

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»**

ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ

THE BULLETIN OF HEMATOLOGY

Том XV № 2 2019

Ежеквартальный научно-практический журнал
Основан в сентябре 2004 года

Главный редактор

Доктор медицинских наук
профессор
С. С. Бессмельцев

Санкт-Петербург
2019

Редакционная коллегия:

С. С. Бессмельцев (главный редактор)

А. Н. Богданов; Л. Н. Бубнова; Т. В. Глазанова (ответственный секретарь);

С. А. Гусева; А. Ю. Зарицкий; Н. М. Калинина; Л. П. Папаян; В. Г. Радченко;

В. И. Ругаль; О. А. Рукавицын; В. Н. Чеботкевич, С. В. Грицаев.

Редакционный совет:

Б. В. Афанасьев (Санкт-Петербург); *В. В. Базарный* (Екатеринбург);

М. Л. Гершанович (Санкт-Петербург); *К. Г. Дуткевич* (Санкт-Петербург); *Г. А. Зайцева* (Киров);

Ю. М. Захаров (Челябинск); *Л. Г. Ковалева* (Москва); *А. В. Литвинов* (Смоленск);

В. И. Мазуров (Санкт-Петербург); *И. В. Поддубная* (Москва); *Т. Н. Поспелова* (Новосибирск);

А. Г. Румянцев (Москва); *В. Г. Савченко* (Москва); *Н. Н. Третьяк* (Киев); *Н. П. Шабалов* (Санкт-Петербург).

Зав. редакцией — *Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — *Т. В. Глазанова*, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

Адрес редакции:

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

E-mail: bloodscience@mail.ru

Сайт: www.bloodscience.ru

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

Обложка и художественное оформление *О. С. Дмитриева*

Компьютерная верстка *О. С. Дмитриева*

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 20.05.2019 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ № 101.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Агентство «ВиТ-принт»», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

18 +

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:

Кувшинов А. Ю., Волошин С. В., Кузяева А. А., Шuvaев В. А., Михалева М. А., Мартынкевич И. С., Чечеткин А. В., Бессмельцев С. С. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О CAR T-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ.....	4
--	----------

ТЕЗИСЫ:

V Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «ГЕНЕТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ – ОТ ДИАГНОСТИКИ К ТЕРАПИИ» Санкт-Петербург, 26–27 апреля 2019 г.....	14
---	-----------

CONTENTS

REVIEW OF LITERATURE

Kuvshinov A. Yu., Voloshin S. V., Kuzyaeva A. A., Shuvaev V. A., Mikhaleva M. A., Martynkevich I. S., Chechetkin A. V., Bessmeltsev S. S. MODERN REPRESENTATION OF CAR T-CELL THERAPY	4
--	----------

**Кувшинов А. Ю., Волошин С. В., Кузьяева А. А., Шуваев В. А.,
Михалева М. А., Мартынкевич И. С., Чечеткин А. В., Бессмельцев С. С.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О CAR Т-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

**Kuvshinov A. Yu., Voloshin S. V., Kuzyaeva A. A., Shuvaev V. A.,
Mikhaleva M. A., Martynkevich I. S., Chechetkin A. V., Bessmeltsev S. S.**

Federal State Budget Institution "Russian Scientific and Research Institute of Hematology and Transfusiology of Federal Medical Biological Agency", St. Petersburg

MODERN REPRESENTATION OF CAR T-CELL THERAPY

Резюме. Адоптивная иммунотерапия является одним из признанных современных методов лечения онкологических заболеваний, основанном на достижениях генетики, молекулярной биологии и иммунологии, целью которого является восстановление нормального функционирования противоопухолевого ответа. В основу данного вида терапии положено создание опухоль-специфичных цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (chimeric antigen receptor, CAR). Из экспериментальной технологии лечение онкологических заболеваний CAR Т-клетками превращается в быстро развивающийся подход к терапии с более чем 500 зарегистрированными клиническими исследованиями при гематологических новообразованиях и солидных опухолях. В статье представлено описание биотехнологии, результаты клинических исследований, обсуждение побочных эффектов и проблем появления резистентности опухолей, а также рассмотрены перспективы дальнейшего развития и внедрения в рутинную клиническую практику CAR Т-клеточной терапии.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR Т-клетка, онкогематология.

Введение. Клеточная терапия, предназначенная для усиления иммунного ответа, в настоящее время получает признание как метод лечения различных заболеваний, особенно онкологических. За последние годы было предложено множество форм иммунотерапии: моноклональные антитела, ингибиторы контрольных путей (checkpoint inhibitors), генетически модифицированные дендритные клетки,

Abstract. Adoptive immunotherapy is one of the accepted modern methods of cancer treatment, based on achievements of genetics, molecular biology and immunology and its goal is to repair the normal functioning of antitumor response. The basis of this type of therapy is the creation of tumor-specific cytotoxic lymphocytes expressing the chimeric antigen receptor (CAR). The treatment of cancer with CAR T-cells is transformed from experimental technology into a rapidly developing therapeutic approach with more than 500 registered clinical trials in hematologic malignancies and solid tumors. The article presents a description of biotechnology, the results of clinical trials, a discussion of side effects and problems of the emergence of tumor resistance, as well as the prospects for further development and introduction of CAR T-cell therapy into routine clinical practice.

Key words: adoptive immunotherapy, chimeric antigen receptor, CAR T-cell, malignant hematology

противоопухолевые вакцины и онколитические вирусы, интерлейкин-27, натуральные киллеры (NK-клетки), адоптивная иммунотерапия. Иммунотерапия относительно нова по сравнению с тремя основными столпами лечения онкологических заболеваний: хирургическое вмешательство, лучевая терапия и химиотерапия. Развитие молекулярной биологии, генетики и иммунологии позволяет получать новые

и уточнять уже накопленные знания о функционировании иммунной системы и способах воздействия на нее. Это привело к созданию химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR), как потенциальной основы для воздействия на иммунную систему с целью активации противоопухолевого ответа.

Иммунная система. Иммунный ответ осуществляется посредством двух форм иммунитета: врожденного и приобретенного (адаптивного). Врожденный иммунитет распознает чужеродные антигены, не нанося вреда клеткам и тканям организма. Распознавание чужеродных антигенов вызывает ответную реакцию воспаления и фагоцитоза с участием врожденных иммунных клеток (нейтрофилы и макрофаги). Такой ответ происходит быстро. Адаптивный иммунитет требует больше времени для формирования ответа. В тимусе в течение первого года жизни человека развиваются Т-клетки, которые отражают ненаследуемые материнские аллоантигены, поскольку они, вероятно, не подвергались иммуностимуляции

патогеном [1]. Воздействие различных антигенов улучшает процесс адаптивного иммунитета. Т-лимфоциты, являясь ключевым звеном адаптивного иммунного ответа, обладают следующими эффекторными функциями: 1) уничтожение инфицированных или опухолевых клеток (цитотоксические Т-лимфоциты); 2) активация (Т-хелперы) макрофагов, В-клеток, секреция цитокинов; ослабление иммунных реакций.

Иммунная система и онкология. Критическим компонентом адаптивного иммунитета является способность Т-клеток распознавать патоген-ассоциированные иммуностимуляторы по топографии эпитопа чужеродного антигена. Процесс развития опухоли и изменение ее свойств при взаимодействии с иммунной системой, в том числе с участием Т-клеток, сформировался как концепция «иммуноредактирования рака». Основные фазы взаимодействия опухоли и иммунной системы: 1) элиминация; 2) равновесие и 3) ускользание [2]. Переориентирование иммунной системы опухолью возможно вследствие ее пластичности.

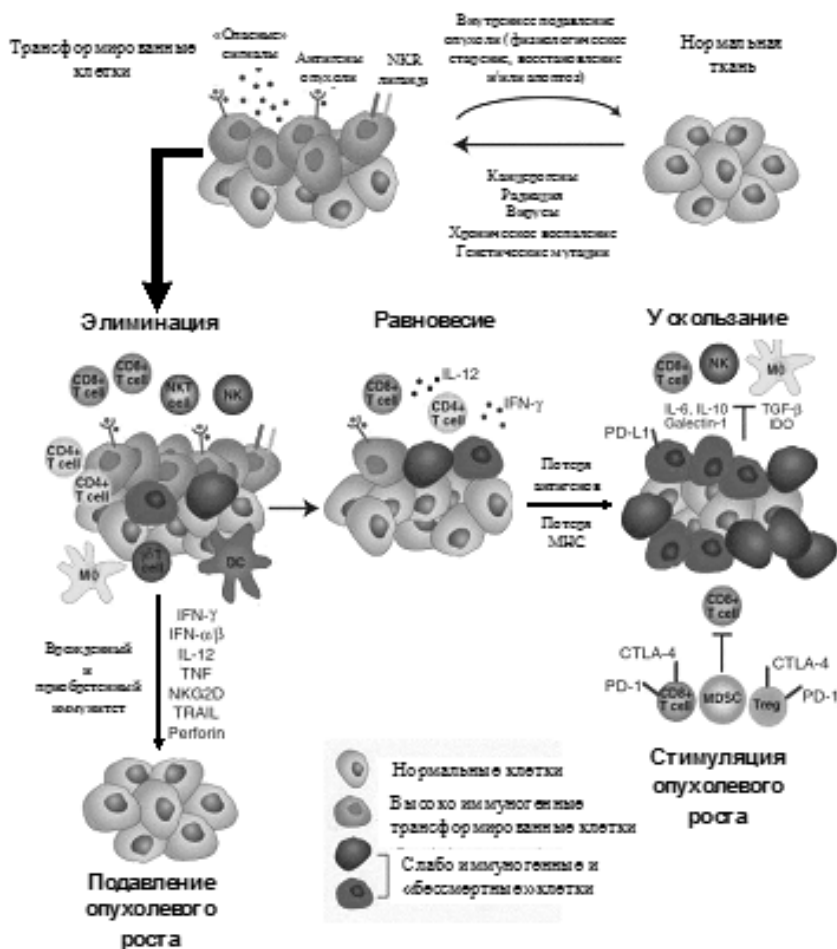


Рис. 1. Процесс взаимодействия иммунной системы и опухоли [2]

Во время фазы «элиминации» чужеродные эпитопы, продуцируемые раковыми клетками устраняются Т-клетками, что согласуется с теорией иммунного надзора, когда иммунная система активно ищет раковые клетки и устраняет их [3]. По мере роста опухоли включаются механизмы, связанные с ангиогенезом и локальным воспалением, что ведет к сильному иммунному ответу с вовлечением NKT, NK, $\gamma\delta$ Т-клеток, макрофагов и дендритных клеток, продуцирующих IFN- γ [1, 3]. IFN- γ создает прямые и непрямые механизмы клеточной гибели и, как следствие, ведет к образованию клеточного детрита, который попадает в лимфатические узлы, где дендритные клетки косвенно активируют CD4 и CD8 Т-клетки. В конечном итоге, CD4 и CD8 Т-клетки мигрируют к опухолевому очагу, чтобы «убить» опухолевые клетки [4].

Фаза «равновесия» наступает тогда, когда раковые клетки погибают с той же скоростью, с какой происходит их рост. Если оставшиеся после фазы «элиминации» опухолевые клетки мутируют и размножаются таким образом, что динамическое равновесие сдвигается в сторону роста опухоли, то, согласно Дарвиновской эволюции, те клетки, которые приспособились к иммунному ответу, могут размножаться бесконтрольно [3].

Таким образом, фаза «ускользания» из-под иммунного надзора происходит, когда раковые клетки становятся неузнаваемыми для иммунной системы, посредством мутаций в генах или под влиянием эпигенетических факторов. Процесс дальнейшего подавления иммунного контроля продолжается путем формирования микроокружения опухоли [3].

Мутации на клеточной мембране, которые не распознаются иммунной системой, представляют особый интерес для иммунотерапии. Необходимо понимать, что процесс распознавания лимфоцитами целого спектра антигенов, которые могут быть различны по своей иммуногенности, не представляется возможным рассматривать в простой бинарной системе.

История. Концепция создания химерного антигенного рецептора принадлежит G. Gross и его коллегам, которые в 1989 г. обнаружили возможность перенаправлять Т-клеточный ответ с помощью сконструированного искусственного рецептора. Это исследование заложило основу для разработки CAR первого

поколения клеток [5]. Годы последовательных и масштабных испытаний ознаменовались первым успешным клиническим применением CAR Т-клеток 1-го поколения (α -GD2 CAR), о котором в 2008 г. сообщили M. Brenner et al.: у трех из 11 пациентов с нейробластомой была достигнута полная ремиссия заболевания [6, 7]. С этого момента началось бурное развитие данной биотехнологии.

Химерный антигенный рецептор. Химерный антигенный рецептор состоит из внеклеточного домена — одноцепочечного вариабельного фрагмента антитела (single-chain variable fragment, scFv) и внутриклеточных сигнальных доменов, состоящих из ζ -цепи CD3 и дополнительных ко-стимулирующих молекул. Вне- и внутриклеточный домены связаны с помощью внеклеточного шарнира (spacer) и трансмембранного домена. Активация Т-клеток происходит в процессе передачи сигнала от внеклеточного домена, который распознает ассоциированный с опухолью антиген (tumor associated antigen, TAA), через трансмембранный домен на внутриклеточный [7]. Такая структура CAR заставляет Т-лимфоциты специфически реагировать на опухолевые клетки с избранными антигенами.

В настоящее время существует 4 поколения CAR, отличающихся между собой по строению внутриклеточного домена. Внутриклеточный домен химерных рецепторов 1-го поколения состоит только из ζ -цепи CD3, в то время как у химерных рецепторов 2-го и 3-го поколений он состоит из одной или двух костимулирующих молекул, таких как CD27, CD28, CD134 (OX-40), CD137 (4-1BB) [7]. Костимулирующие молекулы усиливают литическую и пролиферативную активность CAR Т-клеток. Но, наличие второго костимулирующего домена в химерных рецепторах 3-го поколения увеличивает активность CAR Т-клеток, что приводит к усилению выброса цитокинов [1]. Это ограничило применение рецепторов 3-го поколения, в то время как химерные рецепторы 2-го поколения находятся на различных этапах клинических испытаний. Последнее, 4-е поколение — Т-клетки перенаправленные для универсального цитокин-опосредованного уничтожения (T cells redirected for universal cytokine-mediated killing, TRUCKs), которые активируют врожденную иммунную систему посредством депонирования интерлейкина-12 (ИЛ-12) в опухолевом очаге [8].

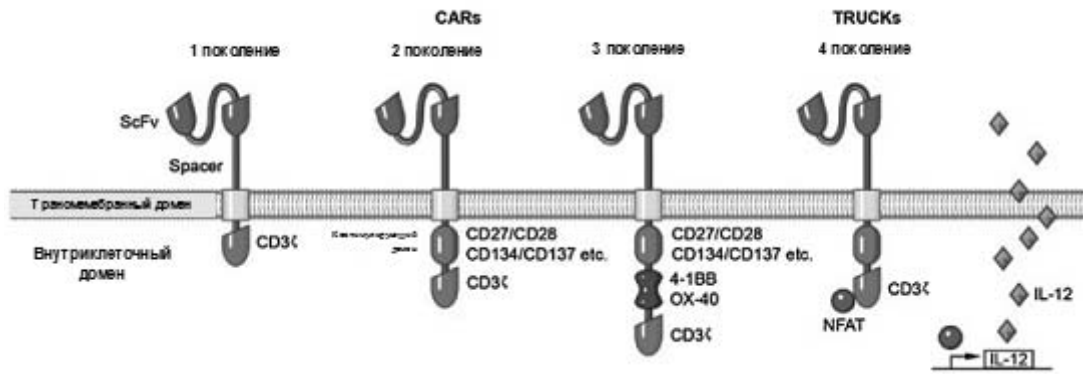


Рис. 2. Поколения химерных антигенных [1]

Приоритетом разработки внеклеточного домена является поиск подходящих мишеней, которыми обычно являются поверхностные

антигены, эпитоп которых уникален для раковых клеток.

Таблица 1

Мишени в CAR T-клеточной терапии (адаптировано из [1, 7])

Опухоль	Антигены, на которые нацелены CAR
Онкогематологические заболевания	CD19
	CD20
	CD22
	CD30
	CD33
	CD38
	CD138
	ROR1
	Lewis(Le)-T (Ley)
	α-цепь рецептора интерлейкина-3 (ИЛ-3)
	Igκ легкие цепи
	Антиген созревания В-клеток (B cell maturation antigen, BCMA) [9, 10].
Немелкоклеточный рак легких	Лиганд NKG2D [11]. Рецептор эпидермального фактора роста (Epidermal growth factor receptor, EGFR)
Меланома	HLA-A1/MAGE-A1
	Ганглиозид GD2
Нейробластома	L1-клеточная молекула адгезии (CD171)
Глиома	EGFRvIII
Рак предстательной железы	Человеческий простат-специфический мембранный антиген (Human prostate-specific membrane antigen, hPSMA)
Мезотелиома	Мезотелин
	Белок активации фибробластов (Fibroblast activation protein, FAP)
Остеосаркома	Человеческий рецептор эпидермального фактора роста (Human epidermal growth factor receptor, HER2)
	α-цепь рецептора интерлейкина-11 (ИЛ-11)
Рак шейки матки	CD44v7 и CD44v8
Желудочно-кишечные стромальные опухоли	KIT
Рак яичников	Фолатный рецептор-α (Folate receptor-α, FRα)
	Лиганд NKG2D
Опухоли брюшины	MUC16

Продолжение таблицы

Опухоль	Антигены, на которые нацелены CAR
Глиобластома	$\alpha 2$ -цепь рецептора интерлейкина-13 (ИЛ-13)
	HER2 и $\alpha 2$ -цепь рецептора ИЛ-13
Метастатический почечно-клеточный рак	Карбокси-ангидраза-IX (carboxy-anhydrase-IX, CAIX)
Аденокарцинома поджелудочной железы	Her2/neu и CD24
Рак молочной железы	ErbB2 и MUC1
Метастазирование в печень	Раковый-эмбриональный антиген (Carcinoembryonic antigen, CEA)
Универсальное воздействие	Биотин
	Изотиоцианат флюоресцин (fluorescein isothiocyanate, FITC)
Воздействие на опухолевую сосудистую сеть	VEGFR-2

Ведутся разработки тандемных CAR, внеклеточный домен которых состоит из двух разных scFv. Например, биспецифический тандем CAR — HER2 и $\alpha 2$ -цепь рецептора ИЛ-13 демонстрирует дополнительную активацию Т-клеток при встрече с обоими антигенами [12]. A. Bister et al. сообщают о потенциально эффективной комбинации CD5 и CD19 тандемного CAR у пациентов с мантийноклеточной лимфомой. Данная комбинация позволяет уменьшить воздействие на здоровые клетки, несущие на себе лишь один из этих рецепторов («on-target off-tumor» токсичность) [13].

С целью упрощения конструкции разработан концепция универсальных CAR, которые с помощью искусственных молекул-адапто-

ров (например, изотиоцианат флюоресцин (fluorescein isothiocyanate, FITC)) распознают альтернативные ТАА, что позволяет «настраивать» активность CAR Т-клеток и делает их применение более безопасным [7].

Одна из многообещающих и наиболее распространенных [14] мишеней (57 %) — рецептор CD19, который экспрессируется на большинстве как нормальных, так и опухолевых В-лимфоцитов.

Технологии производства. Существует два возможных способа получения CAR Т-клеток: *in vivo* (*in situ*) (в кровь пациента вводятся наночастицы, превращающие Т-клетки пациента в CAR Т-клетки) и *ex vivo* (производство состоит из нескольких этапов).

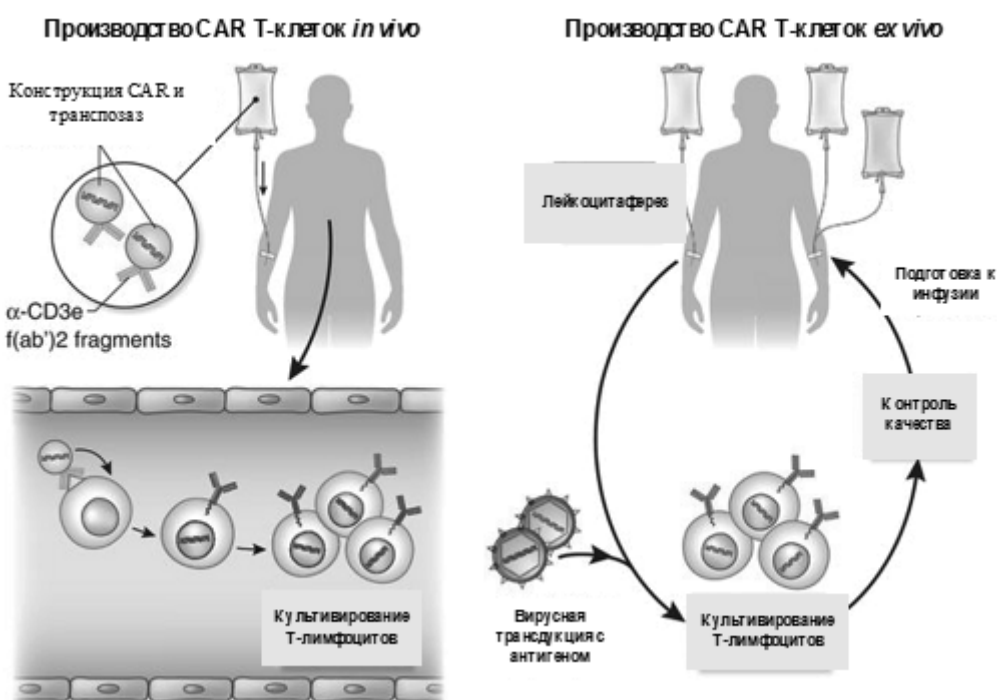


Рис. 3. Способы получения CAR Т-клеток [15]

Этапы производства CAR T-клеток *ex vivo* [16]:

- 1) лейкоцитаферез;
- 2) вирусная /невирусная трансдукция с антигеном;
- 3) культивирование до идеальной дозы от 1 до 5×10^8 клеток;
- 4) контроль продукта (качество, стерильность);
- 5) подготовка к инфузии.

Клинические исследования. Из экспериментальной технологии лечение онкологических заболеваний CAR T-клетками превращается в быстро развивающийся подход к терапии с более чем 500 зарегистрированными клиническими исследованиями при гематологических новообразованиях и солидных опухолях. При этом большинство из них проводится в США и Китае [17].

Клинические исследования CD19 CAR T-клеток показали эффективность при онкогематологических заболеваниях, включая острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) и неходжкинские лимфомы (НХЛ) [18].

Продемонстрирована активность ВСМА-CAR T-клеток у пациентов с множественной миеломой (ММ) [19, 20], начаты испытания у пациентов с лимфомой Ходжкина (ЛХ) [21, 22]. Продолжаются исследования в области применения CAR T-клеточной терапии при некоторых солидных опухолях (глиобластома, нейробластома, HER2-позитивная саркома) [23–25].

По данным систематизированного обзора и мета-анализа исследований в области CAR T-клеток за период 2008–2017 гг. [26] было опубликовано 60 исследований: 18 исследований (30 %) в области онкологии и 42 исследования в области гематологии (32 % — ОЛЛ, 18 % — НХЛ, 3 % — ОМЛ, 2 % — ХЛЛ, 2 % — ЛХ, 13 % — пациенты с двумя или более онкогематологическими диагнозами). В большинстве (57 %) — это исследования I фазы.

Аутологичные CAR T-клетки. В 2017 году Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило первые два препарата для CAR T-клеточной терапии: Kimriah™ (tisagenlecleucel, CTL019, Novartis) [27] для лечения пациентов до 25 лет с рецидивирующими или рефрактерными (P/P) формами пре-B-клеточного острого лимфобластного лейкоза (пре-B-ОЛЛ) [28] и для лечения взрослых пациентов с P/P формами

диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы (ДКВКЛ) [29] и Yescarta™ (axicabtagene ciloleucel, Kite Pharma/Gilead) [30], для лечения взрослых пациентов с P/P формами ДКВКЛ [31]. Оба препарата являются CD19-CAR2-го поколения, с отличием в использованном векторе на этапе производства: лентивирусный вектор — Kimriah™, ретровирусный — Yescarta™. Другие CAR T-клетки являются исследовательскими продуктами в рамках международных или локальных клинических испытаний.

По данным многоцентрового исследования Yescarta™ II фазы у взрослых пациентов с рефрактерной формой ДКВКЛ (Zuma 1) частота общего ответа (ЧОО) составила 82 %, полной ремиссии (ПР) — 54 %. За период наблюдения (медиана — 15,4 месяца) у 40 % пациентов ПР сохраняется [32].

В исследовании Kimriah™ II фазы у пациентов с В-ОЛЛ ЧОО составила 81 %, ПР с отсутствием минимальной остаточной болезни (МОБ-негативная) — 60 %, МОБ-негативная ПР с не полностью восстановившимся кроветворением — 21 %. Бессобытийная выживаемость (БСВ) и общая выживаемость (ОВ) на период наблюдения 6 месяцев составили 73 % и 90 %, соответственно, а на период 12 месяцев: БСВ — 50 %, а ОВ — 76 % [28].

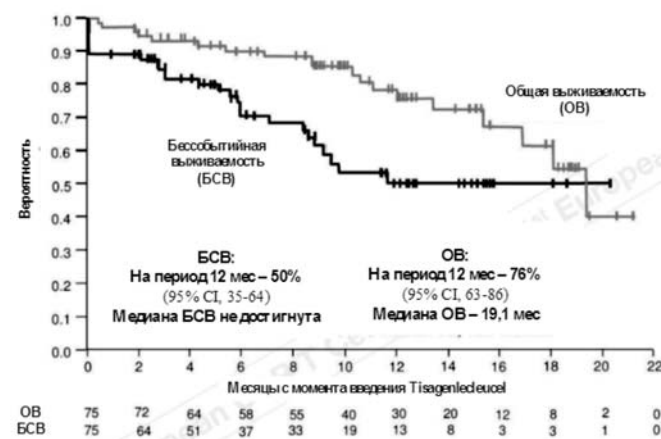


Рис. 4. Бессобытийная и общая выживаемости у пациентов с В-ОЛЛ при проведении терапии Kimriah™ [28]

Побочные эффекты терапии. Лечение онкологических заболеваний без возникновения токсичности и нежелательных явлений — редкость. Аутологичная CAR T-клеточная терапия не исключение, она имеет серьезные побочные эффекты и различный профиль токсичности.

Наиболее распространенными побочными эффектами являются:
 синдром выброса цитокинов («цитокиновый шторм»);
 нейротоксичность;
 синдром лизиса опухоли;
 аллергические реакции;
 В-клеточная аплазия.

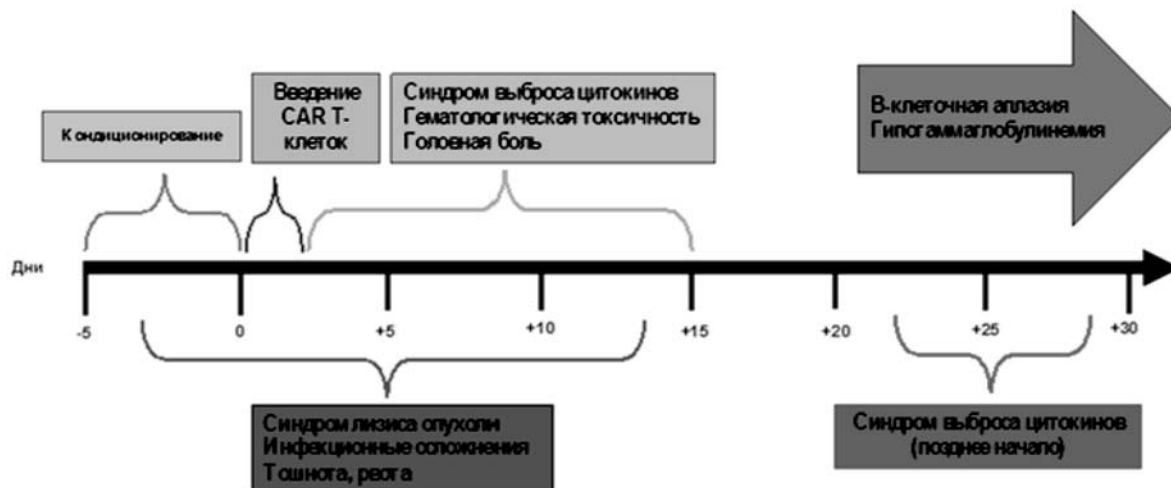


Рис. 5. Сроки возникновения токсичности [32, 33]

Таблица 2

Частота синдрома выброса цитокинов и нейротоксичности (адаптировано из [34])

Исследование	Продукт	Заболевание	Синдром выброса цитокинов, степень 3/4	Нейро-токсичность, степень 3/4
ZUMA-1	Yescarta™	ДВККЛ и ПМВКЛ	13%	28%
Transcend	Tisagenlecleucel	ДВККЛ	1%	15%
Juliet	Kimria™	ДВККЛ	22%	12%
CRB-401	BB2121	ММ	2%	<1%

Синдром выброса цитокинов (СВЦ) — это жизнеугрожающее состояние, основными проявлениями которого являются гипотензия, гипоксия, лихорадка и неврологические нарушения. Данное осложнение развивается в период от 1 до 10 дней (медиана — 3 дня) [34]. Факторами риска являются высокая опухолевая нагрузка, наличие активной инфекции на момент начала CAR T-клеточной терапии. Нейротоксичность развивается в течение 8 недель после введения препарата: медиана — 7 дней для пре-В-ОЛЛ и 12 дней для ДВККЛ [34].

Основные проявления — изменение уровня сознания, галлюцинации, делирий, афазия, атаксия, судороги, тремор. В-клеточная аплазия обусловлена деплецией пула нормальных В-лимфоцитов.

Проблемы CAR T-клеточной терапии и пути их преодоления. Возникновение рецидивов заболевания связано со снижением количества CD19 CAR T-клеток в крови пациента, либо обусловлено потерей экспрессии CD19 на поверхности опухолевых клеток.



Рис. 6. Причины потери эффективности CAR T-клеточной терапии (адаптировано из [35])



Рис. 7. Пути повышения эффективности CAR T-терапии (адаптировано из [35])

Заключение. Адоптивная иммунотерапия с использованием генно-модифицированных Т-лимфоцитов, безусловно, стала прорывным направлением в медицине и квинтэссенцией современной парадигмы онкологии и не только ведет к персонализированной медицине, но и дает надежду на значительное улучшение результатов лечения. Данные биотехнологии требуют высоких материальных (автоматизация технологического процесса), интеллектуальных и организационных ресурсов, что предполагает их возможную реализацию (во всяком случае, на первоначальном этапе

освоения) лишь в крупных научных центрах. Необходимо повышение как эффективности, так и безопасности применения CAR T-клеток. В то же время, предстоит решить один из немаловажных вопросов: управляемость CAR T-клетками во временных, пространственных и функциональных измерениях. Нельзя отрицать, что адоптивная Т-клеточная иммунотерапия обладает потенциально высокой эффективностью. К сожалению, несмотря на то, что появление CAR T-клеточной терапии открывает новые возможности лечения пациентов с онкологическими заболеваниями, частота

достижения ответа ограничена, а появление рецидивов не редко. В терапии солидных опухолей успехи менее впечатляющие, чем в онкогематологии, что связано с особенностями биологии солидных опухолей и нерешенными вопросами стимулирования инфильтрации и персистенции CAR T-клеток в опухолевом микроокружении. Тем не менее, адоптивная иммунотерапия находится в начале своего пути, и, возможно, пришло время для более тщательной оценки способов влияния на иммунную систему, которые позволят повысить эффек-

тивность и минимизировать неблагоприятные явления связанные с CAR T-клеточной терапией в будущем. Вероятно, дальнейшие клинические исследования терапии CAR T-клетками будут направлены не столько на преодоление рефрактерности опухоли к стандартным программам лечения, сколько на решение проблемы эрадикации остаточного опухолевого клона на ранних этапах терапии, что откроет перспективы к излечению онкологических заболеваний в условиях реальной клинической практики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith AJ, Oertle J, Warren D, Prato D. Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *Journal of cellular Immunotherapy*. 2016;2:59–68.
2. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331:1565–70.
3. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3:991–8.
4. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2011;410:1107–11.
5. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci Unit States Am*. 1989;86(24):10024–8.
6. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*. 2008;14(11):1264.
7. Wen Si, Cheng Li, Ping Wei. Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 2018;3: 179–85.
8. Chmielewski M, Abken H. Trucks: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15: 1145–54.
9. Antonana-Vidosola A, Perez-Amill L, Sune G, Castella M, Najjar A, Lozano E, Urbano-Ispizua A, Martin-Antonio B. BCMA CAR T-cell immunotherapy beyond myeloma: a novel target to fight B-cell non-Hodgkin lymphoma. 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris. PI17/01043.
10. Perez-Amill L, Sune G, Antonana-Vidosola A, Najjar A, Castella M, Lozano E, Urbano-Ispizua A, Martin-Antonio B. Pre-clinical evaluation of murine versus humanized BCMA-chimeric antigen receptor modified T cells (ARI2) for Multiple Myeloma treatment. 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris. PI17/01043, PI14/00798.
11. Leivas A, Valeri A, Rio P, Garcia-Ortiz A, Pacello ML, Perez-Martinez A, Lee D, Martinez-Lopez J. NKG2D-CAR transduced primary natural killer cells efficiently target multiple myeloma cells. 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris.
12. Hegde M, Mukherjee M, Grada Z, Pignata A, Landi D, Navai SA, et al. Tandem CAR T cells targeting HER2 and IL13Ralpha2 mitigate tumor antigen escape. *J Clin Invest*. 2016;126(8):3036–52.
13. Bister A, Haist C, Schulte E, Scheckenbach K, Hanenberg H, Gattermann N, Wiek C. Dual targeting to reduce on-target off-tumor toxicities in CAR T-cell therapy for mantle cell lymphoma. 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris.
14. Grigor EJM, Fergusson D, Kekre N, et al. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Transfusion Medicine Reviews*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.01.005>.

15. Olweus J. Manufacture of CAR-T cells in the body. *Nature Biotechnology*. 2017;35:520–1.
16. Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, Zhang Y, Wu M. The application of CAR T-cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(4):539–551.
17. Li Y, Huo Y, Yu L et al. Quality Control and Nonclinical Research on CAR-T Cell Products: General Principles and Key Issues, Engineering. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.12.003>.
18. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.002>.
19. Brudno JN, Maric I, Hartman SD, Rose JJ, Wang M, Lam N, et al. T cells genetically modified to express an anti-B-cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol* Aug. 2018;36(22):2267–80.
20. Mikkilineni L, Kochenderfer JN. Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood*. 2017;130:2594–602.
21. Wang CM, Wu ZQ, Wang Y, Guo YL, Dai HR, Wang XH, et al. Autologous T cells expressing CD30 chimeric antigen receptors for relapsed or refractory hodgkin lymphoma: an open-Label phase I trial. *Clin Cancer Res*. 2017;23:1156–66.
22. Ramos CA, Ballard B, Zhang H, Dakhova O, Gee AP, Mei Z, et al. Clinical and immunological responses after CD30-specific chimeric antigen receptor-redirected lymphocytes. *J Clin Invest*. 2017;127(9):3462–71.
23. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of glioblastoma after chimeric antigen receptor T-cell therapy. *N Engl J Med*. 2016;375:2561–9.
24. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;118:6050–6.
25. Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor- modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol*. 2015;33:1688–96.
26. Grigor EJM, Fergusson D, Kekre N, et al. Risks and Benefits of Chimeric Antigen Receptor T-Cell (CAR-T) Therapy in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.01.005>.
27. Novartis (2017) Prescribing Information (Kymriah®). Available at: <https://www.pharma.us.novartis.com/sites/www.pharma.us.novartis.com/files/kymriah.pdf>
28. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378(5):439–48.
29. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak O, et al. Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2017;377:2545–54.
30. Yescarta® (2017) Prescribing Information. Available at: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM581226.pdf>
31. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531–44.
32. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, Wierda W, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Rev Clin Oncol*. 2018; 15: 47–62.
33. Shank BR. Management of CAR T-cell Adverse Effects in hematological malignancies. HOPA Annual meeting. 2018 March.
34. Ellard R, 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris.
35. Vickers E. What is driving CARs into the spotlight?-the science simplified. 1st European CAR T-cell meeting, 14–16 February 2019, Paris.

**А. О. Абдуллаев, Е. А. Степанова, О. А. Шухов,
Е. Ю. Челышева, И. С. Немченко, А. Г. Туркина, А. Б. Судариков**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва*

НОВЫЕ МУТАЦИИ КИНАЗНОГО ДОМЕНА BCR-ABL1 У ПАЦИЕНТОВ, РЕЗИСТЕНТНЫХ КО ВСЕМ ПОКОЛЕНИЯМ ПРЕПАРАТОВ ИТК

Введение. Появление ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) проложило путь эпохе таргетной терапии хронического миелолейкоза и Ph⁺ (Philadelphia positive) острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Гливек (STI-571, Glivec) стал первым таргетным препаратом ИТК с высокой ингибирующей эффективностью Bcr-Abl1 тирозинкиназы. Однако у части пациентов со временем наблюдалась потеря терапевтического эффекта, обусловленная появлением клона клеток с мутацией КД (киназного домена) гена BCR-ABL1. Исследование молекулярных механизмов резистентности к Гливеку привело к разработке высокоэффективных препаратов ИТК, таких как Дазатиниб, Нилотиниб, Бозутиниб и Понатиниб. Тем не менее, многолетний клинический опыт применения различных поколений ИТК показал неограниченную изобретательность природы — таргетное подавление одного клона приводит к появлению новых клонов с ранее не описанными мутациями.

Цель. Поиск новых мутаций КД BCR-ABL1 у пациентов ХМЛ и Ph⁺ ОЛЛ, резистентных к препаратам ИТК нескольких поколений.

Материалы и методы. Для молекулярно-генетического анализа использованы образцы

мРНК выделенные из клеток крови и костного мозга 52 пациентов ХМЛ и 12 пациентов с Ph⁺ ОЛЛ. Обратная транскрипция проводилась с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-L», по инструкции изготовителя («Интерлабсервис», Россия). В первом раунде амплифицировали участок кДНК BCR-ABL1 включающий 13 экзон BCR и 11 экзон ABL1. Во втором раунде получали фрагмент длиной 731 пн., включающий 4–8 экзоны ABL1. Амплификацию необходимого фрагмента, очистку и прямое секвенирование по Сэнгеру проводили с использованием набора реагентов компании «Синтол» (Россия) согласно инструкции производителя.

Результаты. Среди исследованных пациентов, резистентных к нескольким поколениям препаратов ИТК, были выявлены две новые мутации BCR-ABL1. del. c.1086–1270 (p. R362fs*21) с p. E282Q и BCR-BL. c908_1085del. (p. G303fs*26).

Выводы. Мутации BCR-ABL1. del. c.1086–1270 (p. R362fs*21) с p. E282Q и BCR-BL. c908_1085del. (p. G303fs*26) у пациентов ХМЛ и Ph⁺ ОЛЛ могут быть причиной резистентности к препаратам ИТК нескольких поколений.

**Т. В. Абрамова, Т. Н. Обухова, Л. П. Менделеева, Е. О. Грибанова,
М. В. Соловьев, М. В. Фирсова, С. М. Куликов, Ю. А. Чабаева, И. В. Гальцева, В. Г. Савченко**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва*

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. Множественная миелома (ММ) имеет сложную генетическую структуру. Многочисленные зарубежные исследования по изучению ММ демонстрируют важность результатов цитогенетического исследования для определения прогноза заболевания. Одним из ключевых вопросов в этой области является влияние хромосомных нарушений на клиническое течение заболевания и результаты лечения.

Цель. Изучить спектр и частоту встречаемости хромосомных aberrаций у больных ММ, корреляцию клинико-лабораторных параметров с цитогенетическими нарушениями, а также клинические особенности течения ММ в зависимости от наличия цитогенетических нарушений.

Материалы и методы. В исследование включены 134 пациента с ММ (соотношение муж.: жен. — 67:67) в возрасте от 27 до 80 (медиана

57) лет. Диагноз был установлен в соответствии с критериями IMWG (2014 г.). До начала терапии больным выполнено FISH-исследование с центромерными и локус-специфичными ДНК-зондами для выявления $t(11;14)$, $t(4;14)$, $t(14;16)$, $t(14;20)$, $(6;14)$, гипердиплоидии (трисомий 5,9,15), делеции 13q14/моносомии 13 ($del13q14/-13$), делеции 17p13/TP53 ($del17p13/TP53$), амплификации 1q21 ($amp1q21$), транслокаций с вовлечением локуса гена $cMYC/8q24$ ($t(8q24)/cMYC$). Медиана наблюдения за больными составила 20 мес (3,2–77,4). Согласно системе D-S: I стадия — у 8 (6%), II — у 41 (30,6%), III — у 85 (63,4%) больных. У 41 (30,6%) больного диагностирована подстадия В. Секрция парапротеина G выявлена у 70 (52,3%), парапротеина А — у 25 (18,7%), биклональная секрция — у 3 (2,2%), М-протеин — у 1 (0,7%) пациента. Секрция свободных легких цепей определена у 34 (25,4%) больных. Несекретирующая миелома диагностирована у 1 пациента (0,7%). По шкале ISS: I стадия — у 27 (20,1%), II — у 38 (28,4%), III — у 68 (50,8%) больных, у 1-го (0,7%) нет данных. Повышение концентрации кальция более 2,75 ммоль/л отмечалось у 29 (21,6%); активности ЛДГ относительно нормальных значений (более 378 Е/л) — у 58 (43,3%); повышение концентрации $\beta 2$ -микроглобулина ($\beta 2$ -МГ) свыше 5,5 мг/л — у 68 (50,8%); анемия с уровнем гемоглобина ниже 100 г/л — у 56 (41,8%) пациентов. Индукционная терапия выполнялась бортезомиб-содержащими курсами. Количество индукционных курсов составляло от 4 до 10 (медиана 8). Трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) выполнена 37,3% пациентам ($n = 50$).

Результаты. В дебюте ММ частота первичных хромосомных нарушений составила 88,8%, среди них $t(14q32)/IGH$ — 42,5%, множественные трисомии — 57,5%, их сочетание — 11,2%, $t(11;14)$ — 16,4%, $t(4;14)$ — 12,7%, $t(14;16)$ и $t(14;20)$ — 3,7% и 2,2%, соответственно. Частота вторичных хромосомных нарушений составила 69,4%, среди них $del13q14/-13$ — 40,3%, $amp1q21$ — 39,6% (в 32 случаях (60,4%) выявлена 1 дополнительная копия локуса 1q21, в 21 (39,6%) — 2 и более дополнительные копии

1q21), $t(8q24)/cMYC$ — 17,2%, $del17p13/TP53$ — 12,7%, $del1p32$ — 2,2%. Анализ сочетания первичных и вторичных хромосомных нарушений достоверно доказал ($p < 0,05$), что вторичная абберация $del13q14/-13$ чаще отмечена в сочетании с первичной $t(4;14)$ и реже — с множественными трисомиями. Вторичная абберация $amp1q21$ чаще обнаружена одновременно с $t(4;14)$ и реже — с $t(11;14)$ ($p < 0,05$). Выявлено, что у больных с $t(4;14)$ достоверно чаще ($p < 0,05$) диагностировали анемию ниже 100 г/л, а при наличии $amp1q21$ и $del17p13/TP53$ — повышенную активность ЛДГ. Абберация $t(8q24)/cMYC$ чаще сопровождалась повышенной концентрацией $\beta 2$ -МГ ($p < 0,05$).

Показано, что наличие резистентности опухоли к бортезомиб-содержащей терапии ассоциировано с $t(8q24)/cMYC$ ($p < 0,0001$). Доказано негативное влияние $del17p13/TP53$ и $t(8q24)/cMYC$ на показатели общей выживаемости (ОВ) больных ММ. Так, 3-х летняя ОВ при наличии $del17p13/TP53$ составила 35,5% против 71,3% без неё ($p = 0,002$), а при наличии $t(8q24)/cMYC$ — 50,8% против 67% без неё ($p = 0,001$). Установлено неблагоприятное влияние $amp1q21$ при наличии двух и более дополнительных копий локуса 1q21 ($p < 0,05$) на ОВ и выживаемости без прогрессии (ВБП). Так, у больных без $amp1q21$, с одной дополнительной копией 1q21 или с двумя и более дополнительными копиями 1q21 5-летняя ОВ составила 79,4%, 67,3%, 20,9%, соответственно, а 2-х летняя ВБП — 83%, 50% и 0%, соответственно. Выполнение ауто-ТГСК повышает показатели ОВ больных ММ, однако не нивелирует неблагоприятное влияние $del17p13/TP53$, $t(8q24)/cMYC$ и $amp1q21$ с двумя и более дополнительными копиями локуса 1q21.

Выводы. Наличие резистентности к терапии бортезомиб-содержащими курсами ассоциировано с $t(8q24)/cMYC$. $Del17p13/TP53$, $t(8q24)/cMYC$ и $amp1q21$ при наличии двух и более дополнительных копий локуса 1q21 достоверно влияют на ОВ больных ММ. $amp1q21$ при наличии двух и более дополнительных копий локуса 1q21 в дебюте заболевания является прогностически значимой для больных ММ, отрицательно влияя на ВБП.

З. П. Асауленко¹, И. Н. Спиридонов¹, А. А. Селентьева¹,
Л. Б. Полушкина², А. И. Лепский³, Ю. А. Криволапов¹

¹ Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГИСТОТОПОГРАФИИ МЕГАКАРИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ JAK2 ИЛИ CALR

Введение. Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) относится к группе «Rh-негативных» хронических миелопролиферативных новообразований и характеризуется пролиферацией мегакариоцитарного ростка с увеличением количества крупных зрелых мегакариоцитов с гиперлобулярными ядрами и отсутствием значительной гиперплазии или «сдвига влево» элементов гранулоцитопоза, эритропоза. Более чем у 80 % больных ЭТ встречаются альтернативные мутации — JAK2 и CALR. Доказана прогностическая значимость этих мутаций, но связь мутационного профиля с особенностями строения мегакариоцитарного ростка при ЭТ остается изученной недостаточно. Наиболее точными и объективными инструментами для оценки пространственного расположения мегакариоцитов являются методы исследования с применением алгоритмов кластеризации данных, что позволяет считать актуальной представленную работу. Характеристики пространственного расположения мегакариоцитов необходимы для разработки алгоритмов машинного обучения в научных и практических целях.

Цель. Оценить среднее количество (СК) мегакариоцитов, СК мегакариоцитарных кластеров, СК мегакариоцитов в одном кластере, СК кластеров в 1 мм² и СК мегакариоцитов в 1 мм² в биопсиях костного мозга у больных ЭТ с подтвержденной мутацией JAK2 или CALR.

Материалы и методы. Исследовали 60 биопсий костного мозга больных ЭТ, которые были разделены на две группы: больные с мутацией JAK2 (N=30) и больные с мутацией CALR (N=30). Гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином или азуром и эозином, с помощью сканера Pannoramic 250 Flash III переводились в цифровой формат. В программе Pannoramic Viewer (3DHISTECH) определяли координаты каждого мегакариоцита на срезе

и экспортировали в виде таблицы. Дальнейшая обработка координат с целью анализа пространственных особенностей расположения мегакариоцитов в костном мозге была выполнена на языке программирования Python с помощью алгоритма кластеризации DBSCAN (Density-based spatial clustering of applications with noise). Для анализа использовались следующие параметры алгоритма: минимальное количество соседних мегакариоцитов, необходимых для образования кластера — 3, максимальное расстояние между ними — 100 мкм, расстояние между мегакариоцитами — евклидово. Для описания связи гистотопографических характеристик мегакариоцитов с мутационным статусом использовали логистический регрессионный анализ.

Результаты. Были получены следующие гистотопографические характеристики мегакариоцитов у больных ЭТ с мутацией JAK2: СК мегакариоцитов — 593.6±334.2, СК мегакариоцитарных кластеров — 62.8±30.9, СК мегакариоцитов в одном кластере — 5.9±2.3, СК кластеров в 1 мм² — 2.24±1.03, СК мегакариоцитов в 1 мм² — 21.30±12.62. Гистотопографические характеристики мегакариоцитов у больных ЭТ с мутацией CALR: СК мегакариоцитов — 816.5±484.2, СК мегакариоцитарных кластеров — 83.9±39.5, СК мегакариоцитов в одном кластере — 7.2±2.9, СК кластеров в 1 мм² — 2.09±0.96, СК мегакариоцитов в 1 мм² — 20.15±9.76. Модель логистической регрессии на основе данных кластеризации была статистически значима ($\chi^2(5)=24.73$, $p=0.003$, Nagelkerke $R^2=44.4\%$) и в 80.3 % случаев правильно классифицировала наличие мутации JAK2 или CALR. Коэффициент при свободном члене — 5.86(1.90). Включенные переменные: СК мегакариоцитов в одном кластере (-1.38(0.45), p -value=0.002, отношение шансов — 0.25, 95 % ДИ 0.10–0.61), СК мегакариоци-

тов на мм² (0.62(0.30), p-value=0.04, отношение шансов — 1.87, 95 % ДИ 1.03–3.39).

Выводы. Выявленные с помощью алгоритма кластеризации DBSCAN различия гистотопографических характеристик мегакариоцитов

при исследовании биопсий костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией с мутацией JAK2 или CALR позволяют связать мутационный статус и особенности строения мегакариоцитарного ростка.

**З. П. Асауленко¹, И. Н. Спиридонов¹, А. А. Селентьева¹,
Л. Б. Полушкина², Ю. А. Криволапов¹**

¹ Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург

ОЦЕНКА КОЛОКАЛИЗАЦИИ МЕГАКАРИОЦИТОВ И СОСУДОВ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА В БИОПТАТАХ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ С МУТАЦИЕЙ JAK2 ИЛИ CALR

Актуальность исследования. Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) относится к группе «Rh-негативных» хронических миелопролиферативных новообразований. У 61,7 % больных ЭТ можно обнаружить мутацию JAK2, частота встречаемости мутации CALR — 21 %, в 3,9 % случаев удается выявить мутацию MPL, остальные случаи заболевания в настоящее время считают «трижды-негативными». Интерес представляет изучение JAK2 и CALR-позитивных случаев ЭТ, так как эти альтернативные мутации встречаются более чем у 80 % больных. Для ЭТ характерны особенности строения мегакариоцитарного ростка: отсутствие тропности мегакариоцитов к поверхности костных балок, образование «рыхлых» кластеров, в то время как взаиморасположение мегакариоцитов и сосудов микроциркуляторного русла остается изученными недостаточно, что определило цель этой работы.

Цель. Установить и оценить выраженность колокализации мегакариоцитов и сосудов микроциркуляторного русла в биоптатах костного мозга у больных эссенциальной тромбоцитемией с обнаруженной мутацией JAK2 или CALR.

Материалы и методы. Исследовано 30 биопсий костного мозга больных ЭТ: больные с мутацией JAK2 (N=15) и больные с мутацией CALR (N=15). Гистологические срезы костного мозга, окрашенные в реакции с антителом к CD34 (клон QBEnd/10), с помощью сканера Panoptomic 250 Flash III переводились в цифровой формат. В каждом биоптате костного

мозга на случайно выбранном информативном участке длиной до 1 см определялись координаты всех мегакариоцитов и микрососудов, которые экспортировали в MS Office Excel для дальнейшего анализа в MosaicIA (плагин ImageJ). Для определения колокализации мегакариоцитов и сосудов микроциркуляторного русла в биоптатах костного мозга оценивали параметрический потенциал Хернквиста: при значении «силы взаимодействия» (Str) больше нуля, гипотеза о наличии колокализации принимается. Для опровержения нулевой гипотезы о случайном расположении мегакариоцитов и кровеносных микрососудов в биоптатах костного мозга использовали метод Монте-Карло.

Результаты. У больных ЭТ с мутацией CALR колокализация мегакариоцитов и кровеносных микрососудов была выявлена во всех случаях, среднее значение Str (Str) (стандартное отклонение — CO) = 15.9 (10.8). При ЭТ с мутацией JAK2 в одном случае гипотеза о наличии колокализации была опровергнута (Str < 0), в остальных случаях Str (CO) = 11.3 (5.6). При ЭТ с мутацией CALR мегакариоциты располагались ближе к сосудам микроциркуляторного русла, чем при ЭТ с мутацией JAK2, но различия не были статистически значимыми (p=0.164).

Выводы. При эссенциальной тромбоцитемии с мутацией JAK2 и CALR мегакариоциты сосудов микроциркуляторного русла имеют тенденцию к близкому расположению, что влияет на морфологическую картину заболевания.

Ю. Ю. Ассесорова, Б. Р. Алланазарова, Л. К. Мустафина, Н. С. Пулатова

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

СЛУЧАЙ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА С РЕДКОЙ РЕАРАНЖИРОВКОЙ ХРОМОСОМЫ 11, АССОЦИИРУЕМОЙ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ И МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Введение. $inv(11)(p15q22)$ является рекуррентной хромосомной аномалией, ассоциируемой с реаранжировкой генов *NUP98* и *DDX10*. В мире описано всего тринадцать случаев гемобластозов, при которых была выявлена данная хромосомная инверсия, представленных, главным образом, *de novo* ОМЛ и МДС, а также ОМЛ, связанным с терапией. Случай выявления $inv(11)(p15q22)$ при ХМЛ до настоящего времени был единственным, при этом реаранжировка была выявлена у больного с заболеванием в стадии бластного криза. Настоящим сообщением мы представляем еще один случай появления $inv(11)(p15q22)$ у больного с Ph-положительным, *BCR-ABL*-положительным ХМЛ.

Материалы и методы. Исследование кариотипа больного ХМЛ с клиническими признаками хронической стадии заболевания было выполнено стандартным цитогенетическим анализом методом GTG-бэндинга. Биологическим материалом для цитогенетического исследования был костный мозг (2,0 мл), полученный при стерильной пункции. Дифференцированная сегментация хромосом составляла 350 бэндов на кариотип. Всего было проанализировано 58 метафазных пластинок.

Результаты. При цитогенетическом исследовании было установлено, что 100 % бластных клеток пациента содержали дериваты хромосом 9 и 22. Кроме того, у пациента обнаружен Ph-положительный клеточный клон (29 % [17/58]), в котором был выявлен дериват хромосомы 11. Структурное изменение затрагивало как длинное, так и короткое плечи

11-й хромосомы: область терминального эухроматинового фрагмента q-плеча оказалась укороченной, тогда как терминальный эухроматиновый регион p-плеча — увеличенным с визуальным «смещением» темноокрашенного бэнда к прицентромерной области. При этом дериват приобрел метацентрическую форму, тогда как неизменная хромосома 11 относится к субметацентрическим хромосомам. Относительный размер длины p- и q-плечей деривата хромосомы 11 и ее гомолога, не затронутого перестройкой, сравнительная оценка типа хромосомы по форме и расположение бэндов, позволили определить цитогенетические регионы разрывов. Место поломки на коротком плече располагалось в локусе 15 (11p15), а на длинном плече — в локусе 22 (11q22). Таким образом, у Ph-положительного/*BCR-ABL*-положительного больного ХМЛ методом GTG-бэндинга была установлена дополнительная хромосомная реаранжировка — $inv(11)(p15q22)$.

Выводы. Появление дополнительных хромосомных перестроек в кариотипе пациентов является проявлением клональной эволюции и может свидетельствовать о переходе заболевания из хронической стадии в стадию акселерации до клинической манифестации признаков прогрессии. Таким образом, обсуждаемый случай представляет редкую для ХМЛ реаранжировку хромосомы 11, указывает на возможность прогрессии заболевания и показывает значимость цитогенетического исследования на основе GTG-бэндинга для выявления доклинических признаков клональной эволюции.

О. У. Ачилова, Г. З. Кузиева, А. А. Каюмов

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

ЧАСТОТА РАЗВИТИЯ ДИАЛИЗЗАВИСИМОЙ НЕФРОПАТИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВИДА СЕКРЕЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Введение. Множественная миелома — онкогематологическое заболевание, характеризующееся синтезом патологического иммуноглобулина. Одно из осложнений болезни — миеломная нефропатия. Единственным видом лечения этого заболевания является полихимиотерапия (ПХТ), однако в условиях азотемии проведение ПХТ приводит к большим осложнениям. Экстракорпоральная детоксикация крови (гемодиализ) является необходимым дополнением к плановой ПХТ при миеломной нефропатии.

Цель. Изучение частоты развития диализзависимой нефропатии в зависимости от вида секреции моноклонального иммуноглобулина при множественной миеломе (ММ) и оценка результатов применения заместительной почечной терапии (гемодиализа) совместно с программной ПХТ.

Материалы и методы. Исследование проводилось в отделении терапии стволовыми клетками при Научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Республики Узбекистан. Всего в исследовании участвовало 35 больных с множественной миеломой, осложненной острой почечной недостаточностью (в стадии IIB и IIIB). Гемодиализ проводился по программе ОПН на аппарате Fresenius в специализированных отделениях. Параллельно проводилась полихимиотерапия (ПХТ) согласно стандартному протоколу. Стандартом ПХТ принят курс VCD: бортезомиб 1.3 мг/м² 1,4,8,11 день, Циклофосфамид 400 мг в/в капельно 1,4,8,11 день, Дексаметазон 40 мг 1–4 день. Проводилось 4 индукционных курса и трем больным консолидация аутоТКМ, остальным — курс поддержки ремиссии Леналидомидом 25 мг п.о. длительностью 21 день (28-дневный цикл) до прогрессии.

Результаты. Среди пациентов с миеломой секреция моноклонального иммуноглобулина IgG встречалась у 21 пациента (60 % случаев), моноклонального иммуноглобулина IgA у 4-х (11 % случаев). Среди больных с секрецией IgA миеломная нефропатия развилась у 3х пациен-

тов (т.е. 75 %). У пациентов с секрецией IgG нефропатия встречалась реже, у 12-ти пациентов (50 %). Снижение дозы дексаметазона с 40 мг до 20 мг позволило уменьшить инфекционные и катаболические осложнения, не влияя на выход в ремиссию. К стандартной химиотерапии добавлен курс гемодиализа 2 раза в неделю. Гемодиализ проводился за 1 день до химиотерапии, затем в 3,7,10-й дни. На момент обращения полная анурия наблюдалась у 5-ти пациентов. Но при тщательном сборе анамнеза удалось выявить что эпизод анурии от 1 до 3-х дней наблюдался у всех 35 больных.

Полная ремиссия болезни достигнута у 3 пациентов, очень хороший гематологический ответ у 7, частичный ответ — у 12 человек. Почечный ответ был достигнут у 3х пациентов. У всех остальных сохранялась ХПН в интермиттирующей стадии. Наибольшее снижение показателей креатинина и мочевины наблюдалось в течение первых 8–9 недель. Затем улучшить показатели почек не удалось. Следовательно, повреждения структурных единиц почки после указанного срока приобретают необратимый характер. Среди пациентов с сохранившейся нефропатией диализзависимой формой 3 пациента с секрецией Ig A. Во время наблюдения были и летальные случаи (4 пациента (11 %) умерли в течении 1 года).

Выводы. При моноклональной секреции IgA миеломная нефропатия встречается в 75 % случаев и, в большинстве случаев, почечный синдром является единственным проявлением болезни. Нефропатия, развившаяся у пациентов ММ с секрецией IgA, является зачастую необратимой и в 2/3 случаях пациенты остаются диализзависимыми. При секреции моноклонального IgG нефропатия встречается реже (50 %), но при раннем применении гемодиализа и программной ПХТ в большинстве случаев удается получить полный или частичный почечный ответ. Полный почечный ответ достигнут у 3 пациентов с применением гемодиализа и ПХТ, что составляет 9 %. У них же диагностирована полная ремиссия.

Г. А. Басхаева, Б. В. Бидерман, Е. Н. Паровичникова,
О. А. Гаврилина, Ю. О. Давыдова, И. В. Гальцева

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *IKZF1* ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ

Введение. В ряде исследований показано, что при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) мутации в гене *IKZF1* и персистенция минимальной остаточной болезни (МОБ) являются ключевыми факторами неблагоприятного прогноза.

Цель. Оценить результаты лечения и клиренс МОБ у взрослых больных В-ОЛЛ в зависимости от наличия внутригенных делеций гена *IKZF1* при использовании неинтенсивного, но постоянного цитостатического воздействия.

Материалы и методы. В исследование включено 67 взрослых пациентов, из них 49 больных Ph-негативным (Ph«-») и 18 — Ph-позитивным (Ph«+») В-ОЛЛ. В первой группе лечение проводили по протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016 (с августа 2009 по август 2017, медиана наблюдения — 18,1 мес (1,5–93,4 мес), медиана возраста — 29 лет (17–56), соотношение мужчины: женщины (19:30)); во второй группе лечение проводили по протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2012 в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) (с февраля 2010 по август 2017, медиана наблюдения — 21,2 мес (3,53–91,77 мес), медиана возраста — 31,5 год (17–68), соотношение мужчины: женщины (9:9)). Молекулярный анализ делеций гена *IKZF1* проводили методом мультиплексной флуоресцентной ПЦР, специфичной к «горячим точкам» внутригенных делеций. Исследование МОБ выполнено 21 пациенту методом 6-цветной проточной цитометрии (чувствительность 0,01 %) с использованием антител против: CD19 APC, CD10 PE, CD34 PE-Cy7, CD38 FITC, CD45 PerCP, CD20 APC-H7 и CD58 FITC. Минимальная чувствительность составляла 0,01 %. Контрольные точки для исследования МОБ — 70-й день (окончание II фазы индукции) и 133-й день (окончание III фазы консолидации). Исследование МОБ химерного транскрипта *BCR-ABL1* у больных Ph«+» В-ОЛЛ проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени с чувствительностью 10^{-4} на 70-й день терапии (окончание индукционной фазы лечения). МОБ-негативный статус

устанавливали при количестве химерного транскрипта менее 0,01 %.

Результаты. У больных Ph«+» ОЛЛ частота обнаружения делеций составила 55 %, что было достоверно выше по сравнению с 18 % при Ph«-» ОЛЛ ($p=0,0097$). Анализ спектра различных вариантов делеций при Ph«-» ОЛЛ показал, что наиболее часто встречается $\Delta 4-7$ (55 %), $\Delta 2-8$ выявлена у 33 % больных, а каждый из вариантов $\Delta 2-7$ и $\Delta 4-8$ был представлен у 22 % больных с делециями. При Ph«+» ОЛЛ с одинаковой частотой выявлялись $\Delta 4-7$, $\Delta 2-7$ — у 44 % больных и $\Delta 4-8$, $\Delta 2-8$ — у 11 % больных. При анализе клинико-лабораторных показателей в дебюте заболевания практически у половины (44 %) больных с делецией *IKZF1* наблюдалась коэкспрессия миелоидных антигенов CD13 и CD33 на бластных клетках, в то время как у больных без делеции оба маркера одновременно были выявлены только у 2,5 % больных ($p=0,009$). Эффективность терапии больных Ph«-» В-ОЛЛ по протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016 существенно не отличалась у больных с наличием делеций *IKZF1* и без них: полная ремиссия (ПР) была достигнута у 89 % и 95 %, 3-летняя общая выживаемость (ОВ) у больных с делецией составила 100 % ($n=9$), без делеции — 75,8 % ($n=40$) ($p=0,149$). Безрецидивная выживаемость (БРВ) среди пациентов с делециями и без них составила 80 % ($n=8$) и 70,9 % ($n=36$) ($p=0,693$), а вероятность развития рецидива (ВРР) — 20 % и 26,6 %, соответственно ($p=0,830$). МОБ на +70 день терапии была обнаружена у 100 % больных Ph«-» В-ОЛЛ с делециями *IKZF1* и у 26,6 % без них ($p=0,0024$), на +133 день терапии — у 83 % и 23 % ($p=0,0134$) соответственно. У больных Ph«+» В-ОЛЛ наличие делеции *IKZF1* не оказывало достоверного влияния на частоту достижения молекулярной ремиссии на +70/+133 дни терапии и на долгосрочные результаты: у больных В-ОЛЛ с делециями *IKZF1* 5-летняя ОВ составила 60 % ($n=10$), без делеций — 42 % ($n=8$) ($p=0,41$); БРВ — 25 % ($n=10$) и 33 % ($n=7$) ($p=0,96$), ВРР — 50 % ($n=10$) и 50 % ($n=7$) ($p=0,92$), соответственно.

Выводы. У больных с внутригенными делециями гена *IKZF1* значительно чаще детектируется МОБ на разных этапах терапии по сравнению с больными без делеций гена *IKZF1*. Внутригенные делеции гена *IKZF1* не являются

факторами неблагоприятного прогноза у больных В-ОЛЛ при использовании неинтенсивного, но постоянного цитостатического воздействия, применяемого в протоколах Российской исследовательской группы по изучению ОЛЛ.

**И. Р. Бексеитова, Ж. К. Буркитбаев, С. А. Абдрахманова,
А. А. Турганбекова, К. Х. Жангазиева**

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Астана

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ РОДСТВЕННОЙ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Введение. Степень совместимости пациента и потенциального донора по HLA-системе является важным фактором, ассоциированным с клиническим исходом аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Изучение динамики приживления трансплантата и ее связи с осложнениями играет важную роль в правильной оценке состояния больного и проведении дальнейшего лечения. Количественный мониторинг химеризма после аллогенной ТГСК молекулярными методами стал обязательным диагностическим инструментом для определения степени приживления трансплантата или его отторжения, а также предсказания рецидива основного заболевания.

Цель. Определить значение анализа донорского химеризма у пациентов после алло-ТГСК для определения риска развития рецидива.

Материалы и методы. Проанализировали результаты обследования 31 пациента после алло-ТГСК от родственных доноров с 2013 по 2017 гг., выполненных в клиниках «Национальный центр онкологии и трансплантологии», «Национальный научный центр материнства и детства» г. Астана. Оценку химеризма проводили методом STR-ПЦР с оценкой полиморфизма последовательности гипервариабельных участков геномной ДНК. Идентификация аллелей осуществлялась с помощью программы ChimerMarker версии 3.1.0. Результаты оценивали с использованием дескриптивных статистик, непараметрического 2-стороннего критерия, отношения шансов (ОШ) и 95 % доверительного интервала (ДИ 95 %).

Результаты. Среднее значение возраста доноров составило 21 год (диапазон от 7 до 59 лет), пациентов — 23 года (диапазон

от 1 до 47 лет). Распределение по половому признаку среди пациентов: мужчины 12 (38,7 %), женщины 19 (61,3 %), среди доноров — 16 (51,6 %) и 15 (48,4 %), соответственно. У большей части реципиентов (19 (61,3 %)), число совпадений по HLA генам с донором составляло 9 и менее из 10, тогда как совпадение 10 из 10 наблюдалось у 12 пациентов (38,7 %). Преобладали пациенты с различными вариантами острого миелобластного лейкоза (18 человек (58,6 %)). Для оценки приживления ТГСК были выбраны 15 гипервариабельных участков ДНК и гены для идентификации пола. По степени значимости локусы распределялись в следующем порядке: D3S1358/D2S1338 > D7S820/D13S317 > D8s1179/CSF1PO/D16S539/D5S818/FGA > D19S433 > D21S11/TPOX/AMEL > TH01/VWA > D18S51. По первичным результатам количество информативных локусов между парами донор/реципиент составило 2–11 (среднее значение — 6,5, медиана — 7). По результатам первичного анализа определения гемопоэтического химеризма полный донорский химеризм наблюдался у 16 пациентов, что составило 51,6 %. Смешанный донорский химеризм отмечался у 11 пациентов (35,4 %). Неприживление наблюдалось у 4 пациентов, где у 3 пар степень сочетания HLA было 5/10 и одна пара с HLA совместимостью 10/10. Полный донорский химеризм больше наблюдался среди пар с сочетанием 5/10 по системе HLA, смешанный — 10/10. Однофакторный анализ показал выраженную зависимость между степенью соответствия HLA 10/10 и первичным определением химеризма с исходом со смешанным донорским химеризмом, что в остальных группах не были

статистически достоверны ($p=0,05$). Данные 7 пациентов более +30 дней после алло-ТГСК повторно направлены на анализ. Отмечено, что из 4 пациентов со смешанным химеризмом у 2 пациентов наблюдается переход в возрастающий смешанный химеризм и 2 пациента вышли на полный донорский химеризм. У 1 пациента выявили отрицательную динамику приживления, переход на смешанный донорский химеризм.

Выводы. Информативность всех локусов метода позволяет в ранние сроки определить состояние кроветворения у пациента в посттрансплантационный период. Анализ генопоэтического химеризма определяет развитие рецидива, отторжение трансплантата, а также характер течения болезней «трансплантат против хозяина», что облегчает задачу клиницистам при определении правильной тактики лечения после ТГСК.

**Б. В. Бидерман¹, У. Л. Джулакян¹, Д. А. Королева¹,
Е. Е. Звонков¹, Е. А. Никитин², А. Б. Судариков¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница им. С. П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы

СТЕРЕОТИПНЫЕ АНТИГЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРИ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Введение. Исследования последних 20 лет показали значительную роль влияния антигена в патогенезе В-клеточных лимфопротеративных заболеваний. Сужение репертуара генов варибельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (IGHV) может рассматриваться как доказательство вовлечения ограниченного набора антигенов или суперантигенов в развитие лимфом. Для некоторых заболеваний, например, для хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), показано существование более 200 подгрупп антиген-связывающих участков опухолевых IGHV среди неродственных случаев — «стереотипных» антигенных рецепторов (САР). 19 таких наиболее распространенных подгрупп составляют более 12 % всех случаев ХЛЛ. Для других лимфом также показано существование САР.

Цель. Сравнить особенности опухолевых IGHV и образованные ими САР при ХЛЛ, лимфоме из клеток мантийной зоны (ЛМЗ) и при селезеночной форме лимфомы из клеток маргинальной зоны (СЛКМЗ).

Материалы и методы. В исследование включено 680 пациентов с В-ХЛЛ, 38 с СЛКМЗ и 40 с ЛМЗ. Мутационный статус генов ИГ всех пациентов был исследован в ФГБУ «НМИЦ Гематологии» МЗ РФ с 2006 по 2019 гг. Нуклеотидные последовательности генов ИГ определяли согласно методике, рекомендованной ERIС.

Результаты. Мы подтвердили существенные различия в репертуаре генов IGHV для

ХЛЛ, ЛМЗ и СЛКМЗ. Так, при ХЛЛ наиболее распространенными IGHV-генами являются IGHV1-69, IGHV1-2 (большинство случаев без мутаций) и IGHV3-30, IGHV4-34, IGHV3-23 (в основном, подвергаются соматической гипермутации) — они встречаются у 40 % пациентов. Наиболее часто САР встречаются при ХЛЛ у пациентов с немутированными IGHV-генами. Самыми распространенными подгруппами в нашей группе пациентов были CLL#1 (гены 1,5 и 7 семейств, исключая IGHV1-69), CLL#2 (IGHV3-21), CLL#6,7,9 (IGHV1-69). Наиболее распространенной подгруппой с мутированными генами и, соответственно, с благоприятным прогнозом, является CLL#4 (IGHV4-34). В нашей выборке ЛМЗ наиболее распространенными генами являются IGHV4-34, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV4-59-57 % всех пациентов. При этом, в отличие от ХЛЛ, ген IGHV4-34 чаще был немутированным. Мы обнаружили 3 пары пациентов с последовательностями CDR3-регионов, отвечающими признакам САР. У этих пар были перестройки IGHV4-34/IGHD2-2/IGHJ6 (MCL#1), IGHV3-21/IGHD3-3/IGHJ6 (MCL#2), IGHV4-59/IGHJ6 (MCL#3). Также выявлен один пациент с CDR3, высокомологичным, описанным в литературе, случаем с перестройкой IGHV4-34/IGHD1-26/IGHJ6 (MCL#4). В группе СЛКМЗ самым частым геном является IGHV1-2-50 % всех случаев. При этом, для нашей выборки этой нозологии характерна строго аллель IGHV1-2*04, в то время как при

ХЛЛ эта аллель составляет $\frac{1}{4}$ от всех случаев использования данного гена. Кроме того, при СЛКМЗ, в отличие от ХЛЛ, для IGHV1–2 количество мутированных и немутированных случаев одинаково. Возможно, по этой причине, несмотря на столь сильное сужение репертуара как IGHV-, так и IGHD-генов (высоко представлены гены IGHD3–3 и IGHD3–10), в нашей подгруппе выявлено всего 2 пары пациентов с последовательностями CDR3-регионов, соответствующими признакам CAP (перестройки IGHV1–2*04/IGHD3–3/IGHJ5 и IGHV1–2*04/IGHD3–3/IGHJ5). При сравнении последовательностей CAP между рассматриваемыми нозологиями было выявлено, что в подавляющем большинстве случаев они являются специфичными для конкретных заболеваний — не только на уровне

аминокислотных последовательностей, но и на уровне перестраиваемых генов. Единственное совпадение было обнаружено между группами MCL#1 и CLL#64D. CDR3-регионы этих групп образованы одинаковым набором генов, имеют схожие мотивы и отличаются только длиной.

Выводы. Наши результаты подтверждают влияние антигенов на патогенез лимфом и показывают, что эти антигены специфичны к различным нозологиям. Для ХЛЛ некоторые CAP являются дополнительным прогностическим признаком. Продолжение изучения CAP для других нозологий необходимо для развития представлений о роли антигенной стимуляции в лейкемогенезе и может также способствовать разработке новых диагностических и прогностических маркеров для данных заболеваний.

**К. В. Богданов, Е. Г. Ломаца, О. В. Мерзликina,
Т. С. Никулина, Ю. В. Мирюлова, Н. Т. Сиordia, А. Ю. Зарицкий**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный Медицинский Исследовательский Центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ПРОГРЕССИРОВАНИЕ МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА АССОЦИИРОВАНО С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ НОВЫХ ОНКОГЕННЫХ МУТАЦИЙ И ИЗМЕНЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ НЕКОТОРЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ

Введение. Прогрессия миелолейкоза, сопровождающаяся возникновением нового лейкозного клона клеток с мутацией Cbfb-Myh11/A и полным элиминированием первоначально обнаруженного клона с мутацией Vcr-Abl/p190, описана в научной литературе, но встречается редко. Причина этого явления неизвестна.

Цель исследования. Провести мультифакторный ПЦР-анализ онкогенных мутаций и уровней экспрессии регуляторных генов у больного ОМЛ. Оценить их возможное влияние на прогрессию заболевания.

Материалы и методы. Костный мозг (КМ) и периферическую кровь (ПК) пациента отбирали в пробирки с напылением ЭДТА: при первичном поступлении, во время лечения, при наступлении ремиссии/рецидива. После экстракции РНК и синтеза кДНК на основе обратной транскрипции было выполнено мультифакторное ПЦР-тестирование (TaqMan PCR/QPCR) для определения уровней экспрессии онкогенов и регуляторных генов. Также проводили цитогенетическое исследование (ЦГ), включая FISH, и иммунофенотипирование поверхностных антигенов (CD-маркеров).

Результаты. Первоначально у больного ОМЛ (38 % бластных клеток) проводили мультифакторный ПЦР-анализ наиболее распространенных онкогенных мутаций (n=15), что позволило обнаружить слитный онкоген Vcr-Abl/p190. При этом уровень его экспрессии составил 11 % и 10 % в КМ и ПК, соответственно. ЦГ исследование, включая FISH, подтвердило наличие Ph-хромосомы или хромосомной транслокации t(9;22)(q34; q11), а также отсутствие каких-либо дополнительных хромосомных нарушений. В это же время количественное определение уровней экспрессии онкогена MucN и некоторых регуляторных генов — Spt16, Aprob3A, Casc5 — позволило обнаружить, что экспрессия первых 3 мишеней, включая MucN, оказалась выше в 1.2, 1.7 и 2.2 раза, а последнего, напротив, ниже в 3.3 раза по сравнению с контрольными образцами (норма). Спустя 1.2 месяца после начала химиотерапии (FLAG+дазатиниб), у пациента была достигнута ПКГ ремиссия и ПМО. При этом уровни экспрессии онкогена MucN и генов-регуляторов вернулись к норме. После выписки пациент продолжал принимать дазатиниб (140 мг) с целью профилактики

лейкоза. Через 5 месяцев больного госпитализировали повторно из-за ухудшения состояния. В миелограмме (КМ) было обнаружено 11 % бластов, что подтвердило развитие рецидива. Мультифакторное ПЦР-тестирование позволило обнаружить в КМ слитный онкоген Cbfb-Myh11/A (83.1 %) вместо первоначально выявленного онкогена Vcr-Abl/p190. ЦГ анализ, включая FISH, показал наличие хромосомной мутации inv(16)(p13; q22) в 80 % клеток КМ и отсутствие каких-либо дополнительных хромосомных аномалий. Проведение иммунофенотипирования поверхностных CD-маркеров позволило обнаружить в КМ популяцию бластных клеток с aberrантным фенотипом (Cd45dimCD34+CD38+CD117+CD13+CD33+), характерную для ОМЛ. Дополнительный анализ уровней экспрессии генов MucN, Spt16, Aробес3А, Casc5 продемонстрировал их увеличение в КМ в 5.1, 4.0, 2.1 и 6.3 раза, соответственно (по сравнению с первоначальными результатами). Следует отметить, что при обнаружении рецидива у пациента также выявили нейролейкоз. В это же время экспрессия MucN, Spt16 и Aробес3А превалировала в ПК по сравнению с КМ. Известно, что повышение экспрессии дезаминазы Aробес3А, как правило, ассоциируется с прогрессией ОМЛ и сопровождается возникновением мутаций (G>A) в онкогене WT1 и его гиперэкспрессией. Ранее увеличенная коэкспрессия Aробес3А и Casc5 была обнару-

жена в клетках КМ первичных больных ОМЛ по сравнению с больными ОЛЛ (В-ОЛЛ, Т-ОЛЛ). Что касается повышенной коэкспрессии MucN и Spt16, то впервые она была выявлена у больных с нейробластомой. При этом регулятором онкогена MucN оказался транскрипционный фактор Spt16, ответственный за активацию хроматина. Однако неизвестно, может ли Spt16 выступать в роли модулятора MucN при лейкозе. Что касается настоящего исследования, то спустя 1 месяц после начала химиотерапии (GO+HiDAC) у пациента отмечалась устойчивость к лечению: нарастание уровня бластов (50 %) в КМ и одновременное превалирование экспрессии генов MucN (7.2), Casc5 (22.0) и Spt16 (1.9) в клетках CD34 после сортировки по сравнению с тотальным КМ.

Выводы. Выявлен случай ОМЛ, сопровождающийся возникновением нового лейкозного клона клеток с мутацией Cbfb-Myh11/A и полной утратой прежнего опухолевого клона, несущего Vcr-Abl/p190. При этом показано, что активация онкогена MucN, способствующая самообновлению миелоидных предшественников в КМ, ассоциируется с экспрессией генов-регуляторов: Spt16, Aробес3А, Casc5, вовлеченных в клеточную пролиферацию. Таким образом, повышение уровней экспрессии названных генов коррелирует с прогрессией миелолейкоза и способствует поддержанию метаболизма ОМЛ с более агрессивным течением.

Е. Н. Воропаева¹, Т. И. Поспелова², М. И. Воевода¹, В. Н. Максимов¹

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск

ЧТО МОЖЕТ БЫТЬ СКРЫТО В НЕКОДИРУЮЩИХ УЧАСТКАХ ГЕНА TP53 ПРИ ДВКЛ

Введение. Несмотря на всю сложность картины генетических изменений, происходящих в геноме злокачественной клетки, мутации гена TP53 являются универсальным нарушением, обнаруживаемым при широком круге злокачественных новообразований. В настоящее время углубленный анализ результатов секвенирования вне кодирующих последовательностей гена TP53 отсутствует, количество и функциональные эффекты выявляемых в них aberrаций не оценены.

Цель. Целью данного исследования было выявить изменения в некодирующих участках TP53 в опухолевой ткани диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) и провести прогнозирование возможных последствий этих изменений.

Материалы и методы. Геномную ДНК выделяли из парафиновых блоков биоптатов опухолевых лимфоузлов и экстранодальных очагов поражения 92 пациентов с ДВККЛ. Методом прямого капиллярного секвенирования

по Сэнгеру определена нуклеотидная последовательность участков интронов примыкающих к 5–10 экзонам гена ($n=74$), а также фрагмента 3'-нетранслируемой последовательности *TP53* ($n=92$), содержащего сигнал полиаденилирования. Теоретическое прогнозирование возможных последствий обнаруженных мутаций проводилось с применением программы NetGene2.

Результаты. В опухолевом материале 74 больных ДВККЛ выявлены 12 типов мутаций в интронных участках: g.7675266A>G, g.7675010C>A, g.7674988A>G, g.7674326C>G, g.7674153C>G, g.7673691G>T, g.7673681T>C, g.7673664T>C и g.7673523A>G. Мутация g.7674326C>G, имеющая доказанную биологическую значимость по данным экспериментов *in vitro*, согласно данным The Human Cancer Mutation Database, относится к изменениям, влияющим на сплайсинг. Согласно прогнозу NetGene2, из выявленных нами в группе больных ДВККЛ интронных замен, g.7675010C>A приводит к образованию дополнительного акцепторного сайта сплайсинга, что может приводить к включению в последовательность м-РНК части интрона 5.

В 9 случаях в образцах опухолевой ткани ДВККЛ был выявлен rs78378222, разрушающий сигнал полиаденилирования *TP53* и приводящий к нарушению трансляции белка p53. В 5/9 случаев определен гомозиготный минорный генотип C/C по rs78378222, что свидетельствовало о потере гетерозиготности в данном локусе, которая способствует значительному приросту злокачественного потенциала клеток.

Выводы. До настоящего времени при изучении *TP53* в опухолевой ткани больных ДВККЛ исследования были сосредоточены на поиске мутаций в 5–8 экзонах гена, кодирующих ДНК-связывающий домен белка p53. По этим причинам, безусловно, требуется дальнейшее исследование спектра изменений в некодирующих последовательностях гена *TP53* и определение их функционального эффекта при ДВККЛ. Полученные нами данные свидетельствуют о функциональной селекции на этапах опухолевой прогрессии ДВККЛ изменений в интронах и в 3'-нетранслируемой последовательности гена *TP53*.

**О. А. Гаврилина, Е. Н. Паровичникова, Т. В. Абрамова, Л. А. Гребенюк,
Л. А. Шишигина, Г. А. Алимova, Т. Н. Обухова, В. В. Троицкая, Г. А. Басхаева, В. Г. Савченко**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

ЗНАЧЕНИЕ FISH ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ФИЛАДЕЛЬФИЙСКОЙ ХРОМОСОМЫ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ В-ЛИМФОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ В РАМКАХ РЕГИСТРАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОЛЛ-2016.

Введение. Больные Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом (Ph+ОЛЛ) составляют около 25 % среди всех ОЛЛ взрослых, причем заболеваемость этим вариантом В-ОЛЛ увеличивается с возрастом больного. Несмотря на появление ингибиторов тирозинкиназ и увеличение эффективности терапии Ph+ОЛЛ, эта группа больных по-прежнему относится к высокому риску рецидива и должна рассматриваться как группа пациентов, нуждающихся в трансплантации аллогенного костного мозга. В связи с этим становится актуальной точная верификация этого заболевания в дебюте с целью проведения адекватного эффективного лечения.

Цель. Оценить частоту встречаемости Ph+ОЛЛ в рамках регистрационного исследования и определить необходимость выполнения

прицельного FISH исследования для выявления t(9;22) у больных В-ОЛЛ.

Материалы и методы. С декабря 2016 г. начато регистрационное исследование для всех больных в возрасте старше 18 лет с впервые установленным ОЛЛ в 11 центрах Российской Федерации (Москва, Санкт-Петербург, Киров, Нижний Новгород, Волгоград, Сургут, Екатеринбург, Калуга, Ярославль, Саранск). С декабря 2016 по февраль 2019 года зарегистрировано 187 больных с ОЛЛ: медиана возраста 36 лет (18–74 года); 112 (60 %) мужчин и 75 (40 %) женщин; 115 (61 %) с В-ОЛЛ (из них 17 (15 % от всех В-ОЛЛ) с Ph+ОЛЛ), 67 (36 %) с Т-ОЛЛ и 5 (3 %) с лейкозом смешанного фенотипа. 124 (66 %) больных включены в протокол лечения ОЛЛ-2016, остальные 63 (34 %) пациента лечились по другим протоколам в связи

с выявлением критериев исключения (Ph+ОЛЛ 17 (9 %) больных (получали лечение по протоколу Ph+ОЛЛ-2012), зрелый вариант В-ОЛЛ 6 (3 %) больных, старше 55 лет 24 (13 %) больных, у одного пациента диагноз пересмотрен на острый миелобластный лейкоз, у остальных 15 (8 %) больных к моменту установления диагноза проводилась непрограммная химиотерапия или длительная терапия глюкокортикостероидами). Всем больным с ОЛЛ проводилось централизованное стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) (G-дифференциальная окраска хромосом) клеток костного мозга и у больных В-ОЛЛ выполнялось FISH исследование с использованием ДНК-зондов для выявления транслокации t(9;22).

Результаты. В лабораторию кариологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России поступило 75 аспиратов костного мозга больных В-ОЛЛ (65 % от всех В-ОЛЛ, включенных в регистрационное исследование). По данным СЦИ у 8 (11 %) больных выявлена t(9;22), у 16 (21 %) больных не получено митозов, у 51 больного определен нормальный кариотип или выявлены другие хромосомные aberrации (в том числе, у 3 (11 %) из 75 выявлена t(4;11). При FISH исследовании t(9;22) выявлена у 3 (19 %) больных из 16, у которых не получены мито-

зы и у 4 (8 %) из 50 пациентов с нормальным кариотипом по результатам СЦИ.

Выводы. В рамках регистрационного исследования ОЛЛ-2016 из 75 больных с В-ОЛЛ у 15 (20 %) диагностирован Ph+ОЛЛ, причем у 7 из 15 больных (47 %) только по результатам FISH исследования при отсутствии данных по результатам СЦИ (отсутствие митозов или нормальный кариотип). Данное исследование показало, что выполнение только стандартного цитогенетического исследования у больных с В-ОЛЛ является недостаточным для диагностики Ph+ОЛЛ, который относится к группе высокого риска среди ОЛЛ, и больные нуждаются в обязательном применении ингибиторов тирозинкиназ и рассмотрении вопроса о выполнении аллогенной трансплантации стволовых клеток. Таким образом, всем больным В-ОЛЛ необходимо выполнение FISH исследования с использованием ДНК-зондов для выявления t(9;22).

При отсутствии возможности выполнения FISH исследования необходимо молекулярно-генетическое исследование для выявления не только транскрипта p190, но и p210, так как 30–40 % больных с Ph+ОЛЛ имеют транскрипт p210, более характерный для хронического миелолейкоза.

**А. Д. Гарифуллин, С. В. Волошин, И. С. Мартынкевич, А. Ю. Кувшинов,
М. П. Бакай, Е. В. Клеина, С. Ю. Линников, С. С. Бессмельцев**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ РИСК СТРАТИФИКАЦИИ MSMA RT 3.0 ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. Проведенные за последнее десятилетие исследования значительно улучшили наше понимание молекулярных основ и механизмов прогрессирования множественной миеломы. Цитогенетическое исследование и метод флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) позволяют выявить наиболее частые генетические аномалии при данной патологии. Разделение пациентов в группы риска на основе генетических маркеров используется многими центрами для выбора и оптимизации тактики лечения. Однако системы риск стратификации регулярно обновляются при появлении новой информации о прогностическом значении ге-

нетических aberrаций. Окончательно остается неизвестным влияние комплексного кариотипа и комбинации двух генетических аномалий на прогноз заболевания.

Цель. Определить частоту встречаемости генетических аномалий и их влияние на общую и беспрогрессивную выживаемость у пациентов с впервые выявленной множественной миеломой.

Материалы и методы. Обследовано 159 пациентов с впервые выявленной множественной миеломой (медиана возраста 63 года, диапазон 28–83; соотношение мужчины/женщины — 1:1,37). Цитогенетическое исследование костного мозга

проводилось по стандартному GTG-методу. FISH анализ проводили для выявления перестройки IgH, del13q (13q14/13q34), amp/del 1p32/1q21, delP53/cen 17 (ДНК-зонды MetaSystems). У пациентов с перестройкой IgH дополнительно исследовались t(4;14), t(6;14), t(11;14), t(14;16) и t(14;20). Все пациенты получали бортезомиб-содержащие программы (VD, CVD, VMP, PAD) первой противомиеломной терапии.

Результаты. Частота встречаемости генетических aberrаций у пациентов с ВВММ составила 49 % (78/159). Перестройка IgH была обнаружена в 26,4 % случаев (42/159): t(11;14) — 16,3 % (26/159), t(4;14) — 5,0 % (8/159); TP53/del17p — 5,6 % (9/159); 1p32/1q21 amp/del — 12 % (19/159); гиподиплоидия — 3,1 % (5/159); гипердиплоидия — 1,25 % (2/159); del5q — 0,6 % (1/159); другие аномалии не были обнаружены. Сочетание двух генетических аномалий было обнаружено у 11,9 % (19/159) пациентов, комплексный кариотип (более 3 ГА) у 4,4 % (7/159) пациентов). Медиана общей выживаемости (ОВ) в группе «2 генетические аномалии» и «комплексный кариотип» была ниже, чем в группе

стандартного риска по mSmart 3.0 (нормальный кариотип, t(11;14), гиподиплоидия, гипердиплоидия и другие аномалии): 49 месяцев, 37 месяцев и не достигнута. Медиана беспрогрессивной выживаемости (БПВ) в этих группах составила 12, 11 и 30 месяцев соответственно (p=0,004). На основании результатов ОВ и БПВ нами проведена модификация (mod) группы высокого риска mSMART 3.0 (TP53/del17p, t(4;14), t(4;16), t(14;20), +1q, R-ISS III) с добавлением пациентов, имеющих «2 генетические аномалии» и «комплексный кариотип». Медиана ОВ в группе стандартного риска mSMART 3.0 не была достигнута, в группе высокого риска mSMART 3.0mod — 50 месяцев: 5-летняя ОВ составила 65 % и 38 %, соответственно (p = 0,01). Медиана БПВ составила 58 и 29 месяцев, соответственно (p = 0,02).

Выводы. Сочетание двух генетических аномалий или наличие комплексного кариотипа является неблагоприятным прогностическим маркером. Система риск стратификации mSMART 3.0 может использоваться для оптимизации терапевтических подходов к лечению больных множественной миеломой.

Т. Л. Гиндина, Н. Н. Мамаев, М. В. Латыпова, Е. С. Рябикова, И. А. Петрова, О. В. Паина, Е. И. Дарская, Л. С. Зубаровская, Б. В. Афанасьев

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, г. Санкт-Петербург

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И. П. Павлова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

СЛОЖНОСТЬ ХРОМОСОМНЫХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫМИ РЕЦИДИВАМИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Цель. На основании серийных цитогенетических исследований охарактеризовать изменения кариотипа у больных острыми лейкозами в рецидивах после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Материалы и методы. В исследование включены 73 больных ОМЛ и ОЛЛ (35 женщин и 38 мужчин в возрасте от 0,8 до 60 лет), которым была проведена алло-ТГСК в нашем институте с 2009 по 2016 годы. Изменения кариотипа в клетках костного мозга, регистрируемые в посттрансплантационном рецидиве (ПТР), сравнивались с кариотипом клеток до ТГСК.

Результаты. Изменения исходного кариотипа клонового характера в ПТР были отмечены у 29 (71 %) больных ОМЛ и 23 (72 %) больных

ОЛЛ. Большинство из них касались структурных хромосомных нарушений, которые были свойственны 33/73 (45 %) больных. У 14/73 (19 %) пациентов было отмечено сочетание структурных и количественных аномалий кариотипа. Сложный кариотип с ≥ 3 (СК ≥ 3) и ≥ 5 (СК ≥ 5) хромосомными нарушениями на клетку чаще имел место у больных острыми лейкозами в ПТР, чем до алло-ТГСК (62 % vs. 33 %, p = 0,03 для СК ≥ 3 и 48 % vs. 27 %, p=0,008 для СК ≥ 5). Сложные хромосомные обмены с образованием маркерных, кольцевых хромосом, а также с повреждением 17p имели место в рецидиве после алло-ТГСК у 48 % больных ОМЛ и у 52 % больных ОЛЛ. Сложный кариотип с ≥ 3 хромосомными нарушениями в ПТР у больных с неблагоприятными цитогенетическими профи-

лями до алло-ТГСК (ОЛ с аномалиями хромосом 5, 7, 17, перестройками генов *KMT2A*, *MESOM*, а также с транслокациями *t(6;9)*, *t(9;22)*, *t(4;11)*) наблюдался чаще, чем у больных с благоприятной или промежуточной группой риска (81 % vs. 39 %, $p = 0,0002$), и преимущественно при ОМЛ (80 % vs. 29 %, $p = 0,001$). Возникновение новых хромосомных перестроек (клоновая эволюция кариотипа) имело тенденцию к более частому появлению у больных с неблагоприятным кариотипом (76 % vs. 61 %, $p = 0,13$). Повреждение локуса 17p с участием гена *TP53* имело место у 5 (7 %) больных острыми лейкозами до алло-ТГСК и у 10 (14 %) больных в ПТР. Детальный анализ показал, что пациентам ОМЛ в ПТР более свойственны утраты хромосомных районов, которые касались 1q, 2q, 3q, 5q, 7q, 9q, 11p, 13q, 14q, 17p, и 20q. Встречавшиеся реже приобретения хромосомного материала затрагивали 1q, 11q, 13q, 15q и 21q. В то же время у больных

ОЛЛ в ПТР чаще имели место приобретения хромосомных районов 1q, 8q, 18p, 18q, 21q и Xp, а делеции встречались реже и касались 1p, 8p, 11p, 11q, 17p. Клональная гетерогенность с наличием ≥ 2 аномальных родственных клонов наблюдалась у 6 (8 %) больных до ТГСК и у 24 (33 %) — в пост-трансплантационном рецидиве ($p < 0,0002$).

Выводы. Изменение исходного кариотипа в рецидиве после алло-ТГСК является частым событием как у больных ОМЛ, так и ОЛЛ. Сложный кариотип более свойственен в ПТР больным ОЛ с неблагоприятной группой риска. Формирование в ПТР сложных хромосомных обменов с образованием маркерных, кольцевых хромосом, а также повреждение 17p не исключает важное место в этих хромосомных преобразованиях хромотрипсиса, что требует дальнейшего изучения с использованием современных молекулярных подходов.

Л. Л. Гиршова, И. Г. Будаева, Д. В. Зайцев, Д. В. Моторин, Р. Ш. Бадаев, Д. Б. Заммиева, Ю. В. Миролюбова, К. В. Богданов, О. С. Писоцкая, Т. С. Никулина, Е. Н. Горюнова, А. В. Петров, Р. И. Вабищевич, Ю. А. Алексеева, А. Ю. Зарицкий

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

УРОВЕНЬ МИНИМАЛЬНОЙ РЕЗИДУАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ В ПОСТИНДУКЦИОННОМ ПЕРИОДЕ КАК ПРЕДИКТОР БЕЗРЕЦИДИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАЦИЕНТОВ С ОМЛ С МУТАЦИЕЙ *NPM1*, ЭКСПРЕССИЕЙ ХИМЕРНОГО ГЕНА *RUNX1-RUNX1T1* И В ГРУППЕ С НОРМАЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ

Введение. Использование молекулярно-цитогенетической стратификации острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) позволяет прогнозировать вероятность достижения ремиссии, длительность ответа на программную химиотерапию и определяет стратегию риска-адаптированной терапии. Однако даже внутри определенных групп риска длительность достигнутой ремиссии и частота рецидивов имеет значительную вариабельность. Частота рецидивов может достигать 40 % в группе низкого риска и до 50–60 % в группе промежуточного риска. Оценка минимальной резидуальной болезни (МРБ), позволяет определить потенциальную химиочувствительность опухолевого клона и обеспечить индивидуализированный терапевтический подход.

Цель. Определение прогностической значимости уровня минимальной резидуальной болезни (уровень экспрессии химерного гена *RUNX1-RUNX1T1*, мутации *NPM1*, гиперэкспрес-

сии *WT1*) в постиндукционном периоде и корреляция значений с результатами лечения.

Материалы и методы. В исследование включено 17 пациентов с *NPM1mut*, 17 — с *RUNX1-RUNX1T1* и 19 пациентов с нормальным кариотипом (НК) без дополнительных молекулярно-генетических aberrаций. Все пациенты имели гиперэкспрессию *WT1*. Медиана возраста 41 г. (18–70 лет). У 41,2 % (14/34) пациентов с *NPM1mut* и *RUNX1-RUNX1T1* выявлены дополнительные молекулярно-генетические и цитогенетические аномалии (гиперэкспрессия *BAALC*, мут. *FLT3ITD*, *KMT2A*, *DNMT3A882C*, *C-KIT*, aberrантный кариотип). Мониторинг МРБ проводился с методом количественного ПЦР-анализа. Пациентам проводилась программная полихимиотерапия (ПХТ): индукция ремиссии в режиме «7+3», консолидация с высокими дозами цитозара («HiDAC»). АллоТКМ выполнена 15/34 пациентам в группе с *NPM1mut* и *RUNX1-RUNX1T1* и 10/18 пациентам с ОМЛ-НК.

Результаты. 94,1 % (32/34) пациентов с NPM1mut и RUNX1-RUNX1T1 достигли ПР после 1 курса. У 37,2 % пациентов (12/32) верифицирован рецидив заболевания. У 2-х — молекулярный рецидив. 85,7 % (18/21) пациентов с ОМЛ-НК достигли ПР (52,3 % (11/21) — после 1 индукционного курса). Пороговый уровень (ПУ) редукции NPM1mut и RUNX1-RUNX1T1 после индукции для прогнозирования безрецидивной выживаемости (БРВ) составил 4lg (чувствительность 100 %, специфичность 70 %) и 2,4lg (чувствительность 100 %, специфичность 60 %) соответственно. БРВ и общая выживаемость (ОВ) были достоверно менее продолжительны у пациентов с редукцией NPM1 < 4lg (2,6 мес. и 6,3 мес. против недостижения медианы, $p = 0,006$ и $p = 0,002$ соответственно). В группе пациентов с RUNX1-RUNX1T1 редукция < 2,4lg после первого курса также ассоциировалась с короткой БРВ и ОВ: 6,3 мес. против недостижения медианы с $p = 0,001$ и $p = 0,03$ соответственно). У 15/32 пациентов с ПР уровень редукции NPM1mut и RUNX1-RUNX1T1 не достигал пороговых значений. Девяти пациентам из 15 была продолжена программная ПХТ с «HiDAC». Несмотря на дальнейшее углубление ответа, у всех пациентов (9/9) развился рецидив заболевания в течение 12 месяцев. БРВ в группе с NPM1mut и RUNX1-RUNX1T1 была достоверно более продолжительна при редукции уровня WT1 $\geq 2lg$ ($p = 0,0125$), однако отсутствие редукции NPM1 < 4lg и RUNX1-RUNX1T1 < 2,4lg сохраняло неблагоприятное влияние на прогноз:

БРВ — 4,6 мес. против недостижения медианы ($p = 0,005$). При проведении мультифакторного анализа, включающего мутации FLT3ITD, SKIT, дополнительные генетические aberrации и уровень редукции WT1, уровень редукции NPM1 и RUNX1-RUNX1T1 после 1 курса были независимыми прогностическими факторами для продолжительности БРВ (HR: 10.55; 95 % CI: 1,6–69,9 $p = 0,02$). В группе пациентов с ОМЛ-НК у 8/11 пациентов, достигших ПР после 1 курса, отсутствовало снижение экспрессии WT1 $\geq 2lg$, что ассоциировалось с короткой БРВ: медиана 10,4 мес. против 6,1 мес. ($p = 0,012$). При отсутствии редукции WT1 $\geq 2lg$, у 83,3 % отмечалось развитие рецидива в течение первых 6 месяцев и у 100 % пациентов в течение 12 месяцев.

Выводы. Редукция уровня NPM1 < 4lg и RUNX1-RUNX1T1 < 2,4lg после 1 курса терапии является важным предиктором продолжительности БРВ и ОВ. Редукция WT1 < 2lg после 1 курса ПХТ прогнозирует короткую БРВ, однако оценка специфических маркеров позволяет выделить среди группы с редукцией WT1 $\geq 2lg$ пациентов с наиболее неблагоприятным прогнозом. Использование для определения МРБ динамики уровня экспрессии гена WT1 наибольшее значение имеет для индивидуализации прогноза пациентов с ОМЛ-НК промежуточной группы риска. Данные наблюдения могут позволить выделить группу пациентов с высоким риском рецидива и рассматривать их как потенциальных кандидатов к проведению аллогенной ТКМ.

А. А. Дубровина, В. А. Овсепян, А. В. Рылов, О. Д. Максимов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМА G915C ГЕНА TGFb1 С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Введение. Трансформирующий фактор роста b1 (TGFb1) участвует в регуляции гемопоэза, ингибируя пролиферацию Т-, В-лимфоцитов на стадии G0/G1 и дифференцировку ранних клеток-предшественников. Для пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) характерны повышенный сывороточный уровень TGFb1 на начальных стадиях заболевания и, в некоторых случаях, невосприимчивость опухолевых В-клеток к действию этого фактора. Изменение экспрессии TGFb1 может быть обусловлено

функциональным полиморфизмом в 25 кодоне (rs1800471, G915C, Arg25Pro) одноименного гена. Рядом исследователей показана ассоциация присутствия аллеля +915G с усилением экспрессии гена, а также с агрессивным течением ХЛЛ и неблагоприятным прогнозом. Однако роль данной нуклеотидной замены в патогенезе и течении заболевания до конца не изучена.

Цель. Изучение взаимосвязи полиморфизма G915C гена TGFb1 с предрасположенностью к ХЛЛ.

Материалы и методы. Исследованы образцы ДНК 211 больных ХЛЛ (127 мужчин — 60,2 % и 84 женщины — 39,8 %) с медианой возраста 63 года (размах: от 33 до 82 лет). У 101 (47,9 %) больного заболевание находилось в А-стадии, у 82 (38,9 %) человек — в В-стадии и у 28 (13,2 %) обследованных — в С-стадии. Группа сравнения включала 255 условно здоровых добровольцев в возрасте от 46 до 78 лет (медиана — 56 лет) и была представлена 146 (57,3 %) мужчинами и 109 (42,7 %) женщинами. Анализ полиморфизма G915C гена *TGFb1* проводили методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции с последующим электрофорезом в 7%-ном полиакриламидном геле. Амплификацию осуществляли с использованием олигонуклеотидов и ДНК-полимеразы фирмы ООО «СибЭнзим» (Россия) на термоциклере «Bio-Rad C-1000» (США).

Результаты. Обнаружено, что носители хотя бы одного «мутантного» аллеля +915C встречались достоверно чаще среди больных ХЛЛ, чем в группе сравнения (20,4 % vs. 9,4 %, $p = 0,001$; OR = 2,464, 95 % CI: 1,439–4,217). Нами выявлено, что в исследуемой популяции носительство

«мутантных» генотипов CG и CC увеличивало шансы риска развития заболевания в 2,5 раза. Также был оценен показатель атрибутивного популяционного риска (PAR). Для исследуемой популяции он составил 7 %. Следовательно, возникновение заболевания у указанного процента пациентов, вероятно, обусловлено носительством аллеля +915C. Кроме того, найдены гендерные и возрастные различия в частоте встречаемости «мутантного» аллеля C. Так, он чаще наблюдался у мужчин с ХЛЛ (20,5 % vs. 8,2 %, $p = 0,004$; OR = 2,875, 95 % CI: 1,384–5,972) и у лиц младше 60 лет (20,0 % vs. 7,1 %, $p = 0,002$; OR = 3,269, 95 % CI: 1,489–7,177).

Выводы. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что полиморфизм G915C гена гена *TGFb1* может вносить определенный вклад в развитие предрасположенности к хроническому лимфолейкозу. Также присутствие генотипов +915CC и +915CG гена *TGFb1* у лиц мужского пола моложе 60 лет может являться генетическими маркерами повышенного риска развития хронического лимфолейкоза.

Т. Н. Жевак¹, Т. В. Шелехова², Н. П. Чеснокова², И. А. Будник¹,
О. Е. Царева², А. В. Чантуридзе², П. Ф. Литвицкий¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский Государственный Медицинский Университет имени В. И. Разумовского», г. Саратов

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В МЕХАНИЗМАХ ФОРМИРОВАНИЯ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Введение. В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) является наиболее распространенной формой лейкоза у взрослых. В то же время известно, что окислительный стресс (ОС) играет важную роль в патогенезе неоплазий различной локализации благодаря своей способности индуцировать повреждение ДНК. Однако характер ОС при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ), а также взаимосвязь между интенсивностью перекисного окисления липидов и частотой появления мутаций при В-ХЛЛ изучены недостаточно.

Цель. Определить уровни диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА), нитрита (метаболита оксида азота) в сыворотке крови в качестве маркеров ОС, активность глутатионпероксидазы (ГП) и уровень церуло-

плазмина (ЦП) сыворотки крови в качестве маркеров антиоксидантной защиты (АОЗ), а также изучить взаимосвязь между этими маркерами и наличием цитогенетических aberrаций (ЦА) у больных В-ХЛЛ.

Материалы и методы. В исследование было включено 64 пациента с В-ХЛЛ, которые были сгруппированы по стадиям в соответствии с классификацией Rai K. и соавторов (1975), а также по наличию/отсутствию ЦА. Типы мутаций и их частота в клетках В-ХЛЛ определялись методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием следующих ДНК-проб: TP53 Deletion Probe (17p13.1); ATM Deletion Probe (11q22.3); 13q14.3 Deletion Probe (D13S319); IGH Breakapart Probe (14q32.33); 8q24.21 Breakapart Probe (c-MYC); MYB Deletion

Probe (6q23.3). Уровни ДК, МДА и ЦП и активность ГП сыворотки крови оценивали спектрофотометрически; уровень нитрита сыворотки определяли с помощью иммуноферментного анализа. Контрольная группа включала 30 практически здоровых доноров. Для выявления взаимосвязи между выраженностью ОС и частотой ЦА была проведена биномиальная логистическая регрессия.

Результаты. FISH-исследование позволило установить следующую частоту ЦА у пациентов с В-ХЛЛ: хромосомные аномалии были обнаружены у 42 пациентов (~65,6 %), у 22 пациентов ЦА не были выявлены. Наличие del 13q14.3 как единственной аномалии имело место у 19 пациентов (~29,7 %), del 11q22.3 — у 5 пациентов (~7,8 %), del 17p13.1 — у 4 пациентов (6,25 %), множественные ЦА установлены у 14 пациентов (~21,9 %). Аберраций хромосом 14 и 6 обнаружено не было. Уровни ДК, МДА, ЦП и нитрита в сыворотке крови были достоверно увеличены во всех группах пациентов по сравнению с контрольной группой. Одновре-

менно наблюдалось снижение активности ГП в сыворотке пациентов всех групп, что коррелировало со стадией заболевания. Однако из пяти предикторов статистически значимыми оказались только два — ДК и ЦП. Установлено, что вероятность наличия скрытой мутации увеличивается в 2,77 раза при увеличении уровня ДК на одну единицу (нмоль/мл) и в 1,01 раза при относительном уменьшении уровня ЦП на одну единицу (мг/л).

Выводы. Окислительный стресс играет важную роль в патогенезе В-ХЛЛ и характеризуется избыточным накоплением маркеров ОС (ДК, МДА и нитрита) и антиоксидантного маркера ЦП, а также снижением активности ГП. Увеличение содержания ДК и недостаточно высокий уровень ЦП были независимо связаны с повышенной вероятностью наличия скрытой мутации у пациентов с В-ХЛЛ. Профилактика последствий ОС может улучшить результаты лечения пациентов с В-ХЛЛ и оптимизировать прогноз заболевания.

Д. К. Жоголев, А. С. Поляков, С. Н. Колубаева, Ю. В. Никитин, А. Д. Золотарёв, Я. А. Носков

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ В ОПЫТАХ IN VITRO

Введение. Исследования *in vitro* играют все более значительную роль в онкогематологии, позволяя в настоящее время изучать генетические характеристики и устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. В работе представлен опыт культивирования бластных клеток, полученных от больного с полирезистентным вторичным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и апробация двух адаптированных методик оценки воздействия на них различных противоопухолевых препаратов.

Цель. Освоение методики культивирования бластных клеток при ОМЛ, апробация и оценка возможностей применения клеточного сортирования и микроядерного теста (МЯТ) для оценки генотоксичности различных химиопрепаратов *in vitro*.

Материалы и методы. Бластные клетки получены из периферической крови пациента с вторичным полирезистентным к тера-

пии ОМЛ. В дни забора образцов абсолютное содержание бластов в крови составляло от $28,0 \times 10^9/\text{л}$ до $52,0 \times 10^9/\text{л}$. Всего проведено 3 эксперимента с исследованием генотоксичности нескольких водорастворимых противоопухолевых препаратов *in vitro*. В эксперименте № 1: при помощи клеточного сортиера MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) отсортировали по 520650 CD34+ клеток в 2 пробирки, которые культивировали (37 °C, 5 % CO₂) в течение 4 суток в 5 мл полной питательной среды (ППС), содержащей: 80 % RPMI-1640, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 10 % оригинальной сыворотки больного, 10 мкл ФГА и 100 ЕД/мл пенициллина. В одну из проб после первых суток добавили децитабин в концентрации 1160 нг на 1 мл среды. Для оценки его генотоксичности на том же сортиере по окончании культивирования определили количество клеток, сохранивших жизнеспособность, путём оценки результатов маркировки

свободной ДНК. В экспериментах № 2 и № 3 0,5 мл цельной крови культивировали с 5 мл ППС. Через 24 часа в пробы эксперимента № 2 добавили децитабин в различных концентрациях (290 нг/мл, 580 нг/мл, 1160 нг/мл), в пробы эксперимента № 3 — даунорубицин (3400 нг/мл), а также его комбинацию с интерфероном альфа-2а в расчёте 3600 МЕ на 1 мл ППС. Далее пробы культивировали в течение 48 часов. Для оценки генотоксичности в этих экспериментах использовали МЯТ по следующей методике: в культуры добавлялось по 6 мкл/мл цитохалазина, через 24 часа клетки фиксировали, раскапывали по предметным стёклам и окрашивали по Романовскому-Гимзе. В каждом препарате подсчитывали по 100 бластных клеток с блоком цитокинеза. Оценка генотоксичности производилась по определению соотношения количества клеток с микроядрами к количеству «чистых» делящихся клеток, а также по общему количеству микроядер на 100 клеток.

Результаты. В результате эксперимента № 1 была апробирована методика культивирования отсортированных CD34+ бластных клеток ОМЛ из периферической крови. В связи с тем, что культивирование осуществлялось без специальных смесей цитокинов для роста CD34+ клеток, а также возможным повреждением при сортировке, погибших клеток в обоих пробах оказалось значительно больше, чем ожидалось. Тем не менее, в пробе с добавлением децитабина живых бластных клеток оказалось почти в 2 раза меньше, чем в контрольной пробе (9330 и 17633 клеток соответственно), что подтвердило потенциальную информативность методики.

В эксперименте № 2 при концентрациях децитабина 0 нг/мл (контроль), 290 нг/мл, 580 нг/мл, 1160 нг/мл процент клеток, содержащих микроядра, составил 7, 12, 23, 37 при общем количестве микроядер 7, 16, 42, 72 соответственно. В эксперименте № 3 в контрольной пробе обнаружено 5 % клеток с микроядрами, в пробе с чистым даунорубицином — 30 %, в пробе с добавлением интерферона — 37 %. Общее количество микроядер составило 5, 38 и 73 соответственно.

Выводы. 1. Культуры бластных клеток при ОМЛ, полученные из проб периферической крови, могут быть применены в качестве модели для оценки генотоксичности химиопрепаратов. 2. Клеточный сортер позволяет отобрать необходимое количество клеток с нужным для исследования фенотипом, а после культивирования с высокой точностью оценить их жизнеспособность. Однако, помимо необходимости применения дорогостоящего оборудования, для длительного культивирования менее жизнеспособных после сортировки CD34+ клеток необходимо применение специальных многоцитокиновых сред и других расходных материалов, не производимых на территории Российской Федерации, что требует разработки и изучения альтернативных методик. 3. МЯТ может быть использован для оценки генотоксичности химиотерапевтических препаратов в отношении бластных клеток периферической крови. При этом для адаптации и освоения методики отсутствует необходимость закупки дополнительного дорогостоящего оборудования и материалов.

4. Из результатов эксперимента № 2 следует, что концентрация препарата напрямую коррелирует с уровнем генотоксичности, что подкрепляет выводы о достаточной специфичности результатов таких исследований. В эксперименте № 3 комбинация даунорубицина с интерфероном показала в 1,5 раза более выраженное генотоксическое воздействие на бластные клетки по сравнению с только даунорубицином, что может быть одним из подтверждений прямого противоопухолевого действия препаратов интерферона-альфа. 5. Апробированные методики изучения бластных клеток после дополнительного изучения и совершенствования могут быть использованы в качестве одного из перспективных направлений развития планирования и индивидуализации противоопухолевой терапии не только при ОМЛ, но, возможно, и при других злокачественных новообразованиях. Освоение не требующего существенных затрат метода МЯТ для исследования химиочувствительности опухолевых клеток *in vitro* может способствовать ускорению внедрения в рутинную практику методов индивидуализированной терапии.

А. Д. Золотарёв, А. С. Поляков, Д. К. Жоголев С. Н. Колюбаева, Я. А. Носков

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ВЫЯВЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДОВ ТЕРАПИИ ПРИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Введение. Развитие биотехнологий привело к существенному прогрессу в терапии новообразований, заключающемуся в реализации принципиально новых подходов к созданию противоопухолевых препаратов, на молекулярном уровне воздействующих на многие звенья патогенеза и иммунной системы. Однако эффективность как препаратов традиционной, так и таргетной и иммунотерапии напрямую зависит еще и от особенностей их распределения и метаболизма в организме больного. Цитохром P450 — суперсемейство ферментов (монооксидаз), которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков и катализируют 70–80 % реакций, протекающих во всех стадиях лекарственного метаболизма. Наиболее важными для биотрансформации лекарств являются цитохромы CYP1A1, CYP2A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, осуществляющие метаболизм около 90 % лекарственных препаратов, в том числе и противоопухолевых средств, при этом в метаболизме может принимать участие один или несколько цитохромов. Мутации в этих генах в виде полиморфизма нуклеотидов приводит к изменению активности ферментов, и снижению эффективности химиопрепаратов, применяемых в терапии миелопролиферативных новообразований (МПН).

Цель. Определить генотип нескольких изоферментов цитохрома P450 у пациента с Ph-негативным МПН и вторичным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и проанализировать влияние на возникновение резистентности к терапии.

Материалы и методы. У пациента с резистентным к противоопухолевой терапии вторичным ОМЛ исследовали полиморфизмы генов: CYP2C9: 430 C>T; CYP2C9: A.>C; CYP3A4*1A/1B: A392G; CYP3A5: G6986A; CYP2C19: G681A; CYP4F2: C>T. Исследована проба крови с нормальным абсолютным содержанием созревающих и зрелых нейтрофилов ($4,2 \times 10^9/\text{л}$) и неконтролируемым бластозом ($57,6 \times 10^9/\text{л}$). Выделение ДНК и приготовление

реакционных смесей проводили с помощью наборов фирмы «ДНК-Технология, Россия» и «Литех», Россия. Амплификацию ДНК и получение результатов осуществляли с помощью прибора DT-прайм («ДНК-Технология»). Выявление цитогенетических маркеров осуществляли методом дифференциальной окраски хромосом.

Результаты. В 2016 г. пациенту К., 69 лет, при первичном обследовании по поводу Ph-негативного миелопролиферативного новообразования (МПН) установлен диагноз: атипичный хронический миелоидный лейкоз (аХМЛ), а позднее — первичный миелофиброз (ПМФ) высокого генетического риска (обнаружена мутация ASXL1). На разных этапах проводилась циторедуктивная монотерапия гидроксимочевинной, иматинибом, дазатинибом, руксолитинибом, затем — комбинированная терапия руксолитинибом и гидроксимочевинной, однако устойчивый гематологический ответ без токсичности достигнут только при совместном назначении руксолитиниба и цепэгинтерферона альфа-2b. В 2018 г., после 18 месяцев сохранения полного гематологического ответа, выявлена трансформация заболевания с развитием вторичного ОМЛ. Установлен кариотип: 45, XY, inv(3)(q23q26), -7 в 80 % клеток периферической крови. Проведено 2 курса терапии децитабином, 2 курса терапии цитарабина арабинозидом (малые дозы Ara-C), 2 курса полихимиотерапии азациитидином, идарубицином и цитарабина арабинозидом (Aza-Ida-Ara-C), попытка редукции бластоза меркаптопурином. Констатирована полирезистентность к проводимой терапии. Выявлена мутация в гене CYP2C19 (CT) и возможно являвшаяся одной из причин развития полирезистентности к противоопухолевой терапии.

Выводы. При исследовании методом ПЦР образца крови пациента с Ph-негативным МПН и трансформацией в ОМЛ выявлены гетеро- и гомозиготные мутации генов CYP2C19 (AG) и CYP3A4 (GG). Возможно, что эти мутации (CYP2C19 и CYP3A4) ответственны за метаболизм противоопухолевых препаратов, так

как приводят к снижению функциональной активности ферментов, ими кодируемых. Полученные результаты имеют значение для понимания причин формирования резистентности как к стандартным методам циторедуктивной терапии в хронической фазе МПН (ответ получен только при комбинированном лечении), так и к нескольким линиям индукционной терапии

при трансформации в ОМЛ (ответ не достигнут). По нашему мнению, исследование генов биотрансформации лекарственных препаратов является одним из перспективных направлений совершенствования прогнозирования исходов и планирования противоопухолевой терапии при гемобластозах.

Н. Н. Калитин¹, Н. С. Кострица², Г. А. Дудина³, А. Ф. Карамышева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский клинический научно-практический центр им. А. С. Логинова» Департамента здравоохранения г. Москвы

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ VEGF И ИХ РЕЦЕПТОРОВ VEGFR У ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМИ СИНДРОМАМИ

Введение. Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу клональных гематологических опухолей, объединяемых общим происхождением из стволовой гемопоэтической клетки. МДС характеризуются неэффективным гемопоэзом, являющимся следствием избыточного апоптоза созревающих гемопоэтических клеток костного мозга. Установлено, что ключевую роль в возникновении патологического клона при МДС играют драйверные онкогенные мутации и эпигенетические изменения, включающие гиперметилирование ДНК, деметилирование гистонов и корегуляцию транскрипции. Однако, несмотря на прогресс в понимании биологии этого заболевания и разработку методов патогенетической терапии, лечение пациентов с МДС остается нерешенной проблемой. Факторы роста эндотелия сосудов (VEGF) — известные регуляторы нормального ангиогенеза и неоангиогенеза при злокачественной трансформации. Показано, что рецепторы этих факторов роста (VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3) могут быть экспрессированы также и в клетках злокачественных опухолей, и тогда их взаимодействие с VEGF способствует пролиферации клеток при опухолях и гемобластозах. Роль указанных биологических молекул в патогенезе МДС исследована недостаточно и исследования в этой области содержат противоречивые данные.

Цель. Исследование возможной роли факторов роста VEGF и их рецепторов VEGFR в патогенезе миелодиспластических синдромов (МДС).

Материалы и методы. В работе были исследованы образцы периферической крови 55 больных МДС и 15 здоровых доноров. Были сформированы группы больных МДС, различающиеся по содержанию бластных клеток, а также по степени риска развития заболевания (низкого, промежуточного-1, промежуточного-2 и высокого риска). В отдельную группу были выделены больные с синдромом 5q-. В выделенной из образцов крови моонуклеарной фракции клеток методом полимеразной цепной реакции в реальной времени (Real-Time PCR) была исследована экспрессия генов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и их рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR2* и *VEGFR3*. Сравнили данные по экспрессии генов в разных группах больных МДС.

Результаты. Средние значения экспрессии всех исследованных генов VEGF и их рецепторов VEGFR в крови больных МДС были повышены по сравнению с экспрессией в крови здоровых доноров и отличались значительной вариабельностью. В крови здоровых доноров отсутствовала экспрессия *VEGF-D*, а экспрессия *VEGFR2* была крайне низкой. Статистически достоверные отличия экспрессии генов между группами больных МДС и здоровых доноров были получены для *VEGF-A* и *VEGFR2* ($p < 0,01$). При сравнении экспрессии генов *VEGF* и *VEGFR* в группах больных МДС с содержанием бластных клеток больше или меньше 5 % статистически достоверные отличия также были найдены только для генов *VEGF-A* и *VEGFR2*:

в группе больных с количеством бластных клеток >5 % экспрессия этих генов была повышена ($p < 0,01$). Сопоставление экспрессии генов *VEGF* и *VEGFR* в группах больных МДС с различным риском развития заболевания также показало постепенное повышение экспрессии только для генов *VEGF-A* и *VEGFR2*.

Выводы. Экспрессия генов *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D* и их рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR2* и *VEGFR3* в крови больных МДС повышена по сравнению со здоровыми донорами. В крови здоровых доноров могут быть наиболее ак-

тивны 2 независимые сигнальные системы *VEGF-A/VEGFR1* и *VEGF-C/VEGFR3*. У больных МДС вследствие активации экспрессии *VEGFR2* и появления экспрессии *VEGF-D* могут включаться дополнительные сигнальные системы: *VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGF-D/VEGFR2* и *VEGF-D/VEGFR3*. С увеличением стадии прогрессии заболевания наблюдалось повышение экспрессии только для генов *VEGF-A* и *VEGFR2*, что указывает на возможную роль этой сигнальной системы в развитии МДС.

Х. Я. Каримов, Мохаммад Дин А., К. Т. Бобоев

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ В ИССЛЕДОВАНИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХИМЕРНЫХ ОНКОГЕНОВ ОПУХОЛЕВЫХ КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК

Введение. Поиск новых диагностических и прогностических маркеров и дальнейшее совершенствование диагностических методов у пациентов с различными видами острых лейкозов являются важными направлениями повышения эффективности диагностики и мониторинга терапии лейкемии. Впервые в республике внедрена новая технология биологического микрочипирования для определенных хромосомных транслокаций и химерных онкогенов опухолевых кроветворных клеток. Чувствительность данной технологии составляет 1:10~<000 (1 опухолевую клетку среди 10000 нормальных клеток), специфичность анализа составляет не менее 95 %.

Цель. Оценить эффективность технологии биологического микрочипа для диагностики острого лейкоза.

Материалы и методы. Материалом для исследований явились образцы крови 40 больных (520 исследований) с клинически установленным диагнозом острый лейкоз, наблюдавшихся в НИИ гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан. Предварительный диагноз острый лейкоз установлен на основании данных клинико-лабораторных (морфологического и цитохимического) исследований крови и костного мозга.

Анализ хромосомных транслокаций и генных мутаций опухолевых клеток на биочипе

включал следующие этапы: изоляция РНК из лейкоцитов периферической крови, проведение двухэтапной "гнездовой" (nested) ПЦР, введение флуоресцентной метки в продукт ПЦР второго этапа с помощью флуоресцентно меченных праймеров, гибридизация меченого продукта ПЦР на биочипе, анализ изображения на приборе с программным обеспечением Imageware. Для исследования был выбран набор «ЛК-биочип», состоящий из 13 наиболее значимых химерных онкогенов при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ): t(12;21) ETV6-RUNX1, t(1;19) TCF3-PBX1, t(9;22) BCR-ABL1, t(4;11) MLL-AF4, и при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ): t(15;17) PML-RARA, t(8;21) RUNX1-RUNX1T1, inv(16) CBFB-MYH11, t(9;11) MLL-MLLT3, t(10;11) MLL-MLLT10.

Результаты. Из 40 больных у 13 были выявлены различные мутации, что позволило генетически точно верифицировать диагноз «острый лейкоз». У 5 больных были выявлены структурные перестройки гена AML/ETO t(8;21). Данный химерный ген сам по себе не способен вызвать лейкоз, поэтому для полного подтверждения диагноза необходимо исследовать дополнительные (вторичные) мутации. У 4 больных были выявлены структурные перестройки гена MLL/AF10 t(10;11), в результате данной транслокации появляется онкобелок UPN9610I. У 4 больных были выявлены структурные перестройки гена BCR/ABL t(9;22).

Результаты анализа биологического микро-чипирования был подтвержден путем исследований химерного онкогена t(9;22) BCR/ABL p190 в ПЦР. При этом результаты тестирования контрольных и диагностических образцов показали полное совпадение. Все остальные образцы, возможно, содержали другие соматические мутации, которые возможно идентифицировать с помощью других молекулярных методов (ПЦР, FISH иммунофенотипирование, секвенирование и т.д.), что подтверждает гетерогенность соматических мутаций опухолевых клеток при ОЛ.

Выводы. Применение технологии биологического микрочипа с использованием набора «ЛК-биочип» является наиболее высокопродуктивной технологией исследования специфических химерных онкогенов опухолевых кроветворных клеток, заметно сокращающей время анализа, по сравнению с другими методами, снижающей его себестоимость, и, самое главное, позволяющей одновременно анализировать не менее 13 «горячих» химерных онкогенов у больных острыми лейкозами.

Х. Я. Каримов, Б. Р. Алланазарова, Ю. Ю. Ассесорова, Н. Р. Латипова, К. Т. Бобоев

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

ЗНАЧЕНИЕ КЛАССИЧЕСКОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В СЛУЧАЕ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА С ПЕРВИЧНО-РЕЗИСТЕНТНЫМ ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Введение. Генетический анализ бластных клеток с использованием GTG-бэндинга хромосом является важным методом исследования, поскольку позволяет оценивать состояние всего кариотипа и выявлять количественные и структурные хромосомные изменения, возникающие при острых лейкозах. Особое значение стандартный цитогенетический метод исследования имеет для идентификации редких реаранжировок, а также спонтанных перестроек с неизвестными локусами разрывов хромосом, являющихся следствием нестабильности генома, способных определять вариант течения заболевания. В настоящей работе мы продемонстрировали возможности цитогенетического исследования с использованием метода GTG-бэндинга для оценки кариотипа больной с ОЛЛ, у которой была выявлена новая, клональная, не описанная ранее транслокация с участием 2-й и 22-й хромосом.

Материалы и методы. Исследование кариотипа больной с диагнозом острый лимфобластный лейкоз, было выполнено стандартным цитогенетическим анализом с использованием метода GTG-бэндинга. Биологическим материалом для цитогенетического исследования был костный мозг (2,0 мл), полученный при стерильной пункции до начала проведения курса полихимиотерапии по протоколу Nurag-Svad Блок А. Дифференцированная сегментация хромосом составляла 350 бэндов на кариотип.

Всего было проанализировано 30 метафазных пластинок.

Результаты. Диагноз острый лимфобластный лейкоз был установлен на основании данных гемограммы, миелограммы и цитохимического исследования. У больной отмечалось первично-резистентное течение заболевания с тяжелым состоянием, прогрессией и летальным исходом через полтора месяца после постановки диагноза.

Стандартный цитогенетический анализ показал, что 100 % бластных клеток пациентки содержали дериваты хромосом 2 и 22. В деривате хромосомы 22 в области длинного плеча был обнаружен добавочный фрагмент с темноокрашенными бэндами. Локус соединения добавочного фрагмента с хромосомой 22 находился в регионе 22q13. Дериват хромосомы 2 характеризовался утратой концевой фрагмента р-плеча и появлением в данном регионе более короткого и светлоокрашенного терминального участка. Локус разрыва на хромосоме 2 идентифицировался в области р22. Таким образом, у больной ОЛЛ методом GTG-бэндинга была установлена новая, не описанная ранее, хромосомная реаранжировка — t(2;22)(p22;q13). Изначально тяжелое течение и первично-резистентная форма заболевания, а также ранняя смерть больной, возможно, свидетельствуют о неблагоприятном прогностическом значении данной транслокации.

Выводы. Стандартный цитогенетический анализ не утратил своей актуальности при исследовании больных с острыми лейкозами, поскольку позволяет выявлять не только маркерные и рекуррентные аномалии хромосом, но также и редкие реаранжировки, возможно, связанные с вариантом течения заболевания. Кроме того, цитогенетическое исследование

на основе GTG-бэндинга позволяет идентифицировать хромосомные локусы разрывов, сужая дальнейший поиск молекулярных маркеров патологии, которые могут стать новыми прогностическими факторами и расширить современные представления о механизмах патогенеза острых лейкозов.

Х. Я. Каримов, Н. С. Пулатова

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА RS1042522 ГЕНА-СУПРЕССОРА ОПУХОЛЕВОГО РОСТА TP53 В ОНКОГЕНЕЗЕ ОМЛ

Введение. Известно, что в основе формирования бластных клеток при гемобластозах лежат соматические мутации, возникающие в одной из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. Формирование гемобластозов, также как и возникновение любого другого опухолевого заболевания, является результатом взаимодействия множества генов, среди которых одна из главных ролей традиционно отводится онкогенам и генам-супрессорам опухолевого роста.

Цель. Анализ роли полиморфизма rs1042522 гена TP53 в формировании мутантного клона у пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ).

Материалы и методы. Нами обследован 41 больной с диагнозом ОМЛ (основная группа) и 43 условно здоровые доноры (контрольная группа). ДНК выделяли из периферической крови с использованием набора Рибо-сорб (AmpliSens®, Россия). Тестирование полиморфизма rs1042522 гена TP53 проводили путем стандартной полимеразной цепной реакции на термоциклере CG-1-96 «Corbett Research» (Австралия), с использованием наборов НПО «Литех», согласно инструкции производителя. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009, Version 2.3».

Результаты. Частоты встречаемости Arg и Pro аллелей полиморфизма rs1042522 гена TP53 в исследованных основной и контрольной группах составили 73.2 % и 26.8 % против 75.6 % и 24.4 %, соответственно. Различия по мутантному аллелю в этих группах были статистически незначимыми ($\chi^2 = 0.1$; $p=0.6$). Согласно рассчитанному коэффициенту соотношения шансов, риск развития ОМЛ у носителей данного аллеля статистически недостоверно повышен почти в 1.1 раза (OR = 1.1; 95 % CI 0.56–2.2). Распределение генотипов было следующим: дикий гомозиготный вариант Arg/Arg незначимо превалировал в группе условно здоровых доноров по сравнению с группой пациентов (55.8 % против 51.2 % соответственно; $p>0.05$). При этом неблагоприятные гетеро- и гомозиготные генотипы чаще встречались среди больных, по сравнению с группой контроля (43.9 % и 4.9 % против 39.5 % и 4.6 %, соответственно; $p>0.05$ и $\chi^2<3.9$). Полученные предварительные данные свидетельствуют о недостоверной ассоциации полиморфизма rs1042522 гена TP53 с развитием ОМЛ.

Выводы. Влияние полиморфизма rs1042522 гена TP53 на формирование мутантного клона у пациентов оказалось незначительным, соответственно, данный локус является малоэффективным самостоятельным классификатором для маркировки развития ОМЛ.

М. А. Кислицына, Т. Н. Обухова, Г. А. Алимова, Л. А. Шишигина, Т. В. Абрамова,
Л. А. Гребенюк, Т. Ю. Новикова, С. Р. Горячева, Т. Н. Мусеева, В. Г. Савченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

АНАЛИЗ КАРИОТИПА ИММУНОСТИМУЛИРОВАННЫХ В-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — злокачественное лимфопролиферативное заболевание, субстратом которого являются зрелые В-лимфоциты. Хромосомные aberrации имеют важное прогностическое значение при ХЛЛ. Наиболее часто встречающиеся хромосомные нарушения, такие как делеция 11q22, 13q14, 17p13 и трисомия 12 определяются методом FISH у 80 % больных. Выполнение стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) с использованием В-клеточных митогенов (LPS+TPA) затруднено в связи с низкой митотической активностью опухолевых В-лимфоцитов. Применение при культивировании олигонуклеотида DSP30 в сочетании интерлейкином-2 (DSP30+IL2) увеличивает пролиферативную активность опухолевых клеток ХЛЛ. Комплексный кариотип (три и более хромосомных нарушений) является независимым неблагоприятным прогностическим фактором, однако, по литературным данным, для ХЛЛ прогностически значимым является выявление 5 и более aberrаций. В ряде исследований описана высокая ассоциация комплексного кариотипа с делецией 17p13. Показано, что выявленные при кариотипировании несбалансированные транслокации и транслокации с вовлечением локуса генов *IGH* как в составе комплексного кариотипа, так и изолированно ассоциируются с более низкой общей выживаемостью, укорочением времени до начала терапии и плохим ответом на лечение. Таким образом, прогностическое значение имеют как количественные, так и качественные нарушения, выявляемые в кариотипе у больных ХЛЛ.

Цель. Анализ результатов СЦИ с применением DSP30+IL2 у больных ХЛЛ.

Материалы и методы. В исследование включен 71 больной ХЛЛ, из них 51 мужчина и 20 женщин в возрасте от 35 до 86 лет (медиана возраста — 57 лет), которые наблюдались в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии» в период с марта 2016

по январь 2019 года. Всем больным выполнено СЦИ с использованием при культивировании DSP30+IL2 (из них 50 больным проведено СЦИ с LPS+TPA) и FISH с ДНК-зондами для выявления трисомии 12, делеций 13q14, 11q22, 17p13. Исследования выполнены 42 пациентам до начала терапии и 29 пациентам, получавшим лечение, с резистентным и рецидивирующим течением заболевания.

Результаты. Анализ результатов кариотипирования 50 больных показал высокую эффективность выявления aberrантного и комплексного кариотипа в культуре с DSP30+IL2 — у 36 (72 %) и у 13 (26 %) больных по сравнению с LPS+TPA — у 15 (33 %) и 5 (11 %). Выявлено достоверное различие между количеством метафаз с хромосомными аномалиями, полученными при культивировании с DSP30+IL2 и LPS+TPA ($V=490.5$, $p<0,05$). По результатам СЦИ 71 больного с использованием DSP30+IL2 aberrантный кариотип выявлен в 52 (73 %) случаях. При сравнении данных СЦИ и FISH показано, что частота выявления делеций 13q14, 11q22 и 17p13 выше при FISH-исследовании, однако кариотипирование позволяло детализировать структурные нарушения в этих локусах. В кариотипе были выявлены делеции хромосомы 13 с потерей различных регионов (q11q14, q12q14, q14q21, q14q22, q14q34) и у 8 больных транслокации с вовлечением локусов 13q14, 11q22 и 17p13, сопровождающиеся делециями в данных локусах и подтвержденные методом FISH. Частота выявления трисомии 12 при СЦИ, напротив, превышала таковую при FISH-исследовании за счет выявления частичной трисомии 12 и дубликации региона q13q22 у 2 больных. Методом СЦИ комплексный кариотип был определен у 22 (31 %) пациентов, из них у 11 из 22 (50 %) выявлены 5 и более хромосомных нарушений. В группе больных до начала терапии комплексные нарушения в количестве 5 и более выявлены у 3 из 42 (7 %), из них только у одного выявлена делеция 17p13 методом FISH. В группе больных с резистентным и рецидивирующим течением 5 и более aberrаций

определены у 8 из 29 (28 %), при этом делеция 17p13 при FISH-исследовании выявлена только у 4 из 8 (50 %). Различные структурные aberrации, не входящие в стандартную диагностическую панель при FISH-исследовании, были детектированы методом СЦИ у 38 (54 %) пациентов. Несбалансированные и сбалансированные транслокации выявлялись в 28 (39 %) и 18 (25 %) случаях соответственно. Отмечены повторяющиеся точки разрыва хромосом: 1q, 2q, 3p, 4q, 6q, 7p, 8p, 17p. Несбалансированные транслокации вне комплексного кариотипа определялись у 10 из 28 (36 %) больных. У 6 из 18 (33 %) пациентов были выявлены сбаланси-

рованные транслокации, затрагивающие локус генов *IGH* (14q32) — t(2;14)(p14–15; q31–32), t(6;14)(p21; q32), t(8;14)(q24; q32), t(9;14)(p13; q31–32), t(14;19)(q32; q13).

Выводы. Выполнение СЦИ с использованием при культивировании DSP30 и IL2 наряду с методом FISH позволяет выявлять дополнительные хромосомные aberrации, в том числе комплексные нарушения кариотипа, несбалансированные транслокации и транслокации с вовлечением генов *IGH*, определяющие неблагоприятный прогноз ХЛЛ, и выделять группу больных высокого риска для дальнейшей разработки терапевтического подхода.

**В. С. Климов¹, Е. В. Сокурова², О. В. Тюрина³,
А. В. Никифорова⁴, Т. В. Савоцкая⁵, В. А. Сабыныч⁶**

¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения краевая клиническая больница № 2, г. Владивосток

² Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Владивостокская поликлиника № 4»

³ Государственное автономное учреждение здравоохранения «Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи», г. Владивосток

⁴ Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Уссурийская центральная городская больница», г. Уссурийск

⁵ Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Находкинская городская больница», г. Находка

⁶ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В ПОВСЕДНЕВНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Введение. С 2009 г. в Приморском крае выполняется цитогенетическое исследование у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). С 2011 г. проводится мониторинг молекулярных результатов лечения, регистрация большого молекулярного ответа (БМО) по снижению уровня экспрессии *BCR-ABL* в пределах менее 0,1 % и более 0,01 % по международной шкале (IS), а также полного молекулярного ответа (ПМО), когда *BCR-ABL* транскрипт не выявляется (0,000 %). Исследование выполнялось в лаборатории молекулярной генетики ФГБУ Российского НИИ гематологии и трансфузиологии г. Санкт-Петербурга.

Цель. Анализ результатов терапии пациентов с ХМЛ, получающих терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК).

Материалы и методы. В 2009–2017 гг. диагностировано 111 случаев ХМЛ. Еще 50 пациентов с ХМЛ состояло под наблюдением к началу 2009 г. За этот период умерло от бластного криза ХМЛ 25 пациентов. Другие заболевания стали причиной смерти 15 больных, 5 пациентов выехали на постоянное

место проживания за пределы края (на момент отъезда имели БМО — 4 и ПМО — 1). На конец 2017 г. под наблюдением находилось 116 больных, и в этой группе проведен анализ результатов лечения. На момент диагностики в хронической фазе ХМЛ находились 112, в фазе акселерации — 3, в фазе бластного криза — 1 пациент. Распределение групп прогностического риска по критериям Sokal: низкий риск — 57 (49 %); промежуточный риск — 40 (34 %); высокий риск — 19 (17 %) пациентов. До назначения ИТК от 1 до 9 лет получали терапию гидроксикарбамидом, интерфероном, цитарабином 39 (34 %) больных. Низкая приверженность к терапии отмечена у 20 (17 %) пациентов, допускаявших снижение дозы и необоснованные, длительные перерывы в приеме ИТК. У 10 больных это привело к потере гематологического ответа (ГО). В одном случае потерян полный цитогенетический ответ (ЦО), и еще в одном случае утерян БМО. К концу 2017 г. 99 больных принимали иматиниб и 17 пациентов получали терапию ИТК второго поколения.

Результаты. Общие результаты терапии в 2017 г.: ГО — 110 (95 %); ЦО — 92 (79 %); БМО — 31 (27 %); ПМО — 43 (37 %). БМО + ПМО — 74 (64 %) пациентов. Результаты лечения в зависимости от группы прогностического риска. Группа низкого риска: ГО — 56 (98 %), ЦО — 50 (88 %), БМО — 17 (30 %), ПМО — 26 (46 %). Группа промежуточного риска: ГО — 39 (97,5 %), ЦО — 32 (80,0 %), БМО — 11 (27,5 %), ПМО — 12 (30,0 %). Группа высокого риска: ГО — 15 (79 %), ЦО — 10 (53 %), БМО — 3 (16 %), ПМО — 5 (26 %).

В группе из 17 больных, получающих терапию ИТК второго поколения, пациентов низкого прогностического риска — 10 (59 %), промежуточного риска — 4 (23 %), высокого риска — 3 (18 %). Лиц, получавших терапию гидроксикарбамидом, интерфероном, цитарабином до момента начала терапии ИТК в этой группе — 11 (65 %). Причины перевода на ИТК второго поколения: отсутствие БМО к концу

первого года терапии ИТК первого поколения — 3, потеря ЦО — 2, прогрессирование ХМЛ и переход в фазу акселерации — 1, цитогенетическая резистентность — 7, токсичность 3–4 степени на фоне терапии ИТК первого поколения — 4 больных. Результаты терапии ИТК второго поколения: ГО — 16 (94 %), ЦО — 12 (71 %), БМО — 7 (41 %), ПМО — 2 (12 %). БМО + ПМО — 9 (53 %).

Выводы. Результаты терапии ХМЛ зависят от группы риска прогрессирования гемобластоза, а критерии шкалы Sokal позволяют прогнозировать течение заболевания. Лучшие результаты имеют пациенты из группы низкого риска. Также на результаты терапии ИТК оказывает влияние длительный анамнез предшествующего лечения другими противоопухолевыми препаратами. Еще одним немаловажным фактором, ухудшающим прогноз, является низкая приверженность лечению.

Ж. М. Козич¹, В. Н. Мартинков¹, С. П. Михно¹, Л. Е. Коротаева¹, Л. А. Смирнова²

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр РМ и ЭЧ» г. Гомель

² Учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МАРКЕРОВ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ У ПАЦИЕНТОВ С МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ГАММАПАТИЕЙ И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. Множественная миелома (ММ) относится к группе парапротеинемических гемобластозов, которая в своем развитии проходит стадию моноклональной гаммапатии (МГНГ). Важными признаками опухолевой прогрессии является увеличение количества опухолевых плазматических клеток в костном мозге, а в клинике — появление единичных или множественных очагов деструкций. В основе деструктивного синдрома лежат процессы нарушения нормального соотношения резорбции и восстановления костной ткани, что сопровождается возникновением отклонений в уровне биохимических маркеров и цитокинов.

Цель. Оценить роль биохимических маркеров метаболизма костной ткани и цитокинов у пациентов с ММ и МГНГ для прогнозирования деструктивных поражений.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы костного мозга и периферической крови 100 пациентов: 64 пациента с МГНГ (медиана возраста 60 лет) и 36 пациентов с впервые выявленной ММ (65 лет), проходивших обследование в 2018 г. в ГУ «РНПЦ РМи ЭЧ» г. Гомель. Всем пациентам на момент

постановки диагноза проведено биохимическое исследование крови на маркеры метаболизма костной ткани, уровень β 2-микроглобулина, интерлейкина 6 (IL-6), фактора некроза опухоли ФНО- α , рентгенологическое исследование костей скелета.

Результаты. В нашем исследовании деструкции костной ткани, по данным рентгенологических исследований, встречались у 75 % пациентов с ММ (наиболее часто у пациентов с секрецией IgG — 75 %), и в 25 % случаев при МГНГ (из них наиболее часто у пациентов с секрецией IgA — 67,7 %). Остеокальцин рассматривается в качестве одного из наиболее специфических биохимических маркеров формирования кости и является продуктом остеобластов. При определении в обеих группах пациентов маркеров метаболизма костной ткани было выявлено, что снижение остеокальцина относительно нормы отмечалось у 41,2 % пациентов с ММ, что сопровождалось наличием деструктивного синдрома. У пациентов с МГНГ снижение остеокальцина выявлено в 29 % случаев и у 31,6 % из этой группы выявлены деструкции. Возможно, появление этого

раннего признака нарушения образования костной ткани у пациентов может позволить выявить потерю костной ткани с появлением в скором времени очагов деструкций. Остеокальцин обычно рассматривают совместно с костной щелочной фосфатазой (ВАР). ВАР также отражает интенсивность костеобразования на клеточном уровне. Оба маркера продуцируются остеобластами, но отличаются по своей экспрессии, которая проявляется на разных этапах развития остеобластов. В нашем исследовании снижение ВАР отмечалась только у пациентов с ММ, имеющих значительное поражение костной ткани (множественные очаги деструкций) и не было выявлено изменения уровня ВАР при МГНГ. Не наблюдалось также корреляции между остеокальцином и ВАР у пациентов обеих групп, что подтверждает данные литературы. β -CrossLaps является одним из маркеров резорбции костной ткани. В исследуемой группе у 28,6 % пациентов с ММ, имеющих деструкции костной ткани, отмечалось превышение уровня β -CrossLaps и 20 % пациентов из этой группы не имели очагов поражения. У пациентов с МГНГ только в 7 % случаев выявлено превышение уровня этого показателя, что сопровождалось наличием единичных очагов деструкций, а 18,2 % пациентов не имели деструктивных проявлений. Интерлейкин-6 (IL-6) является стимулятором дифференцировки остеокластов на разных этапах их со-

зревания. При определении IL-6 в сыворотке крови у исследуемых пациентов, несмотря на некоторое превышение его уровня у пациентов с ММ, не выявлено значимых различий между группами ММ и МГНГ. Фактор некроза опухоли (ФНО- α), по мнению различных авторов, также влияет на систему остеокластогенеза, приводя к активации остеокластов. В нашем исследовании наблюдалось значительное превышение этого показателя у пациентов с ММ (59,5 %) и МГНГ (39,1 %), что подтверждает данные литературы об участии этого цитокина в повышенной резорбции костной ткани. Нарушений со стороны уровня фосфора в сыворотке крови пациентов обследуемых групп не выявлено.

Выводы. Оценка метаболизма костной ткани при ММ и МГНГ на основе исследования маркеров в сыворотке крови имеет прогностическое значение как в клинике течения заболевания, так и для проведения ранней диагностики деструктивных проявлений, которые могут явиться предвестниками прогрессии у пациентов с МГНГ. Появление нарушений нормального соотношения этих маркеров свидетельствует о необходимости проведения профилактических мероприятий деструктивного синдрома уже на ранних стадиях. В данном исследовании было выявлено, что у определенного процента пациентов с МГНГ уже имеются нарушения в соотношении данных маркеров в различных вариациях, что требует динамического наблюдения за данной группой.

Д. В. Кравченко¹, В. Н. Мартинков¹, А. Е. Силин¹, А. И. Свирновский²

¹ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

² Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Беларусь

ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА NOTCH1 В ПРОГНОЗЕ БЕСПРОГРЕССИВНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ

Введение. Важным этапом ведения пациентов с ХЛЛ является прогнозирование течения заболевания для оценки необходимости более раннего начала терапии и использования альтернативных методов лечения в индивидуальном порядке в зависимости от выявляемых маркеров. В последние годы появились новые прогностические маркеры, отражающие биологию опухолевых клеток. Наиболее важными из них являются: иммунофенотипические маркеры (CD38, Zap70 и др.), β 2-микроглобулин,

тимидинкиназа, а также цитогенетические (del13q, del17p) и молекулярно-генетические факторы (NOTCH1, SF3B1 и др.).

Цель. Определить взаимосвязь некоторых лабораторных прогностических маркеров с наличием мутации гена NOTCH1, а также оценить влияние мутации гена NOTCH1 на беспрогрессивную выживаемость (БПВ).

Материалы и методы. В исследование были включены 127 пациентов с ХЛЛ, наблюдаемых на базе ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ»

г. Гомеля. Возраст пациентов составил 62 года (55 и 69 лет) (Ме (25 % и 75 %)). Данная когорта была разделена на 2 группы: в первую группу были включены 60 пациентов с начальной стадией ХЛЛ, без прогрессии заболевания. Вторую группу составили 67 пациентов с продвинутыми стадиями ХЛЛ, с признаками прогрессии заболевания. Материалом для исследования являлись костный мозг и венозная кровь. Для определения мутаций гена NOTCH1 применяли метод SSCP-PCR с последующим прямым секвенированием образцов ДНК, имеющих конформационный полиморфизм. Анализ осуществляли в пределах 34-го экзона гена NOTCH1. Секвенирование осуществляли посредством генетического анализатора AB3500 (Applied Biosystems) с прямым и обратным праймером. Использовали методы непараметрической статистики, рассчитываемые в пакете программ Statistica 10.0 (StatSoft, Tulsa, США). Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты. В результате молекулярно-генетического анализа у 12 пациентов были выявлены мутации гена NOTCH1. Проведенный статистический анализ установил значимую корреляцию между наличием мутаций гена NOTCH1 и уровнем $\beta 2$ -микроглобулина в крови (коэффициент бисериальной корреляции 0,82, $p < 0,001$), а также между наличием мутаций NOTCH1 и содержанием тимидинкиназы (коэффициент бисериальной корреляции 0,74, $p < 0,001$). Несмотря на то, что различие

в частоте мутаций NOTCH1 между группами 1 и 2 не было статистически значимым (10,2 % и 15,2 %, соответственно ($p = 0,502$)), в группе 1 пациенты с мутациями NOTCH1 имели статистически значимо более высокий уровень $\beta 2$ -микроглобулина в крови (2,4 мкг/л) в сравнении с пациентами без мутаций (1,8 мкг/л) ($p = 0,006$), а также большее содержание тимидинкиназы (6,2 МЕ/л и 4,0 МЕ/л, соответственно ($p = 0,025$)). Также для пациентов в группе 1 был выполнен анализ времени до прогрессии в зависимости от наличия мутации гена NOTCH1. В результате было установлено, что пациенты с мутацией NOTCH1 имели статистически значимо худшую БПВ (среднее значение 33,4 месяца (95 %ДИ [22,0–44,8]), медиана 41,0 месяц) в сравнении с пациентами без мутаций (59,2 месяцев (95 %ДИ [54,1–64,3]), медиана не достигнута), уровень значимости для лог-рангового критерия $p = 0,018$. Это свидетельствует о целесообразности выявления данной мутации для оценки прогноза течения ХЛЛ.

Выводы. Исследование выявило, что наличие более высоких значений $\beta 2$ -микроглобулина и тимидинкиназы сопоставимо с наличием мутации гена NOTCH1. Также показано, что мутации гена NOTCH1 связаны с неблагоприятным прогнозом в отношении прогрессии заболевания у пациентов с ХЛЛ. Это может говорить о высокой значимости данного фактора в прогнозировании течения ХЛЛ и выборе тактики ведения данных пациентов.

Г.З. Кузиева, О.У. Ачилова, А.А. Каюмов, Алланазарова Б.Р.

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

СЛУЧАИ НАРУШЕНИЯ КАРИОТИПА У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ В УЗБЕКИСТАНЕ

Введение. Множественная миелома является клональной болезнью из озлокачествленных плазматических клеток. Развитию злокачественного процесса часто предшествует моноклональная гаммапатия. Клоны клеток с хромосомными аномалиями могут быть обнаружены еще до трансформации моноклональной гаммапатии в миелому. При миеломе с помощью стандартного цитогенетического метода нарушения кариотипа выявляют у 1/3 больных. Гипо- и гипердиплоидные клоны прогностически неблагоприятны. При проявлении

делеции хромосомы 13, моносомии 13 и других изменений можно предполагать рефрактерность к терапии. Множественные изменения кариотипа также имеют неблагоприятное прогностическое значение. Исследование кариотипа во многом позволяет прогнозировать течение болезни.

Цель. Оценить влияние нарушений кариотипа на течение множественной миеломы и ответ на химиотерапию.

Материалы и методы. Вновь диагностированные пациенты с множественной миеломой,

пролеченные в Научно-исследовательском институте гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан. Исследования проводились стандартным цитогенетическим методом. Поиск метафаз осуществляли при увеличении $\times 200$ (окуляры PI 10x/23 Zeiss, объектив EC Plan-NEOFLUAR20 \times /05 Ph2 ∞ /0,17), анализ метафазных пластинок — при увеличении $\times 1000$ (окуляры PI 10x/23 Zeiss, объектив C Plan-NEOFLUAR100 \times /1,3 Oil ∞ /0,17). Всего было проанализировано 60 метафазных пластинок. Идентификацию хромосом проводили в соответствии с международной системой цитогенетической номенклатуры ISCN2009.

Результаты. Исследовался аспират костного мозга 20 первичных пациентов. Из них гипердиплоидный набор хромосом был обнаружен у троих больных. А именно: 56, XY; 50, XX; 49, XX. При этом ни в одном случае не обнаружены транслокации или делеции хромосом. Допол-

нительные хромосомы обнаружены в группе F и G т.е., 19, 20, 21 хромосомы. У этих больных отслеживался ответ на полихимиотерапию и клиническое течение болезни. У всех троих пациентов с гипердиплоидным набором миеломная болезнь протекала агрессивно, с множественными патологическими переломами костей, множественными плазмоцитомами и нефропатией. Двое из троих пациентов были резистентны к бортезомиб-содержащим протоколам, медиана выживаемости без прогрессирования (PFS) составила 4 месяца, пациенты умерли от стремительного прогрессирования болезни в течение 11 месяцев.

Выводы. Гипердиплоидный набор хромосом при миеломной болезни является прогностически неблагоприятным фактором. Клинически заболевание протекает с образованием множественных плазмоцитов и переломов. Общая выживаемость больных не превышает 1 года.

Н. С. Лазорко, Н. Т. Сиordia, Е. Н. Горюнова, Д. Б. Заммоева, Е. Г. Овсянникова, Е. Г. Ломаца

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Введение. В течение последних 10 лет с повсеместным внедрением в практику терапии пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) продолжительность их жизни приблизилась к среднепопуляционной. При этом среди пациентов с ХМЛ встречаются случаи заболевания онкологической патологией, в том числе и другими гемобластомами.

Цель. Оценить роль молекулярно-генетических исследований в диагностике и определении тактики ведения у пациентов с ранее верифицированным ХМЛ при появлении клинических или лабораторных симптомов другой онкогематологической патологии.

Материалы и методы. С 2010 по 2019 год в НМИЦ им В. А. Алмазова наблюдалось 7 пациентов с ХМЛ (2 мужчин, 5 женщин), у которых имело место наличие второго онкогематологического заболевания. Медиана возраста на момент постановки диагноза ХМЛ составляла 46,8 лет (38,3–68,5 лет), у 6 пациентов ХМЛ де-

бютировал в хронической фазе (ХФ), у 1 в фазе бластного криза (БК), все пациенты получали терапию ИТК (1-один препарат, по 3 пациента получали 2 и 3 линии терапии ИТК). У 6 пациентов ХМЛ предшествовал второй патологии, у 1 развился вторично. Наилучшим ответом на терапию ИТК был глубокий молекулярный ответ (МО) у 4 пациентов, полный гематологический ответ (ПГО) у 3 пациентов. У 2 пациентов была выявлена мутация bcr/abl T315I. Аллогенная трансплантация костного мозга проведена 2 пациентам: одному до выявления второго заболевания, 1 после.

Результаты. Вторыми онкогематологическими заболеваниями были: первичный миелофиброз у 2 пациентов (у одного из них предшествовал ХМЛ), у 2 острый миелобластный лейкоз (ОМЛ), 1 хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ), 1 истинная полицитемия (ИП), 1 миелодиспластический синдром (МДС) в варианте рефрактерной анемии с кольцевыми сидеробластами. Медиана времени между

выявлениями двух заболеваний составила 79 месяцев (6–189 мес.). Все заболевания были верифицированы в соответствии с критериями ВОЗ. У 4 пациентов в ходе диагностики были выявлены дополнительные молекулярно-генетические аномалии: мутации в гене JAK2V617F у 2 пациентов, в гене MPL у 1 пациента, химерный ген CBF-MYH11A inv16 у 1 пациента. Прогрессия ХМЛ в фазу БК и смерть после выявления второго заболевания наблюдалась только у пациента с МДС. Длительность ХМЛ к моменту гибели пациента составила 17 лет, а МДС — 11 лет. Наилучшим ответом на терапию ИТК (проведено 3 линии) у данного пациента был ПГО. После выявления второго заболевания 2 пациента получали только симптоматическую

терапию, 5 пациентов получали специфическую терапию: 3 пациента — гипометилирующую терапию азацитидином (1 на фоне продолжения ИТК, 2 — без), 1 — циторедуктивную терапию гидроксимочевинной (на фоне ИТК), 1 получал пегилированный интерферон (без ИТК).

Выводы. Своевременное и полное дообследование пациентов с ХМЛ при выявлении дополнительных патологических изменений в анализах крови или клинической картине течения заболевания с использованием молекулярно-генетических методик позволяет верифицировать сочетания ХМЛ с другими онкогематологическими заболеваниями и оптимизировать терапию с применением таргетных препаратов.

С. А. Лебедева, Е. А. Зеркаленкова, А. Н. Казакова, О. И. Солдаткина, Л. В. Земцова, Н. М. Тимофеева, Г. А. Новичкова, А. А. Масчан, М. А. Масчан, Ю. В. Ольшанская

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

ОСТРЫЕ МИЕЛОИДНЫЕ ЛЕЙКОЗЫ С Т(10;11)(P10-11; Q23.3): РЕЗУЛЬТАТЫ РЕГИСТРАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОМЛ У ДЕТЕЙ В РОССИИ

Введение. Перестройки гена *KMT2A* (lysine methyltransferase 2A, ранее *MLL*), расположенного в регионе 11q23.3, чаще встречаются у детей и наблюдаются в 5–10 % случаев острых миелоидных (ОМЛ) и лимфобластных лейкозов (ОЛЛ). *KMT2A*-позитивные ОЛ наиболее часто наблюдаются у детей первого года жизни и, как правило, ассоциированы с высоким инициальным бластозом и неблагоприятным прогнозом. Для гена *KMT2A* описано 120 различных хромосомных aberrаций и более 90 различных генов-партнеров, при этом известно, что от характера гена-партнера может зависеть прогноз выживаемости. Так, транслокация t(10;11)(p12; q23.3), чаще встречающаяся при ОМЛ, является предиктором неблагоприятного прогноза. Ген *MLLT10*, локализованный в регионе 10p12, является одним из частых генов-партнеров, однако в этом же регионе расположены и более редкие партнеры. Близкое расположение последних, а также сложный механизм перестройки при t(10;11)(p12; q23.3)/*KMT2A*-*MLLT10* (из-за различной ориентации генов, вовлеченных в перестройку) в ряде случаев затрудняет диагностику рутинными методами

Цель. Молекулярно-генетический анализ когорты пациентов детского возраста с ОЛ с транслокацией t(10;11)(p12; q23.3).

Материалы и методы. В рамках регистрационного исследования ОМЛ, проводимого с 2013 по 2018 год, нами были отобраны 28 пациентов (16 мальчиков и 12 девочек) в возрасте от 3 месяцев до 15 лет (медиана возраста — 19 месяцев), у которых перестройки гена *KMT2A* сочетались с хромосомными aberrациями в регионе 10p11–12. Информированное согласие было получено от родителей всех пациентов. Пациенты получали терапию в соответствии с протоколами AML-BFM (n=8), РОНЦ ОМЛ (n=2), ОМЛ Москва-Минск 2006 (n=15). Всем пациентам выполняли стандартное кариотипирование, перестройки *KMT2A* подтверждали флуоресцентной in situ гибридизацией (FISH). Комплексные кариотипы выявляли методом мультицветной FISH. Природу гена-партнера определяли мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) и длинной инвертированной ПЦР (LDI PCR) с последующим секвенированием по Сэнгеру, а также секвенированием нового поколения на приборе Illumina MiSeq с использованием реагентов NEBNext® Ultra™ II.

Результаты. Сложный характер транслокации $t(10;11)(p12; q23.3)$ (с дополнительными хромосомными перестройками либо в составе комплексного кариотипа) наблюдался в 15 случаях, еще в 2 случаях наблюдался нормальный кариотип. В проанализированной когорте пациентов частота перестроек с участием гена *MLLT10* составила 89,3 % ($n=25$). Другими, более редкими генами-партнерами являлись *NEBL* ($n=2$), *ABI1* ($n=1$), при этом в случае редких-генов партнеров рутинная RT-PCR показывала отрицательные результаты. Природа редких генов-партнеров была определена с помощью LDI PCR и секвенирования нового поколения. В рамках проводимого исследования, точка разрыва гена *KMT2A* наиболее часто локализовалась в интронах 9 ($n=14$) и 10 ($n=7$). В анализируемой когорте частота летальных исходов составила 25 % ($n=7$). Все пациенты

с редкими вариантами $t(10;11)(p12; q23.3)$ на сегодняшний день находятся в длительной полной ремиссии. Однако из-за значительных различий в проводимой терапии оценить влияние химерных генов *KMT2A-NEBL* и *KMT2A-ABI1* на прогноз заболевания пока не представляется возможным.

Выводы. Транслокация $t(10;11)(p12; q23.3)$ характеризуется сложным механизмом и выраженной гетерогенностью. Использование цитогенетических методов в сочетании с молекулярно-генетическими позволяют с высокой точностью определить локализацию точки разрыва гена *KMT2A*, а также природу гена-партнера в рамках $t(10;11)(p12; q23.3)$, что в последствии позволяет подбирать наиболее оптимальный метод мониторинга МОБ для каждого пациента.

Н. Н. Мамаев, Я. В. Гудожникова, Т. Л. Гиндина

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачёвой, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *WT1* — УНИВЕРСАЛЬНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Введение. Согласно нашим представлениям, уровень экспрессии гена *WT1* у больных острыми лейкозами (ОЛ) отражает массу продуцирующих *WT1* мРНК бластных элементов.

Материалы и методы. Эта новаторская молекулярная технология была успешно использована нами для оценки: а) эффективности достигнутой ремиссии и раннего распознавания рецидивов у леченных аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) 88 больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ); а также б) результатов проведенных в условиях *WT1* — молекулярного мониторинга курсов индукционной химиотерапии у 44 больных ОМЛ и 11 больных ОЛЛ, часть из которых получили новые лекарственные препараты, включая Миелотарг и Блинотумомаб.

Результаты. Исследование показало, что у 20 % больных ОМЛ, расцениваемых перед аллоТГСК как в состоянии цитологической ремиссии, на самом деле таковой не имели, на что указывало наличие у них надпорогового повышения стратифицированного LeukemiaNET порогового уровня в 250 копий/ 10^4 копий гена *ABL*. При этом 2-летняя кумулятивная часто-

та рецидивов в этой когорте больных (50 %) оказалась ближе таковой больных, леченных трансплантацией на этапе рецидива (64,3 %, $p = 0,06$), нежели в ремиссии (26,4 %, $p < 0,001$). Отсюда, 2-летняя общая и безрецидивная выживаемости (ОВ и БРВ соответственно) у этих больных также оказались ближе к таковым, леченым в рецидиве. (52,9 % против 17,9 %, $p = 0,042$ и 41,2 % против 10,7 %, $p = 0,059$, соответственно), чем в ремиссии (81,4 % против 52,9 %, $p 0,015$ и 71,4 % против 41,2 %, $p 0,013$, соответственно). Из этих данных следует, что измерение уровня экспрессии гена *WT1* у всех готовящихся к аллоТГСК больных ОМЛ должно стать обязательным. С другой стороны, использование данной молекулярной технологии для оценки эффективности проведенных курсов индукционной химиотерапии у больных с прогностически неблагоприятными цитогенетическими и молекулярно-биологическими вариантами ОЛ показало его несомненную практическую значимость. Несмотря на тяжёлый контингент отобранных для клинической апробации больных ОЛ, у подавляющего большинства из них на фоне индукционных курсов химиотерапии

имело место отчётливое снижение уровня экспрессии гена *WT1*, хотя порогового уровня оно достигало лишь у трети пациентов. Наряду с этим, у 8/55 (15 %) больных была отмечена парадоксальная реакция лейкозных клеток на химиотерапию, которая, по нашим предварительным данным, во многом зависела от включения в лечебные протоколы таргетных препаратов, в частности Миелотарга. Другим важным моментом в появлении парадоксальной реакции на химиотерапию было наличие в кариотипе обследованных больных аллельной делеции гена TP53.

Выводы. В целом, полученные данные показывают большие возможности использования в онкогематологии так называемых панспецифических маркеров, к которым относится ген *WT1*. Ввиду универсальной природы этого молекулярного маркера, стабильности получаемых результатов, а также относительной простоты, дешевизны воспроизводства в клинике самой методики при лёгкости чтения получаемых результатов молекулярного исследования, он заслуживает более активного использования его в гематологических отделениях как федерального, так и регионального уровней.

**Е. Л. Назарова, Э. Е. Сухорукова, Н. В. Минаева,
А. А. Дубровина, А. В. Рылов, И. В. Парамонов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ПЕРВИЧНЫЕ ОПУХОЛИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Введение. По данным Национального института рака США, у 16 % больных, получавших лечение по поводу онкологических заболеваний, наблюдается развитие индуцированных злокачественных новообразований. Среди них частота вторичных гемобластозов составляет от 6 до 27 %. Ранее считалось, что в основе их возникновения лежит лейкозогенная активность цитостатических препаратов, используемых в лечении первой опухоли, часто в сочетании с мутагенным воздействием лучевой терапии. Однако случаи, когда проводилось лишь удаление солидной опухоли без последующих курсов химио- и/или лучевой терапии, а также наблюдения множественных злокачественных новообразований среди членов одной семьи и высокая частота опухолей у больных с наследственными заболеваниями позволили пересмотреть концепцию лекарственно-индуцированного лейкоза. В последние годы большое внимание уделяется изучению индивидуальных особенностей организма и генетической предрасположенности к развитию злокачественных новообразований.

Цель. Изучить участие полиморфизма генов иммунного ответа в качестве фактора риска развития хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) и множественной миеломы (ММ) при наличии первичных опухолей.

Материалы и методы. Обследовано 204 пациента с ХЛЛ и 171 больной ММ в возрасте от 27 до 87 лет (медиана — 60 лет). Из них, 199

(53,1 %) мужчин и 176 (46,9 %) женщин. Генотипирование 20 полиморфных локусов 14 генов иммунного ответа (*TLR2* (rs5743708), *TLR3* (rs3775291), *TLR4* (rs4986790, rs4986791), *TLR6* (rs5743810), *TLR9* (rs5743836, rs352140), *IL1β* (rs2856841, rs1143623, rs1143634, rs16944), *IL2* (rs2069762), *IL4* (rs2243250), *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800871, rs1800896), *IL17A* (rs2275913), *CD14* (rs34424920), *TNFα* (rs1800629), *FCGR2A* (rs1801274)) проводили методом полимеразно-цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (НПФ «Литех», Москва, Россия) и последующей детекцией продуктов реакции в агарозном геле. Для поиска оптимальных моделей межгенного взаимодействия предрасположенности к развитию первых опухолей у больных ХЛЛ и ММ использовали программу MDR version 3.0.2, <http://www.mybiosoftware.com/mdr-2-0-multifactor-dimensionality-reduction.html>.

Результаты. При каждой нозологической форме была выделена группа пациентов, у которых до обнаружения ХЛЛ и ММ наблюдались другие злокачественные новообразования. Среди них 6 случаев ХЛЛ, где его появлению предшествовало в двух случаях выявление рака молочной железы и по одному случаю — рака яичка, яичников, кожи и грибовидный микоз в сроки от 36 до 252 мес (медиана — 135,5 мес), а также три пациента, у которых до дебюта ММ в двух случаях наблюдался рак щитовидной железы и в одном — молочной железы в сроки от

1 до 384 мес (медиана — 144 мес). Различий по гендерному и возрастному (медиана возраста — 58 и 59 лет соответственно) признакам между больными ХЛЛ и ММ не обнаружено. Найдено, что для группы больных ХЛЛ с предшествующими злокачественными заболеваниями характерны две статистически значимых модели, наличие которых прогнозирует развитие ХЛЛ в качестве второй злокачественной опухоли: однолокусная *FCGR2A* (A519C) ($p=0,0001$) и двухлокусная *TLR4* (G896A) / *FCGR2A* (A519C) ($p<0,0001$). У пациентов с ММ также обнаружены две важные модели межгенных взаимодействий: однолокусная *IL17A* (G197A) ($p=0,0286$) и трехлокусная *IL17A* (G197A) / *IL10* (C819T) / *IL6* (G174C) ($p<0,0001$). Интересно отметить, что в результате сравнительного анализа всех

возможных комбинаций полиморфных вариантов генов иммунного ответа найдено, что в развитии ХЛЛ при наличии предшествующих опухолей участвуют гены двух важных паттерн-распознающих рецепторов: *FCGR2A* и *TLR4*, а в развитии ММ как вторичного гемобластоза — гены цитокинов *IL17A*, *IL10* и *IL6*.

Выводы. Несмотря на то, что предшествующие ХЛЛ и ММ первичные опухоли обнаруживались практически в равные сроки (135,5 и 144 мес., соответственно) и у пациентов одного возраста (46 и 47 лет, соответственно), существуют несомненные отличия в патогенезе выбранных гемобластозов и в участии иммунных механизмов, обусловленных разными генами иммунного ответа, при развитии первичных солидных опухолей у больных ХЛЛ и ММ.

М. А. Панева, М. Н. Иванюк, А. А. Заставная

Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА ПОПУЛЯЦИОННОГО РЕГИСТРА ОМСКОЙ ОБЛАСТИ

Введение. Применение ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) в терапии больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) существенно изменило прогноз при данном заболевании, увеличив продолжительность жизни и улучшив качество жизни этих пациентов. В настоящее время ИТК имеют доказанное преимущество над другими методами лечения ХМЛ. Вместе с этим, накоплен опыт нежелательных явлений на фоне приема данных препаратов. Это требует изменения тактики лечения, купирования проявлений токсичности и в ряде случаев отмены препарата.

Цель. Проанализировать данные популяционного регистра пациентов с ХМЛ для оценки эффективности лечения ИТК и определения частоты нежелательных реакций.

Материалы и методы. Проведен анализ медицинской документации 60 пациентов с ХМЛ, проживающих на территории Омской области и получающих ИТК на 01.01.2019 года. Среди наблюдаемых больных было 37 женщин и 23 мужчины, медиана возраста на момент начала терапии составила 50,4 лет (колебания от 22 до 81 года). В дебюте заболевания у большинства больных (95 %) установлена хроническая

фаза заболевания. В качестве препарата первой линии терапии у всех пациентов применялся иматиниб. Средняя продолжительность заболевания от установления диагноза до начала терапии иматинибом не превышала двух лет. Максимальная длительность заболевания у наблюдаемых пациентов составила 20 лет. Частота динамического обследования больных ХМЛ, получающих ИТК, а также объем необходимых обследований определялись в соответствии с клиническими рекомендациями по диагностике и терапии хронического миелолейкоза (2014–2018 гг.).

Результаты. Полный цитогенетический и/или большой молекулярный ответы получены у 39 (65 %) пациентов, стабильность ответа сохраняется. При этом у 15 пациентов полный ответ достигнут на дозе иманитиба 400 мг, 19 больным потребовалось назначение 600 мг препарата, у 5 человек имеется потребность в приеме 800 мг препарата. Частичный цитогенетический ответ достигнут у 4 (6,7 %) больных, отсутствие ответа на терапию первой линии наблюдалось у 16 (26,7 %) пациентов, в 1,6 % наблюдений выявлен только полный гематологический ответ, что связано с недав-

ними сроками начала терапии. Нежелательные явления на фоне терапии ИТК зафиксированы у 11 (18 %) больных. При этом проявления гематологической токсичности 3–4 степени наблюдались лишь у 3 из них. Анализ этой группы пациентов показал, что у 8 обследуемых выявлены сопутствующие заболевания органов пищеварения и эндокринной системы.

Недостаточная эффективность или проявления токсичности 3–4 степени при применении иматиниба потребовали перевода на 2 и 3 линию терапии 15 (25 %) больных. 8 пациентов из них достигли полного цитогенетического и молекулярного ответов.

Выводы. Терапия ИТК первого поколения позволяет достичь полного ответа у большин-

ства больных ХМЛ. В случае неэффективности терапии иматинибом или развития нежелательных явлений на фоне лечения применение ИТК 2 и 3 линии терапии позволяет добиться эффекта более чем у 50 % пациентов. Риск развития нежелательных реакций на прием ИТК и их выраженность повышены у пациентов с сопутствующими заболеваниями. В связи с этим, необходимо тщательно подходить к выбору терапии для каждого пациента, проводя необходимое обследование до начала лечения с целью выявления и оценки риска развития коморбидной патологии, а также проводить мониторинг состояния пациентов в процессе проведения таргетной терапии.

А. Н. Парфененкова, А. А. Кремлев, И. М. Бархатов

*Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, г. Санкт-Петербург
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Университет имени академика И. П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург*

ЭКЗОСОМЫ КАК МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ХИМЕРНОГО ТРАНСКРИПТА BCR-ABL P210 И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Экзосомы — экстраклеточные микровезикулы, размеры которых находятся в интервале от 30 до 150 нм. Они способны выступать в качестве межклеточных переносчиков генетической информации и могут рассматриваться как потенциальный субстрат для оценки минимальной остаточной болезни.

Цель. Оценка потенциального вклада экзосом в результаты определения минимальной остаточной болезни посредством горизонтального переноса химерного транскрипта BCR-ABL p210 на мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга здоровых доноров в модели *in vitro*.

Материалы и методы. Выделение экзосом производили методом дифференциального ультрацентрифугирования конденсированной среды культуры клеток хронического миелоидного лейкоза линии К-562. Полученные частицы анализировали методом лазерной корреляционной спектроскопии. Для проверки стабильности частиц и способности их взаимодействия с биологическими системами был определен Дзета-потенциал. Эксперимент по переносу химерного транскрипта проводился в 24-луночной планшете. Клетки инкубировали

24 часа при 37°C с 5 % CO₂. После этого вносили 300 мкл бессывороточной питательной ростовой среды с экзосомами (выделенных с порядка 70 x 10⁶ клеток на лунку) и инкубировали клетки в течение 24 часов при тех же условиях. Кокультивирование К-562 и МСК проводили в 24-луночной планшете с полупроницаемыми перегородками (диаметр пор — 0,4 мкм) при аналогичных условиях.

Результаты. Наибольшее количество везикул в пробе соответствует размерам экзосом. Результаты исследования 15-ти образцов показали, что распределение среднего размера проб по диаметру находится в диапазоне 51,8÷107,0 нм со средним значением 78,96±20,03 нм. Дзета-потенциал соответствует стабильным частицам и в среднем равен -29,3±7,4 мВ. По результатам Real-Time ПЦР содержание химерного транскрипта BCR-ABL в экзосомах колебалось в интервале 44,42–863,79 копий/мл кондиционной среды со значением медианы 154,42 копий. После кокультивирования К-562 и МСК относительный уровень экспрессии транскрипта BCR-ABL в клетках-реципиентах составило от 0,03 до 11,4 %. Контроль проницаемости мембраны для клеток проводили

с помощью проточной цитометрии по CD45. В результате трансфекции экзосомами относительное содержание химерного транскрипта в МСК здоровых доноров ($n=9$) находилось в интервале от 0,01 до 15,88 % с медианой 0,11 %, что соответствует положительному результату при определении МОБ и указывает

на их непосредственное участие в горизонтальном переносе *in vitro*.

Выводы. Показана возможность горизонтального переноса мРНК гена BCR-ABL (p210) тирозинкиназы в клетки стромального микроокружения *in vitro* посредством экзосомальной фракции.

**И. С. Пискунова, Т. Н. Обухова, Е. Н. Паровичникова, С. М. Куликов,
Г. А. Алимова, Л. А. Шишигина, И. А. Лукьянова, В. В. Троицкая, В. Г. Савченко**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

СТРУКТУРА И ЗНАЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПЕРЕСТРОЕК У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ РН-НЕГАТИВНЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. С внедрением в клиническую практику новых таргетных препаратов перспективы лечения острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) стремительно меняются. Это связано с прогрессом в понимании биологических основ заболевания и различных звеньев патогенеза, ключевую роль в которых играют хромосомные нарушения. При ряде хромосомных aberrаций выявлена прямая корреляция с иммунологическими, морфологическими и клиническими особенностями заболевания. Определение цитогенетических факторов прогноза позволяет стратифицировать больных на группы риска и тем самым снизить токсичность лечения. Вместе с тем, прогностическая значимость отдельных хромосомных aberrаций нивелируется в зависимости от выбранного протокола лечения.

Цель. Определить частоту, спектр, структурные особенности и прогностическое значение цитогенетических нарушений у взрослых больных Рн-негативным ОЛЛ на терапии по протоколу ОЛЛ-2009.

Материалы и методы. В исследование включено 115 взрослых пациентов с впервые выявленным Рн-негативным ОЛЛ: 58 мужчин и 57 женщин в возрасте от 15 до 61 года (средний возраст — 26,5 лет), которые проходили лечение с июня 2009 г. по сентябрь 2016 г. в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ ($n=101$) и в гематологических отделениях областных клинических больниц ($n=14$). Всем пациентам проводили терапию по протоколу ОЛЛ-2009 (ClinicalTrials.gov, NCT01193933). В ретроспективный анализ были включены 100 пациентов, в проспективный — 15. Медиана наблюдения составила 24,5 месяца (0,2–94,4 мес.). В ходе исследования

были проанализированы результаты стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) и на архивном биологическом материале всем пациентам выполнено FISH-исследование с использованием ДНК зондов для выявления структурных перестроек в локусах генов MLL/t(11q23), c-MYC/t(8q24), TP53/делеция 17p13, CDKN2A/делеция 9p21, t(1;19)/E2A-PBX1, t(12;21)/ETV6-RUNX1, iAMP21.

Результаты. При СЦИ кариотип определен у 86 % больных, из них нормальный кариотип выявлен у 48,5 %, хромосомные aberrации — у 51,5 % (структурные перестройки выявлены у 19,2 %, гиперплоидия у 27,2 %, гипоплоидия у 5,1 %). У 17,2 % установлен комплексный кариотип. Вне зависимости от результатов СЦИ, всем больным проводилось FISH исследование с применением вышеуказанных зондов. Aberrации выявлены у 67 % больных: делеция (9) (p21)/CDKN2A у 24,3 %, перестройки гена MLL/t(11q23) у 7,8 %, делеция 17p13/TP53 у 5,2 %, перестройки гена c-MYC/t(8q24) у 2-х больных (1,7 %), t(1;19)/E2A-PBX1 и iAMP21 у 1 больного (0,8 %), другие нарушения (дополнительные сигналы/отсутствие сигналов от локусов генов) у 26,4 %, t(12;21)/ETV6-RUNX1 не выявлена. Применение метода FISH в дополнение к СЦИ позволяет увеличить частоту выявления aberrантного кариотипа с 51,5 до 67 %. Показана достоверная корреляция делеции 9p21/CDKN2A с высокой активностью ЛДГ в крови ($p = 0,02$); перестроек гена MLL/t(11q23) — с лейкоцитозом и высоким содержанием бластных клеток в крови ($p = 0,0016$), гиперплоидии — с нормальным количеством лейкоцитов в крови ($p = 0,02$). Анализ эффективности лечения по протоколу ОЛЛ-2009 (сроки достижения

ПР, ранняя летальность и резистентность) в группах с различными цитогенетическими нарушениями не продемонстрировал статистически значимых различий. При анализе связи цитогенетических нарушений и их сочетаний с долгосрочными результатами лечения (БРВ (HR176,9; $p < 0,0001$) и ВРР (HR6,4; $p = 0,02$)) отмечено статистически значимое неблагоприятное влияние перестроек генов MLL/t(11q23) и c-MYC/t(8q24).

Выводы. Неблагоприятными прогностическими факторами в рамках терапевтического воздействия, предусмотренного протоколом ОЛЛ-2009, являются перестройки генов MLL/t(11q23) и c-MYC/t(8q24). Делеции генов CDKN2A/9p21 и TP53/17p13, численные и комплексные нарушения кариотипа не являются факторами прогноза у взрослых больных Ph-негативным ОЛЛ при использовании протокола ОЛЛ-2009.

Л. Б. Полушкина, В. А. Шуваев, М. С. Фоминых, Е. В. Ефремова, Е. В. Мотыко, Ю. С. Руженкова, А. П. Самородова, Н. Б. Павленко, М. П. Бакай, Л. С. Мартыненко, Е. В. Клеина, С. В. Волошин, С. С. Бессмельцев, А. В. Четчин, И. С. Мартынкевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕФЕКТЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМ ТЕЧЕНИЕМ МИЕЛОИДНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Введение. Стандартные молекулярно-генетические методы не могут дать полного представления об особенностях миелопролиферативных новообразований (МПН), а в отдельных случаях даже подтвердить клональный характер заболевания. При несомненной диагностической и прогностической значимости молекулярных маркеров МПН все более актуальным является использование технологий высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS) для анализа большого массива генетических локусов.

Цель. Оценить молекулярно-генетический профиль МПН у пациентов с различным течением заболевания.

Материалы и методы. Нами были исследованы образцы ДНК цельной крови 7 пациентов с МПН. Шести больным установлен диагноз первичный миелофиброз (ПМФ), одному — эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ). Всем пациентам проводили исследование на наличие отдельных маркеров клональности традиционными методами: драйверных мутаций (ДМ) в генах JAK2 (аллель-специфичная ПЦР), MPL (ПЦР-ПДРФ), CALR (секвенирование по Сэнгеру), а также прогностически значимых aberrаций генов ASXL1, EZH2, SRSF2 (секвенирование по Сэнгеру). Также была использована NGS панель из 55 генов, ассоциированных с МПН с применением реагентов AmpliSeq на приборах MiSeq/HiSeq 2500 (Illumina Inc.).

Результаты. При исследовании традиционными методами мутация JAK2 обнаруже-

на у 3 пациентов, CALR — у 3, не обнаружено ДМ — у 1. У 4 больных выявлены aberrации гена ASXL1, в одном случае в сочетании с EZH2. Все выявленные мутации были подтверждены результатами NGS.

У пациента № 1 с предварительным диагнозом ЭТ на первом этапе молекулярно-генетического исследования маркеры клональности не выявлены. По результатам NGS обнаружены мутации в гене IDH1 (Tyr183Cys, COSM6494783) и KIT (Ile924Thr, rs1000138811), что позволило подтвердить клональную природу заболевания. Благоприятное течение ПМФ с префибротической стадией отмечено у пациента № 2 с мутацией в гене JAK2 и единственной дополнительной aberrацией, выявленной NGS, в гене TET2 (Gly355Asp, COSM6494926). Трансформация ПМФ в хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) констатирована у пациента № 3 с мутацией 1 типа в гене CALR. Методом NGS обнаружена мутация в гене KRAS (Gly12Ala, COSM522), встречающаяся у пациентов с ХММЛ. У остальных 4 пациентов при проведении первичной молекулярно-генетической диагностики выявлено сочетание драйверной мутации с прогностически неблагоприятными aberrациями в генах ASXL1 и EZH2. Прогрессия заболевания отмечена у всех больных даже на фоне проведения таргетной терапии руксолитинибом, 2 пациента (№ 5 и № 7) умерли. По результатам NGS в образце ДНК пациента № 4 с нарастанием лейкоцитоза

и спленомегалии, быстрым усилением фиброза костного мозга до остеосклероза выявлены мутации в генах *CBL* (Glu366Lys, COSM6840675 и Arg246Ter, COSM4387952) и *TET2* (Pro29Arg, COSM5020249) в дополнение к обнаруженным ранее *JAK2* и *ASXL1* (Tyr591Ter, COSM1681609). Прогрессия ПМФ с развитием нейтропении IV степени, тромбоцитопении тяжелой степени отмечена у пациента № 5 с мутациями *JAK2* и *ASXL1* (Arg1068Ter, COSM41715) и абберацией неясного значения Pro278Leu в гене *GNAS*. Постепенное нарастание бластемии в периферической крови, остеосклероз костного мозга наблюдаются у пациента № 6 с мутацией 2 типа в гене *CALR*, а также дополнительными дефектами в генах *ASXL1* (Gly646fsTer12, COSM914346), *GNAS* (Arg844His, COSM94388), *PDGFRA* (Ile989Val, rs145019788). Трансфор-

мация ПМФ в ОМЛ констатирована у пациента № 7 с мутацией типа 1 в гене *CALR* и мутацией *ASXL1* (Leu691fsTer25) и выявленными при помощи NGS неблагоприятными аномалиями генов *IDH1* (Arg132Ser, COSM28748) и *DNMT3A* (Phe734Leu, COSM1169640).

Выводы. Таким образом, результаты, полученные с помощью NGS, позволяют расширить представления об особенностях молекулярно-генетического профиля новообразования у конкретного пациента. Сопоставление перечня обнаруженных мутаций с различным характером течения МПН говорит о важной прогностической роли дополнительных генетических аббераций. Целесообразным видится внедрение расширенных миелоидных панелей NGS уже на этапе первичной диагностики МПН.

**А. С. Поляков, Я. А. Носков, Ю. В. Никитин, С. Н. Колюбаева,
Д. К. Жоголев, А. Д. Золотарёв, Д. В. Гуров**

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕАЛИЗАЦИИ ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННЫХ ПОДХОДОВ В ВЫБОРЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК

Введение: Концепция пациент-специфичного подхода к терапии не является новым подходом в современной медицине. В рутинной практике этими принципами руководствуются прежде всего при выборе антибактериальных, противовирусных, антимикотических препаратов. Тогда как попытки индивидуализированного выбора противоопухолевой терапии, основанные на определении химиочувствительности злокачественных клеток, пока рассматриваются только в качестве перспективного метода. Сложности в практическом применении наработок клеточной онкологии основаны на трудностях в получении достаточного количества однородных опухолевых клеток из солидных новообразований, гетерогенностью опухолей как в рамках одной нозологической формы у различных пациентов, так и в пределах одного новообразования, невозможностью получения дополнительного биопсийного материала в терапевтических целях. С этих позиций наиболее перспективным направлением в плане скорейшего внедрения в практическую медицину является

онкогематология. При таких заболеваниях как миелодиспластический синдром (МДС) или острые миелоидные лейкозы (ОМЛ), когда достаточно для экспериментального изучения количество однородных опухолевых (бластных) клеток может быть получено из костномозговых пунктатов или даже периферической крови, экспериментальные исследования химиочувствительности *in vitro* могут способствовать обоснованному индивидуальному выбору и улучшению исходов терапии.

Цель. Оценить возможность обоснования выбора терапии на основе изучения генотоксичности лекарственных препаратов при резистентном ОМЛ.

Материалы и методы. Бластные клетки периферической крови пациента с полирезистентным ОМЛ отсортировывали на сортере MoFlo Astrios EQ (Beckman Coulter) в 2 пробирки со сложной средой для культивирования, в одну из которых сразу добавляли противоопухолевый препарат (опробован только децитабин). После культивирования (24 часа) сравнивали количество жизнеспособных клеток в пробе

и контроле (по маркировке свободной ДНК). В другом эксперименте полученные от больного бластные клетки культивировали с ППС (24 часа), а после выделения в пробы и контроль добавляли различные водорастворимые противоопухолевые препараты (в моно-варианте и в различных сочетаниях), оценивали генотоксичность с применением микроядерного теста (МЯТ).

Результаты. В ограниченных по перечню исследуемых лекарственных препаратов экспериментах, была показана высокая генотоксичность децитабина (по оценке количества жизнеспособных отсортированных клеток), а также даунорубицина и, особенно, даунорубицина в сочетании с интерфероном-альфа (по оценке в МЯТ).

К сожалению, в описанном случае ОМЛ, результаты оценки химиочувствительности не были использованы в выборе терапии пациенту в связи с развитием тяжелых инфекционных осложнений и наступлением летального исхода. Однако полученный опыт в ближайшее время планируется использовать при планировании терапии в перспективной локальной практике, а с накоплением и обобщением данных и, возможно, рекомендовать к распространению. С позиций оценки точности метода, наибольшей прецизионностью обладают методики исследования однородных —

«чистых» клеточных суспензий, полученных при проточно-цитометрической сортировке бластных клеток с абберрантным фенотипом. Однако низкая доступность оборудования для сортировки, а также выявленное на практике снижение жизнеспособности отсортированных клеток, значительно ограничивают возможности их дальнейшей культивации и изучения без применения сложных многоцитокиновых сред и создания особых физических условий. При этом метод сортировки может быть использован для оценки качества культуральных методов выделения бластных клеток. Оказалось, что культуральный метод выделения обладает достаточной специфичностью, а выделенные бластные клетки ОМЛ остаются достаточно жизнеспособными и для определения генотоксичности лекарственных препаратов, и для создания экспериментальных клеточных линий.

Выводы. Адаптированные к локальным возможностям и апробированные нами методы определения генотоксичности как с применением микроядерного теста, так и подсчета «живых» клеток при проточно-цитометрическом анализе, обладают сопоставимой специфичностью и чувствительностью и могут рассматриваться в качестве перспективных методов определения химиочувствительности бластных клеток при миелоидных лейкозах.

А. С. Поляков, Я. А. Носков, О. Р. Петрова, С. Н. Колюбаева, Д. К. Жоголев, А. Д. Золотарёв

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова», Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

ПРИМЕРЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДОВ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: МУТАЦИИ ГЕНА *ASXL1*

Введение. Отвечающие современным требованиям точность диагностики и прогнозирования исходов онкогематологических заболеваний могут быть достигнуты только при комплексном анализе всех клинических, инструментальных и лабораторных данных. При этом, при некоторых миелопролиферативных новообразованиях (МПН), только обнаружение определенных генетических аномалий может иметь решающее диагностическое и прогностическое значение даже при субклиническом течении заболевания. К этим случаям можно отнести обнаружение различных болезнь-специфичных, болезнь-модифицирующих, эпигенети-

ческих мутаций, дополнительных хромосомных aberrаций или мутаций химерных генов. Среди Rh-негативных МПН, наибольшее количество таких данных накоплено в отношении первичного миелофиброза (ПМФ), что нашло отражение в нескольких уже общепринятых шкалах стратификации риска (DIPSS+, MIPSS, GIPSS) и продолжает обсуждаться.

Цель. Проанализировать 2 случая ПМФ с выявленным высоким генетическим риском (*ASXL1+*).

Материалы и методы. Случай 1: мужчина, на момент установки диагноза ПМФ в префибротической стадии — 67 лет. Характерных для

Ph-негативных МПН диагностических мутаций не выявлено, при эпигенетическом скрининге обнаружена мутация L775X (del1bp) ASXL1 (12 экзон). Оценка риска по шкалам: промежуточный-2 по IPSS (2 балла), промежуточный-2 по DIPSS — 3 (3 балла), промежуточный-2 по DIPSS+ (2 балла), промежуточный-2 по MIPSS (3,5 балла), высокий по GIPSS (4 балла). Терапия до прогрессирования: руксолитиниб, руксолитиниб в сочетании с гидроксикарбамидом, руксолитиниб в сочетании с цепэгинтерфероном альфа-2b. Время до трансформации с формированием ОМЛ M1 (FAB) — 20 месяцев. Полирезистентность к терапии (ARA-C малые дозы N.2, децитабин N.5, AZA-IDA-ARA-C N.2, без отмены руксолитиниба).

Случай 2: женщина, на момент установки диагноза 48 лет. Обнаружена мутация в гене CALR, при эпигенетическом скрининге обнаружена мутация L775X (del1bp) ASXL1 (12 экзон). Оценка рисков по шкалам: высокий по IPSS (3 балла), промежуточный-2 по DIPSS (2 балла), промежуточный-2 по DIPSS+ (2 балла), промежуточный-2 по MIPSS (3 балла), высокий по GIPSS (4 балла). Терапия до прогрессирования: гидроксикарбамид, руксолитиниб. Время до трансформации с формированием ОМЛ M2 (FAB) — 168 месяцев. Полирезистентность к терапии (ARA-C малые дозы N.2, децитабин N.5, без отмены руксолитиниба).

Результаты. По совокупности вводных данных на момент первичной диагностики, оба случая по большинству клинико-лабораторных параметров относились к промежуточному риску, а при учете данных генетического обследования — к высокому. Выполнение фактически показанной при констатации высокого риска аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток/костного мозга (аллоТГСК)

в случае 1 оказалось невозможно в связи с возрастом, коморбидным фоном, развитием тяжелых тромбогеморрагических осложнений в дебюте заболевания. Тогда как в случае 2 выполнение аллоТГСК в «хронической фазе» рассматривалось, однако не было реализовано в связи с отказом пациентки.

В соответствии с результатами многоцентровых исследований, обнаружение эпигенетической мутации ASXL1 является наиболее значимым независимым фактором прогрессирования ПМФ, при этом дополнительное обнаружение болезнь-специфичной мутации в гене CALR коррелирует со значительно большей выживаемостью, то есть является фактором «улучшения» прогноза, вне зависимости от риска по шкале IPSS. В свою очередь, имеются данные, что среди CALR+ пациентов, обнаружение ASXL1 на выживаемость не влияет. При общей схожести представленных случаев ПМФ по большинству клинико-лабораторных нарушений в период первичной диагностики и характеру проводимой патогенетической терапии, наличие мутации CALR в случае 2, по-видимому, отразилось в значительном превышении длительности наблюдения до трансформации. В обоих случаях в фазу «акселерации» было констатировано развитие полирезистентности к стандартной и гипометилирующей терапии. Применение руксолитиниба в период индукционной терапии вторичного ОМЛ могло способствовать снижению выраженности интоксикации и прогрессирования «хронического» клона ПМФ.

Выводы. В настоящее время расширение спектра генетических исследований и, в особенности, охвата ими большего числа пациентов является наиболее перспективным методом прогнозирования исходов и планирования терапии при различных МПН.

**Н. В. Рисинская¹, В. А. Васильева¹, А. Б. Судариков¹, Ю. Г. Жусина², Е. В. Аксенова²,
И. В. Канивец², Н. С. Кострица³, А. А. Юшкова¹, Е. Е. Никулина¹, Ю. А. Чабаева¹,
С. М. Куликов¹, Л. А. Кузьмина¹, Е. Н. Паровичникова¹, В. Г. Савченко¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

² Лаборатория молекулярной патологии ООО «Геномед»

³ Факультет фундаментальной медицины, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова», г. Москва

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ГЕМОБЛАСТОЗАХ: ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ, ОДНОРОДИТЕЛЬСКАЯ ДИСОМИЯ И ЕЕ ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ.

Введение. Изменения в геноме опухолевой клетки можно обнаружить различными методами. В частности, при мониторинге химеризма у пациентов с гемобластозами после трансплантации аллогенных гемопоэтических клеток (алло-ТГСК) детектируется потеря гетерозиготности в локусах коротких tandemных повторов (STR) в случае рецидивов. Потеря гетерозиготности (ПГ) в геноме бластных клеток объясняется либо делецией соответствующего фрагмента или всей хромосомы, что подтверждается цитогенетически, либо однородительской дисомией (ОРД). Это нарушение цитогенетический анализ не выявляет, поскольку при таком варианте потери гетерозиготности происходит дупликация гомологичного участка второй хромосомы, либо всей хромосомы, таким образом сохраняется нормальная копияность региона ПГ.

Цель. Оценить частоту возникновения ПГ и ОРД при рецидивах у пациентов с ОМЛ и ОЛЛ после алло-ТГСК и возможную связь ПГ в локусах STR с другими геномными изменениями в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Был проведен анализ STR-профилей у 46 пациентов (27 ОМЛ, 17 ОЛЛ (4 В-ОЛЛ, 8 Т-ОЛЛ, 5 Ph+ ОЛЛ), 2 острых лейкоза смешанного фенотипа) после алло-ТГСК в период между 2012 и 2018 гг на базе ФГБУ «НМИЦ гематологии», Москва. Пациенты были разделены на две группы: «без рецидива в анамнезе» (26 пациентов: 16 ОМЛ, 4 Ph+ ОЛЛ, 3 В-ОЛЛ, 2 Т-ОЛЛ, 1 острый лейкоз смешанного фенотипа) и группа пациентов с костномозговыми рецидивами или рецидивами центральной нервной системы (20 больных: 9 ОМЛ, 10 ОЛЛ, 1 острый лейкоз смешанного фенотипа). У 40 больных образцы ДНК были выделены из костного мозга в момент диагностики заболевания, у 6 пациентов «дебютных» образцов не было, так как этим больным индукционную

терапию проводили в других медицинских учреждениях. У всех больных с костномозговым рецидивом ДНК выделялась из костного мозга, при нейрорецидиве — из спинномозговой жидкости. Содержание бластных клеток в образцах костного мозга и спинномозговой жидкости определялось морфологически и цитогенетически. Контрольные образцы ДНК были выделены из костного мозга тех же пациентов в стадии ремиссии. STR-профили оценивали, проводя ПЦП с использованием мультиплексного набора COrDIS Plus (Gordiz Ltd, Россия) с последующим фрагментным анализом на генетическом анализаторе ABI3130. Обработка данных была выполнена с использованием программного обеспечения GeneMapper v.4–0. Частота встречаемости гетерозигот для STR-локусов D3S1358, TH01, D12S391, D1S1656, D10S1248, D22S1045, D2S441, D7S820, D13S317, FGA, TPOX, D18S51, D16S539, D8S1179, CSW118, D8S11S, D8S11S, D8S11S, D33S, D5S, D11S, D5S, D11S, D5S, D11S была исследована на когорте пациентов НМИЦ гематологии и их доноров, по 120 человек в каждой. Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) высокого разрешения на платформе Affimetrix Cytoscan™ HD был выполнен для подтверждения ПГ и оценки изменений копияности в геноме. Обработку данных осуществляли с использованием п/о GENOSCAN3000, версия для сборки генома hg19, GRCh37 Genome Reference Consortium Human Reference 37, <https://genome.ucsc.edu/>.

Результаты. Высокая гетерозиготность (от 70 % до 95 %) исследуемых локусов STR была установлена в предварительном эксперименте. В группе «без рецидивов» ПГ по локусам STR в бластах была выявлена у трех пациентов (11,5 %): у двух с ОМЛ и у одного пациента с Т-ОЛЛ. Во второй группе ПГ в STR-локусах была выявлена у 10 пациентов из 20, и дополнительно у трех пациентов ПГ была определена

с помощью ХМА (65 %): 5 пациентов с ОМЛ, 7 ОЛЛ и один пациент с острым лейкозом смешанного фенотипа. Для всех пациентов этой группы с ПГ в дебюте этот же паттерн подтверждался в рецидиве. У одной пациентки с В-ОЛЛ в дебютной опухолевой ДНК была установлена ПГ в 10 из 15 гетерозиготных локусов, этот же STR-профиль с ПГ воспроизводился в образцах из всех рецидивов: 3 костномозговых и 4 нейрорецидива. ХМА показал, что ПГ в локусах STR является результатом ОРД, захватывающей плечо или всю хромосому, в 20 случаях, и результатом делеции в 10 случаях ПГ. Для двух пациентов с рецидивом ОМЛ и мутацией FLT3-ITD (13q12.11) ОРД длинного плеча

13 хромосомы обеспечивала гомозиготность этой мутации. Для одной пациентки с Т-ОЛЛ ПГ в регионе 1p36.3–1p35.3 привела к появлению гомозиготного генотипа резус-фактора RH*SwSwDee в рецидиве.

Выводы. Частота ПГ в локусах STR значительно выше в группе пациентов с рецидивами. ОРД объясняет появление гомозиготных генотипов в дебюте и рецидиве заболевания. ХМА позволяет выявить гены-кандидаты в области ОРД или регионе изменения копийности (делеции, дупликации), вовлеченные в онкогенез у определенного пациента, что может помочь в выборе эффективной таргетной терапии.

Н. Р. Рябчикова¹, Г. Ш. Сафуанова¹, Э. К. Хуснутдинова², И. Р. Миннихметов^{2,3}, В. И. Никуличева¹, А. У. Багаутдинова⁴, А. Ф. Яхина⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа

² Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

³ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республиканский медико-генетический центр, Уфа

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Республиканская клиническая больница им Г. Г. Куватова, Уфа

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *НОСТ1* И *АВСГ2* НА ТЕРАПИЮ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Введение. За последние десятилетия исследователи достигли огромных успехов в понимании молекулярно-биологических основ патогенеза и отработки механизмов диагностики и мониторинга таргетной терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ). Научные работы свидетельствуют о замечательных результатах лечения этого наиболее распространенного миелопролиферативного заболевания ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) 1 и 2 поколения. В то же время, все чаще встречаются исследования по изучению развития резистентности или недостаточного эффекта при лечении ИТК. Особое место занимает дальнейшее изучение генетики этого миелопролиферативного заболевания и поиск прогностических маркеров полиморфных вариантов различных генов для понимания индивидуализированного ответа на лечение и продолжительности жизни пациентов. На сегодняшний день существует мало исследований экспрессии генов переносчиков органических катионов, участвующих в метаболизме ингибиторов

тирозинкиназ: *hOCT1* *АВСГ2* на клинических образцах ХМЛ, а также влияния их экспрессии в определении исхода лечения.

Цель. Оценить влияние полиморфных вариантов генов *hOCT1* и *АВСГ2* на терапию и продолжительность жизни больных ХМЛ.

Материалы и методы. Генетические исследования проводились у 114 пациентов с клинически и цитогенетически установленным диагнозом ХМЛ в хронической стадии, находившихся под наблюдением гематологов Республиканской клинической больницы. Мужчин было 55, женщин 59, медиана возраста составила 43 года (от 14 до 76 лет). Все больные получали лечение ИТК (согласно национальным клиническим рекомендациям и ELN). Сравнимые группы по ответу на лечение рандомизированы и сопоставимы по полу и возрасту. Анализ полиморфных ДНК-локусов генов *hOCT1* и *АВСГ2* осуществляли методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК и ПДРФ-анализом с последующим электрофорезом в 7–8 % полиакриламидном геле. Статистическая обработка полученных данных проводилась на персональном

компьютере типа IBM PC/AT с использованием стандартной программы «Microsoft Office Excel» и пакета прикладных программ статистической программы «Statistica 6.0 for Windows», SAS v.9.3. Для оценки продолжительности жизни в зависимости от генотипа полиморфных локусов генов был проведен анализ выживаемости методом Каплана — Мейера.

Результаты. При изучении уровня экспрессии генов ABCG2 и hOCT1 в лейкоцитах периферической крови больных ХМЛ с полным молекулярным ответом (ПМО), резистентных к терапии ИТК, и здоровых лиц обнаружено достоверное повышение уровня экспрессии гена ABCG2 только в группе пациентов с ПМО ($p=0,036$). Что касается экспрессии гена hOCT1, то статистически значимые различия выявлены между контрольной группой и больными с ПМО ($p=0,037$), контролем и резистентными к терапии пациентами ($p=0,014$). Сравнение распределения частот аллелей и генотипов полиморфного варианта rs683369 в гене

hOCT1 показало, что генотип *C*C достоверно чаще выявлялся у пациентов с эффективным ответом на лечение — в 75,00 % случаев по сравнению с больными, резистентными к лечению — 53,57 % ($\chi^2=3,94$, $p=0,04$, $OR=0,38$). Частота встречаемости генотипа *C*G была почти в два раза выше у больных ХМЛ, резистентных к терапии — 42,86 %, по сравнению с группой больных с эффективным ответом на лечение ИТК — 21,88 % ($\chi^2=3,92$, $p=0,04$, $OR=2,67$).

Выводы. Повышение уровня экспрессии генов-переносчиков лекарственных препаратов у больных ХМЛ свидетельствует об их участии в метаболизме ИТК и влиянии на эффективность ответа на лечение. Анализ общей выживаемости пациентов в зависимости от генотипа полиморфных локусов генов hOCT1 и ABCG2 показал, что наиболее значимым и благоприятным для прогноза являлся генотип CC полиморфного локуса rs683369 гена hOCT1, что является важным прогностическим критерием оценки исходов ХМЛ.

Ю. В. Сидорова¹, Н. Г. Чернова¹, В. Р. Городецкий², Н. В. Рыжикова¹,
Е. Е. Никулина¹, Т. Н. Моисеева¹, В. Н. Двирный¹, А. Б. Судариков¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой», г. Москва

ТОЧЕЧНЫЕ МУТАЦИИ ГЕНОВ STAT3 И STAT5B ПРИ Т-КЛЕТОЧНОМ ЛЕЙКОЗЕ ИЗ БОЛЬШИХ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Введение. Применение современных методов лабораторной диагностики, таких, как проточная цитометрия и ПЦР-исследование реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов, не всегда позволяет разграничить Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ) и реактивный БГЛ-лимфоцитоз при неопухолевых заболеваниях. Примерно в трети случаев Т-ЛБГЛ обнаруживают точечные соматические мутации STAT3 или STAT5B. Доказано, что точечные мутации SH2-доменов STAT3 и STAT5B — это активирующие мутации, которые обеспечивают сигналы выживания и роста опухолевых клеток и значимы для патогенеза Т-ЛБГЛ. В настоящее время выявление данных мутаций считается специфичным для Т-ЛБГЛ, так как доказывает наличие патологического клона.

Цель. Оценить спектр мутаций генов STAT3 и STAT5B при Т-ЛБГЛ, а также значимость опре-

деления данных мутаций для диагностики Т-ЛБГЛ.

Материалы и методы. В работу включены пациенты с Т-ЛБГЛ (n 49) и хроническими лимфолифферативными заболеваниями из НК клеток (n=11), наблюдавшиеся в «Национальном медицинском исследовательском центре» Министерства здравоохранения Российской Федерации с 2010 по 2019 гг. А также 57 пациентов, наблюдавшихся в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой» с 2009 по 2019 гг., с диагнозом Т-ЛБГЛ и сопутствующим ревматоидным артритом. В контрольную группу (n=32) включены пациенты с различными заболеваниями, в том числе МДС, которые сопровождалась БГЛ-лимфоцитозом и потребовали дифференциальной диагностики с Т-ЛБГЛ. Оценку точечных мутаций

генов STAT3 и STAT5B проводили при помощи аллель-специфичной ПЦР на приборе Step One Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA). Определяли следующие мутации, характерные для Т-ЛБГЛ: с.1919А>Т; с.1940А>Т; с.1982А>Т; с.1981G>Т; с.1981G>С; с.1981G>А гена STAT3 (соответствующие аминокислотным заменам р. Y640F; р. N647I; р. D661V; р. D661Y; р. D661H; р. D661N) и с.1924А>С (р. N642H) гена STAT5B.

Результаты. У 33 % пациентов с Т-ЛБГЛ (35 из 106) были выявлены точечные соматические мутации STAT3 или STAT5B. Мутация р. Y640F обнаружена у 19 пациентов, р. D661Y у 11 пациентов, р. N647I у 2 пациентов, р. D661V у 1 пациента, р. D661H у 1 пациента, р. N642H у 1 пациента. У пациентов с сочетанием Т-ЛБГЛ и ревматоидного артрита частота выявления мутаций была незначительно выше (35,1 % против 30,6 %). У 18 % (у 2 из 11) пациентов

с хроническими лимфопрлиферативными заболеваниями из NK клеток были обнаружены мутации STAT3 и STAT5B: р. Y640F р. N642H, соответственно. В группе контроля точечных соматических мутаций STAT3 и STAT5B не выявлено.

Выводы. Выявление точечных соматических мутаций генов STAT3 и STAT5B у больных Т-клеточным лейкозом из больших гранулярных лимфоцитов и хроническим лимфопрлиферативным заболеванием из NK клеток и отсутствие их в контрольной группе свидетельствует о значимости определения данных мутаций при проведении дифференциальной диагностики между реактивным и опухолевым БЛГ-лимфоцитозом. Спектр выявленных на нашей выборке больных точечных мутаций STAT3 и STAT5B совпадает с описанным в литературе для других выборок.

А. Е. Силин, Д. К. Новик, В. Н. Мартинков, В. В. Кошкевич, И. Б. Тропашко, А. А. Силина

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С Rh-НЕГАТИВНЫМИ ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕТАРИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Введение. Наиболее распространенными среди Rh-негативных (BCR-ABL1-негативных) хронических миелопрлиферативных заболеваний (ХМПЗ) являются истинная полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и идиопатический миелофиброз (ИМ).

Основная проблема в диагностике ХМПЗ до недавнего времени заключалась в отсутствии точного метода подтверждения клонального характера заболевания с целью дифференциации от реактивных эритроцитозов и тромбоцитозов. В последние годы для диагностики ХМПЗ стали применяться молекулярно-генетические маркеры клональной миелопрлиферации. Наиболее значимыми из них являются соматические мутации генов JAK2 (V617F), CALR (del и ins) и MPL (W515L и W515K). Диагностическая значимость этих маркеров для каждой из форм ХМПЗ различна. Интерес также представляет зависимость клинико-лабораторных показателей пациентов от мутационного статуса при каждой из форм ХМПЗ.

Цель. Дать оценку распространенности и клинической значимости соматических му-

таций генов JAK2, CALR и MPL в группах пациентов с ИП, ЭТ и ИМ.

Материалы и методы. В исследование были включены 359 пациентов, проходивших обследование в ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ» в период 2014–2018 гг. Группы исследования составили 132 пациента с диагнозом «Истинная полицитемия» с медианой возраста 62,5 года, 108 пациентов с диагнозом «Эссенциальная тромбоцитемия» — 60,5 лет и 119 пациентов с диагнозом «Идиопатический миелофиброз» — 62 года. Материалом для исследования являлись образцы ДНК, выделенные из цельной венозной крови. Мутацию V617F гена JAK2 и мутации W515L и W515K гена MPL анализировали методом ARMS-PCR. Мутации del/ins (тип 1 и тип 2) гена CALR анализировали методом ПЦР с использованием двух праймеров, фланкирующих 9 экзон. Детекция продуктов ПЦР осуществлялась электрофоретически в агарозном геле с окраской бромистым этидием.

Результаты. В группе ИП был выявлен только один тип мутации — V617F JAK2 с частотой 94,7 %. Среди пациентов старше 50 лет встреча-

емость этой мутации была статистически значимо больше, чем среди пациентов в возрасте 50 и менее лет, $p=0,032$. Различия по частоте встречаемости мутации V617F между подгруппами мужчин и женщин не выявлены. Также не выявлены какие-либо клинически значимые различия по лабораторным показателям в зависимости от мутационного статуса.

У пациентов из группы ЭТ мутация JAK2 V617F сопровождала 66,7 % случаев. Группа JAK-положительных пациентов с ЭТ характеризовалась большей медианой возраста ($p=0,050$) и существенно не отличалась по другим изучаемым показателям от пациентов, не имевших данной мутации. Кроме мутации V617F в данной группе были выявлены мутации гена CALR с частотой 16,7 % — у 5 мужчин и 13 женщин. В зависимости от наличия мутаций CALR также не выявлено заметных различий по клинико-лабораторным показателям между пациентами, за исключением возраста. У пациентов с мутациями CALR медиана возраста была на 11 лет меньше ($p=0,030$).

В группе ИМ мутация JAK2 V617F присутствовала в 66,4 % случаев. Медиана возраста у пациентов с мутацией JAK2 составила 64 года, а у пациентов без указанной мутации — 60,0 лет, $p=0,011$. Мутации гена CALR выявлены у 14 пациентов (11,8 %). Средний возраст пациентов с мутациями CALR (медиана 53 лет) был значимо меньше возраста пациентов без данных мутаций (63 года), $p=0,025$. Мутация MPL W515L, которая выявлена только в этой группе, сопровождала 6 случаев ИМ (5,0 %). Не выявлено статистически значимых различий в частоте определения мутации JAK2, CALR и MPL у пациентов разного пола. В группе пациентов с ИМ мутация JAK2 была сопряжена с большим ко-

личеством эритроцитов и уровнем гемоглобина — в 1,28 и 1,32 раза, $p<0,001$ и $p<0,001$ соответственно, в сопоставлении с пациентами без данной мутации, у которых медиана количества эритроцитов $3,4 \times 10^{12}/л$ и уровень гемоглобина 96,2 г/л были снижены относительно значений нормы. Также были выявлены статистически значимые различия в отношении количества лейкоцитов ($p=0,001$), тромбоцитов ($p=0,003$) и уровня ЛДГ ($p=0,035$): у пациентов с мутацией количество лейкоцитов и тромбоцитов было соответственно в 1,45 раза и в 2,27 раз больше (медиана $11,2 \times 10^9/л$ и $501,0 \times 10^9/л$), а содержание ЛДГ — в 1,48 раз меньше (медиана 327,0 Ед/л), чем у JAK2-отрицательных пациентов. В данной группе уровень ЛДГ в плазме крови JAK2-положительных пациентов (медиана 327 Ед/л) был в 2,1 раз ниже, чем у пациентов с мутациями CALR (медиана 687,5 Ед/л, $p=0,011$) и в 1,96 раз ниже, чем у MPL-положительных пациентов (медиана 641,5 Ед/л, $p=0,015$), но значимо не отличался от такового у пациентов без мутаций ($p=0,967$). Среди пациентов с ИМ мутация MPL в 100 % случаев была сопряжена со спленомегалией, что в 5,0 раз чаще, чем у пациентов без каких-либо мутаций ($p=0,001$), в 2,82 раз чаще, чем у пациентов с мутацией JAK2 ($p=0,003$), и в 2 раза чаще, чем при наличии мутаций CALR ($p=0,052$).

Выводы. Соматические мутации генов JAK2 (V617F), CALR (del и ins) и MPL (W515L и W515K) в качестве маркеров клональной миелопролиферации позволяют верифицировать диагноз у 94,7 % пациентов с ИП, 79,7 % пациентов с ЭТ и 83,2 % пациентов с ИМ. Мутационный статус имеет наиболее выраженное клиническое значение в группе пациентов с ИМ.

**С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, Н. В. Рыжикова,
Н. Г. Чернова, Е. Н. Паровичникова, А. Б. Судариков**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва*

ОДНОВРЕМЕННОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ Т- И В-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ, КЛОНАЛЬНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ У ПАЦИЕНТОВ С ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

Введение. Одновременное выявление Т- и В-клеточной клональности, клональная гетерогенность при лимфомах, клональная экспансия Т-лимфоцитов как следствие иммунного, аутоиммунного процесса, сокращения

нормального поликлонального лимфоцитарного разнообразия является диагностической проблемой, решением которой в доступной на сегодняшний день литературе не представлено.

Цель. Изучить клональную гетерогенность у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и клональность при отсутствии признаков опухоли.

Материалы и методы. Ретроспективный анализ данных клональности проведен у 2182 пациентов. Проспективный анализ — у 102 пациентов. Клональные реаранжировки выявляли с помощью метода ПЦР по протоколу BIOMED-2 и последующим проведением фрагментного анализа. Селекция лимфоцитов крови проводилась при помощи магнитных частиц.

Результаты. По данным ретроспективного анализа — одновременное выявление В- и Т-клеточной клональности (четкие клональные пики и клональные пики на поликлональном фоне — сомнительная моноклональная картина) отмечено у 121 из 2182 пациентов. В-клеточная клональность не выявлена ни в одном из случаев Т-клеточных лимфом и в 97 % случаев ассоциирована с В-клеточной лимфомой (пациенты с АИТЛ исключены). Т-клеточная клональность, напротив, выявлена в 21 % случаев В-клеточных лимфом. Среди всех неходжкинских лимфом выявление Т-клеточной клональности только в 17 % случаев ассоциировано с Т-клеточной лимфомой. В единичных случаях одновременное выявление В- и Т-клональности может свидетельствовать о наличии нескольких опухолей (композитной лимфомы).

Клональная гетерогенность — наличие различных по длине в парах нуклеотидов клональных продуктов в различных органах и тканях у одного пациента была отмечена нами при исследовании пациентов с ангиоиммунобласт-

ной Т-клеточной лимфомой (АИТЛ). У 76 % (20 из 26) больных клональные продукты полностью или частично отличались от выявленных в материале лимфатического узла. После выполнения селекции на CD4 и CD8 лимфоциты, показано, что часть клональных Т-лимфоцитов принадлежит к CD8+ популяции лимфоцитов и не имеет отношения к опухоли. В группе здоровых доноров и добровольцев у 35,5 % (18 из 62) человек в крови определялось преобладание одной или нескольких популяций Т-лимфоцитов. Разделив их на CD8+ популяцию и CD8- популяцию, мы показали, что у 10 из 12 обследованных доноров в CD8+ популяции лимфоцитов обнаружены моноклональные реаранжировки генов TCR (n=7), сомнительные моноклональные реаранжировки (n=1) или олигоклональные реаранжировки (n=2). Если в общей популяции был выявлен доминирующий пик, то он же доминировал в CD8+ популяции. При этом у большинства обследованных (у 8 из 12) оставшаяся популяция клеток (CD8-) была поликлональной.

Выводы. Таким образом, В-клеточная клональность является более важным диагностическим критерием наличия В-клеточной лимфомы, в отличие от Т-клеточной клональности, при диагностике Т-клеточной лимфомы. CD8+ лимфоциты, имеющие клонально перестроенные гены TCR, могут персистировать в течение длительного времени и выявляются не только при аутоиммунных заболеваниях, неопухоловых гематологических заболеваниях, но и у пациентов с лимфомами и у здоровых лиц и не имеют отношения к опухоли.

Т. Н. Субботина^{1,2}, А. А. Карнюшка¹, И. Е. Маслюкова¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России», г. Красноярск

АНАЛИЗ УРОВНЯ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ СОМАТИЧЕСКОЙ МУТАЦИЕЙ C. 1849 G>T (V617F) В ГЕНЕ JAK2 С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ «MINOR VARIANT FINDER»

Введение. Соматические мутации в опухолевых клетках могут служить диагностическими и прогностическими маркерами, а также определять чувствительность к противораковым препаратам. Известно, что при использовании метода Сэнгера для анализа соматических му-

таций существуют проблемы, связанные как с количественной оценкой уровня присутствия мутантного аллеля (что важно при онкогематологических патологиях), так и с интерпретацией результатов в образцах ДНК с уровнем нагрузки мутантным аллелем менее 15–20 %.

В тоже время достаточно часто, в том числе и при онкогематологических заболеваниях, соматические мутации (драйверные или ассоциированные с неблагоприятным прогнозом течения заболевания) присутствуют в небольшом количестве исследуемых аллелей. Это диктует необходимость использования более чувствительных молекулярно-генетических методов или дополнительного программного обеспечения (ПО). Новое ПО «Minor Variant Finder» для генетических анализаторов фирмы Applied Biosystems предлагается как удобное в использовании ПО для поиска малопредставленных вариантов соматических мутаций, а также подходящее для оценки уровня аллельной нагрузки соматическими мутациями. Наиболее часто встречающейся драйверной мутацией среди пациентов с хроническими миелопролиферативными неоплазиями (ХМН) является мутация с.1849 G>T (V617F) в 14 экзоне гена *JAK2*.

Целью Определение уровня аллельной нагрузки соматической мутацией с.1849 G>T (V617F) в гене *JAK2* с помощью программы «Minor Variant Finder» в образцах ДНК от пациентов с диагнозом ХМН.

Материалы и методы. Исследовали образцы ДНК 5 пациентов с диагнозом ХМН и разным уровнем аллельной нагрузки ранее выявленной мутации с.1849 G>T (V617F) в гене *JAK2*. ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови с использованием набора реагентов GeneJET™ (ThermoFisherScientific). Участок гена *JAK2* (377bp) амплифицировали, используя праймеры *JAK2_F* (5'-CAAAGCACATTTGTATCCTCA-3') и *JAK2_R* (5'-AGTCCTACAGTGTTCAGT-3'). Продукт ПЦР очищали ExoSAP-IT. Секвенирующую ПЦР с прямого и обратного праймеров, а также очистку полученного продукта проводили с использованием наборов BigDyeTerminatorv3.1 и BigDyeXTerminator. Пробы подвергали капиллярному электрофорезу на генетическом анализаторе 3500. Полученные сиквенсы срав-

нивали с референсной последовательностью гена *JAK2* (NM_004972.3) и контролями для обоих праймеров в программе «Minor Variant Finder» (Applied Biosystems, США) для определения уровня аллельной нагрузки мутацией с.1849 G>T (V617F) в 14 экзоне гена *JAK2*. В качестве контроля использовали ДНК пациента без вышеуказанной мутации.

Результаты. Важно отметить, что ПО «Minor Variant Finder» имеет существенное ограничение и может быть использовано для поиска малопредставленных вариантов соматических мутаций и определения уровня аллельной нагрузки только при анализе однонуклеотидных замен и не может быть использовано в случае indel мутаций. При анализе мутации с.1849 G>T (V617F) в 14 экзоне гена *JAK2* указанное ПО удобно использовать как для поиска малопредставленных вариантов, так и для определения уровня аллельной нагрузки данной мутацией. Уровень аллельной нагрузки мутацией с.1849 G>T при использовании ПО «Minor Variant Finder» у пациента № 1 составил 5,1 % и 4,7 %; № 2–11,0 % и 19,1 %; № 3–14,1 % и 17,7 %; № 4–12,0 % и 12,8 %; № 5–41,2 % и 37,8 % с прямого и обратного праймеров, соответственно. Ранее данный показатель для выбранных пяти образцов ДНК был определен либо методом пиросеквенирования, либо ПЦР-РВ и составил 5,2, 10,5, 15,7, 14,3 и 35,2 %, соответственно.

Выводы. ПО «Minor Variant Finder» может быть использовано для выявления малопредставленных вариантов и оценки уровня аллельной нагрузки соматической мутации с.1849 G>T (V617F) в 14 экзоне гена *JAK2*. Важно отметить, что использование ПО «Minor Variant Finder» позволяет увеличить выявляемость соматических мутаций, поскольку в случае присутствия в образце ДНК менее 20 % мутантного аллеля и анализе результатов секвенирования по Сенгеру без применения данного ПО нельзя быть уверенным в наличии мутации.

Т. Н. Субботина^{1,2}, А. А. Карнюшка¹, Е. А. Дунаева³, К. О. Миронов³, Е. В. Васильев⁴, М. А. Михалев⁵, М. Г. Смелянская⁴, А. С. Хазиева⁴, Т. А. Гаркуша⁶, В. А. Хоржевский⁶

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России», г. Красноярск

³ Федеральное Государственное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва

⁴ Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница», г. Красноярск

⁵ Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», г. Красноярск

⁶ Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро», г. Красноярск

СКРИНИНГОВЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В 9 ЭКЗОНЕ ГЕНА *CALR* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ГЕТЕРОДУПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА

Введение. На сегодняшний день идентифицировано и классифицировано более 50 различных мутаций в гене *CALR*, ассоциированных с хроническими миелопролиферативными новообразованиями (ХМН). Все мутации делят на два типа, к первому типу относятся делеции, ко второму типу — инсерции. Мутации типа 1 чаще встречаются при миелофиброзе (МФ), тогда как при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) мутации типа 1 и типа 2 встречаются с одинаковой частотой. Случаи наличия *CALR* мутаций при истинной полицитемии (ИП) в литературе имеются, но остается неясным клиническое значение таких мутаций и их вклад в развитие патогенеза ИП.

Для выявления всех возможных вариантов *CALR* мутаций удобнее использовать методы секвенирования. Вместе с тем, высокая стоимость секвенирования определяет необходимость разработки двухэтапного алгоритма тестирования с предварительным использованием более доступного скринингового теста. Ранее мы предложили двухэтапный алгоритм для обнаружения мутаций в экзоне 12 *JAK2* с использованием недорогого скринингового теста с помощью гетеродуплексного анализа.

Цель. Продемонстрировать возможность использования метода гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) для выявления мутаций в 9 экзоне гена *CALR* в качестве предварительного скринингового теста.

Материалы и методы. В исследование было включено 6 образцов ДНК пациентов с различными фенотипическими формами ХМН и различным уровнем аллельной нагрузки мутациями в гене *CALR*. Было получено письменное информированное согласие пациентов на прове-

дение научного исследования. Наличие мутаций в гене *CALR* в выбранных образцах ДНК было ранее определено методом секвенирования по Сэнгеру (AB3500, США). Для определения уровня аллельной нагрузки образцы ДНК также были проанализированы методом пиросеквенирования (PyroMark Q24, Германия). Для отработки скринингового теста проводили ПЦР с дополнительным этапом образования гетеродуплексов с использованием набора реагентов «ПЦР-комплект» (Синтол, Москва) на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США). ПЦР-продукты детектировали методом электрофореза в 8 % ПААГ.

Результаты. Диагнозы ЭТ и МФ для шести выбранных пациентов ранее подтверждены морфологическим исследованием трепано-биоптата костного мозга. Важно отметить, что у одного из шести пациентов был подтвержденный диагноз ИП, что является редким явлением. Все шесть пациентов имеют шесть различных *indel* вариантов мутаций в 9 экзоне *CALR*, в частности, пациент № 1 имеет мутацию с. 1154_1155insGTGTC; № 2 — с. 1128_1129insCTTTGCTT и с. 1131_1133delAGA; № 3 — с. 1100_1151del (52); № 4 — с.1154_1155insTTGTC; № 5 — с. 1092_1143del (51); № 6 — с.1154_1155insTTGTC. Минимальное и максимальное количество нуклеотидов, отличающих мутантную последовательность 9 экзона *CALR* от дикого типа, при разных вариантах мутаций составило 5 и 52, соответственно. Уровень аллельной нагрузки варьировал в выбранных образцах ДНК от 25 % до 50 %.

При анализе полученных электрофореграмм на дорожках всех шести проб, имеющих мутации, четко визуализируется основной фрагмент, соответствующий дикому типу — 265 п.о. Полосы, соответствующие мутантным аллелям

визуализируются лишь для пациентов № 3 и № 5, имеющих крупные делеции. На дорожках пациентов № 1, № 2, № 4 и № 6 таковые полосы отсутствуют, что, по-видимому, обусловлено типом мутации, то есть, во всех этих четырех вариантах мутантный аллель отличается от аллеля дикого типа инсерцией 5-ти нуклеотидов. Важно отметить, что во всех шести случаях также визуализируются дополнительные полосы выше фрагмента дикого типа, соответствующие гетеродуплексам, образованным сочетанием фрагментов дикого и мутантного типов аллелей. Таким образом, использование

метода гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ позволило выявить мутации в 9 экзоне гена *CALR* во всех выбранных образцах ДНК.

Выводы. Предлагаемый вариант гетеродуплексного анализа с детекцией в ПААГ может быть рекомендован к использованию как скрининговый тест, предшествующий секвенированию. Двухэтапный подход позволяет оптимизировать алгоритм и повысить эффективность тестирования пациентов с подозрением на мутации в 9 экзоне гена *CALR*.

С. А. Таурова, О. В. Березина, В. С. Овчинников, Т. И. Поспелова

*Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Городская клиническая больница № 2, Новосибирск.*

АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТАХ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

Введение. Генетические аномалии играют основную роль в патогенезе острых лейкозов, а также определяют морфологические и иммунологические особенности опухолевых клеток.

Цель. Изучить структуру хромосомных аберраций (ХА) при различных морфологических вариантах острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) у больных г. Новосибирска и Новосибирской области.

Материалы и методы. В лаборатории Городского гематологического центра г. Новосибирска за период с 2014 по 2018 гг. обследовано 111 пациентов города и области с впервые выявленным ОМЛ. Средний возраст больных составил 47 лет (от 16 до 78). Из них 48 мужчин (43,2 %), 63 женщины (56,8 %). Всем пациентам проведены стандартные цитогенетические исследования (СЦИ), изучены данные морфологического исследования и проточной цитометрии. У 104 больных (93,7 %) СЦИ были дополнены флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH). Использовались следующие ДНК-пробы: Break Apart Probe — *MLL*(11q23.3), *EVI1*(3q26.2), *E2A*(19q13.3) (Cytocell), *RARA*(17q21), *JAK2*(9p24) (Kreatech), Translocation Probe — *BCR/ABL* t(9;22), *AML1/ETO* t(8;21), *CBFB/MYH11* t(16;16), *PML/RARα* t(15;17) (Cytocell), *KMT2A/MLLT3* t(9;11), *DEK/NUP214* t(6;9) (Kreatech), Deletion Probe — *Del*(5q), *Del*(7q),

P53 (Cytocell), *Satellite Enumeration Probe* — *Yq12*, *D8Z1* (Kreatech).

Результаты. Самую многочисленную группу составили ОМЛ с минимальными признаками миелоидной дифференцировки бластов — 24 человека (21,6 %). ХА выявлены у 9 человек (37,5 %): *i*(17q) в 2-х случаях, *inv*(16), +8, *t*(8;21) (q21; q22), *add*(9q), —7/*del*(7q), *del*(5q) у 2 пациентов в составе комплексного кариотипа, гипердиплоидия, дополнительные локусы генов *MLL*, *EVI1*, *BCR*, *ABL1*, *TAS2R1*, *EGR1* (выявлены только при FISH-исследовании). Больных с ОМЛ с миелоидной линейной направленностью без признаков созревания бластов — 17 человек (15,3 %). Из них аномалии выявлены у 10 пациентов (58,8 %): *inv*(16), —17/*del*(17p) у 2 больных, *t*(8;21) (q21; q22), +11/11q по 2 случая, —7/*del*(7q), *del*(5q) по 4 случая, дополнительные локусы гена *MLL*, комплексный кариотип у 3 человек. У одного пациента делеция длинного плеча хромосомы 5 выявлена только при FISH-исследовании. В группе ОМЛ с созреванием 16 человек (14,4 %). Аберрации выявлены у 10 больных (62,5 %): +8 (4 случая, в одном из них выявлена только при FISH-исследовании), -X, *inv*(3)(q21q26), *t*(8;21) (q21; q22) у двоих пациентов, *del*(2q), *del*(9) (q22), +22, —7, *del*(7q), комплексный кариотип у 2 человек. С промиелоцитарным вариантом ОМЛ обследовано 15 больных (13,5 %). При СЦИ *t*(15;17)(q24; q21) обнаружена у 13 пациентов,

в двух случаях поломка выявлена только при FISH-исследовании. У одного больного в транслокации участвует изохромосома 17, другие дополнительные aberrации обнаружены у 4 человек: +8 (2 случая), +21, —22. В группу с миеломонобластным вариантом острого лейкоза вошли 17 человек (15,3 %). ХА выявлены у 11 пациентов (64,7 %): t(8;21)(q21; q22) в сочетании с другими поломками (—Y и del(9)(q22)), 4 сверхчисленных хромосомы 8, inv(3)(q21q26), del(5q) в 2-х случаях, del(16)(q22), del(17p), перестройки MLL у 3 человек (в одном случае подтверждена FISH t(9;11)(q21–22; q23)), дополнительные локусы гена MLL у 2 пациентов, отсутствие локуса гена E2A(19q13.3), у одного человека комплексный гиподиплоидный кариотип. В трех случаях поломки выявлены только при FISH-исследовании. В группе ОМЛ с моноцитарной линейной направленностью 19 человек (17,1 %). Aberrации выявлены у 12 пациентов: t(9;11)(q21–22; q23) в 2-х случаях, у 3 больных перестройки локуса гена MLL, выявленные только при FISH-исследовании, del(11)(q23), +8 в сочетании с другими aberrациями, del(5q) в составе комплексного кариотипа. В группе ОМЛ с мегакариоцитарной направленностью бластов 3 пациента (2,7 %). У всех комплекс-

ные изменения кариотипа с гиподиплоидией (del(5q), —17/del(17p) и другие ХА).

Выводы. Распределение некоторых наиболее значимых хромосомных aberrаций среди морфологических вариантов ОМЛ отличается от среднестатистического. Так, транслокация t(8;21)(q21; q22), наиболее характерная для ОМЛ с созреванием, была выявлена с одинаковой частотой среди пациентов с миелоидной направленностью без созревания, с созреванием и с миеломонобластным вариантом. inv(16) обнаружена в группе с минимальными признаками миелоидной дифференцировки, с миелоидной направленностью без созревания, хотя считается наиболее специфичной для миеломонобластного варианта. Перестройки 11q23 чаще всего были выявлены в группе пациентов с моноцитарной линейной направленностью, что соответствует среднестатистическим показателям. Трисомия 8 чаще встречалась у пациентов с миелоидной направленностью с созреванием. Делеции 5q, 7q, 17p с наибольшей частотой обнаружены при ОМЛ без созревания. Комбинация стандартного цитогенетического исследования и флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) позволяет чаще выявлять цитогенетические aberrации.

Е. В. Трегубова, В. А. Овсепян, М. В. Сарпова, А. С. Лучинин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *CYP1B1* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Введение. Известно, что некоторые структурные варианты генов ферментов надсемейства цитохрома P450 играют роль в развитии ряда опухолевых заболеваний, в том числе гемобластозов. Одним из ключевых ферментов указанного надсемейства, участвующих в первой фазе метаболизма многих ксенобиотиков, является CYP1B1. При окислении ксенобиотиков в данной фазе образуются активные промежуточные метаболиты, некоторые из которых могут оказаться мутагенами и канцерогенами, способными вызвать повреждение ДНК. Кроме того, CYP1B1 может действовать как опухоль-супрессорная (антилейкемическая) гидроксилаза путем биоактивации нетоксичных пищевых компонентов (например, таких как ресвератрол), превращая их в вещества, ингибирующих

рост клеток. Известно, что полиморфный локус Leu432Val гена *CYP1B1*, расположенный в экзоне 3 и кодирующий гем-связывающий домен одноименного фермента, связан с изменением его каталитической активности: замена Leu на Val в положении 432 повышает активность данного фермента. В настоящее время обсуждается прогностическое значение полиморфного статуса гена *CYP1B1* в развитии и течении хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), однако роль отдельных аллельных вариантов этого гена при данном заболевании изучена недостаточно.

Цель. Изучение возможности ассоциации полиморфного локуса Leu432Val гена *CYP1B1* с риском развития ХМЛ.

Материалы и методы. В исследование включены 64 больных ХМЛ (35 (54,7 %) мужчин и 29

(45,3 %) женщин) в возрасте от 17 до 82 лет (медиана — 51 год). В группу сравнения вошли 311 условно здоровых лиц (мужчин — 157 (50,5 %), женщин — 154 (49,5 %)) в возрасте от 46 до 88 лет (медиана — 58 лет). Генотипирование проводили с использованием метода классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) при помощи термоциклера BIO-RAD C1000™ («Bio-Rad Laboratories», США). Детекцию продуктов ПЦР осуществляли методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле. Тесты на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга и выявление ассоциаций индивидуальных аллелей или генотипов с риском развития заболевания или его стадиями проводили методом χ^2 . Ассоциацию изучаемых генетических вариантов с риском развития заболевания оценивали по соотношению шансов (ОШ) с доверительным интервалом (ДИ) при 95 % уровне значимости. Для расчета генетического риска возникновения ХМЛ применялись общая и мультипликативная модели наследования.

Результаты. Установлены гендерные различия в распределении частот аллелей полиморфного локуса Leu432Val гена *CYP1B1* в исследуемых группах. Так, у больных ХМЛ мужского пола вариантный аллель 432Val гена

CYP1B1 встречался реже, чем в группе условно здоровых мужчин (27,1 % vs. 39,8 %, $\chi^2 = 3,92$, $p = 0,05$), в то время как статистически значимых различий между больными и условно здоровыми женщинами в распределении частот указанного аллеля не обнаружено. Из анализа отношений шансов следует, что носительство вариантного аллеля 432Val понижает риск развития ХМЛ у мужчин (ОШ = 0,56, 95 % ДИ = 0,32–1,00). Носительство же аллеля 432Leu, наоборот, является «рисковым» в отношении развития данного заболевания у индивидов мужского пола (72,9 % vs. 60,2 %; ОШ = 1,78; ДИ95 % = 1,00–3,15). Полученный результат можно объяснить тем, что у носителей аллеля 432Val гена *CYP1B1* в результате повышенной активности фермента по сравнению с носителями аллеля 432Leu образуется больше антилейкемического агента (например, пикетаннола), что может уменьшить риск развития ХМЛ.

Выводы. Полученные результаты могут свидетельствовать о пониженном риске развития ХМЛ у лиц мужского пола, являющихся носителями аллеля 432Val гена *CYP1B1*. Для подтверждения результатов необходимы дальнейшие исследования на более представительных выборках.

**И. С. Февралева, Н. В. Рисинская, А. Чабаяева, С. М. Куликов,
Л. А. Кузьмина, Е. Н. Паровичникова, А. Б. Судариков**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский медицинский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

СОЧЕТАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ ЦИТОКИНОВ CCR5, CCR2, ЦИТОКИНОВ IL6 И SDF1 У РЕЦИПИЕНТОВ И ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА: АНАЛИЗ АССОЦИИ С ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННЫМИ СОБЫТИЯМИ

Введение. После аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ) в организме реципиента сосуществуют вместе клетки реципиента и донора. Рецепторы на поверхности стволовых клеток, на клетках крови реципиента, ферменты, цитокины и хемокины, продуцируемые этими клетками после ТКМ, имеют донорское происхождение, в то время как белки, продуцируемые другими тканями, синтезируются генами реципиента. Донор и реципиент могут различаться любыми полиморфными аллелями, кроме основных HLA-аллелей. В последние годы в литературе появились работы, показывающие, что наличие определенных

полиморфизмов в генах TNF-alpha, IL-1alpha, IL-1Ra, IL-4 у реципиентов и доноров костного мозга оказывает влияние на посттрансплантационные события, такие как возникновение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ), тяжесть протекания этой реакции, продолжительность безрецидивного периода, инфекционные осложнения. В данной работе мы исследовали полиморфизмы рецепторов CCR2 и CCR5, экспрессирующихся на поверхности моноцитов, макрофагов и лимфоцитов — клеток, развивающихся из донорского костного мозга, и лигандов SDF1 и IL-6, секретирующихся клетками реципиента, рецепторы для

которых находятся на поверхности клеток донорского костного мозга.

Цель. Исследование возможной связи сочетаний полиморфных аллелей генов CCR5-delta 32, CCR2-64I, SDF1-3>A, IL-6~<572 C/G в парах реципиент/донор с общей выживаемостью, временем восстановления гемопоэза, риском возникновения РТПХ и инфекционными осложнениями у пациентов после ТКМ.

Материалы и методы. В исследование включены 43 пациента НМИЦ гематологии в возрасте от 18 до 64 лет (медиана 32 года), 13 мужчин и 30 женщин, после аллогенной ТКМ. Распределение по диагнозам следующее: 26 человек с ОМЛ, 9 человек с ОЛЛ, 3 — с апластической анемией, 2 — с МДС, 2 — с ХМЛ и 1 — с ХЛЛ. Образцы ДНК, выделенной из крови доноров и реципиентов до ТКМ, проанализировали на наличие полиморфных аллелей CCR5-delta 32(rs333), CCR2-64I(rs1799864), SDF1-3>A(rs1801157), IL6-572 C/G (rs1800796). Аллель-специфичную ПЦР проводили с праймерами и флюоресцентными пробами TaqMan собственного дизайна. Результаты генетического анализа были сопоставлены с клиническими данными. Для статистического анализа использовали лицензионное программное обеспечение SAS.

Результаты. По каждому исследуемому полиморфному аллелю когорты пациентов была разделена на 4 группы: 1 — нет мутантных аллелей у донора и реципиента; 2 — одинако-

вое количество мутантных аллелей у донора и реципиента; 3 — у донора меньше мутантных аллелей, чем у реципиента (0 vs 1, 0 vs 2, 1 vs 2); 4 — у донора больше мутантных аллелей, чем у реципиента. Группы сбалансированы по возрасту, полу, диагнозу, стадии заболевания и источнику трансплантата. Для полиморфных аллелей CCR5-delta 32, SDF1-3>A, IL-6~<572 C/G не было найдено связи с общей выживаемостью, временем реконституции, риском развития РТПХ и инфекционными осложнениями до 30 дня после ТКМ. Однако для группы пациентов, в которой у донора было больше мутантных аллелей гена CCR2-64I, чем у реципиента, восстановление гемопоэза происходило медленнее, чем в остальных группах ($p < 0.0001$). Для этой же группы была выявлена повышенная частота инфекционных событий с 30 по 120 день после трансплантации ($p < 0,0016$): 91 % (10 из 11 пациентов) против 22–50 % (среднее 25 %, 8 из 32 пациентов в остальных группах).

Выводы. Сниженные темпы восстановления гемопоэза и повышенная частота инфекционных осложнений у реципиентов после ТКМ могут быть связаны с приобретенными при трансплантации полиморфными аллелями гена CCR2. Исследование несовпадения полиморфных аллелей генов цитокинов и рецепторов цитокинов у донора и реципиента в перспективе может быть использовано для прогнозирования осложнений после ТКМ.

**Г. А. Цаур^{1,2,3,4}, Т. А. Мухачева⁴, П. А. Сибиряков¹, С. Ю. Ковалев⁴, А. Е. Друй⁵,
Ю. В. Ольшанская⁵, О. И. Солдаткина⁵, А. М. Попов⁵, Т. Ю. Вержбицкая^{1,2},
Е. С. Нохрина¹, Л. И. Савельев^{1,2,3}, О. Р. Аракаев^{1,2}, Л. Г. Фечина^{1,2}**

ВЫЯВЛЕНИЕ BCR-ABL1-ПОДОБНОГО ОЛЛ У ДЕТЕЙ

¹ Государственное автономное учреждение здравоохранения

Свердловской области Областная детская клиническая больница, г. Екатеринбург

² Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Центр специализированных видов медицинской помощи «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», г. Екатеринбург

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии, трансплантологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Цель. Отработка способа выявления BCR-ABL1-подобного ОЛЛ; клиническая и генетическая характеристика детей с BCR-ABL1-подобным ОЛЛ; оценка прогноза этой группы пациентов.

Материалы и методы. На основании ранее опубликованных данных нами была обрабо-

тана система анализа экспрессии 5 генов методом ПЦР в режиме реального времени (IGJ, SPATS2L, MUC4, CRLF2, CA6) для верификации группы BCR-ABL1-подобного ОЛЛ. Экспрессию генов оценивали методом deltaCt по отношению к экспрессии контрольного гена ABL1, после чего формировали единый интегральный

показатель. В том случае, если он был близок к результату, полученному у пациентов с *BCR-ABL1*-позитивным ОЛЛ, то пациентов относили в группу *BCR-ABL1*-подобного ОЛЛ. В исследуемую группу было включено 147 детей с ОЛЛ из В-линейных предшественников в возрасте от 1,2 до 17 лет (медиана 4,0 лет). Из этого числа было 10 пациентов с Ph-позитивным ОЛЛ, 59 пациентов с известными структурными и количественными цитогенетическими aberrациями, включая транслокации *t(9;22)(q34; q11)*, *t(12;21)(p13; q22)*, *t(1;19)(q23; p13)*, перестройки *11q23/MLL*, высокую гипердиплодию ($n=51-65$), гиподиплодию ($n<45$), а 78 пациентов сформировали группу без повторяющихся генетических перестроек («другие В-ОЛЛ»). Перестройки генов *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *IgH*, *JAK2*, *PDGFRb/CSFR1* оценивали методом FISH. Делеции в гене *IKZF1* выявляли методом MLPA. Наличие химерного гена *CRLF2-P2RY8* проводили методами ПЦР в геномной ДНК, MLPA и FISH. Химерный ген *CRLF2-IgH* выявляли методом FISH. Результаты терапии оценивали по кривым бессобытийной выживаемости (БСВ) и кумулятивной частоте развития рецидива (КЧР)

Результаты. Иерархический кластерный анализ и анализ главных компонент показали, что 16 пациентов с ОЛЛ кластеризовались совместно с 9 из 10 случаев Ph-позитивного ОЛЛ. Из 16 человек с *BCR-ABL1*-подобным профилем экспрессии было 3 пациента с ОЛЛ и синдромом Дауна, 1 пациент с внутривитрихромосомной амплификацией 21, 1 пациент с транслокацией *t(12;21)/ETV6-RUNX1*, а также 11 пациентов без повторяющихся перестроек («другие В-ОЛЛ»). Пациент с наличием транслокации *t(12;21)* был исключен из дальнейшего анализа. У пациентов с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ достоверно чаще выявлялись делеции в гене *IKZF1* и высокая

экспрессия *CRLF2* по сравнению с пациентами без *BCR-ABL1*-подобного профиля (67 % и 11 %, 40 % и 6 %, соответственно; $p<0,001$ в обоих случаях). У 9 пациентов, у которых определяли наличие химерных генов с участием тирозинкиназ, перестройки гена *JAK2* выявлены в двух случаях, *CRLF2* — в четырех (по 2 случая *CRLF2-IgH* и *CRLF2-P2RY8*), еще в двух случаях перестройки ни одного из исследованных генов выявлено не было. Среди пациентов с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ преобладали девочки (80 % против 57 % в оставшейся группе, $p=0,011$), у них чаще выявлялся инициальный лейкоцитоз более $30 \times 10^9/\text{л}$ (67 % и 18 %, соответственно, $p=0,001$) и М3 статус костного мозга на 15-й день индукции ремиссии (27 % и 4 %, соответственно, $p=0,010$). Пациенты с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ чаще стратифицировались в группу высокого риска (40 % и 9 %, соответственно, $p=0,001$). БСВ пациентов с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ, лечившихся по протоколу ALL-MB2008 ($n=10$), была достоверно ниже по сравнению с группой «другие В-линейные ОЛЛ» пациентами без *BCR-ABL1*-подобного профиля экспрессии ($n=57$) ($0,28 \pm 0,17$ и $0,93 \pm 0,04$, соответственно, $p<0,001$), а КВР — статистически значимо выше ($0,57 \pm 0,19$ и $0,02 \pm 0,02$, соответственно, $p<0,001$). Диагностическая эффективность *BCR-ABL1*-подобного профиля экспрессии генов для предсказания рецидива составляет 0,939 (95 % ДИ 0,881–0,997).

Выводы. Таким образом, нами показана технология быстрой идентификации пациентов с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ методом ПЦР в режиме реального времени. В данной группе пациентов часто выявляются случаи с делециями *IKZF1*, а также перестройки с участием киназ. Прогноз для пациентов с *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ при лечении по протоколу ALL-MB2008 — неблагоприятный.

А. И. Шакирова, И. М. Бархатов, Я. А. Гудожникова, Н. Н. Мамаев

Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачёвой, г. Санкт-Петербург
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

БИОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *BAALC* У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ПРИ ТЕРАПИИ МЕТОДОМ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Введение. На сегодняшний день лучшим способом терапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) считается аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Одним из отягчающих моментов такого лечения являются частые посттрансплантационные рецидивы (ПТР) заболевания и его прогрессия. Согласно современным представлениям, популяция клеток, ответственных за ПТР, формируется ранними лейкозными предшественниками, в частности лейкозными стволовыми клетками с иммунофенотипом CD34⁺CD38⁻, изучать которые в клинических условиях не так просто. Важный шаг к разрешению проблемы был сделан после внедрения в клинику нового панспецифического молекулярного маркера *BAALC* (*brain and acute leukemia-cytoplasmic*), гиперэкспрессия которого имеет место у половины больных ОМЛ, причём уровень его экспрессии слабо коррелирует с количеством бластных элементов в костном мозге. В то же время факт неслучайного распределения встречаемости гиперэкспрессии гена *BAALC* у больных с различными ФАБ-вариантами ОМЛ позволил предположить его важную патогенетическую роль в популяции инициирующих рецидив незрелых типов клеток (Xiao et al., 2015). Данная гипотеза подтверждается тем, что уровень экспрессии *BAALC* у больных ОМЛ значительно выше в субпопуляции CD34⁺ клеток по сравнению с общей фракцией ядерных элементов в костном мозге или более дифференцированными CD34-CD117⁺ и CD34-CD117⁻ клетками ($p < 0,001$). Кроме того, она значительно снижена у больных острым промиелоцитарным лейкозом. Что касается окончательной взаимосвязи гиперэкспрессии гена *BAALC* с продуцирующими его ранними предшественниками лейкозного гемопоэза у больных ОМЛ, её ещё предстоит установить.

Материалы и методы. Изучение уровня экспрессии гена *BAALC* было проведено у 115

больных ОМЛ, в возрасте от 2 до 60 лет, которым алло-ТГСК выполнялась в НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой. Измерение экспрессии гена *BAALC* осуществляли серийно методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Уровень экспрессии *BAALC* в 3100 копий/10⁴ копий *ABL1*, отличающийся от медианы такового у больных в ремиссии до ТГСК на четыре стандартных отклонения, был выбран в качестве порогового для исследования клинического значения гиперэкспрессии *BAALC*.

Результаты. Согласно полученным результатам, такой неблагоприятный в прогностическом отношении фактор в дебюте заболевания, как гиперэкспрессия гена *BAALC*, в случае выполнения больному алло-ТГСК своей клинической значимости не имеет, как по отношению к общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ), так и к риску развития ПТР ($p > 0,377$). В то же время в случае гиперэкспрессии *BAALC* в костном мозге непосредственно перед началом режима кондиционирования, риск развития ПТР значительно возрастает (69,2 % vs. 39,8 %, $p = 0,026$), даже в случае алло-ТГСК в состоянии достигнутой цитологической ремиссии.

Как известно, важным предиктором течения посттрансплантационного периода у больных ОМЛ является наличие у больных на момент ТГСК гиперэкспрессии маркера *WT1*, который на молекулярном уровне отражает популяцию бластов в костном мозге. Согласно полученным данным, обнаружение у больных на момент выполнения алло-ТГСК повышенного уровня обоих обсуждаемых здесь маркеров приводило к значительному ухудшению показателей двухлетних ПТР и БРВ, по сравнению с таковыми у больных, не имевших их гиперэкспрессии (80 % vs. 37,5 % ($p = 0,015$) и 6,7 % vs. 45,4 % ($p = 0,013$) соответственно), или обнаруживающих гиперэкспрессию только одного маркера

(80 % vs. 21,1 %, ($p=0,003$) и 6,7 % vs. 42,1 %, ($p=0,028$) соответственно).

В отличие от того, что лечение с помощью алло-ТГСК позволяет преодолеть неблагоприятный фактор гиперэкспрессии *BAALC* в дебюте ОМЛ, в случае повышения уровня его экспрессии в посттрансплантационном периоде ухудшение прогноза течения заболевания становится очевидным. Ухудшение прогноза касалось ОВ (22,7 % vs. 68,9 %; $p=0,00$), БРВ (9,1 % vs. 66,2 %; $p=0,00$) и кумулятивной частоты возникновения ПТР (90,9 % vs. 16,2 %; $p=0,00$) в течение двух лет после ТГСК. По нашим данным серийный мониторинг уровня экспрессии *BAALC* после ТГСК на день (Д) Д+60, Д+90, Д+120, Д+150 и Д+270 имеет важное клиническое значение ($p<0,006$). При сравнении данного подхода с результатами определения минимальной остаточной болезни (МОБ) реко-

мендованными методами исследования с помощью ROC-анализа было показано, что уровень экспрессии *BAALC* слабо отражает количество остаточных клеток опухолевого клона после проведенной терапии, а потому его серийный мониторинг не целесообразно использовать в качестве универсального маркера МОБ у больных ОМЛ после ТГСК.

Выводы. Представленные здесь результаты показывают, что изучение уровней экспрессии гена *BAALC* у пациентов с ОМЛ существенно дополняет систему стратификации этих больных на группы риска, основанную на экспрессии гена *WT1* и может стать важным подспорьем для предсказания ответа на терапию. Поэтому изучение взаимосвязи гиперэкспрессии гена *BAALC* с конкретными фракциями незрелых лейкозных предшественников в области изучения острых лейкозов становится крайне важным.

Д. Б. Шамсутдинова, Х. Я. Каримов

Научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, г. Ташкент

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНА PAI I 5G/4G НА РИСК РАЗВИТИЯ ТРОМБОЗА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Введение. Многочисленные исследования последних лет посвящены выяснению роли таких генетических дефектов, как мутация гена PAI I в предрасположенности к формированию тромбозов. Определено, что эта мутация может стать причиной остро локализованного тромбоза или блокады терминального сосудистого русла микротромбами и фибрином. Однако данные о значимости данного генетического маркера в развитии тромбоэмболических осложнений у онкогематологических больных крайне противоречивы, особенно в отношении влияния на гемостаз носительства генетических изменений PAI I при ХМПЗ.

Цель. Изучение влияния полиморфизма 5G/4G гена PAI I на риск развития тромбоза у больных с ХМПЗ.

Материалы и методы. Работа выполнена на 225 образцах ДНК, выделенных из периферической крови больных с наиболее часто встречающимися ХМПЗ — хроническим миелолейкозом (ХМЛ, $n=32$) и истинной полицитемией (ИП, $n=79$), а также группы контроля ($n=114$). Всего обследовано 111 больных, из них 53 с тромбозом и 58 без тромбоза. Генотипирование образ-

цов и детекция мутации полиморфизма 5G/4G гена PAI I проводились методом ПЦР на приборе «Applied Biosystems 2720» (США) с использованием наборов реагентов НПО «Литех» (Москва, Россия), согласно инструкции производителя. Статистический анализ результатов проведен с использованием пакета статистических программ «OpenEpi 2009».

Результаты. В результате проведенного исследования нами выявлены статистически значимые различия между объединенной группой больных ХМПЗ с тромбозом и условно здоровых доноров по частотам 5G и 4G аллелей (42.5/57.5 % против 73.2/26.8 %, соответственно; $\chi^2=29.6$; $P<0.05$; OR=3.7; 95 % CI 2.28–6.022). В этих исследованных группах выявлено статистически значимое различие и в распределение генотипа 5G/4G (57.4 % против 30.5 %; $\chi^2=4.3$; $P=0.04$; OR=2.0; 95 % CI 1.03–3.861) и гомозиготного генотипа 4G/4G (30.2 % против 7.9 %; $\chi^2=14.1$; $P<0.05$; OR=3.8; 95 % CI 2.05–12.39).

Также выявлялось статистически значимое увеличение носительства частот неблагоприятного 4G аллеля в подгруппе больных с тромбозом по сравнению пациентов без тромбо-

за (57.5 % против 33.6 %; $\chi^2=12.8$; $P=0.0003$; $OR=2.7$; 95 %CI 1.55–4.614). Носительство гетерозиготного генотипа 5G/4G и гомозиготного генотипа 4G/4G гена PAI I в этих подгруппах составило: 54.7 % против 43.1 % ($\chi^2=1.5$; $P=0.2$; $OR=1.6$; 95 %CI 0.753–3.377) 30.2 % против

12.1 % ($\chi^2=5.5$; $P=0.02$; $OR=3.1$; 95 %CI 1.178–8.427), соответственно.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии гетерозиготного и гомозиготного генотипов 5G/4G гена PAI I на риск развития тромбоза у больных с ХМПЗ в Узбекистане.

О. А. Шухов, А. Г. Туркина, Е. Ю. Чельшева, А. В. Быкова, А. Н. Петрова, И. С. Немченко

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

ТЕРАПИЯ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА СОГЛАСНО СОВРЕМЕННЫМ РЕКОМЕНДАЦИЯМ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО ПРОСПЕКТИВНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ «РАННЯЯ ИНДУКЦИОННАЯ ТЕРАПИЯ И МОНИТОРИНГ (РИТМ)»

Введение. Современные клинические рекомендации по диагностике и терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) определяют показания к смене ингибитора тирозинкиназ (ИТК) первой линии в случае «неудачи» терапии на различных этапах лечения.

Цель. Оценить эффективность терапии ХМЛ при выполнении протокола своевременного мониторинга и переключения.

Материалы и методы. Набор в пилотное проспективное исследование «РИТМ» проводился в течении 5 лет. В исследование и анализ вошли 100 больных ХМЛ. Терапия и мониторинг проводился согласно Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и терапии ХМЛ (2013 г.).

Результаты. Медиана наблюдения от начала терапии составила 46 мес. (от 12 до 74 мес). В качестве первой линии терапии иматиниб получали 91 (91 %) больных, 9 (9 %) ИТК второ-

го поколения (ИТК2). «Неудача» терапии была зафиксирована у 31 (31 %) больных. На ИТК2 переключены 26 (84 %) больных из группы «неудачи». На момент проведения анализа живы 95 (95 %) пациентов. Кумулятивная частота смертей, ассоциированных с ХМЛ, составила 2 %. К пятому году наблюдения кумулятивная вероятность достижения полного цитогенетического (ПЦО), большого (БМО) и глубокого (глубокого МО) молекулярного ответов составила 93 %, 88 % и 66 % соответственно.

Выводы. Выполнение протокола современных рекомендаций позволяет получить результаты, сопоставимые с результатами терапии ИТК2 в первой линии лечения, что позволит уменьшить затраты на лечение и риск развития нежелательных явлений, сопровождающих терапию ИТК2. Высокая частота достижения глубокого МО в дальнейшем позволит увеличить долю больных в ремиссии без лечения.

Anna Dolnik^{1,6}, Sibylle Cocciardi¹, Silke Kapp-Schwoerer¹, Frank G. Rücker¹, Susanne Hirsch¹, Tamara J. Blätte¹, Sabrina Skambraks¹, Jan Krönke¹, Andrea Corbacioglu¹, Verena I. Gaidzik¹, Peter Paschka¹, Veronica Teleanu¹, Gudrun Göhring³, Felicitas Thol⁴, Michael Heuser⁴, Arnold Ganser⁴, Daniela Weber¹, Eric Sträng⁵, Hans A. Kestler⁵, Karlheinz Holzmann², Hartmut Döhner¹, Lars Bullinger^{1,6*#}, Konstanze Döhner^{1*#}

¹ Department of Internal Medicine III, University Hospital of Ulm, Ulm, Germany

² Genomics Core Facility, University of Ulm, Ulm, Germany

³ Institute of Cell & Molecular Pathology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴ Department of Haematology, Haemostasis, Oncology, and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁵ Institute of Medical Systems Biology, Ulm University, 89081 Ulm, Germany

⁶ Department of Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Charité University Medicine, Berlin, Germany

* these authors contributed equally

CLONAL EVOLUTION PATTERNS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA (AML) WITH NPM1 MUTATION

Mutations in the *nucleophosmin 1 (NPM1)* gene are considered founder mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML). To further characterize the genetic composition of *NPM1* mutated (*NPM1*^{mut}) AML, we comprehensively assessed 129 paired samples obtained at diagnosis and relapse. We found a significant shift in the genetic pattern from diagnosis to relapse in 77 (60 %) patients (pts) with the highest instability seen for *FLT3*-ITD, while *DNMT3A*^{mut} proved to be the most stable aberration (95 %). *NPM1*^{mut} was lost at relapse in 11 pts (9 %) of which 10 revealed a stable preleukemic mutation (i.e. *DNMT3A*^{mut} and *IDH2*^{mut}). To gain further insight into these *NPM1*^{mut} loss cases, we performed whole exome sequencing (WES), which confirmed persistence of mutations known to be involved in clonal hematopoiesis. Moreover, at the time of relapse *NPM1*^{mut} loss pts

featured distinct mutational patterns that shared almost no somatic mutation with the corresponding diagnosis sample and impacted different signaling pathways. In contrast, mutational profiles of pts with persistent *NPM1*^{mut} at relapse were more stable which was reflected by a high overlap of mutations being present at diagnosis and relapse. RNA-Seq of *NPM1*^{mut} loss diagnosis/relapse pairs further supported a switch in signaling cascades at relapse. This includes the loss of characteristic *NPM1*^{mut} associated gene expression patterns, thereby supporting the hypothesis that loss of *NPM1*^{mut} at relapse is a distinct disease. Thus, our findings confirm that relapse often originates from persistent leukemic clones, although *NPM1*^{mut} loss cases more closely resemble a second “*de novo*” or treatment-associated AML (tAML).

Igor Wolfgang Blau

Charité University Berlin, Clinic for Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Berlin, Germany

RISK STRATIFICATION IN MULTIPLE MYELOMA

In recent years, several new drugs have been approved for the treatment of multiple myeloma. Many of these newer drugs are highly efficacious and less toxic than older chemotherapy drugs. In 2014, the diagnostic criteria for multiple myeloma were revised. The intent with the new criteria was to identify patients who require therapy at an earlier stage than at manifestation of organ complications. A subset of patients who were previously defined as having high-risk smoldering multiple myeloma was redefined as having multiple myeloma. In this context, it is logical to raise questions regarding the optimal clinical

management of patients who are diagnosed with smoldering multiple myeloma in the current era. When is the optimal time to start therapy?

New diagnostics standards published by V. Rajkumar in *Lancet Oncology* in 2014 summarized results of previous studies and represented the mind of the International Myeloma Working Group (IMW). Multiple Myeloma as plasmacell proliferative disease is defined by clonal bone marrow (by BM cytology or histology) plasma cells $\geq 10\%$ or biopsy-proven or extramedullary plasmacytoma. The new criterias for treatment indication are (2 any 1 or more of the below

listed myeloma defining events (actualized CRAB criteria)): Hypercalcemia: serum calcium 0.25 mmol/L (1 mg/dL) higher than the upper limit of normal or 2.75 mmol/L (11 mg/dL); renal insufficiency: creatinine clearance 40 mL/min and/or serum creatinine 173 mmol/L (2 mg/dL); Anemia: hemoglobin value of .2.0 g/dL below the lower limit of normal, or a hemoglobin value 10.0 g/dL; Bone lesions: 1 or more osteolytic lesions on skeletal radiography (ie, X-ray), low-dose CT, or PET-CT; clonal bone marrow plasma cell percentage 60 %; Involved/uninvolved serum free light chain ratio 100, and the involved serum free light chain concentration 10 mg/dL or higher; two or more focal lesions based on MRI studies of the skeleton.

With the introduction of the 2014 IMWG criteria for multiple myeloma, a proportion of patients previously considered to have smoldering multiple myeloma now fulfill the criteria of multiple myeloma requiring therapy. Ironically, with the change of the multiple myeloma criteria, the patients sometimes referred to as “ultra high risk smoldering multiple myeloma” (ie, very high risk of developing multiple myeloma) have become “ultra low risk multiple myeloma” because they now represent the earliest stage of multiple myeloma (ie, with a better likelihood of good clinical outcomes). Again, with the change of the definition of multiple myeloma in 2014, multiple myeloma

no longer is a disease that requires symptoms. The old terminology “asymptomatic multiple myeloma” has become irrelevant (because it includes both smoldering multiple myeloma and some patients with multiple myeloma) and the currently correct terminologies are smoldering multiple myeloma and multiple myeloma requiring therapy.

In 2015, A. Palumbo published in Blood the revised international scoring system (R-ISS), included LDH and cytogenetic aberrations (interphase FISH) to level of albumin and beta2 microglobulin. This new risk stratification led to our recent understanding, based on genetic determined course of disease in individual patient. Following this new definition of different myelomas, clinicians started first time treatment programs last year, based on this high risk criterias. This should be the future of myeloma treatment going on in direction to cure this disease.

Here we review and dissect data and models on the topics of clinical features, underlying biology, and early treatment trials in smoldering multiple myeloma, and first trials based on cytogenetic aberrations. The presentation highlights assumptions, facts, and gaps in the literature. As indicated in the title of the paper, the recurrent theme of the text is this: shall we treat smoldering multiple myeloma in the near future and could we cure myeloma patients by differential therapy.

Olga Blau

Charité University Berlin, Clinic for Hematology, Oncology and Tumorimmunology, Berlin Germany

DNMT3A MUTATION IN AML

Acute myeloid leukemia (AML) is caused by the accumulation of genetic mutations in undifferentiated myeloid precursors, resulting in impaired hematopoiesis and bone marrow failure. One of the common aberration in AML is mutation in the epigenetic modifying gene, DNA methyltransferase 3A (*DNMT3A*). *DNMT3A* is a de novo DNA methyltransferase that has recently gained relevance because of its frequent mutation in a large variety of immature and mature hematologic neoplasms. *DNMT3A* mutations are early events during cancer development and seem to confer poor prognosis to AML patients making this gene an attractive target for new therapies.

The occurrence of *DNMT3A* mutation in pre-leukemic cells (pre-LSCs) explains a particular attention to *DNMT3A*. Much evidence confirmed

that early mutations transform stem cells into pre-LSCs. Later, cooperating mutations would arise in cells that already contain the initiating mutations, resulting that pre-LSCs undergo clonal evolution leading to AML. Last studies have exposed a complex architecture of leukemia, where several genetically diverse subclones coexist with the dominant primary clone. We and other groups have shown that clonal genetic diversity, complex structure of gene crosstalk, multiple mutations, and extensive sub-clonal changes are common for AML.

DNMT3A mutation is a specific alteration with distinct biological properties. It was shown that *DNMT3A* mutations are present in T-cells and B-cells in diagnostic samples of AML and in T-cells several years later. The evidence from our study confirmed this data. The presence of *DNMT3A* in

both B- and T-cells lead to assumption that mutation had occurred in an early pre-LSCs prior to the acquisition of other genetic events, and could be resistant to chemotherapy.

Recent studies using sequencing of adults without hematological malignancies have identified premalignant genetic changes in leukemia-associated genes, most commonly in *DNMT3A*, *TET2*, and *ASXL1*. This can suggest the significant role of these mutations in early phase of leukemia development.

We and other groups have demonstrated that pre-LSCs with *DNMT3A* mutations persist in CR. The loss of correlation between *DNMT3A* and others mutations in CR after standard chemotherapy could be explained by the presence of mutations in different leukemic subclones. Additionally, we have shown disappearance of *DNMT3A* mutation in patients with complete donor chimerism after allogeneic stem cell transplantation. This data suggests the removal of leukemic stem cells after transplantation and indicate the importance of this therapy for high risk AML patients.

Induction therapy leads to achieving complete remission (CR) in 52 % to 72 % of AML patients. Although potentially curative therapy (eg, new agents, target therapy) is now available for many patients, about 50 % have relapse after CR. There are many various clonal pathways to relapse, including the addition of novel mutations in pre-LSC and LSC. Recent progress in understanding the pathogenesis of leukemia relapse has revealed many dysregulated molecular pathways that could provide a rational basis for the development of novel targeted therapies.

Recently, the prognostic value of *DNMT3A* activities via alterations in methylation patterns that have a clear effect on the activity of gene-specific promoters was demonstrated. *DNMT3A*

mutations may cause irregular DNA methylation patterns and transcriptional expression levels in genes known to be involved in acute myeloid leukemia pathogenesis. Changes of enzymatic activity affect normal methylation patterns in AML specific genes. Moreover, it was shown that alternative splicing of *DNMT3A* have epigenetic and functional effects. Specific variant of *DNMT3A* have a distinct epigenetic effects.

In addition to changes in methylation, specific mutations in epigenetic modifiers sufficiently disrupt interactions with their regulatory components or bindings factors, which could be restored pharmacologically. The ability to rationally direct such changes will require an understanding of mutations in epigenetic regulators. In the last years, *DNMT3A* and its potentially pathway partners are extensively studied. It was shown that symmetric methylation of histone H4 arginine 3 (H4R3me2s) by the protein arginine methyltransferase (PRMT5) is required for subsequent DNA methylation. The histone-binding protein Cooperator of PRMT5 (COPRS) guides PRMT5. H4R3me2s serves as a direct binding target for the DNMT3A. Furthermore, *GFI1* (Growth Factor Independent 1) is one of the targets of PRMT5 in complex processes of epigenetic regulation. We analyzed expression level of *DNMT3A*, *DNMT3B*, *PRMT5*, and *GFI1* genes in AML patients and found significant correlation in expression levels of above genes. Moreover, AML patients are characterized by upregulation of *DNMT3A*, *DNMT3B*, and *PRMT5* genes expression. However, within the AML cohort patients with *DNMT3A* mutation presented with lower expression of these genes compared to other AML cases. This could be caused by the inactivating mutation. Additionally, our data demonstrate that not only mutations in *DNMT3A* but also its expression level correlates with outcome of AML.