

УДК: 616.98[578.825-616.155.392]:614.876

Н. І. Білоус✉, І. В. Абраменко, А. А. Чумак, І. С. Дягіль, З. В. Мартіна

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

NOTCH1 МУТАЦІЇ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ЛІМФОЦИТАРНУ ЛЕЙКЕМІЮ, ЯКІ ПОСТРАЖДАЛИ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧОРНОБИЛЬСЬКІЙ АЕС

Мета роботи – встановити частоту розвитку мутацій гена *NOTCH1* у хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію (ХЛЛ), які зазнали впливу іонізуючого випромінювання (ІВ) внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, для з'ясування вірогідного внеску в патогенез радіаційно-асоційованих форм захворювання.

Методи. Визначення мутацій гена *NOTCH1* методом полімеразної ланцюгової реакції з наступним секвенуванням продуктів реакції проведено у 201 році раніше нелікованого хворого на ХЛЛ В-клітинного походження: 88 опромієних внаслідок Чорнобильської катастрофи і 113 пацієнтів контрольної групи.

Результати. Мутації гена *NOTCH1* виявлено у 13,4 % із 201 обстежених пацієнтів, переважно серед хворих з немутованим статусом генів варіабельних ділянок важких ланцюгів імуноглобулінів (IGHV) ($p = 0,001$). Групи обстежених хворих не розрізнялись за статтю, віком, стадією захворювання, мутаційним статусом IGHV генів. Однак, в групі постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС знайдена достовірно нижча частота мутацій гена *NOTCH1* (6,8 % проти 18,6 %; $p = 0,015$), ніж у неопромієних хворих. Крім того, в контрольній групі кількість *NOTCH1* мутацій збільшувалась у хворих, які потребували початку лікування, порівняно з хворими, обстеженими при діагностиці захворювання ($p = 0,012$), а в основній – залишалась на однаковому рівні ($p = 0,317$). При аналізі клінічних даних всіх пацієнтів наявність мутацій *NOTCH1* була асоційована зі стадією захворювання, більш високим ініціальним лейкоцитозом, більш короткими періодами до початку терапії та безрецидивного виживання.

Висновок. Отримані результати підтвердили негативне прогностичне значення мутацій гена *NOTCH1*, однак не виявили їх суттєвого внеску у розвиток ХЛЛ в групі постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС.

Ключові слова: хронічна лімфоцитарна лейкемія, мутації гена *NOTCH1*, іонізуюче випромінювання, аварія на Чорнобильській АЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 319–327.

✉ Білоус Надія Іванівна, e-mail: nbilous@yahoo.com

N. I. Bilous✉, I. V. Abramenko, A. A. Chumak, I. S. Djagil, Z. V. Martina

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", 53, Melnikov str., Kyiv, 04050, Ukraine

NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia patients sufferers of Chernobyl NPP accident

Objective – to estimate the frequency of *NOTCH1* mutations in chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients, sufferers of Chernobyl NPP accident, for elucidation of their impact in development of radiation-associated forms of disease.

Methods. *NOTCH1* mutations were determined by polymerase chain reaction followed by direct sequencing in 201 previously untreated patients with CLL of B-cell origin: 88 CLL patients, sufferers of the Chernobyl NPP accident, and 113 CLL patients of the control group.

Results. Mutations of *NOTCH1* were found in 13.4 % of observed patients, mostly in cases with unmutated heavy chain variable region (IGHV) genes ($p = 0.001$). Patients of the two groups were comparable by gender, age, stage at diagnosis, and mutational status of IGHV genes. But, the frequency of *NOTCH1* mutations in the main group appeared to be lower in comparison with the control group (6.8 % vs 18.6 %; $p = 0.015$). Furthermore, if in the control group the number of *NOTCH1* mutations increased in patients requiring first treatment compared with patients at diagnosis ($p = 0.012$), in the main group such differences were non-significant ($p = 0.317$). When clinical data of all observed groups of patients were analyzed, the presence of *NOTCH1* mutations was associated with more advanced stage of disease, higher initial WBC count, bulky disease, short time-to-treatment period and progression-free survival.

Conclusion. Our data confirmed negative prognostic value of *NOTCH1* mutations, but suggested to minimal impact of *NOTCH1* mutations in CLL development under exposure to ionizing radiation.

Key words: chronic lymphocytic leukemia, *NOTCH1* mutations, ionizing radiation, Chernobyl NPP accident.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:319-327

ВСТУП

Суттєве значення в патогенезі хронічної лімфоцитарної лейкемії (ХЛЛ) та деяких інших онкогематологічних захворювань відіграє активація внутрішньоклітинної передачі сигналу, опосередкована Notch рецепторами [1]. Родина Notch рецепторів складається з чотирьох трансмембранних білків – Notch1–4, які мають зовнішньоклітинний домен, через який відбувається зв'язування лігандів, та внутрішньоклітинний домен, що опосередковує передачу сигналу [2]. Лігандами Notch рецепторів виступають білки родин Serrate/Jagged та Delta, що експресуються на мембранах клітин мікрооточення та безпосередньо на лейкоцитарних клітинах ХЛЛ. При їх взаємодії з рецептором відбувається протеолітичне розщеплення останнього та вивільнення внутрішньоклітинного домену з наступним переміщенням до ядра клітини. У ядрі утворюється транскрипційний комплекс, що складається з внутрішньоклітинного домену Notch рецептора, фактора транскрипції CBF1/RBP-Jк, який активує CBF1-залежні гени-мішені, включаючи Мус онкоген [3]. Встановлено, що лейкоцитарні клітини при ХЛЛ мають підвищену експресію Notch1 і Notch2 рецепторів, а також їх

INTRODUCTION

Activated intracellular signaling mediated by the Notch receptors has been associated with pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and several others hematologic malignancies [1]. Family of Notch receptors includes four transmembrane proteins (Notch 1–4). They have extracellular part responsible for interaction with their ligands and intracellular part which contributes to signaling pathways function [2]. Proteins of Serrate/Jagged and Delta families, that expressed on microenvironmental cells and CLL leukemic cells, are ligands for the Notch receptors. When the Notch receptor interacts with its ligand, the proteolytic cleavages of the protein with intracellular domain release is initiated and intracellular part of Notch translocates into the nucleus. Transcription complex, which contains intracellular part of Notch and transcription factor CBF1/RBP-Jк, modifies the expression of CBF1-dependend target genes, including the Myc oncogen [3]. It was found that CLL leukemic cells have increased expression of Notch1 and Notch2 receptors as well as their

лігандів Jagged1 і Jagged2, порівняно з нормальними аналогами, що свідчить про конституційну активацію Notch сигнального шляху та його значення в патогенезі ХЛЛ [4].

Активуючі мутації гена *NOTCH1* при ХЛЛ В-клітинного походження вперше виявлені у 2011 р. при проведенні повного секвенування геному лейкоциклітин двома незалежними групами дослідників [5, 6]. Переважну більшість мутацій складає делеція двох пар нуклеотидів (c.7544_7545delCT, P2514fs) у PEST послідовності [пролін (P), глутамінова кислота (E), серин (S) та треонін (T) збагачена послідовність] С-термінальної частини внутрішньоклітинного домену Notch1 рецептора. З цією послідовністю зв'язується SEL-10 білок E3 родини убіквітин-протеїн-лігаз, що є необхідною умовою для наступної деградації в протеосомах вільної частини Notch1 рецептора, переміщеної до ядра клітин, та припинення Notch-індукованої транскрипції генів [3, 7]. Таким чином, після активації Notch1 рецептора з наявністю мутацій в PEST домені, його внутрішньоклітинна частина, переміщена у ядро, набуває резистентності до убіквітин-опосередкованої деградації в протеосомах, а транскрипційна активність значно збільшується. Частота мутацій гена *NOTCH1* складає 8–11 % при діагностиці захворювання, 10–15 % серед хворих перед початком лікування і 15–20 % на момент розвитку резистентності до хіміотерапії, та, за даними деяких авторів, їх присутність асоційована зі скороченням терміну безрецидивного та загального виживання пацієнтів [5, 6, 8].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Зважаючи на існування певних даних епідеміологічних досліджень щодо збільшення ризику розвитку ХЛЛ під впливом іонізуючого випромінювання (ІВ) [9–12], метою дослідження було встановлення частоти розвитку мутацій гена *NOTCH1* у хворих на ХЛЛ, які зазнали впливу ІВ внаслідок аварії на Чорнобильській АЕС, для з'ясування можливого внеску в патогенез радіаційно-асоційованих форм захворювання.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Визначення мутацій гена *NOTCH1* проведено у 201 нелікованого хворого на ХЛЛ В-клітинного походження: 181 чоловіка (90,0 %) і 20 жінок (10,0 %) віком від 33 до 79 років на момент діагнозу (середній вік $(57,98 \pm 0,67)$ року, медіана 58 років). Діагноз ХЛЛ встановлювали на основі клініко-гематологічних критеріїв та імунофенотипування лімфоцитів периферичної крові – виявлення типового фенотипу $CD5^+CD19^+CD23^+CD22^{low}$. Стадію захворювання виз-

Jagged1 and Jagged2 ligands compared with normal B-cells. It is suggested about constitutive activation of Notch signaling pathway and its role in CLL pathogenesis [4].

The activating *NOTCH1* mutations in B-cell CLL were first found through the whole-genome sequencing of leukemic cells by the two independent research teams in 2011 [5, 6]. The overwhelming majority of mutations is commonly represented by a single 2-bp deletion (c.7544_7545delCT, P2514fs) in C-terminal PEST [proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) rich] domain of the Notch1 receptor. SEL-10 protein from the E3 family of ubiquitin-protein ligases interacts with PEST domain, directs the activated Notch1 towards proteosomal degradation, and downregulates the Notch1-induced transcription [3, 7]. So, after activation of Notch1 receptor with available mutated PEST domain, its intracellular part upon translocation to a nucleus becomes resistant to ubiquitin-associated degradation and its transcriptional activity increases significantly. *NOTCH1* mutations occur in 8–11 % of the newly diagnosed CLL cases, 10–15 % at the time of first treatment initiation and 15–20 % at a time of resistance to chemotherapy onset and, according to data of several authors, are associated with short progressive-free and overall survival [5, 6, 8].

OBJECTIVE

Due to presence of some epidemiologic data in which increased CLL risk under influence of ionizing radiation (IR) was found [9–12], the aim of the paper was to estimate the frequency of *NOTCH1* mutations in CLL patients, sufferers of Chernobyl NPP accident, for elucidation of their impact in development of radiation-associated forms of disease.

MATERIALS AND METHODS

The *NOTCH1* mutations were studied in 201 untreated CLL patients: 181 males (90.0 %) and 20 females (10.0 %) at the age of 33–79 years (mean age 57.98 ± 0.67 years, median age 58 years). CLL was diagnosed on the basis of clinical history, lymphocyte morphology, and immunophenotypic criteria (detection of typical phenotype $CD5^+CD19^+CD23^+CD22^{low}$). The stage of the disease was assessed by Binet or Rai classifica-

начали за класифікаціями К. R. Rai із співавт. та J. L. Binet із співавт. Медіана спостереження за пацієнтами становила 53 міс (11–329 міс). За період спостереження, після проведення молекулярних досліджень, 144 хворим була призначена терапія, 94 – померли.

За фактом впливу ІВ хворі були розподілені на дві групи. Основну групу становили 88 пацієнтів, опромінених внаслідок Чорнобильської катастрофи. Серед них 5 евакуйованих з м. Прип'ять, 13 мешканців контрольованих територій, забруднених радіонуклідами, 70 учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС, серед яких 59 брали участь в ЛНА в 1986 р., а 11 – в 1987–1989 рр. Дози опромінення, за даними офіційних документів, становили в середньому для учасників ЛНА 1986 р. ($39,92 \pm 8,7$) сЗв ($n = 19$) і учасників ЛНА 1987–1989 рр. – ($5,06 \pm 1,03$) сЗв ($n = 6$). Накопичені дози (з 1986 року до діагнозу ХЛЛ) у 6 мешканців радіаційно забруднених територій (середня доза ($1,21 \pm 0,39$) сЗв) розраховувались за показниками щільності забруднення ^{137}Cs . Абсорбовані дози 4 евакуйованих з м. Прип'ять (середня доза ($4,76 \pm 0,35$) сЗв) були реконструйовані з урахуванням дати та маршруту евакуації, дати виїзду із забруднених територій та прийому препаратів йоду.

Хворі на ХЛЛ ($n = 113$), які не мали в анамнезі впливу ІВ, становили контрольну групу. Пацієнти основної та контрольної груп співпадали за статтю, віком, стадією при діагностиці захворювання, клінічною фазою хвороби на момент проведення молекулярних досліджень та мутаційним статусом варіабельних ділянок важких ланцюгів генів імуноглобулінів (IGHV) (табл. 1).

Геномну ДНК для проведення молекулярних досліджень отримували з мононуклеарів периферичної крові з використанням набору QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Велика Британія) згідно з інструкцією виробника. Мутаційний статус IGHV генів був визначений у 87 хворих основної та 112 хворих контрольної групи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з наступним прямим секвенуванням, як описано раніше [13]. Отримані сіквенси аналізували за допомогою баз даних IgBlast та IMGT. Послідовності, що мали гомологію $> 98\%$ з відповідним гермінативним IGHV геном розцінювали як немутовані (UM), а випадки з гомологією $< 98\%$ – як мутовані (M).

Мутації гена *NOTCH1* визначали у регіоні с.7282_7680 34-го екзону *NOTCH1* гена, який є “гарячою” точкою наявності таких мутацій, за допомогою ПЛР з наступним секвенуванням згідно з Fabbri et al. [5].

Median duration of the follow-up period was 53 months (range 11–329 months). During the observation after the fulfillment of molecular studies 144 CLL patients received therapy and 94 patients died.

CLL patients were divided into two groups according to IR exposure. The main group consisted of 88 IR-exposed CLL patients (5 evacuees from Prypiyat, 13 inhabitants of radionuclide-contaminated areas, and 70 clean-up workers). Information about doses of clean-up workers was available from the State Registry of Chernobyl Catastrophe Sufferers of Ukraine. Among clean-up workers 59 were clean-up workers of 1986 (estimated doses available for 19 persons, mean dose 39.92 ± 8.7 cSv), 11 were clean-up workers of 1987–1989 (estimated doses available for 6 patients, mean dose 5.06 ± 1.03 cSv). Accumulated doses (since 1986 to the diagnosis of CLL) in 6 residents of contaminated areas (mean dose 1.21 ± 0.39) were calculated based on ^{137}Cs soil contamination density. Absorbed doses for the 4 evacuees from Prypiyat (mean dose 4.76 ± 0.35 cSv) were reconstructed taking into account date and route of evacuation, date of removal from contaminated territory, and the administration of iodine.

The control group included 113 CLL patients with no exposure to ionizing radiation in a history. Patients of the two groups were comparable by gender, age, disease stage at diagnosis, clinical phase of disease at the moment of molecular studies, and mutational status of heavy chain variable region (IGHV) genes (Table 1).

Genomic DNA for molecular analysis was extracted from peripheral blood mononuclear cells with the QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Crawley, United Kingdom) according to the manufacturer's protocol. The IGHV gene mutational status was assessed by polymerase chain reaction (PCR) followed by direct sequencing, as described above [13]. Sequences were analyzed using the IgBlast and IMGT databases. Sequences with $> 98\%$ homology with the corresponding germ-line IGHV gene were considered as unmutated (UM), and cases with $< 98\%$ homology were considered to be mutated (M).

NOTCH1 mutations were analyzed in the hotspot с.7282_7680 region in exon 34 of *NOTCH1* gene by PCR amplification followed by direct sequencing according to Fabbri et al. [5].

Отримані результати обробляли за допомогою методів варіаційної статистики в програмі SPSS 16.0 software package (SPSS, США).

Statistical processing of obtained data was performed using the SPSS 16.0 software package (SPSS, Chicago, IL).

Таблиця 1

Характеристика обстежених хворих на хронічну лімфоцитарну лейкемію

Table 1
Baseline clinical characteristics of observed CLL patients

Показники Characteristics		Основна група	Контрольна група	p
		IR-exposed patients n = 88	Control group n = 113	
Вік, роки, медіана (розкид) / median age, years (range)		57 (36–76)	58 (33–79)	0,918
Стать, n (%) / gender, n (%)	чоловіки / male жінки / female	79 (89,8) 9 (10,2)	102 (90,3) 11 (9,7)	0,908
Стадія за Rai при діагностиці, n (%) / Rai stage at diagnosis, n (%)	0 I II III IV	12 (13,6) 33 (37,5) 35 (39,8) 3 (3,4) 5 (5,7)	14 (12,4) 41 (36,3) 45 (39,8) 8 (7,1) 5 (4,4)	0,835
Стадія за Binet при діагностиці, n (%) / Binet stage at diagnosis, n (%)	A B C	46 (52,3) 36 (40,9) 6 (6,8)	56 (49,6) 44 (38,9) 13 (11,5)	0,530
Ініціальний лейкоцитоз, · 10 ⁹ /л / initial WBC count, · 10 ⁹ /L		37,31 ± 5,19	46,94 ± 5,35	0,207
Мутаційний статус IGHV генів, n (%) / IGHV mutational status, n (%)	M UM	34 (39,1) 53 (60,9)	35 (31,3) 77 (68,7)	0,507
Клінічна фаза ХЛЛ, n (%) / clinical phases of CLL, n (%)	діагностики захворювання at diagnosis необхідності початку терапії requiring first treatment	47 (53,4) 41 (46,6)	60 (53,1) 53 (46,9)	0,965

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мутації гена *NOTCH1* були виявлені у 13,4 % серед всіх обстежених хворих та представлені типовою делецією двох пар нуклеотидів c.7544_7545delCT (P2514fs). У двох пацієнтів (один – основної та один – контрольної групи) виявлені додаткові *NOTCH1* мутації. В першому випадку це була вже відома делеція однієї пари нуклеотидів c.7444delC [14], в іншому – раніш не описана інсерція однієї пари нуклеотидів c.7570_7571insC. Обидві мутації призводили до зсуву рамки зчитування і, як було очевидно з їх локалізації, порушували деградацію білка *NOTCH1* через руйнування регуляторного PEST домену.

Частота мутацій гена *NOTCH1* в основній групі виявилась нижчою, ніж в контролі (6,8 та 18,6 %, відповідно; p = 0,015). Різниця була найбільш очевидною серед хворих, які потребували проведення терапії першої лінії. В контрольній групі кількість мутацій гена *NOTCH1* збільшувалась у таких хворих, порівняно з пацієнтами, обстеженими при діагностиці захворювання (p = 0,012), однак в основній групі ці розбіжності були невірні (p = 0,317).

RESULTS

Mutations of *NOTCH1* were found in 13.4 % of observed patients and were represented by typical two base pair deletion c.7544_7545delCT (P2514fs). In two patients (one at a time from each group) additional *NOTCH1* mutation was detected. In one case it was previously published single base pair deletion c.7444delC [14], in another – single base pair insertion c.7570_7571insC, which was not previously reported. Both mutations cause shift in reading frame and, based on their localization along the *NOTCH1* protein, are predicted to result in *NOTCH1*-impaired degradation through the truncation of regulatory PEST domain.

The frequency of *NOTCH1* mutations in the main group appeared to be lower in comparison with the control group (6.8 % vs 18.6 %; p = 0.015). Differences were more significant among patients requiring first treatment. In the control group the number of *NOTCH1* mutations increased in patients requiring first treatment compared with patients at diagnosis (p = 0.012), but in the main group such differences were non-significant (p = 0.317).

В обох групах мутації гена NOTCH1 переважно виявлялись у хворих з UM IGHV генами ($p = 0,001$), причому у хворих з UM IGHV генами, які не зазнали впливу ІВ, частота мутацій була вищою, ніж у пацієнтів основної групи (табл. 2). Важливо зазначити, що цей феномен не був пов'язаний з різницею між пацієнтами основної і контрольної групи в частоті експресії IGHV генів різних родин, як мutowаних ($p = 0,432$), так і немutowаних ($p = 0,917$) (рис.1).

Ми не виявили суттєвих розбіжностей у низькій частоті мутацій гена NOTCH1 залежно від радіаційного анамнезу опромінених хворих на ХЛЛ: вони були

In both groups NOTCH1 mutations were found mostly in UM IGHV cases ($p = 0.001$), but IR non-exposed CLL patients with UM IGHV gene had increased number of mutations compared to IR-exposed ones (Table 2). Notably, the differences in frequency of UM IGHV gene usage ($p = 0.917$) as well as M IGHV gene usage ($p = 0.432$) were non-significant between observed groups of CLL patients (Fig.1).

We did not reveal any differences in low frequency of NOTCH1 mutations depending on IR anamnesis of irradiated CLL patients: they were

Таблиця 2
Розподіл NOTCH1 мутацій у обстежених хворих

Table 2
Distribution of NOTCH1 mutations in observed patients

Обстежені хворі Observed patients	Кількість хворих з NOTCH1 мутаціями, n (%) Number of patients with NOTCH1 mutations, n (%)		p
	основна група / IR-exposed patients	контрольна група / control group	
Всі хворі / all patients	6 із 88 (6,8)	21 із 113 (18,6)	0,015
При постановці діагнозу / at diagnosis	2 із 47 (4,3)	6 із 60 (10,0)	0,262
Потребують лікування / requiring first treatment	4 із 41 (9,8)	15 із 53 (28,3)	0,026
З IGHV генами* мutowаними / M IGHV cases* немutowаними / UM IGHV cases*	0 із 34	1 із 35 (2,9)	0,321
	6 із 53 (11,3)	20 із 77 (26,0)	0,040

Примітки. * – мутації генів IGHV не досліджені в одного пацієнта основної і в одного хворого контрольної групи.
Notes. * – по IGHV gene mutations were studied in one at a time patient from both groups.

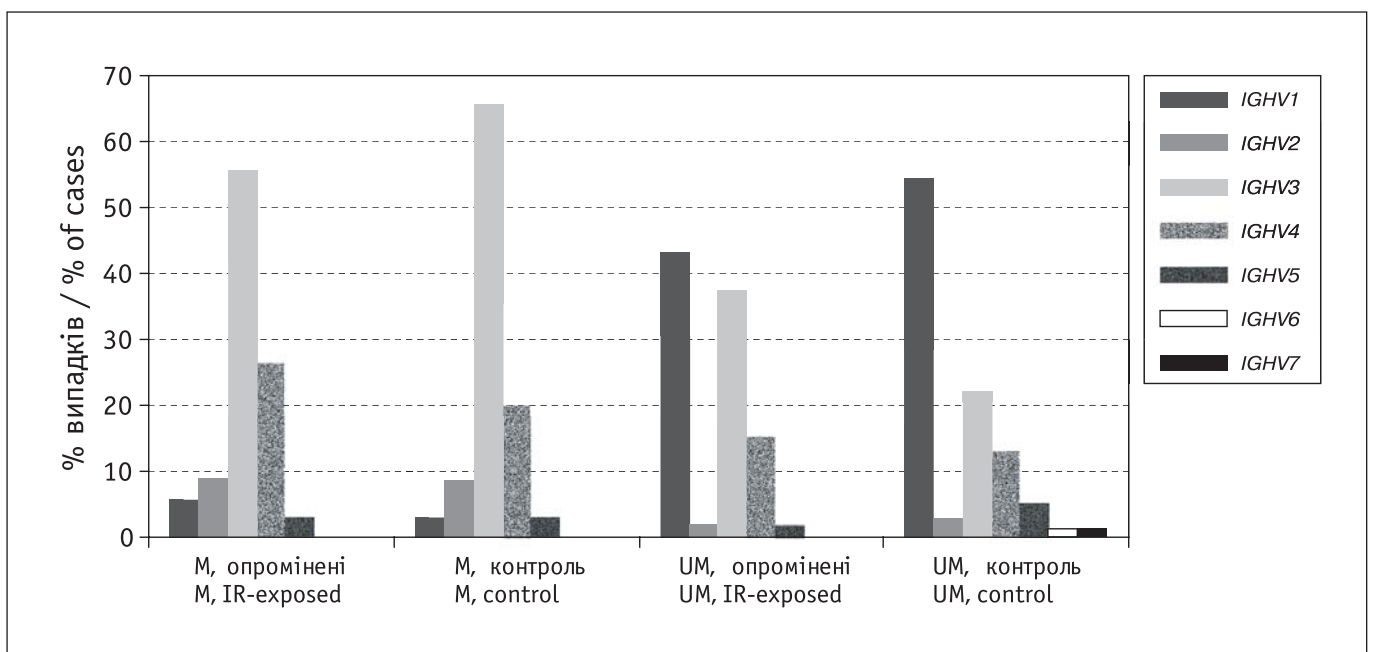


Рисунок 1. Розподіл мutowаних (M) та немutowаних (UM) IGHV генів окремих родин серед обстежених хворих

Figure 1. The distribution of mutated (M) and unmutated (UM) IGHV genes of separate families among observed CLL patients

Таблиця 3

Клінічні дані обстежених хворих залежно від наявності *NOTCH1* мутацій (М – є мутації; UM – мутацій немає)

Table 3

Clinical data of observed patients depending on presence of *NOTCH1* mutations (M – mutated cases; UM – unmutated cases)

Показники Parameters	Всі хворі / all patients		Основна група / IR-exposed patients		Контрольна група / control group	
	UM	M	UM	M	UM	M
<i>Стадія за Binet при діагностиці, n (%) / Binet stage at diagnosis, n (%)</i>						
A	94 (54,0)	8 (29,6)	44 (53,7)	2 (33,3)	50 (54,3)	6 (28,6)
B	67 (38,5)	13 (48,1)	32 (39,0)	4 (66,7)	35 (38,0)	9 (42,9)
C	13 (7,5)	6 (22,2)	6 (7,3)	0	7 (7,6)	6 (28,6)
<i>p</i>	0,013	0,382	0,012			
Ініціальний лейкоцитоз, ·10 ⁹ /л / Initial WBC count, ·10 ⁹ /L						
	39,69 ± 3,36	62,15 ± 14,85	36,82 ± 5,46	43,78 ± 16,57	42,23 ± 4,95	67,66 ± 18,67
<i>p</i>	0,042		0,732		0,065	
<i>Значна лімфаденопатія*, n (%) / bulky disease*, n (%)</i>						
немає / no	159 (93,3)	22 (81,5)	76 (95,0)	4 (66,7)	83 (92,2)	18 (85,7)
є / yes	11 (6,5)	5 (18,5)	4 (5,0)	2 (33,3)	7 (7,8)	3 (14,3)
<i>p</i>	0,033		0,009		0,348	
Медіана ТТТ, міс / Median TTT, mo						
	22	4	22	3	20	6
<i>p</i>	0,037		0,226		0,105	
Медіана PFS, міс / Median PFS, mo						
	58	36	64	27	49	41
<i>p</i>	0,019		0,234		0,099	
Медіана OS, міс / Median OS, mo						
	79	55	112	80	73	43
<i>p</i>	0,101		0,793		0,102	

Примітки. * – у чотирьох пацієнтів дані щодо лімфаденопатії були відсутні.
Notes. * – no data on bulky disease were available in 4 patients.

виявлені у 4 (6,8 %) учасників ЛНА 1986 року, 1 (9,1 %) учасника ЛНА 1987–1989 років та у 1 (7,7 %) мешканця забрудненої радіонуклідами території ($p = 0,925$). Розподіл *NOTCH1* мутованих випадків залежно від року постановки діагнозу ХЛЛ (до 5 років, в період 5-10 років та після 10 років з моменту аварії на ЧАЕС) не розрізнявся: 16,7; 5,6 та 6,7 %, відповідно; $p = 0,608$. Кореляція між віком опромінених хворих на ХЛЛ на момент Чорнобильської аварії та наявністю мутацій гена *NOTCH1* була відсутня ($r = 0,021$; $p = 0,849$).

При аналізі клінічних даних всіх обстежених хворих наявність мутацій гена *NOTCH1* була асоційована з пролонгованою стадією захворювання, вищим ініціальним лейкоцитозом, більшим ступенем лімфаденопатії, коротшими періодами до початку терапії (TTT період) та безрецидивного виживання (PFS), однак не з показниками загального виживання (OS) пацієнтів (табл. 3). Це співпадає з даними окремих авторів, які також не виявили статистично значущої асоціації між мутаціями гена *NOTCH1* та OS [14, 15].

revealed in 4 (6.8 %) clean-up workers of 1986, 1 (9.1 %) clean-up workers of 1987–1989, and 1 (7.7 %) resident of contaminated areas ($p = 0.925$). Distribution of *NOTCH1* mutated cases depending on year of CLL diagnosis (<5, 5-10 and >10 years after Chernobyl NPP catastrophe) did not differ: 16.7 %, 5.6 %, and 6.7 %, correspondingly; $p = 0.608$. Correlation between age of IR-exposed CLL patients at the moment of Chernobyl NPP catastrophe and the presence of *NOTCH1* mutations was absent ($r = 0.021$; $p = 0.849$).

When clinical data of all observed patients were analyzed, the presence of *NOTCH1* mutations appeared being associated with more advanced stage of the disease, higher initial WBC count, bulky disease, shorter time-to-treatment (TTT) period and progression-free survival (PFS) time, but not with overall survival (OS) of patients (Table 3). It was agreed with data of some authors who also did not find a statistically significant association between *NOTCH1* mutations and OS [14, 15].

ВИСНОВОК

Обстежені групи раніш нелікованих хворих на ХЛЛ співпадали за більшістю проаналізованих показників (стать, вік, стадія захворювання, ініціальний лейкоцитоз, мутаційний статус IGHV генів, експресія IGHV генів різних родин). Тим не менше, в групі хворих, які зазнали впливу ІВ, виявлена низька частота мутацій гена NOTCH1, тоді як в контрольній групі розподіл NOTCH1 мутацій у хворих на окремих клінічних фазах захворювання співпадав з результатами, виявленими іншими авторами [16]. Нам не вдалось встановити причини виявлених розбіжностей. Однак в цілому, отримані дані свідчать, що внесок мутацій гена NOTCH1 у розвиток ХЛЛ на тлі впливу ІВ є мінімальним.

Подяка

Дослідження проведені за планом Національної академії медичних наук України (НДР № держреєстрації 0114U002846). Ми вдячні містеру Т.Хармсу, президенту благодійної організації Кіндергільфе Київ е.В. за підтримку в придбанні реактивів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Leong K.G. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis / K. G. Leong, A. Karsan // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – P. 2223–2233.
2. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor / R. Kopan // *Cell Sci*. – 2002. – Vol. 115. – P. 1095–1097.
3. Aster J. C. Notch signalling in Tcell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies / J. C. Aster, S. C. Blacklow, W. S. Pear // *J. Pathol*. – 2011. – Vol. 223. – P. 262–273.
4. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells / E. Rosati, R. Sabatini, G. Rampino [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, No. 4. – P. 856–865.
5. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation / G. Fabbri, S. Rasi, D. Rossi [et al.] // *J. Exp. Med*. – 2011. – Vol. 208, No. 7. – P. 389–401.
6. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia / X. S. Puente, M. Pinyol, V. Quesada [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 475. – P. 101–105.
7. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor / N. Gupta-Rossi, O. Le Bail, H. Gonen [et al.] // *The J. Biol. Chem*. – 2001. – Vol. 276, No. 37. – P. 34371–34378.
8. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia / D. Rossi, S. Rasi, G. Fabbri [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – P. 521–529.
9. Weiss H. A. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis / H. A. Weiss, S. C. Darby, R. Doll // *Int. J. Cancer*. – 1994. – Vol. 59. – P. 327–338.
10. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease / P. D. Inskip, R. A. Kleinerman, M. Stovall [et al.] // *Radiat. Res*. – 1993. – Vol. 135. – P. 108–124.

CONCLUSION

Previously untreated CLL patients of the two observed groups were comparable by the majority of analyzed parameters (gender, age, stage at diagnosis, initial WBC counts, mutational status of IGHV genes, IGHV gene usage). Nevertheless, low frequency of NOTCH1 mutations was found in IR-exposed CLL patients at diagnosis and before first line therapy as well, when the patients of control group had the expected distribution of NOTCH1 mutations during clinical phases of disease [16]. We can not explain reasons for these differences. But, anyway, our data suggest to minimal impact of NOTCH1 mutations on CLL development under IR-exposure.

Acknowledgements

Study was supported by the National Academy of Medical Sciences of Ukraine (grant # 0114U002846 of state registration). We thank Mr. T. Harms president of the charitable organization Kiev Kinderhilfe e.V. for support reagents purchasing.

REFERENCES

1. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood*. 2006;107:2223-33.
2. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *Cell Sci*. 2002;115:1095-97.
3. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J. Pathol*. 2011;223:262-73.
4. Rosati E, Sabatini R, Rampino G, Tabilio A, Di Ianni M, Fettucciari K, et al. Constitutively activated Notch signaling is involved in survival and apoptosis resistance of B-CLL cells. *Blood*. 2009;113(4):856-65.
5. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabanian H, Ma J, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J. Exp. Med*. 2011;208(7):389-401.
6. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordonez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101-5.
7. Gupta-Rossi N, Le Bail O, Gonen H, Brou Ch, Logeat F, Six E, et al. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *The J. Biol. Chem*. 2001;276(37):34371-8.
8. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119:521-9.
9. Weiss HA. Cancer mortality following X-rays treatment for ankylosing spondylitis. *Int. J. Cancer*. 1994;59:327-38.

11. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks / A. Y. Romanenko, S. C. Finch, M. Hatch [et al.] // *Radiat. Res.* – 2008. – Vol. 170, No. 6. – P. 711–720.
12. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among chernobyl cleanup workers / L. B. Zablotska, D. Bazyka, J.H. Lubin [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2013. – Vol. 121, N 1. – P. 59–65.
13. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl NPP accident – with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis / I. Abramenko, N. Bilous, A. Chumak [et al.] // *Leuk. Res.* – 2008. – Vol. 32, No. 4. – P. 535–545.
14. NOTCH1, SF3B1, and TP53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG / A. Schnaiter, P. Paschka, M. Rossi [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 122, No. 7. – P. 1266–1270.
15. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial / S. Stilgenbauer, A. Schnaiter, P. Paschka [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 123, No. 21. – P. 3247–3254.
16. Rossi D. The spectrum of genetic defects in chronic lymphocytic leukemia / D. Rossi, M. Fangazio, G. Gaidano // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* – 2012. – Vol. 4, No. 1. – e2012076.
10. Inskip PD, Kleinerman RA, Stovall M, Cookfair DL, Hadjimichael O, Moloney WC, et al. Leukemia, lymphoma, and multiple myeloma after pelvis radiotherapy for benign disease. *Radiat. Res.* 1993;135(1):108-24.
11. Romanenko AY, Finch SC, Hatch M, Lubin JH, Bebesko VG, Bazyka DA, et al. The Ukrainian-American study of leukemia and related disorders among Chernobyl cleanup workers from Ukraine: III. Radiation risks. *Radiat. Res.* 2008;170(6):711-20.
12. Zablotska LB, Bazyka D, Lubin JH, Gudzenko N, Little MP, Hatch M, et al. Radiation and the risk of chronic lymphocytic and other leukemias among chernobyl cleanup workers. *Environ. Health Perspect.* 2013;121(1):59-65.
13. Abramenko I, Bilous N, Chumak A, Davydova E, Kryachok I, Martina Z, et al. Chronic lymphocytic leukemia patients exposed to ionizing radiation due to the Chernobyl Npp accident-with focus on immunoglobulin heavy chain gene analysis. *Leuk. Res.* 2008;32(4):535-45.
14. Schnaiter A, Paschka P, Rossi M, Zenz T, Buhler A, Winkler D, et al. NOTCH1, SF3B1, and Tp53 mutations in fludarabine-refractory CLL patients treated with alemtuzumab: results from the CLL2H trial of the GCLLSG. *Blood.* 2013;122(7):1266-70.
15. Stilgenbauer S, Schnaiter A, Paschka P, Zenz T, Rossi M, Dohner K, et al. Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia: results from the CLL8 trial. *Blood.* 2014;123(21):3247-54.
16. Rossi D, Fangazio M, Gaidano G. The spectrum of genetic defects. in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2012;4(1):e2012076.

Стаття надійшла до редакції 11.08.2015

Received: 11.08.2015