  mutation and translocation involving  $c-MYC$  gene locus ( $TP53+/MYC+$ ) in tumor cells and in cases without  $TP53+/MYC+$



**Рис. 2.** Вероятность развития рецидивов/прогрессирования в группах больных с сочетанием мутации гена  $TP53$  и транслокации с участием локуса гена  $c-MYC$  ( $TP53+/MYC+$ ) в опухолевых клетках и отсутствием  $TP53+/MYC+$

**Fig. 2.** Relapse/progression probability in combined cases of  $TP53$  mutation and translocation involving  $c-MYC$  gene locus ( $TP53+/MYC+$ ) in tumor cells and in cases without  $TP53+/MYC+$

С. Schuster и соавт. в 2011 г. показали, что у Em-Мышей при потере функции  $p53$  выживаемость была значительно хуже, чем у мышей, лимфоидные опухоли которых характеризовались гиперэкспрессией  $Bcl2$  [30]. Таким образом, в настоящее время концепция молекулярного патогенеза лимфоидных опухолей подразумевает поиск кооперирующих генетических событий, которыми могут быть опосредованы различия в чувствительности к иммунохимиотерапии. В отношении агрессивных В-клеточных лимфом с реаранжировкой гена  $c-MYC$  верно то, что их прогноз зависит от наличия дополнительных генетических нарушений [31]. Так, у ряда больных следует проводить цитогенетическое исследование для выявления транслокаций с участием локусов генов  $BCL2$  и  $BCL6$ , а также секвенирование для определения мутаций гена  $TP53$  [27].

Следует подчеркнуть, что иммуногистохимический метод позволяет судить о наличии мутаций гена  $TP53$  с поправкой на тип мутации. Это обусловлено тем, что в 17 % случаев мутации гена  $TP53$ , такие как сдвиг рамки считывания и нонсенс-мутации, приводят к укорочению белкового продукта, который не определяется с помощью иммуногистохимического исследования [29]. В связи с этим в настоящем исследовании не проводилась иммуногистохимическая оценка экспрессии белка  $p53$ .

В ретроспективном исследовании А.И. Schiefer и соавт. оценивалась прогностическая значимость сочетания наличия делеций или мутаций гена  $TP53$  ( $TP53+$ ) в опухолевых образцах и транслокаций с участием локусов генов  $c-MYC$  и  $BCL2$  у 101 больного ДВКЛ [28]. У 53 пациентов выявлена транслокация с участием локуса гена  $c-MYC$ . Больные ДВКЛ с  $TP53+$  имели худшие результаты терапии в сравнении с

группой  $TP53-$  (частота полных ремиссий составила 34,4 vs 60,9 %;  $p = 0,01$ ). Аномалии гена  $TP53$  были независимым прогностическим фактором при многофакторном анализе ( $p = 0,01$ ). На первый взгляд результаты этой исследовательской группы противоречат концепции о том, что наиболее сильным негативным фактором прогноза является статус «double-hit». Так, больные с одной транслокацией с участием локуса гена  $c-MYC/8q24$ , а также пациенты с аномалиями  $TP53$  в сочетании с транслокациями генов  $c-MYC$  и  $BCL2$  имели наиболее благоприятные результаты терапии (медиана выживаемости не достигнута), так же как и в отсутствие данных аномалий (медиана выживаемости 65 мес.). У больных с  $MYC+/BCL2+$  «double-hit» лимфомой медиана выживаемости составила 28 мес., у больных с  $MYC+/TP53+$  — 10 мес., у больных с аномалиями гена  $TP53$  в клетках лимфомы — 12 мес. Это соотносится с полученными нами результатами в отношении больных HGBL NOS и HGBL DH и свидетельствует о том, что необходимо детальное исследование дополнительных механизмов молекулярного патогенеза лимфоидных опухолей. Однако авторы не оценивают вклад определенного типа аномалий гена  $TP53$  (мутации/делеции) отдельно, которые могут иметь различное функциональное значение в опухолевой клетке.

А. Clipson и соавт. в 2015 г. показали, что случаи с сочетанием всех трех событий  $MYC+/BCL2+/TP53+$  ( $n = 9$ ) имели худшие показатели ОВ, чем больные с  $MYC+/TP53+$  ( $n = 13$ ) и  $MYC+/BCL2+$  ( $n = 25$ ). При многофакторном анализе неблагоприятное влияние на прогноз заболевания оказывало именно сочетание  $MYC+/TP53+$  вне зависимости от наличия или отсутствия перестройки гена  $BCL2$  [23].

В проведенном нами исследовании сочетание *MYC+ / TP53+* в опухолевых клетках значимо повышало вероятность рецидивов/прогрессирования HGBL DH и HGBL NOS в течение 3-лет (83 и 20 % в группах больных с транслокацией локуса гена *c-MYC* и наличием *TP53-MUT* либо *TP53-WT* в клетках опухоли;  $p = 0,01$ ) и имело тенденцию к прогностической значимости в отношении 3-летней ОВ (14 и 71 % соответственно;  $p = 0,06$ ).

Интересен факт нивелирования негативного влияния, оказываемого наличием одновременно 2 транслокаций с участием локусов генов *c-MYC/8q24* и *BCL2/18q21* в присутствии мутации гена *TP53* [28]. Известно, что *c-MYC* способен препятствовать злокачественной опухолевой трансформации двумя способами. Во-первых, путем индукции p19ARF происходит активация p53, что по принципу обратной связи блокирует MDM2, вызывая апоптоз и старение клеток [32]. Во-вторых, высокий уровень экспрессии *c-MYC* подавляет экспрессию антиапоптотического фактора BCL2 и факторов семейства BCL-xL [33, 34]. Это взаимодействие в норме обеспечивает баланс между про- и антиапоптотическими факторами, что увеличивает чувствительность клеток к проапоптотическим стимулам. TP53 может индуцировать апоптоз путем прямого связывания с BCL2 и членами его семейства, приводя к активации BAX и индукции формирования апоптосомы. При условии нарушения этого механизма вследствие потери функции *TP53* по причине делеций или мутаций либо гиперэкспрессии BCL2 может произойти бесконтрольная клеточная пролиферация [30]. Однако в 2011 г. С. Schuster и соавт. описан феномен «уравновешивания» негативного влияния BCL2 в комбинации с потерей функции *TP53* на модели трансгенных Em-Мус-мышей. Блокирование апоптоза в клетках с дефицитом p53 вследствие гиперэкспрессии BCL2 может замедлить прогрессирование лимфоидной опухоли посредством попадания злокачественных клеток в «окно иммунологической видимости» для NK- и Т-клеток [30]. Таким образом, для развития лимфомы требуются дополнительные генетические изменения, которые часто включают потерю *TP53* или избыточную экспрессию BCL2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутация гена *TP53* в опухолевых клетках встречается с высокой частотой у больных HGBL DH и HGBL NOS (30 и 27 % соответственно). Нет определенных клинических признаков, позволяющих заподозрить наличие *TP53-MUT*, за исключением того, что больные с *TP53-MUT* чаще имеют высокие значения активности ЛДГ. Сочетание мутации гена *TP53* в опухолевых клетках и транслокации с участием локуса гена *c-MYC* позволяет стратифицировать HGBL DH и HGBL NOS на группы риска рецидивов/прогрессирования заболевания. Целесообразно проводить скрининг мутаций гена *TP53* в клетках лимфомы у больных HGBL DH и HGBL NOS ввиду того, что транслокация локуса гена *c-MYC* в них обнаруживается чаще, нежели у больных ДВКЛ. В случае первично-резистентных HGBL DH и HGBL NOS необходимы новые подходы к терапии.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов. А.М. Ковригина, член редакционной коллегии журнала «Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика», не участвовала в рецензировании рукописи.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** А.Е. Мисюрина, С.К. Кравченко, В.А. Мисюрин.

**Сбор и обработка данных:** А.Е. Мисюрина, В.А. Мисюрин, А.М. Ковригина, А.У. Магомедова, Е.А. Барях, Ф.Э. Бабаева.

**Анализ и интерпретация данных:** А.Е. Мисюрина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин.

**Подготовка рукописи:** А.Е. Мисюрина, В.А. Мисюрин.  
**Окончательное одобрение рукописи:** А.Е. Мисюрина, С.К. Кравченко, В.А. Мисюрин.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы статьи выражают благодарность всем сотрудникам лабораторий и клинических подразделений, участвовавшим в проведении исследования.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Matlashewski G, Lamb P, Pim D, et al. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*. 1984;3(13):3257–62. doi: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb02287.x.
2. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*. 1991;252(5013):1708–11. doi: 10.1126/science.2047879.
3. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(1):130–4. doi: 10.1073/pnas.83.1.130.
4. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):749–58. doi: 10.1038/nrc2723.
5. Voudsen KH, Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–31. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.037.
6. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, et al. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev*. 1999;13(20):2658–69. doi: 10.1101/gad.13.20.2658.
7. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356(6366):215–21. doi: 10.1038/356215a0.
8. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):117–29. doi: 10.1038/nrc992.
9. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*. 2012;119(16):3668–83. doi: 10.1182/blood-2011-11-366062.
10. Mihara M, Erster S, Zaika A, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003;11(3):577–90. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00050-9.
11. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28(6):622–9. doi: 10.1002/humu.20495.
12. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAIL receptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(13):4396–405. doi: 10.1182/blood-2007-02-072082.

13. Haupt S, Raghu D, Haupt Y. Mutant p53 drives cancer by subverting multiple tumor suppression pathways. *Front Oncol.* 2016;6:12. doi: 10.3389/fonc.2016.00012.
14. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(3):233–9. doi: 10.1038/35106009.
15. Soussi T, Lozano G. P53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331(3):834–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.190.
16. Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(14):8424–9. doi: 10.1073/pnas.1431692100.
17. Xu-Monette ZY, Young KH. The TP53 tumor suppressor and autophagy in malignant lymphoma. *Autophagy.* 2012;8(5):842–5. doi: 10.4161/auto.19703.
18. Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell.* 2005;120(1):7–10. doi: 10.1016/s0092-8674(04)01252-8.
19. Young KH, Leroy K, Moller MB, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood.* 2008;112(8):3088–98. doi: 10.1182/blood-2008-01-129783.
20. Joerger AC, Ang HC, Fersht AR. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(41):15056–61. doi: 10.1073/pnas.0607286103.
21. Joerger AC, Fersht AR. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem.* 2008;77(1):557–82. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.060806.091238.
22. Peroja P, Pedersen M, Mantere T, et al. Mutation of TP53, translocation analysis and immunohistochemical expression of MYC, BCL-2 and BCL-6 in patients with DLBCL treated with R-CHOP. *Sci Rep.* 2018;8(1):14814. doi: 10.1038/s41598-018-33230-3.
23. Clipson A, Barrans S, Zeng N, et al. The prognosis of MYC translocation positive diffuse large B-cell lymphoma depends on the second hit. *J Pathol Clin Res.* 2015;1(3):125–33. doi: 10.1002/cjp.2.10.
24. Aukema SM, Kreuz M, Kohler CW, et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica.* 2014;99(4):726–35. doi: 10.3324/haematol.2013.091827.
25. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO classification of tumours. Revised 4th edition, Vol. 2. Lyon: IARC Press; 2017.
26. Gebauer N, Bernard V, Gebauer W, et al. TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations. *Leuk Lymphoma.* 2015;56(1):179–85. doi: 10.3109/10428194.2014.907896.
27. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood.* 2012;120(19):3986–96. doi: 10.1182/blood-2012-05-433334.
28. Schiefer AI, Kornauth C, Simonitsch-Klupp I, et al. Impact of Single or Combined Genomic Alterations of TP53, MYC, and BCL2 on survival of patients with diffuse large B-cell lymphomas: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(52):e2388. doi: 10.1097/MD.0000000000002388.
29. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from the international DLBCL rituximab-CHOP consortium program. *Blood.* 2013;121(20):4021–31. doi: 10.1182/blood-2012-10-460063.
30. Schuster C, Berger A, Hoelzl MA, et al. The cooperating mutation or “second hit” determines the immunologic visibility toward MYC-induced murine lymphomas. *Blood.* 2011;118(17):4635–45. doi: 10.1182/blood-2010-10-313098.
31. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol.* 2014;27(7):958–71. doi: 10.1038/modpathol.2013.214.
32. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent proapoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.* 2005;17(6):631–6. doi: 10.1016/j.ceb.2005.09.007.
33. MacLean KH, Keller UB, Rodriguez-Galindo C, et al. c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL. *Mol Cell Biol.* 2003;23(20):7256–70. doi: 10.1128/mcb.23.20.7256-7270.2003.
34. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature.* 1985;318(6046):533–8. doi: 10.1038/318533a0.