

Якутик И. А., Аль-Ради Л. С., Бидерман Б. В., Никитин Е. А., Судариков А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации», Москва.

## МУТАЦИЯ *B-RAFV600E* У БОЛЬНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

**Введение.** Волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ) — хроническое В-лимфопролиферативное заболевание, составляющее около 2% от общего числа лейкозов. Несмотря на то, что в большинстве случаев существующие методики диагностики и лечения данного заболевания показывают высокую эффективность, некоторые пациенты с ВКЛ оказываются резистентными к такому лечению. Вариантная форма ВКЛ (в-ВКЛ) — В-клеточная неоплазия, составляющая около 10–20% случаев ВКЛ. В-ВКЛ характеризуется значительно более слабым ответом на стандартные методы терапии по сравнению с классической формой ВКЛ (к-ВКЛ). Таким образом, поиск новых терапевтических мишеней и диагностических маркеров ВКЛ остается актуальной. В июне 2011 было опубликовано первое сообщение о 100% встречаемости мутации гена *B-RAF*, приводящей к аминокислотной замене V600E у больных к-ВКЛ.

**Материалы и методы.** В данном исследовании использовалась геномная ДНК, выделенная из образцов периферической крови и аспиратов костного мозга пациентов с ВКЛ и другими лимфопролиферативными заболеваниями. Исследование включало 28 случаев к-ВКЛ, 12 случаев в-ВКЛ, 8 случаев лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и 9 случаев хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ). Постановка диагноза основывалась на общепри-

нятых стандартных критериях, включающих исследование иммунофенотипа. Выявление мутации *B-RAF<sup>V600E</sup>* осуществлялось с помощью двух методик: прямое секвенирование 15 экзона гена *B-RAF* и аллель специфичная ПЦР-РВ с LNA-модифицированными праймерами и пробами.

**Результаты и обсуждение.** По результатам прямого секвенирования 15 экзона гена *B-RAF* мутация V600E была выявлена у всех пациентов с к-ВКЛ с достаточным количеством лейкозных клеток в образце (11/11 — 100%), а также у 5 (83%) пациентов с в-ВКЛ. Ни в одном случае ХЛЛ или ЛМЗС мутация обнаружена не была. Принимая во внимание тот факт, что прямое секвенирование является надежным, но не достаточно чувствительным методом, позволяющим обнаруживать гетерозиготные мутации в образцах содержащих не менее 20% клеток несущих мутацию. А также учитывая, что образцы, получаемые от пациентов с к-ВКЛ, часто содержат малые количества лейкозных клеток вследствие лейкопении или фиброза костного мозга, мы решили использовать аллель специфичную ПЦР-РВ с LNA-модифицированными праймерами и пробами. По результатам ПЦР мутация *B-RAF<sup>V600E</sup>* была выявлена у всех исследованных пациентов с к-ВКЛ (28/28-100%), а также у 10 (83%) пациентов с в-ВКЛ (см. Таблицу). Примечательно, что независимо от

диагностического критерия для в-ВКЛ, будь то лейкопения либо отсутствие экспрессии CD25, значительная часть пациентов оказывалась мутированной.

Таблица.

	Прямое секвенирование		Аллель специфичная ПЦР-РВ	
	В-RAF(+)	В-RAF(-)	В-RAF(+)	В-RAF(-)
к-ВКЛ	11 (100%)	0 (0%)	28 (100%)	0 (0%)
в-ВКЛ (лейкопения)	5 (83%)	1 (17%)	10 (83%)	2 (17%)
в-ВКЛ (CD25-)	6 (100%)	0 (0%)	7(100%)	0 (0%)
ЛМЗС	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	8 (100%)
ХЛЛ	0 (0%)	9 (100%)	0 (0%)	9 (100%)

**Выводы.** Был разработан простой, быстрый и чувствительный метод для детекции мутации В-RAF<sup>V600E</sup>. Была подтверждена ее 100% встречаемость у больных к-ВКЛ. Данная активирующая мутация играет, несомненно, важную роль в патогенезе ВКЛ и может использоваться в качестве критерия при дифференциальной диагностике в сочетании с гистологическими, морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками. Наличие мутации в значительной

доле случаев в-ВКЛ противоречит ранее опубликованным данным и может служить доказательством несовершенства существующей системы критериев для диагностики в-ВКЛ. Отсутствие мутации В-RAF<sup>V600E</sup> в 100% случаев лимфомы маргинальной зоны селезенки и ХЛЛ доказывает целесообразность применения данного маркера при дифференциальной диагностике между к-ВКЛ и другими В-клеточными лимфомами и лейкозами.