



Оригинальная статья

Уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR)

Захаров С.Г.¹ • Голенков А.К.¹ • Мисюрин В.А.² • Катаева Е.В.¹ • Барышникова М.А.² • Чуксина Ю.Ю.¹ • Митина Т.А.¹ • Трифонова Е.В.¹ • Высоцкая Л.Л.¹ • Черных Ю.Б.¹ • Клинушкина Е.Ф.¹ • Белоусов К.А.¹ • Финашутина Ю.П.² • Мисюрин А.В.²

Захаров Сергей Геннадьевич – науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹
✉ 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация. Тел.: +7 (916) 076 66 99.
E-mail: hematologymoniki@mail.ru

Голенков Анатолий Константинович – д-р мед. наук, профессор, руководитель отделения клинической гематологии и иммунотерапии¹

Мисюрин Всеволод Андреевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей²

Катаева Елена Васильевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Барышникова Мария Анатольевна – канд. фарм. наук, заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей²

Чуксина Юлия Юрьевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Митина Татьяна Алексеевна – д-р мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Трифопова Елена Викторовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Высоцкая Людмила Леонидовна – канд. мед. наук, науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Черных Юлия Борисовна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Клинушкина Елена Федоровна – мл. науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Белоусов Кирилл Александрович – науч. сотр., отделение клинической гематологии и иммунотерапии¹

Финашутина Юлия Павловна – науч. сотр., лаборатория рекомбинантных опухолевых антигенов²

Мисюрин Андрей Витальевич – д-р биол. наук, заведующий лабораторией рекомбинантных опухолевых антигенов²

Актуальность. Ранее мы показали, что экспрессия генов *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) коррелирует с клиническими проявлениями болезни: они минимальны у пациентов с высокой активностью проапоптотических генов и низкой активностью генов, блокирующих апоптоз, и более выражены у пациентов с высоким уровнем экспрессии антиапоптотических и низким уровнем экспрессии проапоптотических генов. **Цель** – сравнить уровни экспрессии генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным ХЛЛ до и после проведения курса химиотерапии комбинацией флударабина, циклофосфамида и ритуксимаба (FCR) с учетом исходных клинических данных и ответа на лечение. **Материал и методы.** В проспективное одноцентровое когортное исследование включены 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ, проходивших клинико-диагностическое обследование и лечение в период с ноября 2014 по декабрь 2017 г. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови для диагностики ХЛЛ проводили методом 4-цветной проточной цитометрии. Для исследования экспрессии генов внешнего пути апоптоза выполняли полимеразную цепную реакцию в реальном времени с обратной транскрипцией. Всем больным применяли стандартную программу лечения FCR с последующим проведением поддерживающего лечения ритуксимабом. **Результаты.** Среди 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ преобладали мужчины (n=16). Медиана возраста составила 64 года (от 47 до 77 лет). У 16 пациентов диагностированы I и II стадии ХЛЛ по Rai, у 7 – III и IV стадии. Для удобства анализа пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от уровня данного показателя. Перед началом терапии в группе больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* по сравнению с пациентами с низким уровнем данного показателя наблюдался более высокий уровень экспрессии генов *TNFR2* (p < 0,0015) и *TRAIL* (p < 0,0053). До проведения FCR-терапии в группе с низким уровнем

экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов было увеличено (p=0,0016), а эритроцитов снижено (p=0,0159). Исходно в группе с высоким уровнем экспрессии *FAS* было больше больных с I и II стадией ХЛЛ (p=0,0205). Через 3 дня после проведения 4-дневного курса FCR-терапии повышение уровня экспрессии отмечено только для генов *FAS* (p=0,0025) и *TRAIL* (p=0,0045). По завершении 1-го цикла FCR-терапии у больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов снижалось быстрее, чем в группе больных с высоким уровнем экспрессии этого гена (p=0,0019). После 6 циклов FCR-терапии полной или частичной ремиссии достигли 82% (19 из 23 пациентов), при этом у больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* было большее количество полных ремиссий (p=0,026). Нежелательных явлений, связанных с проведением FCR-терапии, не зарегистрировано. **Заключение.** Гены внешнего пути апоптоза – один из ключевых факторов опухолевого роста при ХЛЛ. Полученные нами данные о влиянии FCR-терапии на уровень экспрессии генов *FAS* и *TRAIL* дают возможность рассматривать их как мишень для данной комбинации препаратов, а также могут лечь в основу разработки новых молекулярных препаратов.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, гены апоптоза, FCR-терапия

Для цитирования: Захаров СГ, Голенков АК, Мисюрин ВА, Катаева ЕВ, Барышникова МА, Чуксина ЮЮ, Митина ТА, Трифонова ЕВ, Высоцкая ЛЛ, Черных ЮБ, Клинушкина ЕФ, Белоусов КА, Финашутина ЮП, Мисюрин АВ. Уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до и после проведения терапии флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR). Альманах клинической медицины. 2018;46(8):734–41. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-734-741.

Поступила 25.10.2018;
принята к публикации 13.12.2018



Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) представляет собой лимфопролиферативный процесс, в основе которого лежит накопление опухолевых клеток, приводящее к угнетению функций костного мозга [1]. Клиническими проявлениями болезни считаются лимфоцитоз периферической крови, лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия. Данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при хроническом лимфолейкозе свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов [2–4]. Основное внимание исследователей было сконцентрировано на изучении внутреннего сигнального пути [5–7], поскольку используемые сегодня при лечении ХЛЛ таргетные препараты направлены на блокирование путей передачи сигнала в В-клетке.

В ряде работ выявлена важная роль внешнего пути апоптоза при онкогематологических заболеваниях, в том числе наличие связи между большой опухолевой массой и снижением уровня экспрессии FAS/APO-1 на поверхности лимфоцитов [8]. Нами показано значение четырех внешних сигнальных путей для процессов апоптоза при ХЛЛ [9]. Основным механизмом является FAS-опосредованный сигнальный путь, при котором осуществляется взаимодействие FAS-лиганда и FAS-рецептора, завершающееся активацией каспаз, инициирующих процессы апоптоза [10]. Второй путь активации апоптоза – взаимодействие TNF и TNF-рецептора (TNFR1–2) [11–13]. Третий – взаимодействие TRAIL [14, 15] с его рецепторами семейства DR (DR4/5), которое может наряду с активацией апоптоза вызывать и его торможение через NF-κB. [16]. Инициация четвертого сигнального пути осуществляется за счет взаимодействия рецептора DR3 с лигандом TL1A [17–19], которое характеризуется двойным механизмом действия, то есть может активировать как апоптотический, так и антиапоптотический сигнальные пути [20, 21].

В своей предыдущей работе [9] мы также показали, что экспрессия генов *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным ХЛЛ коррелирует с клиническими проявлениями болезни: они были минимальными у пациентов с высокой активностью проапоптотических генов и низкой активностью генов, блокирующих

апоптоз, и более выраженными у пациентов с высоким уровнем экспрессии антиапоптотических и низким уровнем экспрессии проапоптотических генов.

На втором этапе нашей работы мы решили выяснить, как влияет терапия флударабином, циклофосфамидом и ритуксимабом (FCR) на уровень экспрессии генов апоптоза *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* у больных с впервые выявленным ХЛЛ в зависимости от клинических данных и ответа на лечение.

Материал и методы

В проспективное когортное исследование вошли 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ, прошедших обследование и лечение в отделении клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с ноября 2014 по декабрь 2017 г. В исследование включали пациентов с установленным диагнозом впервые выявленного ХЛЛ в возрасте от 18 до 80 лет, со стадиями заболевания от I до IV по Rai [22] с показаниями для FCR-терапии. Установление диагноза, показаний к терапии и оценку ответа на лечение осуществляли в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по ХЛЛ (IWCLL, 2008) [22]. Критериями невключения были хроническая почечная недостаточность с клиренсом креатинина меньше 30 мл/мин, гемолитическая анемия, возраст более 80 лет, полистемная коморбидность, тяжелые аллергические состояния в анамнезе. Критерием исключения служила непереносимость ритуксимаба.

Все больные проходили клинико-диагностическое обследование, включавшее общий и биохимический анализ крови, исследование аспиратов костного мозга до и после завершения индукционного периода противоопухолевой химиотерапии, ультразвуковое исследование лимфоузлов брюшной полости и забрюшинного пространства, а также компьютерную томографию органов грудной клетки.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови для диагностики ХЛЛ проводили в клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского методом 4-цветной проточной цитометрии (“Becton Dickinson”, США) с использованием

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского»; 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24, Российская Федерация

моноклональных антител к антигенам CD3, CD19, CD20, CD22, CD5, CD23, CD38 (“Becton Dickinson”, США). При установлении иммунофенотипического профиля, характерного для ХЛЛ, у пациентов в дебюте заболевания до начала противоопухолевой терапии дополнительно определялась экспрессия CD38. Критерием позитивности CD38 считали наличие экспрессии антигена на поверхности более чем 20% опухолевых клеток. Экспрессия CD38-антигена на В-лимфоцитах более 20% позитивных клеток свидетельствует об отсутствии соматических гипермутаций вариабельных участков генов иммуноглобулинов и коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов с ХЛЛ [23].

Для исследования экспрессии генов внешнего пути апоптоза (*FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5*) проводили полимеразную цепную реакцию в реальном времени с обратной транскрипцией в лаборатории рекомбинантных опухолевых антигенов Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, как описано в работе [9].

Всем 23 пациентам применяли стандартную программу лечения FCR: ритуксимаб 1 цикл – 375 мг/м² внутривенно капельно в 1-й день, последующие циклы – 500 мг/м² внутривенно капельно в 1-й день; флударабин 25 мг/м² внутривенно капельно во 2–4-й дни; циклофосфамид 250 мг/м² внутривенно капельно во 2–4-й дни. Цикл составлял 32 дня. Индукционный период состоял из 6 циклов.

После завершения индукционной противоопухолевой FCR-терапии выполнен анализ

клинических результатов, где была зафиксирована категория ответа (ремиссия полная, частичная или стабилизация болезни). Далее последовало наблюдение за больными с проведением поддерживающего лечения ритуксимабом. Медиана наблюдения составила 33 месяца. Выбывших из исследования не было.

Этическая экспертиза. В соответствии со ст. 32 «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (утверждены ВС РФ от 22.07.1993 № 5487-1 в редакции от 30.12.2008) исследование проводили с письменного согласия обследуемых. Проведение исследования одобрено комитетом по этике при ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол заседания от 15 декабря 2016 г.).

Статистический анализ. Размер выборки предварительно не рассчитывался. Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладных пакетов программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США) и Microsoft Office Excel 2016. Количественные данные представлены в виде медианы (Me), минимальных и максимальных значений (min-max). Для исследования связи уровня экспрессии гена *FAS* с количественными параметрами (возраст больных, поражение лимфатических узлов, количество лимфоцитов, уровень гемоглобина, количество эритроцитов и тромбоцитов, экспрессия CD38, количество клеток с иммунофенотипом CD19⁺/CD5⁺ и уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL*) использовали U-критерий Манна – Уитни. Для исследования связи уровня экспрессии гена *FAS* с качественными параметрами (пол, стадия заболевания

Таблица 1. Экспрессия генов внешнего пути апоптоза у 23 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* до проведения FCR-терапии

Параметр	Высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n=8)	Низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n=15)	Значение p
Возраст, Me (min–max), годы	63 (59–78)	65 (47–78)	0,8557*
Мужчины, %	75	73	0,9309**
<i>DR3</i> , Me (min–max), %	145 (5–1925)	169 (0–1074)	0,9645*
<i>DR4/5</i> , Me (min–max), %	599 (333–6932)	766 (416–1350)	0,3282*
<i>FAS</i> , Me (min–max), %	7717 (4617–12980)	373 (113–2550)	<0,0001*
<i>TNFR2</i> , Me (min–max), %	6868 (1587–32842)	1811 (559–2939)	0,0015*
<i>TRAIL</i> , Me (min–max), %	11775 (2111–19670)	2401 (436–14600)	0,0053*

* U-критерий Манна – Уитни

** Критерий χ^2



Таблица 2. Клинические показатели 23 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* до проведения FCR-терапии

Параметр	Высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n = 8)	Низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (n = 15)	Значение <i>p</i>
Степень увеличения лимфатических узлов, Me (min–max), баллы	6 (0–10)	7 (2–12)	0,4411*
Степень увеличения печени, Me (min–max), баллы	0 (0–1)	1 (0–6)	0,1453*
Степень увеличения селезенки, Me (min–max), баллы	1 (0–2)	1 (0–2)	0,1876*
Количество лимфоцитов, Me (min–max), 10 ⁹ /л	5,9 (2,2–135)	92 (10,3–216)	0,0016*
Концентрация гемоглобина, Me (min–max), г/л	140 (124–149)	127 (101–135)	0,0817*
Количество эритроцитов, Me (min–max), 10 ¹² /л	4,59 (4,2–5,42)	3,85 (1,35–5)	0,0159*
Содержание клеток с иммунофенотипом CD19 ⁺ /CD5 ⁺ /CD23 ⁺ , Me (min–max), % от всех лимфоцитов периферической крови	48,2 (0,7–82,2)	68 (6,5–94,5)	0,1673*
Содержание CD38-позитивных клеток ХЛЛ, Me (min–max), %	3,2 (0,5–7,2)	19,5 (0,7–89)	0,1246*
I–II стадия ХЛЛ по Rai, %	100	53	0,0205**

ХЛЛ – хронический лимфолейкоз

* U-критерий Манна – Уитни

** Критерий χ^2

I и II против стадий III и IV, клинический исход) применяли критерий χ^2 . Для анализа величины изменения таких признаков, как количество лимфоцитов, размер лимфатических узлов, печени и селезенки, а также уровня экспрессии исследованных генов использовали критерий Уилкоксона [24]. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Характеристика пациентов

Из 23 больных с впервые выявленным ХЛЛ было 16 мужчин и 7 женщин, медиана возраста составила 64 года (от 47 до 77 лет). У 16 больных диагностирована I–II стадии ХЛЛ по Rai, у 7 – III–IV стадии.

У всех больных (n = 23) пальпировались увеличенные периферические лимфатические узлы, у 2 определялись конгломераты в аксиллярной и шейной областях. В 12 наблюдениях пальпировались печень и селезенка, у 6 отмечено значительное их увеличение (> 5 см из-под реберной дуги). Лимфоаденопатию средостения и брюшной полости регистрировали у 15 обследованных. В анализах периферической крови 7 пациентов отмечен уровень гемоглобина ниже 100 г/л. Гиперлейкоцитоз (уровень лейкоцитов периферической крови более 200×10^9 /л) зафиксирован у 4 человек. Признаки опухолевой интоксикации (выраженная потливость) наблюдались у 12.

Показаниями для химиотерапии у больных с I–II стадией ХЛЛ были укороченное время удвоения лимфоцитов периферической крови и признаки опухолевой интоксикации.

Оценка уровня экспрессии генов апоптоза и клинических данных в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*

В ходе исследования мы получили данные об уровнях экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* у 23 больных до и после проведения курса FCR-терапии, а также оценили клинические

Таблица 3. Динамика экспрессии генов внешнего пути апоптоза у 7 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом до лечения и после цикла FCR-терапии

Ген	Уровень экспрессии гена, Me (min–max), %		Значение <i>p</i> (U-критерий Манна – Уитни)
	до лечения	после курса FCR-терапии	
<i>DR3</i>	305,35 (136–1294)	1077,8 (31–7088)	0,3715
<i>DR4/5</i>	785,55 (429,6–1215)	1204 (348,9–2767)	0,2139
<i>FAS</i>	403,4 (216–857,5)	2027,1 (528–7200)	0,0025
<i>TNFR2</i>	2004,8 (559–33080)	2104,2 (559–16770)	0,9784
<i>TRAIL</i>	2803,4 (650–34250)	5851,4 (1869,1–51560)	0,0045

**Таблица 4.** Сравнение клинических показателей 23 больных с хроническим лимфолейкозом до лечения и после проведения 1-го цикла FCR-терапии

Параметр	Отношение показателя после лечения к исходному (доля)		Значение <i>p</i>
	высокий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (<i>n</i> = 8)	низкий уровень экспрессии гена <i>FAS</i> (<i>n</i> = 15)	
Степень увеличения лимфатических узлов, баллы	4/6 (0,7)	5,5/7 (0,8)	0,7093*
Степень увеличения печени, баллы	0/0	1/1	0,1657*
Степень увеличения селезенки, баллы	0/0	0/0	0,3839*
Количество лимфоцитов, 10 ⁹ /л	1,1/5,9 (0,2)	10,25/92 (0,1)	0,0019*
Концентрация гемоглобина, г/л	128/140 (0,9)	122,5/127 (1)	0,5815*
Количество эритроцитов, 10 ¹² /л	4,64/4,59 (1)	4,1/3,85 (1)	0,0577*
Полная ремиссия после 6 циклов индукции, %	75	27	0,0263**

*U-критерий Манна – Уитни

**Критерий χ^2

показатели после первого и шестого циклов FCR-терапии, характеризующие ее эффективность. Для удобства анализа пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*, как определено нами в работе [9].

Результаты до проведения FCR-терапии отображены в табл. 1. Из ее данных видно, что группа больных с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* отличалась от группы с низким уровнем этого показателя более высоким уровнем экспрессии не только гена *FAS* ($p < 0,0001$), но и генов *TNFR2* ($p < 0,0015$) и *TRAIL* ($p < 0,0053$), что может свидетельствовать о большей чувствительности опухолевых клеток к развитию апоптоза.

Анализ исходных клинических данных в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS* (табл. 2) показал, что в группе с низким уровнем экспрессии гена *FAS* количество лимфоцитов было увеличено ($p = 0,0016$), а эритроцитов снижено ($p = 0,0159$). В группе с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* было больше больных с I–II стадией ХЛЛ ($p = 0,0205$).

Через 3 дня после проведения 4-дневного курса FCR-терапии у 7 из 23 больных, отобранных случайно, без селекции по какому-либо признаку, было изучено изменение экспрессии генов внешнего пути апоптоза (табл. 3). Оказалось, что после завершения курса лечения повышение уровня экспрессии отмечено только для генов *FAS* ($p = 0,0025$) и *TRAIL* ($p = 0,0045$).

Клинические данные всех 23 больных ХЛЛ в зависимости от уровня экспрессии гена *FAS*

мы проанализировали по завершении 1-го цикла FCR-терапии (табл. 4). Наибольшие различия были установлены по динамике снижения количества лимфоцитов крови. У больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* по сравнению с высоким количество лимфоцитов снижалось быстрее ($p = 0,0019$).

После 6 циклов FCR-терапии полной или частичной ремиссии достигли 82% (19 из 23 пациентов), при этом большее количество полных ремиссий отмечено у пациентов с высоким уровнем экспрессии гена *FAS* ($p = 0,026$).

Нежелательных явлений, связанных с проведением FCR-терапии, не зарегистрировано.

Обсуждение

В настоящем исследовании мы получили данные, позволившие показать участие генов внешнего пути апоптоза *FAS*, *TRAIL* и *TNFR2* в достижении противоопухолевого ответа после проведения FCR-терапии у больных с впервые выявленным ХЛЛ, а также подтвердить их проапоптотическую роль [25, 26]. Важно отметить, что в группе пациентов с высокой активностью проапоптотических генов проявления болезни были менее выражены.

При анализе уровня экспрессии изучаемых генов после проведения 1-го курса FCR-терапии статистически значимое повышение показателей отмечено только для *FAS* и *TRAIL*, но не для *TNFR2*, что может быть обусловлено его способностью как активировать, так и блокировать апоптоз [10–13].



На основании вышесказанного можно предположить: комбинация препаратов флударабина, циклофосфида и ритуксимаба опосредует противоопухолевый ответ через активацию генов апоптоза *FAS* и *TRAIL*. Интересно отметить, что ритуксимаб комплементарно связывается с CD20 на мембране опухолевого В-лимфоцита при ХЛЛ, вызывая апоптоз, а также клеточную цитотоксичность [27]. Следовательно, FCR-программа имеет двойной механизм противоопухолевого действия: генопосредованный и мембранный. Активация двух ключевых генов апоптоза *FAS* и *TRAIL* под влиянием FCR-терапии

сопровождалась уменьшением клинических проявлений ХЛЛ в большей степени у больных с низким уровнем экспрессии *FAS*.

Заключение

Гены внешнего пути апоптоза – один из ключевых факторов опухолевого роста при ХЛЛ. Полученные нами данные о влиянии FCR-терапии на уровень экспрессии генов *FAS* и *TRAIL* дают возможность рассматривать их как мишень для данной комбинации препаратов, а также могут лечь в основу разработки новых молекулярных препаратов. ©

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Финансирование

Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Литература

1. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017;92(9):946–65. doi: 10.1002/ajh.24826.
2. Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:151–71. doi: 10.1007/978-1-4614-8051-8_7.
3. Podhorecka M, Macheta A, Bozko M, Bozko A, Malek NP, Bozko P. Deregulation of apoptosis – is it still an important issue in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia? *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):652–8. doi: 10.2174/1568009616666160427103930.
4. Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2014;5(2):309–25. doi: 10.18632/oncotarget.1480.
5. Huang X, Shen Q, Chen S, Chen S, Yang L, Weng J, Du X, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. *J Hematol Oncol*. 2011;4:23. doi: 10.1186/1756-8722-4-23.
6. Baptista MJ, Muntañola A, Calpe E, Abrisqueta P, Salamero O, Fernández E, Codony C, Giné E, Kalko SG, Crespo M, Bosch F. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5924–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771.
7. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362–74. doi: 10.1038/nri3834.
8. Барышников АЮ. Принципы и практика вакцинотерапии рака. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2004;24(2):59–63.
9. Захаров СГ, Голенков АК, Мисюрин АВ, Катаева ЕВ, Рудакова АА, Барышникова МА, Митина ТА, Трифонова ЕВ, Высоцкая ЛЛ, Черных ЮБ, Клинушкина ЕФ, Белоусов КА, Финашутина ЮП, Мисюрин ВА. Экспрессия основных генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом в сравнении с клиническими данными. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):41–6. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46.
10. Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G. Mutation analysis of the *FAS* and *TNFR* apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol*. 2001;29(2):228–33. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00623-8.
11. Srivastava S, Tsongalis GJ, Kaur P. Role of microRNAs in regulation of the *TNF/TNFR* gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem*. 2016;49(16–17):1307–10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.010.
12. Aggarwal BB. Signalling pathways of the *TNF* superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56. doi: 10.1038/nri1184.
13. Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in *TNF* receptor-induced signaling to *NF-κB*, *MAP* kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. 2016;116:1–10. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.009.
14. Secchiero P, di lasio MG, Gonelli A, Barbarotto E, Melloni E, Tiribelli M, Chiaruttini C, Zauli G. Differential gene expression induction by *TRAIL* in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells showing high versus low levels of *Zap-70*. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):229–36. doi: 10.1002/jcp.21116.
15. Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human *TRAIL* gene. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(12):1143–51. doi: 10.4161/cbt.21354.
16. Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, Zauli G. *NF-κB* pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(11):2083–102. doi: 10.1007/s00018-013-1545-4.
17. Meylan F, Richard AC, Siegel RM. *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.
18. Cavallini C, Lovato O, Bertolaso A, Zoratti E, Malpeli G, Mimiola E, Tinelli M, Aprili F, Tecchio C, Perbellini O, Scarpa A, Zamò A, Cassatella MA, Pizzolo G, Scupoli MT. Expression and function of the *TL1A/DR3* axis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(31):32061–74. doi: 10.18632/oncotarget.5201.
19. Jablonska E, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F, Parfienczyk A, Puzewska W, Bukin M. *TNF* family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma*. 2005;46(9):1307–12. doi: 10.1080/10428190500158789.
20. Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschwender M. Soluble *TL1A* is sufficient for activation of death receptor 3. *FEBS J*. 2016;283(2):323–36. doi: 10.1111/febs.13576.
21. McCarthy BA, Yancopoulos S, Tipping M, Yan XJ, Wang XP, Bennett F, Li W, Lesser M, Paul S, Boyle E, Moreno C, Catera R, Messmer BT, Cutrona G, Ferrarini M, Koltz JE, Allen SL, Rai KR, Rawstron AC, Chiorazzi N. A seven-gene expression panel distinguishing clonal expansions of pre-leukemic and chronic lymphocytic leukemia B cells from normal B lymphocytes. *Immunol Res*. 2015;63(1–3):90–100. doi: 10.1007/s12026-015-8688-3.
22. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; 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.
23. Зуева ЕЕ, Куртова АВ, Русанова ЕБ, Слободнюк КЮ, Горчакова МВ, Голубева ВИ, Салогуб ГН. Диагностика онкогематологических



заболеваний с помощью проточной цитометрии. СПб.: СпецЛит; 2017. 327 с.

24. Орлов АИ. Непараметрические критерии согласия Колмогорова, Смирнова, омега-квадрат и ошибки при их применении [Интернет]. Научный журнал КубГАУ. 2014;97(03):31–45. Доступно на: <http://ej.kubagro.ru/2014/03/pdf/47.pdf>.

References

- Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. 2017;92(9):946–65. doi: 10.1002/ajh.24826.
- Fegan C, Pepper C. Apoptosis deregulation in CLL. *Adv Exp Med Biol*. 2013;792:151–71. doi: 10.1007/978-1-4614-8051-8_7.
- Podhorecka M, Macheta A, Bozko M, Bozko A, Malek NP, Bozko P. Deregulation of apoptosis – is it still an important issue in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia? *Curr Cancer Drug Targets*. 2016;16(8):652–8. doi: 10.2174/1568009616666160427103930.
- Billard C. Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2014;5(2): 309–25. doi: 10.18632/oncotarget.1480.
- Huang X, Shen Q, Chen S, Chen S, Yang L, Weng J, Du X, Grabarczyk P, Przybylski GK, Schmidt CA, Li Y. Gene expression profiles in BCL11B-siRNA treated malignant T cells. *J Hematol Oncol*. 2011;4:23. doi: 10.1186/1756-8722-4-23.
- Baptista MJ, Muntañola A, Calpe E, Abrisqueta P, Salamero O, Fernández E, Codony C, Giné E, Kalko SG, Crespo M, Bosch F. Differential gene expression profile associated to apoptosis induced by dexamethasone in CLL cells according to IGHV/ZAP-70 status. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5924–33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2771.
- Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(6):362–74. doi: 10.1038/nri3834.
- Baryshnikov AY. Tumor vaccination principles and practice. *The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*. 2004;24(2):59–63. Russian.
- Zakharov SG, Golenkov AK, Misyurin AV, Kartaeva EV, Rudakova AA, Baryshnikova MA, Mitina TA, Trifonova EV, Vysotskaya LL, Chernykh YB, Klinushkina EF, Belousov KA, Finashutina YP, Misyurin VA. Expression of the apoptosis-related genes in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia in clinical data context. *Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):41–6. Russian. doi: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46.
- Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amarglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G. Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol*. 2001;29(2):228–33. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00623-8.
- Srivastava S, Tsonalis GJ, Kaur P. Role of microRNAs in regulation of the TNF/TNFR gene superfamily in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Biochem*. 2016;49(16-17):1307–10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.08.010.
- Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745–56. doi: 10.1038/nri1184.
- Borghi A, Verstrepen L, Beyaert R. TRAF2 multitasking in TNF receptor-induced signaling to NF- κ B, MAP kinases and cell death. *Biochem Pharmacol*. 2016;116:1–10. doi: 10.1016/j.bcp.2016.03.009.
- Secchiero P, di Iasio MG, Gonelli A, Barbarotto E, Melloni E, Tiribelli M, Chiaruttini C, Zauli G. Differential gene expression induction by TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells showing high versus low levels of Zap-70. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):229–36. doi: 10.1002/jcp.21116.
- Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene. *Cancer Biol Ther*. 2012;13(12): 1143–51. doi: 10.4161/cbt.21354.
- Gasparini C, Celeghini C, Monasta L, Zauli G. NF- κ B pathways in hematological malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(11):2083–102. doi: 10.1007/s00018-013-1545-4.
- Meylan F, Richard AC, Siegel RM. 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.
- Cavallini C, Lovato O, Bertolaso A, Zoratti E, Malpeli G, Mimmiola E, Tinelli M, Aprilì F, Tocchio C, Perbellini O, Scarpa A, Zamò A, Cassatella MA, Pizzolo G, Scupoli MT. Expression and function of the TL1A/DR3 axis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(31): 32061–74. doi: 10.18632/oncotarget.5201.
- Jablonska E, Kiersnowska-Rogowska B, Rogowski F, Parfienczyk A, Puzewska W, Bukin M. TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk Lymphoma*. 2005;46(9):1307–12. doi: 10.1080/10428190500158789.
- Wan Z, Pan H, Liu S, Zhu J, Qi W, Fu K, Zhao T, Liang J. Downregulation of SNAIL sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF- κ B pathway. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1560–6. doi: 10.3892/or.2015.3743.
- ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia – focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):548–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0226.
- Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, Billard C. Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015;29(5):345–50. doi: 10.1016/j.blre.2015.03.005.
- Bittner S, Knoll G, Füllsack S, Kurz M, Wajant H, Ehrenschwender M. Soluble TL1A is sufficient for activation of death receptor 3. *FEBS J*. 2016;283(2):323–36. doi: 10.1111/febs.13576.
- McCarthy BA, Yancopoulos S, Tipping M, Yan XJ, Wang XP, Bennett F, Li W, Lesser M, Paul S, Boyle E, Moreno C, Catera R, Messmer BT, Cutrona G, Ferrarini M, Koltz JE, Allen SL, Rai KR, Rawstron AC, Chiorazzi N. A seven-gene expression panel distinguishing clonal expansions of pre-leukemic and chronic lymphocytic leukemia B cells from normal B lymphocytes. *Immunol Res*. 2015;63(1–3): 90–100. doi: 10.1007/s12026-015-8688-3.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, Hillmen P, Keating MJ, Montserrat E, Rai KR, Kipps TJ; 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.
- Zueva EE, Kurtova AV, Rusanova EB, Slobodnyuk KYu, Gorchakova MV, Golubeva VI, Salogub GN. Flow cytometry in the diagnosis of oncohematological diseases. *Saint Petersburg: SpetsLit*; 2017. 327 p. Russian.
- Orlov AI. Nonparametric goodness-of-fit Kolmogorov, Smirnov, omegasquare tests and the errors in their application [Internet]. *Scientific Journal of KubSAU*. 2014;97(03):644–72. Russian. Available from: <http://ej.kubagro.ru/2014/03/pdf/47.pdf>.
- Wan Z, Pan H, Liu S, Zhu J, Qi W, Fu K, Zhao T, Liang J. Downregulation of SNAIL sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF- κ B pathway. *Oncol Rep*. 2015;33(3):1560–6. doi: 10.3892/or.2015.3743.
- ten Hacken E, Burger JA. Molecular pathways: targeting the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia – focus on the B-cell receptor. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):548–56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0226.
- Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, Billard C. Strategies targeting apoptosis proteins to improve therapy of chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2015;29(5):345–50. doi: 10.1016/j.blre.2015.03.005.



Expression levels of the apoptosis genes *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* and *DR4/5* in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukemia before and after treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR)

S.G. Zakharov¹ • A.K. Golenkov¹ • V.A. Misyurin² • E.V. Kataeva¹ • M.A. Baryshnikova² • Yu.Yu. Chuksina¹ • T.A. Mitina¹ • E.V. Trifonova¹ • L.L. Vysotskaya¹ • Yu.B. Chernykh¹ • E.F. Klinushkina¹ • K.A. Belousov¹ • Yu.P. Finashutina² • A.V. Misyurin²

Background: We have previously shown that the *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* gene expression in patients with newly diagnosed chronic lymphoblastic leukemia (CLL) correlates with clinical manifestations of the disease: they are minimal in patients with high activity of the pro-apoptotic genes and low activity of the apoptosis-inhibiting genes, and advanced in patients with high expression of the anti-apoptotic and low expression of the pro-apoptotic genes. **Aim:** To compare the levels of expression of the external apoptosis pathway genes in patients with newly diagnosed CLL before and after chemotherapy with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR), taking into account baseline clinical data and the response to treatment. **Materials and methods:** This prospective one-center cohort study included 23 patients with newly diagnosed CLL, who underwent clinical and diagnostic assessments and treatment from November 2014 to December 2017. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes for CLL diagnosis was done by four-color flow cytometry. Expression of the external apoptosis pathway genes was assessed by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. All patients were treated with a standard FCR regimen with subsequent maintenance treatment with rituximab. **Results:** There were more men ($n=16$) than women among our 23 CLL patients. Median age was 64 years (range, from 47 to 77 years). Sixteen (16) patients had CLL Rai Grade I and II, and 7 patients had CLL Grades III and IV. For convenience of analysis, all patients were divided into two groups depending on the *FAS* gene expression. At baseline, the patients with high *FAS* expression had higher *TNFR2* ($p < 0.0015$) and *TRAIL* ($p < 0.0053$) expression levels. Before FCR therapy, the patients with low *FAS* expression had

higher lymphocyte counts ($p=0.0016$) and lower erythrocyte counts ($p=0.0159$). At baseline, there were more Grade I and II patients in the group with higher *FAS* expression ($p=0.0205$). At day 3 after the end of a four day FCR cycle, there was an increase only of the *FAS* ($p=0.0025$) and *TRAIL* ($p=0.0045$) expression. After the completion of the first FCR cycle, lymphocyte counts in the patients with low *FAS* expression decreased earlier than those in the patients with high *FAS* expression ($p=0.0019$). After six FCR cycles, complete or partial remission was obtained in 82% (19/23) of the patients. The patients with high *FAS* expression had higher complete remission rate ($p=0.026$). No adverse events related to FCR were registered. **Conclusion:** The external apoptosis pathway genes are one of the key factors of the tumor progression in CLL. Our data on the effect of FCR therapy on the *FAS* and *TRAIL* gene expression make it possible to consider them as a target for this combination regimen and may become the rationale to develop new pharmaceutical molecules.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, apoptosis genes, FCR regimen

For citation: Zakharov SG, Golenkov AK, Misyurin VA, Kataeva EV, Baryshnikova MA, Chuksina YuYu, Mitina TA, Trifonova EV, Vysotskaya LL, Chernykh YuB, Klinushkina EF, Belousov KA, Finashutina YuP, Misyurin AV. Expression levels of the apoptosis genes *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3*, *DR4/5* in patients with newly diagnosed chronic lymphatic leukemia before and after treatment with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab (FCR). Almanac of Clinical Medicine. 2018;46(8):734–41. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-734-741.

Received 25 October 2018;
accepted 13 December 2018

Sergey G. Zakharov – MD, Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

✉ 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel.: +7 (916) 076 66 99.
E-mail: hematologymoniki@mail.ru

Anatoliy K. Golenkov – MD, PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Vsevolod A. Misyurin – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors²

Elena V. Kataeva – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Mariya A. Baryshnikova – PhD in Pharmacology, Head of the Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors²

Yuliya Yu. Chuksina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Tat'yana A. Mitina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Elena V. Trifonova – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Lyudmila L. Vysotskaya – MD, PhD, Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Yuliya B. Chernykh – MD, PhD, Senior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Elena F. Klinushkina – Junior Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Kirill A. Belousov – Research Fellow, Department of Clinical Hematology and Immunotherapy¹

Yuliya P. Finashutina – Research Fellow, Laboratory of Recombinant Tumor Antigens²

Andrey V. Misyurin – PhD, ScD in Biology, Head of the Laboratory of Recombinant Tumor Antigens²

¹ Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., Moscow, 129110, Russian Federation

² N.N. Blokhin National Medical Research Centre of Oncology; 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russian Federation

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.