

ЗАРУБИНА КСЕНИЯ ИГОРЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ У БОЛЬНЫХ
ОСТРЫМИ ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Паровичникова Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Тумян Гаяне Сепуговна – доктор медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гемобластозов отдела гематологии и трансплантации костного мозга Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мартынкевич Ирина Степановна – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2021 года в ____ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Генетические нарушения, детектируемые методами кариотипирования, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), а также различными вариантами ПЦР и секвенирования нуклеиновых кислот позволяют разделить острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) на четко установленные, прогностически значимые генетические подтипы, которые используются для стратификации риска и классификации.

Внедрение методов массивного параллельного секвенирования (полногеномное, экзомное и транскриптомное секвенирование) дало возможность проводить детальные исследования генома, которые вместе с определением профиля экспрессии генов в значительной степени расширяют понимание патогенеза ОЛЛ и его гетерогенности. Опираясь на полученные в ходе этих исследований данные, удается не только определять молекулярно-генетические маркеры заболевания, но и выделять новые подтипы ОЛЛ, которые впоследствии входят в современные классификации опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей.

Так, в 2003 году была впервые идентифицирована интрахромосомная амплификация хромосомы 21 (iAMP21) во время рутинного скрининга t(12;21)/*ETV6-RUNX* у детей, больных В-клеточным ОЛЛ (Harewood L., et al., 2003). В 2009 году с использованием экспрессионных чипов высокой плотности был открыт новый молекулярно-генетический подтип В-клеточного ОЛЛ – *BCR-ABL1*-подобный острый лимфобластный лейкоз (Boer M.L., et al., 2009; Mullighan C., et al., 2009), а в 2016 году две вышеописанные нозологические формы были включены экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в качестве предварительных классификационных единиц в раздел В-лимфобластных лейкозов/лимфом современной классификации опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей (Arber D.A., et al., 2016). Среди Т-клеточных ОЛЛ новым подтипом, включенным в классификацию ВОЗ 2016 года, был ОЛЛ из ранних Т-клеточных предшественников (ETP-ОЛЛ), описанный в 2009 году E. Coustan-Smith и соавторами (Coustan-Smith E., et al., 2009).

Наряду с открытием новых подтипов ОЛЛ продолжает активно изучаться патогенез заболевания. Исследования последних лет с применением массивного параллельного секвенирования выявили у больных ОЛЛ спектр соматических мутаций в генах, вовлеченных в многочисленные сигнальные пути, которые регулируют транскрипцию,

лимфоидную дифференцировку, клеточный цикл, модификацию структуры хроматина, эпигенетическую регуляцию, а также TP53-, RAS/RAF/MEK/ERK -, JAK/STAT-, NOTCH-, PI3K/AKT/mTOR-, Wnt/ β -катенин-зависимые передачи сигнала (Harrison C.J., 2011; Harrison C.J., 2013; Inaba H., Greaves M., et al., 2013).

Большой интерес представляет исследование сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (включает гены *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *PTPN11*) и JAK/STAT (гены *JAK1*, *JAK2*, *IL7R*, *CRLF2*), активацию которых часто регистрируют у больных ОЛЛ. К наиболее распространенным механизмам активации этих каскадов в ходе лейкогенеза относят возникновение мутаций в генах киназ и рецепторов цитокинов, формирующих эти каскады. Интерес к изучению активирующих мутаций в генах, формирующих вышеописанные сигнальные пути, обусловлен двумя клиническими аспектами. Во-первых, точная идентификация генетических изменений и их комбинаций способствует более строгой стратификации пациентов на группы риска, а во-вторых, обнаружение аномалий, на которые возможно осуществлять таргетное воздействие, позволяет внедрять новые методы лечения в клиническую практику. Значение активирующих мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *CRLF2* у больных, которым проводили терапию по протоколам российских многоцентровых исследований, неизвестно.

С учетом всего вышеописанного изучение биологической и клинической роли мутаций *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *CRLF2* у взрослых больных В-клеточным ОЛЛ при проведении химиотерапии по протоколам российских многоцентровых исследований является актуальной задачей.

Другим важным предметом исследования является мутационный статус гена *TP53*. Хотя нарушения гена *TP53* описаны при множестве опухолей, при ОЛЛ они встречаются достаточно редко, за исключением рецидивов ОЛЛ и ОЛЛ с гипоплоидным кариотипом (Holmfeldt L., et al., 2013; Hsiao M.H., et al., 1994). Примечательно, что более половины мутаций гена *TP53* у больных ОЛЛ с гипоплоидным кариотипом детектируют в неопухолевых клетках, что позволяет предположить наследственный характер этих мутаций, и в этом случае лейкоз может считаться проявлением синдрома Ли-Фраумени (СЛФ) (Comeaux E.Q., et al., 2017). Эти данные имеют важное значение для понимания генетического патогенеза ОЛЛ.

Таким образом, выявление молекулярно-генетических изменений опухолевого клона, а также комплексная оценка ключевых сигнальных путей в опухолевых клетках не только дает представление о биологии опухоли, но и открывает новые возможности для таргетных терапевтических подходов.

Цель исследования

Оценить частоту, спектр и прогностическое значение мутаций в генах *NRAS*, *KRAS* сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK, *JAK2*, *CRLF2* сигнального каскада JAK/STAT и мутаций гена *TP53* у взрослых больных острыми лимфобластными лейкозами.

Задачи исследования

1. Провести исследование мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*KRAS*, *NRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*, *CRLF2*) у больных *de novo* Ph-позитивными и Ph-негативными В-клеточными острыми лимфобластными лейкозами.
2. Оценить мутационный статус гена *TP53* у больных *de novo* Ph-позитивными и Ph-негативными Т- и В-клеточными острыми лимфобластными лейкозами.
3. Охарактеризовать Ph-негативный В-клеточный острый лимфобластный лейкоз в зависимости от наличия мутаций в генах сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*KRAS*, *NRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*, *CRLF2*), а также Ph-позитивные и Ph-негативные Т- и В-клеточные острые лимфобластные лейкозы в зависимости от наличия мутаций гена *TP53*.
4. Определить мутационный статус генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*KRAS*, *NRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*) у больных с рецидивом Ph-негативного В-клеточного ОЛЛ и гена *TP53* у больных с рецидивами Ph-позитивного и Ph-негативного Т- и В-клеточных острых лимфобластных лейкозов.
5. Оценить эффективность химиотерапии по протоколам ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2012 и ОЛЛ-2016 у больных острыми лимфобластными лейкозами с мутациями в исследуемых генах и без них.

Научная новизна

Определено прогностическое значение активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) у взрослых больных *de novo* Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ и показано, что наряду с более быстрым клиренсом опухолевых клеток

обнаружение мутаций в генах *NRAS*, *KRAS* ассоциировано и с более высокой летальностью, связанной с терапией.

Показано, что основная часть мутаций гена *TP53* у взрослых больных В-клеточным ОЛЛ носит герминальный характер и ассоциирована с синдромом Ли-Фраумени.

Выявлены две новые мутации гена *TP53*: инсерция (с.847insCCC) и делеция (с.397_412del16).

Практическая значимость работы

Результаты исследования учитывались в ходе разработки практических рекомендаций и протоколов химиотерапии ОЛЛ в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Было установлено, что детекция мутаций генов *NRAS* и *KRAS* является дополнительным диагностическим критерием, который позволяет осуществлять выбор прецизионного противоопухолевого воздействия с включением таргетных препаратов (ингибиторов тирозинкиназ) у взрослых больных как с *de novo* Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ, так и с рефрактерными формами и рецидивами.

Обнаружение мутаций гена *TP53* у взрослых больных *de novo* ОЛЛ позволяет быстро и четко определять показания к выполнению алло-ТГСК, а также выделять носителей герминальных мутаций (врожденный синдром Ли-Фраумени).

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации в генах *NRAS*, *KRAS* у больных В-клеточным Ph-негативным ОЛЛ ассоциированы с более быстрым клиренсом опухолевых клеток и с летальностью, связанной с терапией, однако показатели пятилетней общей, безрецидивной выживаемости и вероятности развития рецидива у этих больных существенно не отличаются от показателей больных без данных мутаций.

2. У большинства больных *de novo* В-клеточным ОЛЛ мутации в гене *TP53* носят герминальный характер и ассоциированы с синдромом Ли-Фраумени. Выявлены две ранее не описанные мутации гена *TP53*: инсерция (с.847insCCC) и делеция (с.397_412del16).

Апробация работы

Основные положения диссертации представлены в виде устных и стендовых докладов, тезисов на конференциях, симпозиумах и конгрессах: EHA-SWG Scientific Meeting on New Molecular Insights and Innovative Management Approaches for Acute Lymphoblastic Leukemia (г. Барселона, 2018 г.), IV конгресс гематологов России (г. Москва, 2018 г.), EWALL Meeting (Париж, 2018 г.), SOHO Annual Meeting (all-virtual event, 2020 г.), 62nd ASH annual meeting and Exposition (all-virtual event, 2020 г.).

Апробация диссертации состоялась на заседании проблемной комиссии «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (Протокол № 8 от 13.07.2020 года).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 48 научных работ, из них 9 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Объем и структура работы

Диссертационная работа включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список сокращений», «Список литературы» и «Приложение». Текст диссертации изложен на 172 страницах, содержит 21 рисунок и 17 таблиц. Список литературы включает 349 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика больных

В исследование были включены 186 взрослых пациентов с впервые установленным ОЛЛ. Среди них группа с Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ составила 95 больных (46 мужчин и 49 женщин от 17 до 59 лет, медиана возраста – 31 год): 31 пациенту проводили терапию по протоколу ОЛЛ-2009 с августа 2009 г. по август 2016 г.; остальным 64

пациентам, включенным в исследование с ноября 2016 г. по январь 2020 г., лечение осуществляли согласно протоколу ОЛЛ-2016. Медиана наблюдения составила 18,77 мес. (0,57–122,27).

В группу с Т-клеточным ОЛЛ включено 64 пациента (44 мужчины и 20 женщин от 16 до 53 лет, медиана возраста – 27 лет), им проводили лечение по протоколам ОЛЛ-2009 (n=19) с марта 2009 г. по сентябрь 2016 г. и ОЛЛ-2016 (n=45) с мая 2017 г. по декабрь 2019 г. Медиана наблюдения составила 19,58 мес. (0,57–131,33).

В группу с Ph-позитивным В-клеточным ОЛЛ включено 27 пациентов (10 мужчин и 17 женщин от 23 до 72 лет, медиана возраста – 33 года), им проводили лечение по протоколам ОЛЛ-2009 (n=2) в сочетании с ИТК и ОЛЛ-2012 (n=23), двое больных получали терапию по другим протоколам. Медиана наблюдения составила 25,97 мес. (6,63–123,63). Клинико-лабораторная характеристика больных представлена в таблице 1.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика 186 пациентов, включенных в исследование

Показатель	В-ОЛЛ		Т-ОЛЛ,
	Ph «-» ОЛЛ,	Ph «+» ОЛЛ,	
Число пациентов	95	27	64
Возраст, медиана (диапазон), лет	31 (17–59)	33 (23–72)	27 (16–53)
Мужчины/женщины, n	46/49	10/17	44/20
Лейкоциты, медиана (диапазон), ×10 ⁹ /л	8,1 (0,4–812)	39 (2,8–412,8)	31,1 (0,5–833)
ЛДГ, медиана (диапазон), ед/л	839 (200–20062)	1318 (508–5451)	548,9 (120–20064)
Спленомегалия, %	74,4	76	81,7
Гепатомегалия, %	65,9	88	79,7
Нейролейкемия, %	11,2	15,4	19,6
Исходная группа риска по ОЛЛ-2009:			
• Стандартная, %	35,8	-	64
• Высокая, %	64,2	-	36

Имунофенотип бластных клеток был определен у всех 186 больных, включенных в исследование. У больных Rh-негативным и Rh-позитивным В-клеточными ОЛЛ наиболее часто определяли общий (ВП) иммунофенотип 64,2% и 89%, соответственно. Среди больных Т-клеточным ОЛЛ преобладал кортикальный-Т (ТШ) вариант (40,5%).

В исследование было включено 39 взрослых пациентов с рецидивами ОЛЛ. Среди них группа с Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ составила 22 пациента, Rh-позитивным - 7 больных, и в группу с Т-клеточным ОЛЛ было включено 10 пациентов. У большинства больных рецидивы были костномозговыми. У больных Rh-позитивным и Т-клеточным ОЛЛ рецидивы в основном были ранними, 85,7 % и 80 % соответственно. В случае В-клеточного ОЛЛ доли ранних и поздних рецидивов были равны.

Для больных, биологический материал которых был доступен для исследования, было выполнено сопоставление мутационных изменений в парах «*de novo*-рецидив». У больных с Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ был выполнен анализ 10 пар «*de novo*-рецидив», Rh-позитивным В-клеточным ОЛЛ – 2 пар и Т-клеточным ОЛЛ – 9 пар.

Экстракция нуклеиновых кислот

Образцы геномной ДНК больных для ретроспективного исследования брали из коллекции лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (руководитель лаборатории, д.б.н. Судариков А.Б.). ДНК из лейкемических клеток костного мозга больных ОЛЛ для проспективного исследования выделяли модифицированным солевым методом. ДНК из буккальных клеток выделяли согласно методике, описанной Liu и соавторами (Liu L., et al., 2015).

Постановка полимеразной цепной реакции

Олигонуклеотидные праймеры, которые использовали в работе для ПЦР-амплификации и секвенирования фрагментов генов, были разработаны специально для данного исследования в лаборатории генной инженерии ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (руководитель лаборатории Сурин В.Л.) и синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Амплификацию проводили в системе PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 0.01–0.02 мкг геномной ДНК и 10 пкмоль каждого из праймеров. Эффективность амплификации определяли с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

Очистку продуктов амплификации осуществляли посредством вырезания ПЦР-фрагмента из 1,5 % агарозного геля с последующим выделением ДНК из геля с использованием колонок Wizard SV® Gel and PCR Clean-up System (Promega) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование по Сэнгеру

Определение первичной нуклеотидной последовательности проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера с использованием набора ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (Thermo Fisher Scientific). Капиллярный электрофорез осуществлялся на автоматическом генетическом анализаторе ДНК ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific) в Центре коллективного пользования «Геном» в Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, РАН, Москва. Полученные последовательности генов больных сопоставляли с соответствующими референсными последовательностями из базы данных NCBI (*NRAS* – EU332857, *KRAS* – NG_007524, *JAK2* – NG_009904, *CRLF2* – NG_034237, *TP53* – NG_017013.2). При анализе последовательности использовали программный пакет BioEdit (Hall T.A., 1999). Молекулярные исследования проводились вслепую относительно клинических данных.

Анализ найденных мутаций гена *TP53* проводили с использованием пяти предсказательных баз данных для оценки патогенности несинонимичных замен: PolyPhen-2 (v2.2.2), PROVEAN (v.1.1.5), SIFT (v.6.2.1), MutationTaster и FATHMM (v2.3) (Adzhubei I.A., et al., 2010; Choi Y., et al., 2012; Schwarz J.M., et al., 2014; Shihab H.A., et al., 2013; Sim N.-L., et al., 2012) и базы данных ClinVar NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Секвенирование клинического экзема и биоинформатическая обработка

Секвенирование клинического экзема проводили для образцов ДНК одного пациента с диагнозом В-клеточный ОЛЛ на разных стадиях заболевания (дебют, ремиссия, рецидив). Библиотека была сконструирована с использованием панели секвенирования TruSight One (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США), которая обогащает экзоны 4813 генов, имеющих важное клиническое значение. Секвенирование выполняли на платформе Illumina MiSeq с набором TruSight™ One Sequencing Panel (Illumina) с длиной чтения 2x150 пн. Анализ данных проводился после окончания секвенирования автоматически с использованием встроенного программного обеспечения MiSeq Reporter software 2.6

(<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq/products-services/miseq-reporter.html>) в соответствии с рабочим процессом BWA Enrichment и GATK. В качестве референсного генома была использована версия генома человека hg19. В результате был получен 71 млн чтений отличного качества. Более 99 % прочтений прошли фильтрацию по качеству, длине и были использованы в работе (от 21 млн до 26 млн для каждого образца). Среднее покрытие целевых фрагментов составило $\times 100$. Чувствительность 0,996 для SNP и 0.757 для Indel (делеции и инсерции). Полученные данные аннотировали в программах Variant Studio (Illumina) и wANNOVAR (Yang H., et al., 2015).

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проведен в лаборатории биостатистики ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (руководитель, к.т.н. Куликов С.М.). Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение «SAS 9.4» (Sas institute inc., Cary, NC, USA).

Параметрические данные были представлены в виде средних значений и медианы с указанием минимального и максимального значений. Перед проверкой различий средних значений выборок проводили тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения (отличным от нормального считали распределение при уровне значимости $p < 0,05$). Проверку статистической значимости различий средних выборок с нормальным распределением осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента, для выборок с ненормальным распределением применяли критерий Манна-Уитни. χ^2 -критерий Пирсона или точный критерий Фишера (если в таблицах сопряженности ожидаемые значения были меньше 5) применяли для всех категориальных переменных, независимыми считали признаки при $p < 0,05$. При анализе клинично-лабораторных и цитогенетических данных осуществлялись множественные проверки гипотез. Для контроля FDR на уровне $\alpha = 0,05$ был применен метод Бенджамини – Хохберга.

Эффективность лечения оценивали по следующим критериям: вероятность достижения полных ремиссий, ранняя летальность (смерть в период индукционной терапии), рефрактерность к терапии (отсутствие клинично-гематологической ремиссии после двух фаз индукции). Смерть в период проведения второй фазы индукции у больных, достигших ПР заболевания после первой фазы индукционной терапии, считали смертью во время консолидации.

Анализ долгосрочных результатов терапии проводили по методу Каплана-Мейера. В анализ вошли такие параметры, как пятилетняя общая выживаемость, пятилетняя безрецидивная выживаемость и вероятность развития рецидива. Пятилетняя ОВ и пятилетняя БРВ пациентов с активирующими мутациями генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) была также оценена с помощью модели Mixture cure fraction model, которая учитывает долю «вылеченных» пациентов. Статистическую значимость различий между кривыми выживаемости в группах определяли с помощью теста log-rank. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Исследование активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*, *CRLF2*) у больных *de novo* В-клеточным ОЛЛ

1.1 Результаты секвенирования генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*, *CRLF2*) у больных *de novo* В-клеточными ОЛЛ

Мутации генов *NRAS*, *KRAS* и *JAK2* (кроме гена *CRLF2*, мутаций в котором выявлено не было) были обнаружены только у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ. Частоты обнаружения мутаций генов *NRAS* и *KRAS* сопоставимы и составляют 9,7 % и 12,9 % соответственно ($p = 0,488$). Наибольшее число мутаций (76,2 %) локализовано в кодонах 12 и 13 ГТФ-связывающего домена. Мутации гена *JAK2* – крайне редкое событие, частота обнаружения – 3, 16%. У больных Ph-позитивным ОЛЛ мутации в анализируемых генах обнаружены не были. Важным наблюдением является тот факт, что у трех пациентов Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ молекулярные нарушения были обнаружены одновременно в двух сигнальных каскадах RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT. Ассоциация мутаций различных генов нескольких сигнальных каскадов предполагает, что в процессе лейкогенеза участвуют генетические нарушения, затрагивающие множество внутриклеточных сигнальных путей.

С целью исключения герминального характера мутаций генов *NRAS* и *KRAS* их статус оценивали на образцах костного мозга 10 больных в ремиссии, среди которых у 4 ранее были найдены мутации в гене *NRAS*, а у 6 – в гене *KRAS*. Герминальный характер мутаций не был подтвержден ни в одном из случаев.

1.2 Влияние мутаций генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) на клинико-лабораторные параметры больных *de novo* Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ

Для анализа клинико-лабораторных параметров у больных *de novo* Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия активирующих мутаций генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) было выделено три подгруппы: 1) больные с мутацией в гене *NRAS* и без мутаций (подгруппа 1); 2) больные с мутацией в гене *KRAS* и без мутаций (подгруппа 2); 3) больные с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS* и без мутаций (подгруппа 3).

Никаких значимых корреляций найдено не было, за исключением того, что больные с мутациями гена *KRAS* (от 17 до 49 лет, медиана 27) были значимо моложе больных без мутаций (от 19 до 59 лет, медиана 33) ($p=0,046$). Аналогичные результаты были получены при сравнении группы больных с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS* (от 17 до 49, медиана 25) и больных без мутаций (от 19 до 59 лет, медиана 33) ($p=0,0097$).

Также были обнаружены достоверные различия по количеству бластных клеток в костном мозге: у больных с мутациями гена *KRAS* и у больных с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS* бластных клеток в костном мозге значимо больше, чем у больных без мутаций ($p=0,021$ и $p=0,0005$, соответственно). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Сравнение различных клинико-лабораторных параметров у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия активирующих мутаций в генах сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*)

Показатель	Подгруппа 2		<i>p</i>	Подгруппа 3		<i>p</i>
	Мутация гена <i>KRAS</i> , n (%)	Отсутствие мутации, n (%)		Мутация гена <i>NRAS</i> и <i>KRAS</i> , n (%)	Отсутствие мутаций, n (%)	
Число больных	11	73		20	73	
Возраст, медиана (диапазон), лет	27 (17–49)	33 (19–59)	0,046	25 (17–49)	33 (19–59)	0,0097
Исходная группа риска по ОЛЛ-2009:						
• Стандартная	7 (63,64)	24 (32,88)	0,863	9 (45)	24 (32,88)	0,975
• Высокая	4 (36,36)	49 (67,12)		11 (55)	49 (67,12)	

Лейкоциты, медиана (диапазон), ×10 ⁹ /л	3,2 (0,4–21,18)	8,1 (1–812)	0,412	8,01 (0,4–540)	8,1 (1–812)	0,742
Бластные клетки в костном мозге, медиана (диапазон), %	93 (78–96,8)	72,8 (6,8–99)	0,021	92,2 (50,2–100)	72,8 (6,8–99)	0,0005
ИФТ вариант острого лейкоза:						
• Ранний пре-B (BI)	1 (9,09)	18 (24,66)	0,958	1 (5)	18 (24,66)	0,768
• Общий B (BII)	8 (72,73)	44 (60,27)		16 (80)	44 (60,27)	
• Пре-B (BIII)	1 (9,09)	9 (12,33)		1 (5)	9 (12,33)	
• В/миелоидный	1 (9,09)	2 (2,74)		2 (10)	2 (2,74)	
Цитогенетическая группа риска:						
• Благоприятная	2 (18,18)	3 (4,11)	0,999	3 (15)	3 (4,11)	0,656
• Промежуточная	7 (63,64)	38 (52,05)		10 (50)	38 (52,05)	
• Неблагоприятная	1 (9,09)	20 (27,4)		6 (30)	20 (27,4)	
• Нет митозов	1 (9,09)	12 (16,44)		1 (5)	12 (16,44)	

1.3 Эффективность терапии больных *de novo* Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ с мутациями и без мутаций генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*)

При оценке результатов терапии (процент ремиссий, рефрактерность и летальность в индукции) в нашем исследовании не было показано различий между больными с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS* и больными без мутаций. Наличие мутаций генов *NRAS*, *KRAS* также не влияло на вероятность достижения ремиссии у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3. Сравнение результатов терапии у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия мутаций генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*)

Показатель	Подгруппа 1		P	Подгруппа 2		P	Подгруппа 3		p
	<i>NRAS</i> mut, n (%)	WT, n (%)		<i>KRAS</i> mut, n (%)	WT, n (%)		<i>NRAS</i> и <i>KRAS</i> mut, n (%)	WT, n (%)	
Число больных	9	73		11	73		20	73	
Ремиссия	7 (77,78)	62 (85)	0,55	10 (90,9)	62 (85)	0,36	17 (85)	62 (85)	0,42

Рефрактерность	1 (11,1)	8 (11)	0	8 (10,9)	1 (5)	8 (10,9)
Летальность в индукции	1 (11,1)	3 (4)	1 (9,1)	3 (4,1)	2 (10)	3 (4,1)

В анализ долгосрочных результатов терапии вошли такие параметры, как пятилетние ОВ, БРВ и ВРР, которые оценивались в трех подгруппах больных Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ: 1) больные с мутациями гена *NRAS* и без мутаций (подгруппа 1); 2) больные с мутациями гена *KRAS* и без мутаций (подгруппа 2); 3) больные с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS* и без мутаций (подгруппа 3). При оценке долгосрочных результатов терапии на протоколах ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2016 в зависимости от наличия или отсутствия активирующих мутаций генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ достоверных различий не было выявлено. В качестве примера на рисунке 1 продемонстрированы долгосрочные результаты терапии больных с мутациями в гене *NRAS*, *KRAS* и без мутаций.

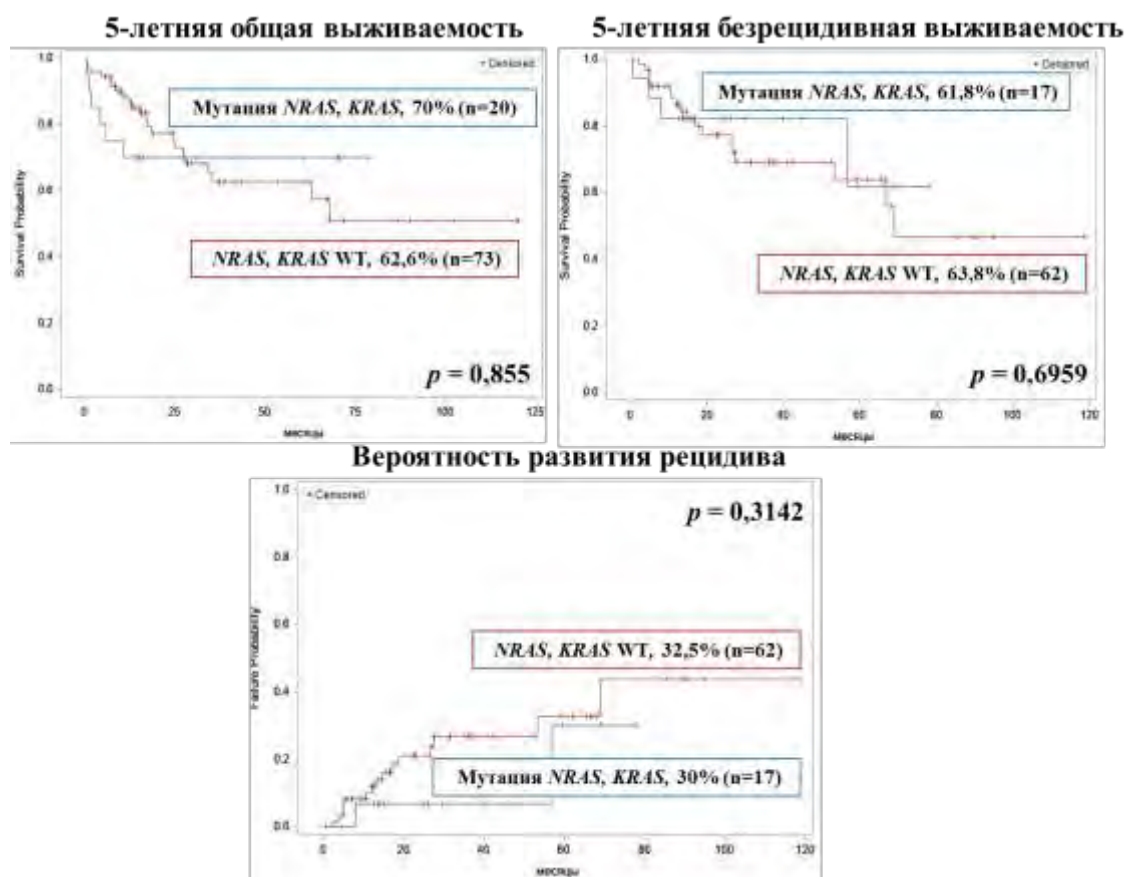


Рисунок 1. Долгосрочные результаты терапии больных Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ с активирующими мутациями генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) и без мутаций (*NRAS*, *KRAS* WT – дикий тип генов)

При анализе причин смерти только в федеральном центре (для исключения влияния на смертность фактора региональных различий) было показано, что смерть, связанная с терапией, произошла у двоих больных, оба были с мутациями, а среди больных, умерших не от токсических осложнений, не было ни одного пациента с мутациями (0 из 14). В ходе этого анализа было показано, что мутации ассоциированы именно с токсической смертью ($p=0,008$). Таким образом, мы делаем осторожный вывод о том, что фактор наличия мутаций в генах *NRAS* или *KRAS* ассоциирован с ранней летальностью, связанной с терапией.

2. Исследование мутаций гена *TP53* у взрослых больных *de novo* ОЛЛ

2.1 Результаты секвенирования гена *TP53* у взрослых больных *de novo* ОЛЛ

Частота обнаружения мутаций гена *TP53* у всех проанализированных больных ОЛЛ составила 7,8 %. Наибольшее число мутаций (11,2 %, $n=10$) обнаружено у больных В-клеточным Rh-негативным ОЛЛ по сравнению с 7,4 % ($n=2$) и 3,1 % ($n=2$) у больных Rh-позитивным и Т-клеточным ОЛЛ соответственно. Распределение мутаций гена *TP53* у больных *de novo* ОЛЛ представлено на рисунке 2.



Рисунок 2. Распределение мутаций гена *TP53* у больных *de novo* ОЛЛ

Все обнаруженные мутации носят клональный или мажорный характер, о чем косвенно свидетельствует тот факт, что мутантный пик сопоставим с пиком дикого типа на электрофореграмме. Примеры электрофореграмм для больных с мутациями гена *TP53* представлены на рисунке 3.

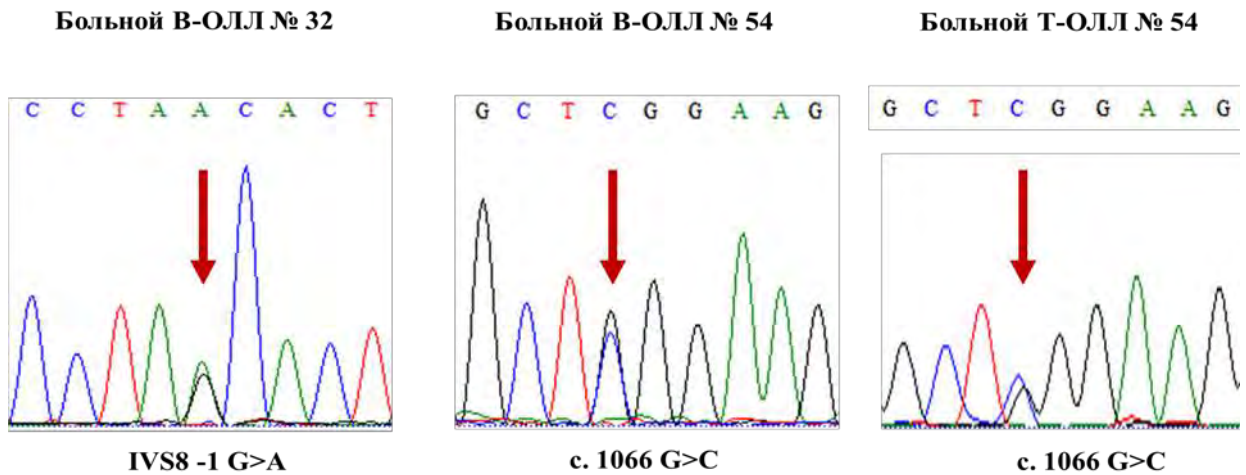


Рисунок 3 – Примеры электрофореграмм для больных с мутациями гена *TP53*

Выявлено две мутации гена *TP53*: инсерция (с.847insCCC) и делеция (с.397_412del16), которые отсутствуют в базах данных и могут считаться новыми. Также обнаружено два очень редких варианта – инсерция (с.844insCCC) и делеция (с.866_867delTC).

Все обнаруженные миссенс-мутации были ранее описаны у больных с СЛФ, и практически все они характеризуются как патогенные согласно анализу генетических вариаций с использованием предсказательных программ PROVEAN (v.1.1.5), SIFT (v.6.2.1), MutationTaster и FATHMM (v2.3), PolyPhen-2 (v2.2.2) и базы данных ClinVar NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Для доказательства герминального характера мутаций статус гена *TP53* оценивали в ремиссии на образцах костного мозга и периферической крови, на образцах костного мозга после алло-ТГСК и в тканях не кроветворного происхождения (буккальный эпителий). Всего в анализ было включено пять больных, неопухолевый биологический материал которых был доступен для исследования. У больных с В-клеточным ОЛЛ в двух случаях исследовали костный мозг в ремиссии до и после алло-ТГСК, в одном – костный мозг в

ремиссии и буккальный эпителий. У одного больного с Rh-положительным ОЛЛ исследовали периферическую кровь в ремиссии и буккальный эпителий. И у одного больного с T-клеточным ОЛЛ исследовали буккальный эпителий. Герминальный характер мутаций был подтвержден у 4 из 5 обследованных больных. Только у больного с Rh-положительным ОЛЛ мутация гена *TP53* в период ремиссии и в буккальном эпителии обнаружена не была. Таким образом, важным практическим выводом работы является наблюдение, что основная часть мутаций гена *TP53* у больных В-клеточным ОЛЛ носит герминальный характер и ассоциирована с синдромом Ли-Фраумени.

2.2 Влияние мутаций гена *TP53* на клинико-лабораторные параметры и эффективность терапии больных *de novo* Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ с мутациями и без мутаций гена *TP53*

Корреляция между наличием мутаций гена *TP53* и клинико-лабораторными характеристиками больных *de novo* Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ, включающими возраст, пол, инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$, ЛДГ более 750 ед/л, спленомегалию, нейрорлейкемию и другие факторы выявлена не была.

Эффективность лечения была проанализирована у всех 89 больных, результаты продемонстрированы в таблице 4. При оценке результатов терапии (процент ремиссий, рефрактерность и летальность в индукции) было показано, что у больных Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ с мутацией гена *TP53* результаты терапии статистически значимо хуже ($p=0,034$).

Таблица 4. Сравнение результатов терапии у больных Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия мутаций гена *TP53*

Показатель	Больные <i>de novo</i> В-клеточным ОЛЛ		<i>p</i>
	Мутации гена <i>TP53</i> , n (%)	Отсутствие мутаций, n (%)	
Число больных	10	79	
Ремиссия	6 (60)	69 (87,3)	0,034
Рефрактерность	2 (20)	7 (8,9)	
Летальность в индукции	2 (20)	3 (3,8)	

При оценке результатов терапии показано, что больные с мутациями гена *TP53* медленнее достигают костномозговой ремиссии (Me 45 vs 35 дней) и в меньшем проценте (70,4 % vs 90,6 %) случаев по сравнению с группой больных без мутаций ($p=0,038$). Результаты представлены на рисунке 4.

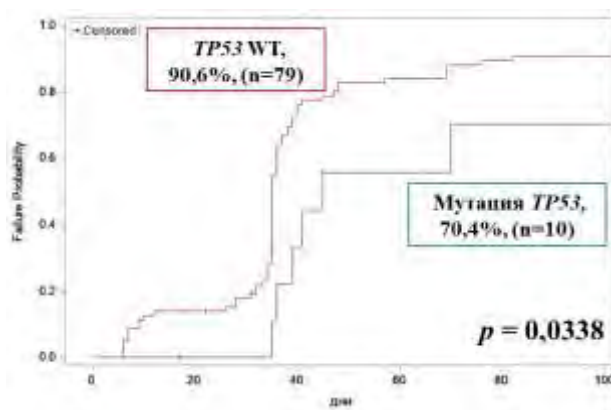


Рисунок 4. Вероятность достижения ремиссии у больных Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия мутации гена *TP53*

Показатели пятилетней общей выживаемости больных с мутациями гена *TP53* хуже по сравнению с группой больных без мутаций (48 % vs 66,9 %), но не достигают статистически значимых различий ввиду относительно малого количества наблюдений. Показатели пятилетней БРВ и ВРР не отличались между группами. Результаты продемонстрированы на рисунке 5. Стоит обратить внимание на тот факт, что ВРР в нашем исследовании у больных с мутациями гена *TP53* составила 0 %. Согласно литературным данным, есть основания полагать, что вероятность развития рецидивов, в частности ранних, у больных с мутациями гена *TP53* значимо выше, чем у больных с диким типом гена (Salmoiraghi S., et al., 2016). Такое отличие наших данных от результатов зарубежных коллег мы объясняем небольшим объемом выборки (всего шесть больных в группе с мутациями).

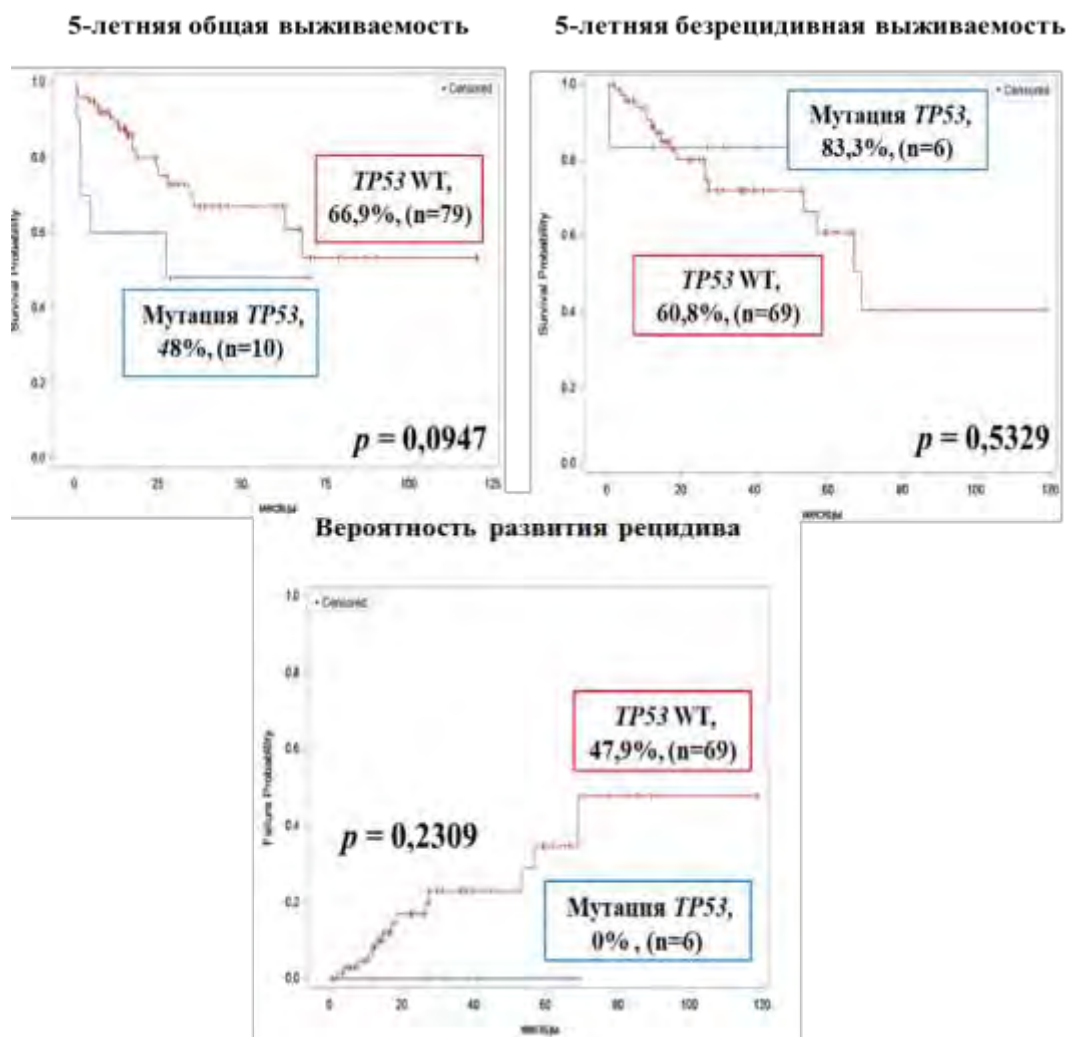


Рисунок 5. Долгосрочные результаты терапии больных Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ с мутациями гена TP53 и без мутаций (TP53 WT – wild type)

3. Изучение генетических нарушений у больных с рецидивами ОЛЛ

3.1 Результаты секвенирования активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) и JAK/STAT (*JAK2*) и гена *TP53* у больных с рецидивами ОЛЛ

Заключительным этапом работы стало изучение генетических нарушений у больных с рецидивами ОЛЛ. В этой части исследования использовали два разных подхода. Первый заключался в оценке мутационного статуса генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*), JAK/STAT (*JAK2*) и гена *TP53* у больных с рецидивами ОЛЛ. В результате было показано, что среди анализируемых больных с рецидивами Rh-

негативных В-клеточных ОЛЛ мутации генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*), JAK/STAT (*JAK2*) и гена *TP53* встречаются менее чем в 10 % случаев (4,5 %, 9 %, 0 % и 5 % соответственно). У больных Ph-положительными В-клеточными ОЛЛ мутации генов сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK (*NRAS*, *KRAS*) и гена *TP53* не обнаружены ни у одного больного. Мутации гена *TP53* у больных Т-клеточными ОЛЛ выявлены в 10 % случаев (у 1 из 10 больных). Распределение мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *TP53* у больных с рецидивами ОЛЛ представлено на рисунке 6.



Рисунок 6. Распределение мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *TP53* у больных с рецидивами ОЛЛ

При сопоставлении пар «*de novo*-рецидив» у больных Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ отмечено появление новых клонов в одном случае с мутацией в гене *NRAS* и в одном случае с мутацией в гене *KRAS*; сохранение исходного клона с мутацией в гене *KRAS*; утрата клона с мутацией в гене *KRAS* и появление клона с мутацией в гене *TP53*. Мутации гена *TP53* в рецидиве в обоих выявленных случаях были ассоциированы с делецией 17p13, что приводит к полной утрате функции гена *TP53* и рефрактерному течению рецидива заболевания.

4. Результаты секвенирования клинического экзоза у больного Rh-негативным В-клеточным ОЛЛ на разных стадиях заболевания

Секвенирование клинического экзоза проводили для образцов ДНК одного пациента с диагнозом В-клеточный ОЛЛ на разных стадиях заболевания (дебют, ремиссия, рецидив). Задачей этого пилотного исследования было оценить, какие специфические генетические нарушения присутствуют в опухолевой ткани в отличие от нормальной кроветворной ткани, а также рассмотреть динамические изменения первичного опухолевого клона во время развития рецидива заболевания.

Для этой цели при первичном анализе всего массива данных, который включал более 9 тысяч генных вариаций для каждого из трех образцов, были отобраны только клональные вариации (на момент установления диагноза), которые патогенны либо по природе мутаций (frameshift-мутации, нонсенс-мутации, мутации сайта сплайсинга), либо по предсказательным базам данных (PolyPhen-2, SIFT). В результате по каждому из образцов было выявлено около 70 вариаций. Большинство диагностированных патогенных вариаций не ассоциированы с онкогенезом и носят герминальный характер.

В таблице 5 представлены клональные соматические мутации, которыми опухолевая ткань отличалась от нормальной кроветворной ткани.

Таблица 5. Динамика молекулярно-генетических изменений на разных стадиях заболевания

Ген/ Хромосома	Мутация/ Аберрация	Замена	Мутационная нагрузка		
			<i>de novo</i> (бл. кл. 91 %)	Ремиссия (бл. кл. 1,6 %)	Рецидив (бл. кл. 75 %)
<i>ABCC2</i>	Инсерция (frameshift)	c.3258_3259insAAAATGG (p.Asp1087LysfsTer9)	39 % (клон)	Нет	Нет
<i>ABCC2</i>	Мутация сайта сплайсинга	c.3258+1G>C	40 % (клон)	Нет	12 % (субклон)
<i>HRH2</i>	Миссенс	c.611G>A (p.Arg204His)	74,5 % (клон)	Нет	18.2 % (субклон)
<i>MTFMT</i>	Миссенс	c.796C>T (p.Arg266Cys)	57,6 % (клон)	Нет	18.6 % (субклон)
Хромосома 3	Моносомия		Клон	Нет	Минорный клон

Важно отметить, что в гене *ABCC2* на момент установки диагноза было выявлено две мутации (инсерция и мутация сайта сплайсинга), а в рецидиве в виде субклона наблюдается только мутация сайта сплайсинга (с.3258+1G>C). Вероятнее всего, исходно мутации гена *ABCC2* существовали в разных клонах, судьба которых различна (один исчез, а другой остался в небольшом количестве в виде минорного клона). Таким образом, в момент диагностики, скорее всего, уже существовало несколько клонов опухолевых клеток. По всем параметрам, представленным в таблице 5, мы наблюдаем в рецидиве субклон, отличающийся от первичного.

Таким образом, можно сделать вывод, что, вероятнее всего, на момент диагностики в опухоли присутствует несколько клонов, и во время рецидива происходит смена опухолевых клонов – мажорный клон, диагностированный в дебюте заболевания, становится минорным в рецидиве.

Выводы

1. У больных Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ частота обнаружения мутаций генов *NRAS* и *KRAS* составляет 9,7 % и 12,9 % соответственно. Выявление мутации гена *JAK2* – крайне редкое событие: 3,16 %. Мутации гена *CRLF2* среди исследованных нами больных Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ не обнаружены. У больных Ph-позитивным ОЛЛ мутации в анализируемых генах не найдены.

2. Показано, что больные Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ с мутациями генов *NRAS* и *KRAS* моложе по сравнению с больными без мутаций (медиана возраста – 25 лет против 33 лет; $p=0,0097$) и на момент диагностики ОЛЛ бластных клеток в костном мозге у них достоверно больше, чем у больных без мутаций (медиана – 92,2 % против – 72,8 %; $p=0,0005$). При обнаружении мутаций генов *NRAS* и *KRAS* отмечен более быстрый, чем без мутаций, клиренс опухолевых клеток: на 70-й (75 % против 41 %; $p=0,0522$) и 133-й (92 % против 63 %; $p=0,0796$) дни протокола.

3. Мутации в генах *NRAS*, *KRAS*, ассоциированы с ранней летальностью, связанной с терапией ($p=0,008$), у больных В-клеточным Ph-негативным ОЛЛ. При этом у больных с мутациями в генах *NRAS*, *KRAS* и без них вероятность достижения ремиссии (94,4 % против 83,6 %; $p = 0,3335$), пятилетняя общая выживаемость (70 % против 62,6 %; $p = 0,855$) и безрецидивная выживаемость (61,8 % против 63,8 %; $p = 0,6959$), а также вероятность развития рецидива (30 % против 32,5 %; $p = 0,3142$) существенно не отличаются.

4. Частота обнаружения мутаций гена *TP53* у всех анализируемых больных ОЛЛ составила 7,8 %. Мутации гена *TP53* были обнаружены, главным образом, у больных В-клеточным ОЛЛ (11,2 %). Все выявленные мутации клональны, и основная их часть у больных В-клеточным ОЛЛ носит герминальный характер и ассоциирована с синдромом Ли-Фраумени.

5. У больных В-клеточным ОЛЛ с мутациями гена *TP53* медленнее по сравнению с больными без мутаций (медиана 45 дней против 35 дней) и в меньшем проценте случаев (70,4 % против 90,6 %) достигается полная ремиссия ($p = 0,0338$). Пятилетняя общая выживаемость больных В-клеточным ОЛЛ с мутацией гена *TP53* хуже по сравнению с больными без мутаций (48 % против 66,9 %; $p = 0,0947$).

6. При рецидивах Ph-негативных В-клеточных ОЛЛ мутации генов *NRAS*, *KRAS* и *TP53* обнаружены менее чем в 10 % случаев (4,5 %, 9 % и 5 % соответственно). При

рецидивах Т-клеточных ОЛЛ мутация гена *TP53* обнаружена в 1 из 10 случаев. Мутации гена *TP53* в рецидиве ОЛЛ ассоциированы с делецией 17p13, что приводит к полной утрате функции гена *TP53* и рефрактерному течению рецидива заболевания. По данным секвенирования клинического экзоза, на момент диагностики в опухоли присутствует несколько клонов, во время рецидива происходит смена опухолевых клонов – мажорный клон, диагностированный в дебюте заболевания, становится минорным в рецидиве.

Практические рекомендации

1. Детекция мутаций генов *NRAS* и *KRAS* методом секвенирования по Сэнгеру является крайне важным подходом, так как позволяет быстро выявить дополнительные молекулярные маркеры у взрослых больных *de novo* Ph-негативными В-клеточными ОЛЛ, необходимые для выбора оптимального лечения с включением таргетных (ингибиторов тирозинкиназ) и иммунных препаратов (блинатумомаб).

2. Целесообразно внедрение детекции мутаций гена *TP53* у взрослых больных *de novo* ОЛЛ в рутинную клиническую практику как для выявления соматических мутаций гена, так и для определения носителей герминальных мутаций. Выявление мутации гена *TP53* и делеции гена *TP53* является крайне неблагоприятным прогностическим фактором, который требует разработки новых терапевтических подходов и обязательного включения в программную терапию ОЛЛ трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. Родственники таких пациентов нуждаются в генетической консультации, профилактических осмотрах и динамическом наблюдении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зарубина, К.И. Токсичность и эффективность тирозинкиназных ингибиторов в сочетании с химиотерапией при резистентном течении острого Ph-позитивного лимфобластного лейкоза (обзор литературы и клинический случай) / К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова, О.А. Гаврилина, А.Н. Соколов, В.В. Троицкая, Л.А. Кузьмина, В.Е. Мамонов, Г.М. Галстян, В.Г.Савченко // Онкогематология. – 2017. – Т. 12. – №. 3. – С. 41-49.
2. Гаврилина, О.А. Результаты ретроспективного многоцентрового исследования терапии больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом по протоколам Российской исследовательской группы / О.А. Гаврилина, Е.Н. Паровичникова, В.В. Троицкая, Л.А. Кузьмина, С.Н. Бондаренко, А.Н. Соколов, В.А. Лапин, К.И. Зарубина, Г.А. Басхаева, И.А. Лукьянова, Г.А. Клясова, А.Б. Судариков, Т.Н. Обухова, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2017. – Т. 62. – №. 4. – С. 172–180.
3. Басхаева, Г.А. Роль мутаций гена IKZF1 при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе у взрослых больных, получающих лечение по протоколам Российского многоцентрового исследования / Г.А. Басхаева, Е.Н. Паровичникова, Б.В. Бидерман, О.А. Гаврилина, Ю.О. Давыдова, М.Ю. Дроков, К.И. Зарубина, И.А. Лукьянова, В.В. Троицкая, А.Н. Соколов, И.С. Пискунова, Е.А. Степанова, С.Ю. Смирнова, А.Б. Судариков, И.В. Гальцева, Т.Н. Обухова, В. Г. Савченко // 2018. – Т. 63. – №. 1. – С. 16–30.
4. Зарубина, К.И. Трудности диагностики и терапии Ph-подобных острых лимфобластных лейкозов: описание 3 клинических случаев / Зарубина К.И., Паровичникова Е.Н., Басхаева Г.А., Красильникова А.Е., Гаврилина О.А., Бидеман Б.В., Судариков А.Б., Бондаренко С.Н., Давыдова Ю.О., Гальцева И.В., Соколов А.Н., Троицкая В.В., Савченко В.Г. // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 7. – №. 90. – С. 110–117.
5. Гаврилина, О.А. Применение позитронно-эмиссионной томографии/ компьютерной томографии для оценки ответа на химиотерапию у больных острыми лимфобластными лейкозами/лимфобластными лимфомами / О.А. Гаврилина, В.В. Троицкая, Г.А. Басхаева, И.А. Лукьянова, К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – №. 2. – С. 138–149.
6. Гаврилина, О.А. Применение неларабина у взрослых больных с рефрактерным течением/рецидивом острого Т-лимфобластного лейкоза/лимфомы: опыт одного центра / О.А. Гаврилина, Е.С. Котова, Е.Н. Паровичникова, В.В. Троицкая, А.Н. Соколов, Г.А. Басхаева, К.И. Зарубина, З.Т. Фидарова, Л.А. Кузьмина, В.Н. Двирнык, Т.Н. Обухова, В.Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – №. 4. – С. 382–395.

7. Sokolov, A.N. BCR/ABL, IKZF deletions and FLT3-ITD as the targets for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treatment: blinatumomab combined with tyrosine kinase inhibitors and ATRA / A.N. Sokolov, E.N. Parovichnikova, V.V. Troitskaya, L.A. Kuzmina, I.V. Galtseva, S.M. Kulikov, S.N. Bondarenko, I.A. Lukyanova, T.I. Lobanova, E.I. Usikova, K.I. Zarubina, O.A. Gavrilina, Ju.O. Davidova, N.M. Kapranov, V.G. Savchenko // Cellular Therapy and Transplantation. – 2020. – Т. 9. – №. 1. – С. 38–46.
8. Зарубина, К.И. Диагностика и лечение острого лимфобластного лейкоза у больного синдромом Ниймеген, впервые диагностированном во взрослом возрасте // К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова, А.В. Кохно, О.А. Гаврилина, В.В. Троицкая, Т.Н. Обухова, А.М. Ковригина, Г.А. Клясова, Е.В. Райкина, М.А. Масчан // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65. – №. 1. – С. 39-51.
9. Зарубина, К.И. Исследование активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах взрослых / К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова, В.Л. Сурин, О.С. Пшеничникова, О.А. Гаврилина, Г.А. Исинова, В.В. Троицкая, А.Н. Соколов, И.В. Гальцева, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Т.Н. Обухова, А.Б. Судариков, В.Г. Савченко // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92. – №. 7. – С. 31-42.