

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

ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ

THE BULLETIN OF HEMATOLOGY

Том XVII № 2 2021

Ежеквартальный научно-практический журнал
Основан в сентябре 2004 года

Главный редактор

Заслуженный деятель науки РФ
Доктор медицинских наук
профессор
С.С. Бессмельцев

Санкт-Петербург
2021

Редакционная коллегия:

С. С. Бессмельцев (главный редактор), заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕ, Санкт-Петербург;
А. Н. Богданов, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;
Л. Н. Бубнова, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;
Т. В. Глазанова (ответственный секретарь), доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;
С. В. Грицаев, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;
С. А. Гусева, доктор медицинских наук, профессор, г. Киев (Украина);
И. Л. Давыдкин, доктор медицинских наук, профессор, г. Самара;
А. Ю. Зарицкий, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;
Н. М. Калинина, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;
Л. П. Папаян, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург;
Р. М. Рамазанова, доктор медицинских наук, профессор, г. Алматы (Республика Казахстан);
Н. А. Романенко, доктор медицинских наук, Санкт-Петербург;
О. А. Рукавицын, доктор медицинских наук, профессор, г. Москва;
В. Н. Чеботкевич, доктор медицинских наук, профессор, Санкт-Петербург.

Редакционный совет:

К. Т. Бобоев, доктор медицинских наук, профессор, г. Ташкент (Республика Узбекистан)
А. К. Голенков, доктор медицинских наук, профессор, академик РАЕН, заслуженный врач РФ, г. Москва;
И. Г. Дуткевич, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, Санкт-Петербург;
В. И. Мазуров, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Санкт-Петербург;
И. В. Поддубная, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;
Т. И. Поспелова, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, г. Новосибирск;
А. Г. Румянцев, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва;
В. Г. Савченко, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, г. Москва.

Зав. редакцией — кандидат медицинских наук, доцент
Е. Р. Шилова, тел.: (812) 717-58-57

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

Импакт-фактор РИНЦ: 0,387

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 *М.В. Келер*
Компьютерная верстка *М.В. Келер*

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 00.00.0000 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 000.

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

Отпечатано в ООО «XXX», XXX, Хxxx.

18 +

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕДОВЫЕ СТАТЬИ

<i>Блау О., Буллингер Л., Блау И.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ.....	4
---	---

<i>Блау О., Долник А., Буллингер Л.</i> ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ – МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В 2021 ГОДУ.....	13
---	----

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

<i>Мотыко Е.В., Блау О.В., Полушкина Л.Б., Мартыненко Л.С., Бакай М.П., Руженкова Ю.С., Клеина Е.В., Павленко Н.Б., Раджабова А.М., Карягина Е.В., Успенская О.С., Волошин С.В., Бессмельцев С.С., Четкин А.В., Мартынкевич И.С.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ 620 ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ, ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ НА ПРОГНОЗ	18
--	----

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

<i>Грицаев С.В., Романенко Н.А., Зенина М.Н.</i> ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОМОНОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ: ДИАГНОСТИКА, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ЛЕЧЕНИЕ	26
--	----

VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии»	43
--	-----------

НОВОСТИ

РЕЗОЛЮЦИЯ СОВЕТА ЭКСПЕРТОВ ПО ПРОБЛЕМЕ ТЕРАПИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ. ПРОТОКОЛ СОВЕТА ЭКСПЕРТОВ	87
---	----

CONTENTS

EDITORIAL ARTICLE

<i>Blau O., Bullinger L., Blau I.W.</i> GENETIC ABERRATIONS IN MULTIPLE MYELOMA	4
--	---

<i>Blau O., Dolnik A., Bullinger L.</i> ACUTE MYELOID LEUKEMIA – MOLECULAR DIAGNOSTICS IN 2021	13
---	----

ORIGINAL ARTICLES

<i>Motyko E.V., Blau O.V., Polushkina L.B., Martynenko L.S., Bakai M.P., Ruzhenkova Yu.S., Kleina E.V., Pavlenko N.B., Radzhabova A.M., Karyagina E.V., Uspenskaya O.S., Voloshin S.V., Bessmeltsev S.S., Chechetkin A.V., Martynkevich I.S.</i> MOLECULAR GENETIC PROFILE OF 620 PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA, ASSESSMENT OF THE IMPACT OF MUTATIONS ON PROGNOSIS	18
--	----

HEMATOLOGY: YESTERDAY, TODAY, TOMORROW

<i>Gritsaev S.V., Romanenko N. A., Zenina M.N.</i> CHRONIC MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA: DIAGNOSIS, PROGNOSIS, AND TREATMENT	26
--	----

Блау О., Буллингер Л., Блау И.В.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АНОМАЛИИ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Blau O., Bullinger L., Blau I.W.

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

GENETIC ABERRATIONS IN MULTIPLE MYELOMA

Резюме.

Множественная миелома (ММ) – злокачественная опухоль плазматических клеток, характеризующаяся сложными цитогенетическими и молекулярно-генетическими абберациями. Геномный анализ показывает разнообразие мутаций генов, анеуплоидий, изменений числа сегментарных копий, транслокаций, которые чрезвычайно гетерогенны и более многочисленны, чем другие гематологические злокачественные новообразования. Известно, что развитию ММ предшествуют предопухольные стадии, и поэтому она представляет собой вполне определенную модель прогрессирования заболевания, пригодную для изучения клональной эволюции и гетерогенности. Здесь мы рассмотрим основные генетические аномалии у пациентов с ММ, их участие в патогенезе и прогностическое значение.

Abstract.

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell malignancy characterized by complex cytogenetic and molecular genetic aberrations. Genomic analysis shows a variety of gene mutations, aneuploidies, segmental copy-number changes, translocations that are extremely heterogeneous, and more numerous than other hematological malignancies. It is known that the development of MM is preceded by pre-malignant stages, and therefore it represents a well-defined model of disease progression, suitable for studies of clonal evolution and heterogeneity. Here we review at the main genetic abnormalities in patients with MM, involvement in pathogenesis, and prognostic value.

Introduction:

Multiple myeloma (MM) is an incurable disease characterized by the clonal proliferation of bone marrow (BM) plasma cells (PC) that secrete a monoclonal immunoglobulin [1]. Despite the introduction of novel drugs, it remains an incurable disease as most patients eventually relapse. Although second and subsequent remissions can be

achieved with further therapy, MM usually appears more aggressive after each relapse, culminating in treatment-resistant disease with short survival [2, 3].

MM is characterized by genetic heterogeneity, while several genomic events simultaneously lead to tumor development and progression (Table 1).

Table 1.

Main genomic alterations in multiple myeloma

Genetic event	Driver genes	Frequency (%)	Risk
Primary events			
IgH translocations			
t(11;14)	CCND1	15-20	Standard risk
t(4;14)	FGFR3/MMSET	15	High risk
t(6;14)	CCND3	2	Standard risk
t(14;16)	MAF	5	High risk
t(14;20)	MAFB	1	High risk
Copy-number variations			
Hyperdiploidy		50	Good prognosis
del(13q)	RB1	40	Standard risk
Secondary events			

Chromosome gains			
1q		40	High risk
8q	MYC	15	Standard risk
11q	CCND1	15	Standard risk
Chromosome losses			
1p		30	High risk
17p	TP53	10	High risk
MYC rearrangements	MYC	15	High risk
Somatic mutations			
MAPK pathway	KRAS, NRAS, BRAF	45	Standard risk
NF-κB pathway	CYLD, TRAF3, LBT, NIK	15	Standard risk
RNA metabolism	DIS3, FAM46C	15	Standard risk
DNA-repair pathway	TP53, ATM, ATR	10	High risk
Plasma cell differentiation	IRF4, PRDM1	10	Standard risk

Numerous genetic abnormalities are major prognostic factors in MM. Molecular cytogenetic methods such as G-band karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH) combined with more advanced genetic techniques, encompassing single nucleotide polymorphism (SNP) arrays and, more recently, next-generation sequencing (NGS), allow the identification of numerous recurrent chromosomal and genetic alterations in MM [4, 5]. These changes can be divided into three types: chromosomal translocations, copy number abnormalities and point mutations. The prognostic value of many of genetic anomalies has been analyzed in several studies with large numbers of patients [6, 7].

Over the past decade, the results of large-scale studies of whole exome sequencing have provided new insights into clonal heterogeneity and disease evolution. Moreover, the repeated coincidence of genomic events helps to analyze the genomic complexity underlying tumor progression. The development of MM is considered as a multistep process. Most MM patients progress from an asymptomatic premalignant stage, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) [2, 3]. How quickly progression occurs is largely determined by genetic aberrations. Translocations involving immunoglobulin heavy chain (IgH) genes or hyperdiploidy are known to be frequent initiating events that deregulate normal PC behavior, leading to the development of MGUS [8-10]. Further mutational burden leads to the intermediate stage of smoldering multiple myeloma (SMM). The main cytogenetic type of the disease influences the rate of progression. Thus, patients with translocation t(4; 14), deletion of 17p, and gain (1q) have a higher risk of progression from SMM to MM [8, 10, 11]. Since it has been observed that MGUS / SMM patients usually already have genetic abnormalities and do not show any clinical symptoms

of MM, it seems that the initial genetic defects alone are not enough to induce MM transformation [12].

MM is a clinical model of disease continuity between MGUS, SMM, MM, and plasmacell leukemia (PCL) provides a unique framework for understanding the genomic hierarchy and clonal evolution. Genetic abnormalities found in the MGUS stage are likely to be the primary events involved in tumor development. In contrast, the aberrations present in stages of MM that were absent in MGUS are likely secondary events leading to tumor progression. Recent applications of NGS have shown that MM patients exhibit complex mutational landscapes. In addition, there intracлонаl genetic heterogeneity exist in the main tumor clone [10, 13-18].

Since intracлонаl heterogeneity was observed at all stages of MM, it can be assumed that the progression of disease may be mediated by competition between subclones and the growth of the fittest of these subclones. Recently, a study based on the use of whole exome sequencing has shown evidence of intracлонаl heterogeneity and subclonality from the earliest stages of MGUS / SMM, where most of the transformed subclonal populations involved in progression to MM are already present at diagnosis. There was no significant difference in subclonality characteristics at the initial asymptomatic stage of MGUS and intermediate stage of SMM, suggesting that severe subclonal remodeling is also not the only phenomenon associated with the transition between asymptomatic stages [10].

Chromosomal Translocations

Somatic hypermutation and class-switching recombination are two key features of normal B cell development. During early differentiation of B-cells in the BM, after contact with antigens, immunoglobulin (Ig) genes segments are rearranged to form the primary Ig repertoire. These are physiological mechanisms of affinity maturation in the germinal

center, but they are also involved in the pathogenesis of MM [19].

The vast majority of chromosomal translocations affect chromosome 14, namely the IGH locus at 14q32, which is one of the most actively transcribed genes in PC. As a result of translocations, the partner genes are brought under the control of the IGH enhancer, and the expression of certain of these oncogenes is activated. This event gives a selective advantage to subclones carrying these translocations. IGH translocations are considered triggering events and are therefore called primary translocations. They include five chromosomal loci, 11q13, 6p21, 4p16, 16q23, and 20q11, which contain the oncogenes CCND1, CCND3, FGFR3 / MMSET, MAF, and MAFB, respectively [4, 7].

Translocation t(11;14)

The t(11;14)(q13;q32) is the most common translocation in MM with a reported frequency of 15–20% based on FISH and conventional cytogenetic analyses [4]. The breakpoints on 14q32 fall within either the JH region or the switch region. As a result of the translocation, cyclin D1 (CCND1) is juxtaposed to the powerful IgH 3' enhancer on chromosome 14, its expression is dysregulated, as indicated by gene expression profiling [20]. Traditionally, MM patients with t(11;14) have been categorized as standard risk [3]. However, some recent studies indicate that in the era of novel agents t(11;14) is associated with shorter survival, acting as a marker of intermediate risk. These data also suggest that high-dose chemotherapy benefits patients with t(11;14) [22]. Recently it has been shown that MM patients with t(11; 14) have a standard risk when they receive induction therapy with new agents in combination with high dose of melphalan auto stem cell transplantation (ASCT) [23].

Additional genetic aberrations may also play a role in disease risk. Patients with a t(11;14) alone have better overall survival (OS) compared to patients with a t(11;14) translocation in combination with any other assessed aberrations. The combination of t(11;14) with multiple amplifications 1q, del(1p), and del(IgH) had the most negative effect on OS [24].

A particularly optimistic factor in determining the risks of MM patients with t(11;14) is the fact that there is a specific therapy for this type of myeloma. Venetoclax, a BCL-2 inhibitor, induces cell death, especially in those with t(11;14) who express high levels of BCL-2 compared to BCL-XL and MCL-1 [25].

Translocation t(4;14)

This translocation is observed in about 15% of MM patients, more often in young people [7]. This aberration can be identified using FISH analysis, but they cannot be detected by karyotyping techniques. In the IgH locus, the breakpoints occur in the switch region and dissociate the intronic enhancer from the 3' enhancer [4]. The translocation t(4;14) results in the simultaneous overexpression of two genes, FGFR3

(fibroblast growth factor receptor 3) and the multiple myeloma SET domain gene (MMSET) on der(4) [4, 7].

Both FGFR3 and MMSET genes are not normally expressed on PC but are overexpressed as a result of the t(4;14). It was shown that only 75% of the MM with t(4;14) display a simultaneous overexpression of both genes. In the remaining 25% of cases, only MMSET is activated, and the absence of FGFR3 expression in most cases is associated with the loss of the FGFR3 gene on the der(14) [26]. Furthermore, the poor prognosis of t(4; 14) persists irrespective of FGFR3 expression. These data suggest that MMSET may be a critical transforming event in MM with t(4; 14). In some cases (10%), displaced FGFR3 contains activating mutations that may be involved in the progression of MM [26].

FGFR3 is one of the high-affinity tyrosine kinase receptors for the FGF ligand family. These proteins play a role in several important cellular processes, including regulation of cell growth and division, cell type determination, angiogenesis, and embryo development [27].

Numerous data prove that MMSET is an oncogene and plays an important role in the development of MM. MMSET encodes histone-3-lysine 36 (H3K36) methyltransferase, and its overactivation in MM has been shown to affect the expression of many genes [28]. Histones are the stage of a variety of post-translational modifications that ultimately regulate gene transcription. Lysine methylation is one of the characteristic processes of post-translational histone modifications in the regulation of the structure and function of chromatin. It is suggested that the principal physiologic activity of MMSET is demethylation of H3K36, and in the process rules out generation of H3K36me3, H4K20me2, and several other putative methyl products of MMSET [29]. Signaling pathway analysis indicated that MMSET could regulate cell death and the p53 pathway (e.g., BAX, BCL2, and caspase 6), the cell cycle (cyclin E2, E2F2, TP53, INP1, and CDC25A), genes for DNA repair (ATM, E2F2, and GADD45A), and integrin-mediated signaling (CDC42 and integrin alpha-L) [30, 31].

The t(4;14) translocation is associated with unfavorable prognosis and patients bearing it were classified in the high-risk category [3]. Interestingly, despite the poor prognosis associated with t(4;14), early treatment of these patients with the proteasome inhibitor bortezomib results in a survival improvement [7, 14]. Clinical testing of selumetinib (MEK1/2 inhibitor) did not affect treatment outcomes for MM patients, which stopped the development of this drug.

Translocation t(6;14)

The rare translocation t(6;14) is present in only 3% of patients with MM. This chromosomal rearrangement leads to fusion of cyclin D3 (CCND3) with IGH

enhancers. It was shown that the t(6;14)(p21;q32) translocation leads to overexpression of cyclin D3. The initial oncogenic event for this type of MM is the primary translocation of Ig, which disrupts the regulation of cyclin D3, providing a proliferative stimulus to PC. By microarray analyses high levels of cyclin D3 mRNA have been shown in cases with t(6;14) detected by FISH [32]. Although the low prevalence of t(6;14) precludes the estimation of survival, this translocation is included in the standard-risk category [3].

Translocations t(14;16) and t(14;20)

Translocations t(14;16) and t(14;20) are the least common class of primary IgH translocation. They observed in less than 5% of MM patients [33]. Translocations deregulate the MAF and MAFB genes, respectively. Both genes belong to the MAF family. MAF genes family are transcription factors. MAFB is a basic leucine zipper transcription factor that plays an important role in the regulation of lineage-specific hematopoiesis. Overexpression of MAFB in MM induces proliferation and protects cells from drug-induced apoptosis, conferring resistance. Increased levels of MAF induce upregulation of cyclin D2 through its transactivation function, resulting in an accelerated rate of division and DNA synthesis [34]. The overexpression of MAF is observed in half of MM cases. This proportion is much more frequent than was expected from the low prevalence of the t(14;16) [4]. It is shown, that the oncoprotein MAF increases the expression of integrin $\beta 7$, an adhesion molecule that heterodimerises with integrin to bind to Ecadherin on the surface of BM stroma cells. This finding suggests that MAF enhances the adhesion of myeloma cells to BM stroma through the integrin $\alpha E\beta 7$ /E-cadherin pathway [35].

It was noted, that the distance between the enhancer and the oncogene MAF in t(14;16) is considerably longer than in other IgH translocations. Taking into account such a long distance it is still an open question whether or not IgH may act as enhancer for MAF in this translocation [36].

Translocations t(14;16) and t(14;20) are considered high-risk cytogenetic factors [3, 7]. Some studies reported that MEK inhibition induces apoptosis of MAF-expressing MM cells and blocks survival signals provided by the microenvironment [37]. The blockade of FOS activity is also toxic for MM cells harboring t(4;14), which is associated with the MAF upregulation in myeloma cells with MMSET translocations [7].

MYC aberration

MYC has long been recognized as one of the most frequently deregulated oncogenes in human cancer. Structural variants of MYC are common in B cell malignant neoplasms, including MM. Rearrangements involving the MYC proto-oncogene on the long arm of chromosome 8 (8q24.1) are common cytogenetic abnormalities detected by FISH in approximately 15%

of newly diagnosed MM patients [38]. The structural variants of MYC are distributed over at least two broad regions and serve to amplify or transpose large enhancers to drive MYC expression. Interestingly, almost all MYC translocations are also accompanied by copy number changes, with most of them showing large duplicated sequences at both break points of the translocation [34]. Types of MYC-mediated genomic instability include single nucleotide substitutions and double-stranded breaks resulting from induction of reactive oxygen species, gene amplification, and generation of extrachromosomal elements, as well as numerical chromosomal defects resulting from aberrant DNA synthesis and defects in genes, checkpoint of the mitotic spindle. These aberrations result in overexpression of MYC, which is a prerequisite for the creation of important behavioral characteristics of the tumor, such as invasiveness, metastasis, and the acquisition of resistance to chemotherapy. Recently there has been a clear understanding of how this contributes to transformation. Due to its role as a transcription factor, MYC alters the expression of hundreds of target genes, many of which are themselves oncogenes or tumor suppressors [39-43]. Since structural variants of MYC are less common in MGUS than in MM, this suggests that MYC changes contribute to disease progression. The activation of MYC is a key event in the progression from MGUS and smoldering myeloma (SMM) to symptomatic myeloma [44].

Prognostic value of MYC rearrangements has not yet been established; at this time, they are not included in risk stratification systems for newly diagnosed MM. While some studies have found MYC rearrangements to be associated with inferior outcomes, other studies failed to show prognostic significance [45, 46].

Copy number abnormalities

Most MM cases are aneuploid, in which there are frequent gains and losses of complete chromosomes or chromosome arms. According to the ploidy status, MM is usually categorized in hyperdiploid (H-MM) and non-hyperdiploid (NH-MM) MM. The H-MM group, which accounts for 50–60% of all MM cases, is characterized by the presence of trisomies that typically affect the odd chromosomes [47].

The NH-MM group includes hypodiploid (up to 44/45 chromosomes), pseudodiploid (44/45 to 46/47), and near-tetraploid (more than 74) cases. NH-MM is frequently characterized by the loss of chromosomes 13, 14, 16, and 22. Hyperhaploid karyotypes, as a result of the loss of nearly a haploid set of chromosomes, have also been found in MM. The most frequent monosomie or deletions present in hyperhaploid cases affect 17p, 1p, 13q, and 16q [48, 49]. The NH-MM is characterized by a very high prevalence of IGH translocations. Similarly, monosomy or deletion of chromosome 13 occurs predominantly in NH-MM [50, 51].

Hyperdiploidy

Hyperdiploidy is the other common type of initiating genetic event in MM. The high proportion of chromosomal imbalances observed in MM is a clear sign of underlying genomic instability. Unlike translocations, it is very difficult to trace the oncogenic effects of hyperdiploidy due to the aneuploidy of numerous chromosomes. Hyperdiploidy is hypothesized to occur during rapid germinal center proliferation that results in chromosome segregation errors [34]. Both IgH translocations and hyperdiploidy were found to be clonal aberrations at all stages of gammopathy, which is consistent with their basic role in the MM pathogenesis [4].

Notably, the H-MM is associated with a low incidence of structural chromosomal abnormalities [50]. Hyperdiploidy, in itself, seems to be an early event in MM evolution since it has been described in MGUS [52].

Hyperdiploidy, is almost mutually exclusive with IgH translocations, tends to have a better prognosis than IgH-translocated MM [34, 53]. Several studies have shown that hyperdiploid patients have better response rates to treatment and longer survival than patients with other aneuploidies H-MM rarely results in extramedullary disease or PCL [54]. On the contrary, hyperhaploid karyotypes are associated with an adverse prognosis, even worse than that of the hypodiploid group, with an estimated 20–25% survival after five years, despite intensive treatments based on PIs, IMiDs, and tandem ASCT [49].

Deletion of 13q

Among the numerical abnormalities, monosomy 13 is the most common; it is detected in about 45% of cases. Indeed, deletions of chromosome 13 identified by interphase FISH usually represent monosomy 13 and only occasionally represent an interstitial deletion, accounting for only 15% of cases [55, 56]. Del(13q) was described in MM for the first time in 1995 and has consistently been related to adverse prognosis [57].

This deletion loses the RB1 gene. The RB protein is a well-studied tumor suppressor. A multifunctional protein regulates a number of critical cellular activities, including cell cycle development, response to DNA damage, checkpoint activation, and differentiation [58]. Depending on phosphorylation, RB either inhibits or activates the G1 / S cell cycle transition [59]. Recently was demonstrated that RB interacts with nuclear factor κ B (NF- κ B) [58]. NF- κ B is a transcription factor that is highly implicated in cancer. It can be activated by proinflammatory cytokines [60]. Recently, RB has been shown to specifically bind to p65 protein from NF- κ B/Rel family [58]. A recent CRISPR/Cas9-based screening identifies the NF- κ B pathway as one of the key mechanisms that promote cancer cell escape from immune attack of T cells [61]. RB deletion seems to increase PDL1 (Programmed

death-1) expression, mediated by the NF κ B pathway.

Deletion of 17p, TP53 Mutation

Deletion of 17p13 is found from 5 to 12% in MM patients [62, 63]. Its incidence increases with a progression of disease [64]. Importantly, that these percentages can vary from study to study depending on the chosen cut-off value. The 20% threshold is the most widely used and recommended by the European Myeloma Network (EMN) [65, 66]. Additionally, it has been shown that an MLPA cut-off value of <0.75 is equivalent to 20% by iFISH. Both are suitable molecular methods for detecting del(17p13), that can be readily applied in standard diagnostic laboratories [66].

Deletion (17p13) has consistently been associated with shorter progression free survival (PFS) OS in patients with MM [46, 62, 67]. Detailed analysis of TP53 aberrations in a large study supports the independent predictive value of monoallelic TP53 changes [66].

This deletion entails the loss of the TP53 gene, which is a key suppressor gene that organizes multiple functions associated with cell cycle control and DNA damage response [68]. In spite of the infrequent presence of TP53 mutations in MM, the TP53 gene is mutated in about half of patients who harbor del(17p), giving rise to its biallelic inactivation [69]. Patients with biallelic inactivation of TP53 have an aggressive clinical course and poor prognosis [66, 70]. The TP53 mutation frequency increases in the late stages of the disease, which indicates its important role in the progression of MM [70]. These results have also been confirmed by massive parallel sequencing [71].

TP53 mutations are distributed mainly in coding exons with a strong predominance for exons 4–9, which encode the DNA-binding domain of the protein. In fact, 95% of the TP53 mutations stand in the core DNA-binding domain [68]. TP53 mutations can be classified in two categories: contact and structural mutations. Contact mutations affect residues involved directly in DNA-contacts without altering p53 folding, and perturb the transcriptional function of p53 protein. In contrast, structural mutations lead to destabilization of the local structure of p53 core domain [68, 72]. In all types of human cancers, the missense TP53 mutations have been detected predominantly in 6 hotspot residues located within the DNA-binding domain (residues R175, G245, R248, R249, R273, and R282) [68, 72, 73].

Gain of 1q

The long arm of chromosome 1 is gained (three copies) or amplified (more than three copies) in nearly 50% of MM patients, these percentages increase as the disease progresses [62, 74]. Gain or amplification of chromosome arm 1q21 occurs in a subclone of the tumor as a secondary genomic event and is more amplified as the tumor progresses and a risk factor for the progression from smoldering multiple myeloma

to MM [75].

Trisomy of chromosome 1, tandem duplications of 1q21, and jumping whole-arm translocations of 1q are some of the ways in which gain of 1q21 occurs, suggesting that these aberrations are heterogeneous at the genomic level [76]. Genes located in the 1q21 amplicon, including *CKS1B*, *PSMD4*, *IL6R*, *ADAR*, *MCL1*, and others, are associated with tumor proliferation and/or drug sensitivity because of upregulation of the expressed genes resulting from the increased gene dosage in MM cells with trisomy of chromosome 1 [75]. To date, the relevant genes on 1q21 remain unclear. Putative targets of this amplification include *CKS1B* and *PMSD4* genes, mediating cell cycle progression and resistance to bortezomib, respectively.

A common feature shared by *CKS1B* and *PMSD4* is that both of their expressions are highly sensitive to copy number variation of 1q21, and higher expression levels adversely affect clinical outcome, suggesting the existence of a gene-dosage effect that is of biological and prognostic significance [77-79]. Other genes mapped at 1q, such as *MUC1*, *MCL1*, *ANP32E*, *BCL9*, *PSMD4*, and *PDZK1*, have been proposed as candidate participants in myelomagenesis.

Several studies have shown that a 1q21 gain is a significant and independent factor in poor prognosis [80-82]. Although there are also a number of studies that have not been able to confirm this. The prognostic value depends on the treatment regimens, cohorts, and newly identified prognostic markers. Nevertheless, numerous publications suggest that at diagnosis, trisomy 1q seems to be an independent adverse prognosis marker for OS, even in the era when new drugs are used [46, 62, 80, 83].

Deletions of 1p

Deletions of 1p, *del(1p)*, have been observed in up to 30% of MM patients [84], their frequency increases to 60% in PCL [85], indicating that *del(1p)* may be related to clonal evolution [86].

Several minimally altered regions on 1p have been identified, including 1p32.3, 1p31.3, 1p22.1-1p21.3 and 1p12, where the *FAM46C*, *CDC14A*, *MTF2*, and *CDKN2C* genes are located [84, 86, 87]. Previously, the recurrent homozygous deletions and down expression of *CDKN2C* and *FAF1* has already been described in homozygous 1p32.3 losses [86, 88]. In addition, recurrent homozygous deletions of *FAM46C* at 1p12 was identified as a gene with potential pathogenic relevance [87]. The next generation sequencing of 38 myeloma samples found *FAM46C* to be frequently mutated, highlighting the potential significance of this gene [12].

Chromosome 1p deletion is associated with poor outcome in myeloma patients [86]. In particular, *del(1p)* is associated with shorter survival in transplant-eligible patients, according to data from both the MRC Myeloma IX trial (United Kingdom) and

the IFM (Institut Francophone du Myélome, France) group [84, 89].

Mutations

Whole-genome and whole-exome sequencing by NGS of thousands of MM samples has led to the detection of around 60 exonic mutations per patient [14]. The frequency of mutations in MM is higher than in acute leukemia, but much lower than in solid tumors, which tend to have hundreds of mutations [90]. In contrast with other hematological malignancies, there is no universal, unique, and specific mutation in MM, although many recurrently mutated genes have been detected [7]. In fact, about 250 mutated genes have been described in MM [90], about 60 of which are considered driver genes [91]. Most mutations are single nucleotide variants with consequences for the structure of the final protein. Mutations are present at both the clonal and sub-clonal levels, and increase as the disease progression. Various studies have investigated the mutational landscape of MM at diagnosis [92] and relapse [93, 94]. Some even compared the landscapes on both occasions by using paired samples [95, 96]. Even though there are many mutated genes, only a few of them are mutated in more than 5% of patients [97]. However, many of the mutated genes belong to key pathways that are usually dysregulated in MM: *KRAS* (20-25%), *NRAS* (20-25%), *TP53* (8-15%), *DIS3* (11%), *FAM46C* (11%), *BRAF* (6-15%), *TRAF3* (3-6%), *ROBO1* (2-5%), *EGR1* (4-6%), *SP140* (5-7%), and *FAT3* (4-7%) [98].

It seems that deregulation of RAS / MAPK, the NF- κ B pathway, and apoptotic response plays a central role in the development of MM. However, the RAS / MAPK or NF- κ B mutation was not predictive in this clinical trial [92].

The most significant predictive mutational marker in this study was TP53. The combination of TP53 mutation with additional mutations in *ATM* or *ATR* was found in 17% of cases with a significantly poor outcome. Besides *ATM* and *ATR*, *ZFX4* has been identified as a frequently mutated gene. These genes are related apoptotic response to DNA damage DNA-Damage-Repair pathway [92].

Conclusion

Over the past decade, major improvements have been observed in the outcome of MM patients. This progress is mainly related to the availability of novel drugs. However, despite these improvements, it is clear that a huge heterogeneity persists in patient outcome. One of the most important predictors of prognosis for patients with MM is the detection of recurring genetic abnormalities. Pronounced genetic heterogeneity is the main feature of MM. This heterogeneity is mainly the result of biologic variations observed at the individual level.

It has been clearly shown that most tumor plasma cells share a common pool of mutations, but they

may distinguish in several subclonal aberrations. The major clone at the time of diagnosis may be different from the major clone seen at the first relapse, which may also be different from the subclones seen at later relapses. There is probably competition between clones in the bone marrow niche for survival. Bone marrow niche characteristics (such as nutrient accessibility or hypoxia) may influence to the selection the clone with the best fitness. In addition, mutations itself can generate resistant clones. The different proliferative capacity of subclones can also be involved in selection. Finally, chemotherapy can also play an important role in the destruction of the most sensitive cells, but in the selection of more resistant ones, as well as for drugs that have mutagenic effects, with a direct effect on tumor cells.

The primary genomic events in MM are the acquisition of hyperdiploidy or translocations affecting the IGH genes; these events are mutually exclusive. Secondary genomic events include other chromosomal translocations, copy number variations, loss or addition of chromosomes. Recently, whole-exome sequencing studies have revealed numerous genomic mutations. Genomic events underlying MM affect multiple signalling pathways including the MYC, NF- κ B, and MAPK pathways, plasma-cell differentiation, cell-cycle regulation or DNA-damage repair. The development of specific and, in particular, target therapy based on this knowledge opens up great opportunities in the future. However, typing of multiple genetic lesions can now identify high-risk patients, allowing stratification of the treatment.

REFERENCES:

1. Joshua, D.E., et al., Biology and therapy of multiple myeloma. *Med J Aust*, 2019. 210(8): p. 375-380.
2. Kumar, S.K., et al., Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*, 2012. 26(1): p. 149-57.
3. Rajkumar, S.V., Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*, 2020. 95(5): p. 548-567.
4. Gutiérrez, N.C., R. García-Sanz, and J.F. San Miguel, Molecular biology of myeloma. *Clin Transl Oncol*, 2007. 9(10): p. 618-24.
5. Ryland, G.L., et al., Novel genomic findings in multiple myeloma identified through routine diagnostic sequencing. *J Clin Pathol*, 2018. 71(10): p. 895-899.
6. Palumbo, A., et al., Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*, 2015. 33(26): p. 2863-9.
7. Cardona-Benavides, I.J., C. de Ramón, and N.C. Gutiérrez, Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma: Prognostic and Therapeutic Implications. *Cells*, 2021. 10(2).
8. Walker, B.A., et al., Intracлонаl heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*, 2014. 28(2): p. 384-390.
9. Landgren, O., et al., Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*, 2009. 113(22): p. 5412-7.
10. Dutta, A.K., et al., Subclonal evolution in disease progression from MGUS/SMM to multiple myeloma is characterised by clonal stability. *Leukemia*, 2019. 33(2): p. 457-468.
11. Kyle, R.A., et al., Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*, 2007. 356(25): p. 2582-90.
12. Chapman, M.A., et al., Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature*, 2011. 471(7339): p. 467-72.
13. Dutta, A.K., et al., Cutting edge genomics reveal new insights into tumour development, disease progression and therapeutic impacts in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2017. 178(2): p. 196-208.
14. Manier, S., et al., Genomic complexity of multiple myeloma and its clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. 14(2): p. 100-113.
15. Szalat, R. and N.C. Munshi, Genomic heterogeneity in multiple myeloma. *Curr Opin Genet Dev*, 2015. 30: p. 56-65.
16. Brioli, A., et al., The impact of intra-clonal heterogeneity on the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2014. 165(4): p. 441-54.
17. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 2012. 12(5): p. 335-48.
18. Greaves, M. and C.C. Maley, Clonal evolution in cancer. *Nature*, 2012. 481(7381): p. 306-13.
19. González, D., et al., Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*, 2007. 110(9): p. 3112-21.
20. Zhan, F., et al., Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*, 2002. 99(5): p. 1745-57.
21. Baldin, V., et al., Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, 1993. 7(5): p. 812-21.
22. Lakshman, A., et al., Natural history of t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*, 2018. 32(1): p. 131-138.
23. Gao, W., et al., What Multiple Myeloma With t(11;14) Should Be Classified Into in Novel Agent Era: Standard or Intermediate Risk? *Front Oncol*, 2020. 10: p. 538126.
24. Leiba, M., et al., Translocation t(11;14) in newly diagnosed patients with multiple myeloma: Is it always favorable? *Genes Chromosomes Cancer*, 2016. 55(9): p. 710-8.
25. Kumar, S., et al., Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*, 2017. 130(22): p. 2401-2409.
26. Pawlyn, C. and G.J. Morgan, Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 2017. 17(9): p. 543-556.
27. Kalf, A. and A. Spencer, The t(4;14) translocation and FGFR3 overexpression in multiple myeloma: prognostic implications and current clinical strategies. *Blood Cancer Journal*, 2012. 2(9): p. e89-e89.
28. Brito, J.L., et al., MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells. *Haematologica*, 2009. 94(1): p. 78-86.

29. Xie, Z. and W.J. Chng, MMSET: role and therapeutic opportunities in multiple myeloma. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 636514.
30. Martinez-Garcia, E., et al., The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells. *Blood*, 2011. 117(1): p. 211-20.
31. Min, D.J., et al., MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC. *Leukemia*, 2013. 27(3): p. 686-94.
32. Shaughnessy, J., et al., Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*, 2001. 98(1): p. 217-223.
33. Castaneda, O. and R. Baz, Multiple Myeloma Genomics - A Concise Review. *Acta Med Acad*, 2019. 48(1): p. 57-67.
34. Barwick, B.G., et al., Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 1121.
35. Hurt, E.M., et al., Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell*, 2004. 5(2): p. 191-9.
36. Bergsagel, P.L. and W.M. Kuehl, Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001. 20(40): p. 5611-22.
37. Annunziata, C.M., et al., A mechanistic rationale for MEK inhibitor therapy in myeloma based on blockade of MAF oncogene expression. *Blood*, 2011. 117(8): p. 2396-404.
38. Avet-Loiseau, H., et al., Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*, 2001. 98(10): p. 3082-6.
39. Smadbeck, J., et al., Mate pair sequencing outperforms fluorescence in situ hybridization in the genomic characterization of multiple myeloma. *Blood Cancer J*, 2019. 9(12): p. 103.
40. van Riggelen, J., A. Yetil, and D.W. Felsher, MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(4): p. 301-9.
41. Prochownik, E.V., c-Myc: linking transformation and genomic instability. *Curr Mol Med*, 2008. 8(6): p. 446-58.
42. Hoffman, B. and D.A. Liebermann, Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, 2008. 27(50): p. 6462-72.
43. Misund, K., et al., MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma. *Leukemia*, 2020. 34(1): p. 322-326.
44. Chng, W.J., et al., Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia*, 2011. 25(6): p. 1026-35.
45. Walker, B.A., et al., Translocations at 8q24 juxtapose MYC with genes that harbor superenhancers resulting in overexpression and poor prognosis in myeloma patients. *Blood Cancer J*, 2014. 4(3): p. e191.
46. Avet-Loiseau, H., et al., Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*, 2007. 109(8): p. 3489-95.
47. Chng, W.J., R.P. Ketterling, and R. Fonseca, Analysis of genetic abnormalities provides insights into genetic evolution of hyperdiploid myeloma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. 45(12): p. 1111-20.
48. Hoctor, V.T. and L.J. Campbell, Hyperhaploid plasma cell myeloma. *Cancer Genet*, 2012. 205(7-8): p. 414-8.
49. Sawyer, J.R., et al., Hyperhaploidy is a novel high-risk cytogenetic subgroup in multiple myeloma. *Leukemia*, 2017. 31(3): p. 637-644.
50. Smadja, N.V., et al., Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003. 38(3): p. 234-9.
51. Mateo, G., et al., Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(10): p. 3661-7.
52. Chng, W.J., et al., A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood*, 2005. 106(6): p. 2156-61.
53. Avet-Loiseau, H., et al., Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2009. 27(27): p. 4585-90.
54. Besse, L., et al., Cytogenetics in multiple myeloma patients progressing into extramedullary disease. *Eur J Haematol*, 2016. 97(1): p. 93-100.
55. Fonseca, R., et al., Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*, 2001. 15(6): p. 981-6.
56. Avet-Loiseau, H., et al., Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol*, 2000. 111(4): p. 1116-7.
57. Tricot, G., et al., Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*, 1995. 86(11): p. 4250-6.
58. Jin, X., et al., Phosphorylated RB Promotes Cancer Immunity by Inhibiting NF-κB Activation and PD-L1 Expression. *Mol Cell*, 2019. 73(1): p. 22-35.e6.
59. Burkhart, D.L. and J. Sage, Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*, 2008. 8(9): p. 671-682.
60. Taniguchi, K. and M. Karin, NF-κB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, 2018. 18(5): p. 309-324.
61. Manguso, R.T., et al., In vivo CRISPR screening identifies Ptpn2 as a cancer immunotherapy target. *Nature*, 2017. 547(7664): p. 413-418.
62. Avet-Loiseau, H., et al., Long-term analysis of the IFM 99 trials for myeloma: cytogenetic abnormalities [t(4;14), del(17p), 1q gains] play a major role in defining long-term survival. *J Clin Oncol*, 2012. 30(16): p. 1949-52.
63. Hu, B., et al., High-risk myeloma and minimal residual disease postautologous-HSCT predict worse outcomes. *Leuk Lymphoma*, 2019. 60(2): p. 442-452.
64. Tiedemann, R.E., et al., Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia*, 2008. 22(5): p. 1044-52.
65. Merz, M., et al., Baseline characteristics, chromosomal alterations, and treatment affecting prognosis of deletion 17p in newly diagnosed myeloma. *Am J Hematol*, 2016. 91(11): p. E473-e477.
66. Shah, V., et al., Molecular Characterisation of TP53 Aberrations in 1,777 Myeloma Trial Patients. *Blood*, 2017. 130(Supplement 1): p. 4331-4331.
67. Xiong, W., et al., An analysis of the clinical and biologic significance of TP53 loss and the identification of potential novel transcriptional targets of TP53 in multiple myeloma. *Blood*, 2008. 112(10): p. 4235-46.

68. Herrero, A.B., et al., Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016. 17(12): p. 2003.
69. Thakurta, A., et al., High subclonal fraction of 17p deletion is associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Blood*, 2019. 133(11): p. 1217-1221.
70. Chin, M., et al., Prevalence and timing of TP53 mutations in del(17p) myeloma and effect on survival. *Blood Cancer Journal*, 2017. 7(9): p. e610-e610.
71. Lionetti, M., et al., Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget*, 2016. 7(16): p. 21353-61.
72. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, Structural Biology of the Tumor Suppressor p53 and Cancer-Associated Mutants, in *Advances in Cancer Research*. 2007, Academic Press. p. 1-23.
73. Rivlin, N., et al., Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & Cancer*, 2011. 2(4): p. 466-474.
74. An, G., et al., Chromosome 1q21 gains confer inferior outcomes in multiple myeloma treated with bortezomib but copy number variation and percentage of plasma cells involved have no additional prognostic value. *Haematologica*, 2014. 99(2): p. 353-9.
75. Hanamura, I., Gain/Amplification of Chromosome Arm 1q21 in Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*, 2021. 13(2).
76. Sawyer, J.R., et al., Evidence for a novel mechanism for gene amplification in multiple myeloma: 1q12 pericentromeric heterochromatin mediates breakage-fusion-bridge cycles of a 1q12 approximately 23 amplicon. *Br J Haematol*, 2009. 147(4): p. 484-94.
77. Fonseca, R., et al., International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia*, 2009. 23(12): p. 2210-21.
78. Shaughnessy, J.D., Jr, et al., Pharmacogenomics of bortezomib test-dosing identifies hyperexpression of proteasome genes, especially PSMD4, as novel high-risk feature in myeloma treated with Total Therapy 3. *Blood*, 2011. 118(13): p. 3512-24.
79. Zhan, F., et al., CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms. *Blood*, 2007. 109(11): p. 4995-5001.
80. Fonseca, R., et al., Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia*, 2006. 20(11): p. 2034-40.
81. Hanamura, I., et al., Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood*, 2006. 108(5): p. 1724-32.
82. Shaughnessy, J.D., Jr, et al., Testing standard and genetic parameters in 220 patients with multiple myeloma with complete data sets: superiority of molecular genetics. *Br J Haematol*, 2007. 137(6): p. 530-6.
83. Shah, V., et al., Prediction of outcome in newly diagnosed myeloma: a meta-analysis of the molecular profiles of 1905 trial patients. *Leukemia*, 2018. 32(1): p. 102-110.
84. Boyd, K.D., et al., Mapping of chromosome 1p deletions in myeloma identifies FAM46C at 1p12 and CDKN2C at 1p32.3 as being genes in regions associated with adverse survival. *Clin Cancer Res*, 2011. 17(24): p. 7776-84.
85. Li, F., et al., Identification of characteristic and prognostic values of chromosome 1p abnormality by multi-gene fluorescence in situ hybridization in multiple myeloma. *Leukemia*, 2016. 30(5): p. 1197-201.
86. Leone, P.E., et al., Deletions of CDKN2C in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(19): p. 6033-41.
87. Walker, B.A., et al., A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood*, 2010. 116(15): p. e56-65.
88. Walker, B.A., et al., Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood*, 2011. 117(2): p. 553-562.
89. Hebraud, B., et al., Deletion of the 1p32 region is a major independent prognostic factor in young patients with myeloma: the IFM experience on 1195 patients. *Leukemia*, 2014. 28(3): p. 675-9.
90. Corre, J., et al., Multiple myeloma clonal evolution in homogeneously treated patients. *Leukemia*, 2018. 32(12): p. 2636-2647.
91. Maura, F., et al., Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun*, 2019. 10(1): p. 3835.
92. Walker, B.A., et al., Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol*, 2015. 33(33): p. 3911-20.
93. Lohr, J.G., et al., Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell*, 2014. 25(1): p. 91-101.
94. Bolli, N., et al., Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications*, 2014. 5(1): p. 2997.
95. John, R.J., et al., Clonal evolution in myeloma: the impact of maintenance lenalidomide and depth of response on the genetics and sub-clonal structure of relapsed disease in uniformly treated newly diagnosed patients. *Haematologica*, 2019. 104(7): p. 1440-1450.
96. Weinhold, N., et al., Clonal selection and double-hit events involving tumor suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*, 2016. 128(13): p. 1735-1744.
97. Lionetti, M. and A. Neri, Utilizing next-generation sequencing in the management of multiple myeloma. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017. 17(7): p. 653-663.
98. Kumar, S.K. and S.V. Rajkumar, The multiple myelomas — current concepts in cytogenetic classification and therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2018. 15(7): p. 409-421.

Блау О., Долник А., Буллингер Л.

ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ - МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА В 2021 ГОДУ

Blau O., Dolnik A., Bullinger L.

Department of Hematology, Oncology, and Tumorimmunology, Campus Virchow Klinikum, Berlin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

ACUTE MYELOID LEUKEMIA – MOLECULAR DIAGNOSTICS IN 2021

Резюме

Острый миелолейкоз (ОМЛ) развивается как клональная экспансия недифференцированных миелоидных предшественников, имеющих соматически приобретенные мутации, которые объясняют биологическую и клиническую гетерогенность заболевания. За последние десятилетия накопилось много информации о патогенной значимости этих геномных aberrаций. В последнее время молекулярно-генетическая диагностика широко применяется в обычной клинической практике, что позволяет расширить наше понимание механизмов клональной эволюции лейкоза и динамики заболевания. Новые технологии секвенирования следующего поколения (NGS) позволяют нам выявлять множество субклонов, сосуществующих на различных этапах развития заболевания. Этот обзор содержит краткий обзор возможностей молекулярной диагностики и влияния генетических аномалий на индивидуальные особенности течения заболевания. В настоящее время информация о прогностической значимости молекулярно-генетических aberrаций активно используется в клинической практике и формирует современные рекомендации по диагностике ОМЛ. В соответствии с ними, наряду с хорошо изученными молекулярными маркерами NPM1, CEBPA и FLT3, обновленная версия рекомендаций European LeukemiaNet (ELN) также рекомендует скрининг на мутации RUNX1, TP53 и ASXL1. В будущем эти, а также другие aberrации, характерные для ОМЛ, будут иметь решающее значение не только для мониторинга минимальной остаточной болезни (МРБ), но и для выбора адекватных терапевтических персонализированных подходов в лечении ОМЛ.

Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) develops as a clonal expansion of undifferentiated myeloid precursors that have somatically acquired mutations, which account for the biological and clinical complexity of the disease. Over the past decades, there has been a growing knowledge on the pathogenic relevance of these genomic aberrations. Recently, molecular genomic diagnostics have begun to be translated into the clinic, and mechanisms of clonal leukemia evolution and disease dynamics are starting to be understood, especially as novel next generation sequencing (NGS) technologies allow us to capture multiple competing clones coexisting at any disease time point. This review provides a short summary of molecular diagnostics and the impact of genomic changes on the individual patient outcome. Molecular diagnostics forms the basis for novel genomic classification schemes that are reproducible and clinically relevant. In accordance, next to the well-established molecular markers NPM1, CEBPA, and FLT3, the updated version of the European LeukemiaNet (ELN) guidelines also recommends the screening for RUNX1, TP53, and ASXL1 mutations. In the future, these as well as other AML associated aberrations will not only be crucial in determining measurable residual disease (MRD), but also in guiding targeted therapeutic approaches and novel genome-wide approaches will lead the way.

Introduction

Since the development of chromosomal banding and conventional karyotyping techniques, genomic aberrations have started to play an important role in the understanding of the pathogenesis of acute myeloid leukemia (AML), and since then have become well established diagnostic and prognostic markers [1, 2]. With the turn of the century, advances

in microarray and next-generation sequencing (NGS)-based “omics” technologies have led to an exponential growth of the knowledge about molecular aberrations underlying AML biology [3, 4], and since several years molecular diagnostics have begun to translate into refined disease classification and improved patient management [5, 6]. In this short review, a brief overview of the heterogeneous genomic landscape

of AML and its impact on molecular diagnostics is provided, including recent advances in genomics-based AML classification and patient care.

Current State of the Art

Genomic landscape: Following comprehensive studies using microarray technologies, in the 208 AML was also the first tumor genome to be completely

sequenced using the novel NGS technology [7]. Subsequent studies led to the identification of novel recurrent somatic mutations of biologic, prognostic, and therapeutic relevance, and they identified AML as complex and dynamic disease characterized by a high inter- and intra-individual heterogeneity (Figure 1).

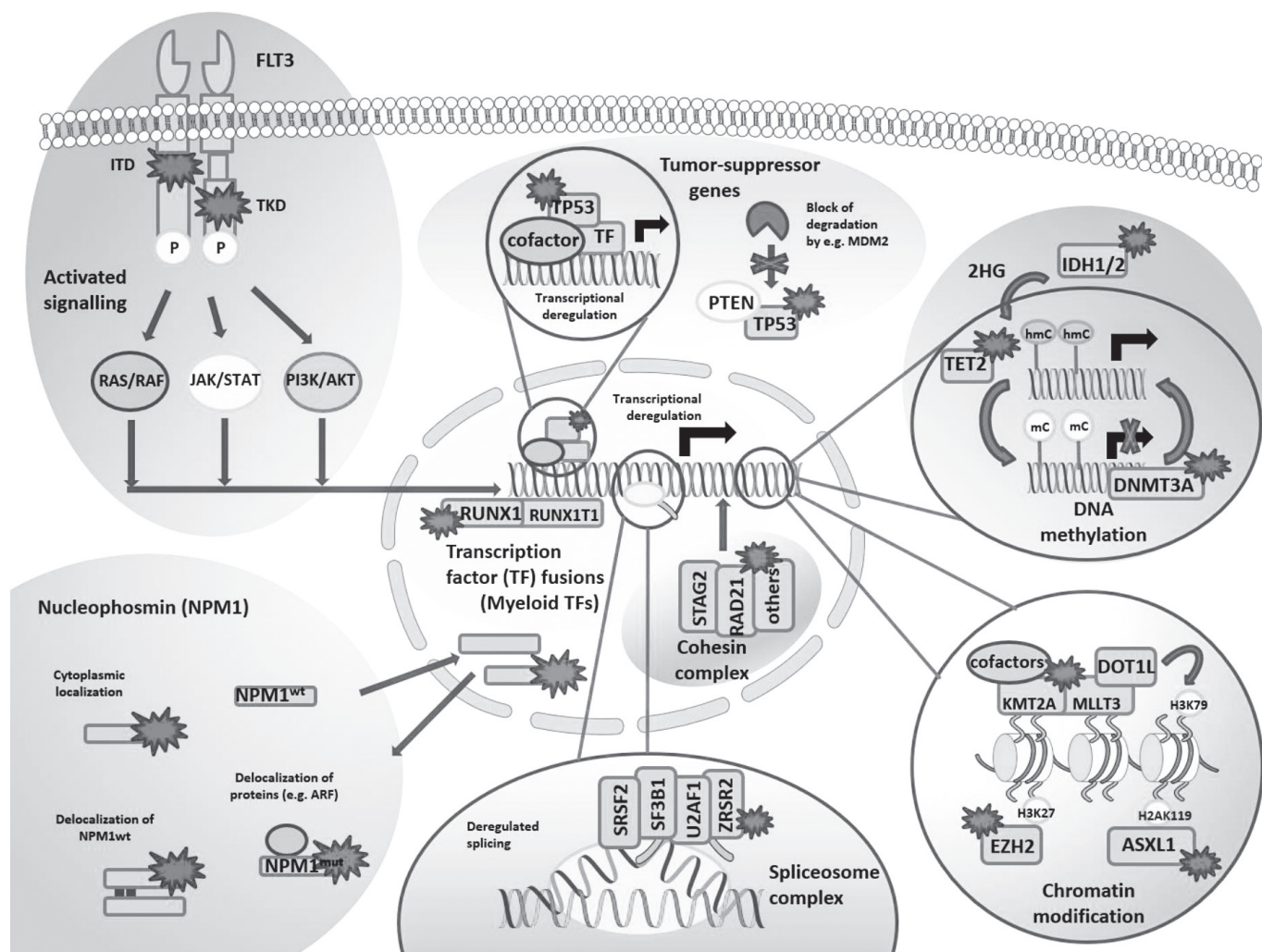


Figure 1. Mutational Landscape in AML. Illustration of eight functional categories of genes commonly mutated in AML. Adopted from reference [1]

(1) mutations in signaling genes, such as the class III tyrosine kinase receptor gene FLT3 (ITD, internal tandem duplications; TKD, tyrosine kinase domain mutations) confer proliferative advantage through activated signaling (upper left panel in lilac); (2) mutations in myeloid transcription factors (TFs), such as RUNX1, and/or transcription factor (TF) fusions by chromosomal rearrangements, such as t(8;21)(q22;q22) [RUNX1-RUNX1T1] lead to transcriptional deregulation and impaired hematopoietic differentiation (center panel in yellow); (3) mutations in the nucleophosmin (NPM1) gene, encoding a multifunctional nucleocytoplasmic shuttling protein, result in the aberrant cytoplasmic localization of NPM1 and NPM1-interacting proteins

(lower left panel in blue); (4) mutations of spliceosome complex genes, such as SRSF2, SF3B1, U2AF1, and ZRSR2, are involved in deregulated RNA processing (lower middle panel in lilac); (5) Cohesion complex gene mutations, such as RAD21 and STAG2, might impair accurate chromosome segregation and transcriptional regulation (center panel in purple); mutations of genes involved in the epigenetic homeostasis of cells lead to either (6) deregulation of chromatin modification, such as ASXL1, EZH2, and KMT2A mutations (lower right panel in green) or (7) deregulation of DNA methylation, such as DNMT3A, IDH1, IDH2, and TET2 mutations (upper right panel in purple); and (8) mutations of tumor-suppressor genes, such as TP53, can e.g. lead

to transcriptional deregulation (upper middle panel in orange).

Genome-wide profiling of 200 de novo AML cases within the “The Cancer Genome Atlas (TCGA)” project revealed an average of 13 coding mutations [single nucleotide variations (SNVs), and insertions/deletions (indels) per adult AML as well as a median of one somatic copy-number variant (e.g., trisomies or monosomies) and an average of less than one gene-fusion event [3]. While the recurrently mutated genes included known candidates (such as NPM1, FLT3, CEBPA, DNMT3A, IDH1, and IDH2) as well as genes just recently implicated in leukemogenesis (including EZH2, U2AF1, SMC1A, and SMC3), the mutational patterns are non-random of co-occurrence and mutual exclusivity. Especially NPM1, CEPBA, and RUNX1 mutations were mutually exclusive of transcription factor fusions, thereby indicating that these aberrations might be leukemia-initiating events similar to the fusion genes.

Clonal evolution: Analysis of the variant allele frequency (VAF) demonstrated that over half of the TCGA cases exhibited at least one subclone in addition to a founding leukemia clone (the clone showing the highest VAF values) [3]. Together with other studies, these data support a clonal evolution concept in which epigenetic regulator mutations (e.g. DNMT3A, TET2, and ASXL1 mutations) or splicing factor gene mutations (e.g. SF3B1, and SRSF2 mutations) occur as early founder events in pre-leukemic progenitor cells prior to transforming leukemogenic events (e.g. NPM1 or signaling molecule mutations). In accordance, recurrent

mutations in epigenetic regulators and splicing factor genes can be found in the blood of mainly elderly patients [8, 9], and the term “clonal hematopoiesis of indeterminate potential” (CHIP) was proposed to describe the presence of leukemia-associated somatic mutations in blood or bone marrow in the absence of conventional diagnostic criteria for a hematologic malignancy [10]. While the transformation rate of CHIP into a hematologic malignancy is 0.5-1% per year, in the future the role of persisting CHIP following leukemia treatment will have to be better understood by monitoring of measurable residual disease (MRD) for both pre-leukemic and leukemic markers.

Molecular diagnostics: Until today, conventional cytogenetic analysis remains mandatory for the AML workup, although molecular testing by reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) for recurring rearrangements can be useful if cytogenetic analysis fails and in the future whole genome sequencing approaches might fill in (see below). Molecular genetic diagnostics, as recommended by the European LeukemiaNet (ELN) [6], should comprise at least screening for (i) disease defining mutations in NPM1, CEBPA, and RUNX1 genes; (ii) prognostic and targetable mutations in FLT3, both tyrosine kinase domain mutations (at codons D835 and I836) mutations and internal tandem duplications (ITDs) (including data on the mutant–to–wild-type allelic ratio); and (iii) mutations in TP53 and ASXL1 that have consistently been associated with poor prognosis (Table 1).

Table 1.

2017 European LeukemiaNet (ELN) risk stratification by genetics^a

Risk Category ^b	Genetic Lesion
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Mutated NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD ^{low(c)} Biallelic mutated CEBPA
Intermediate	Mutated NPM1 and FLT3-ITD ^{high(c)} Wild type NPM1 without FLT3-ITD or with FLT3-ITD ^{low(c)} (w/o adverse-risk gene mutations) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A ^d Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EVI1) -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype, ^e monosomal karyotype ^f Wild type NPM1 and FLT3-ITD ^{high(c)} Mutated RUNX1 ^g Mutated ASXL1 ^g Mutated TP53 ^h

Adopted from reference (6).

- a Frequencies, response rates and outcome measures should be reported by risk category, and, if sufficient numbers are available, by specific genetic lesions indicated.
- b Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies.
- c Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥ 0.5); semi-quantitative assessment of FLT3-ITD allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve (AUC) "FLT3-ITD" divided by AUC "FLT3-wild type"; recent studies indicate that AML with NPM1 mutation and FLT3-ITD low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic hematopoietic-cell transplantation.
- d The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.
- e Three or more unrelated chromosome abnormalities in the absence of one of the WHO-designated recurring translocations or inversions, i.e., t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML with BCR-ABL1.
- f Defined by the presence of one single monosomy (excluding loss of X or Y) in association with at least one additional monosomy or structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML).
- g These markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes.
- h TP53 mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.

While it is time consuming and cost ineffective to capture these aberrations by conventional sequencing strategies, the list of molecular markers informing clinical practice is growing and testing has started to be replaced by NGS-based gene panel diagnostics in many laboratories, which in daily routine have become the preferred methodology [11]. In the future, it will be crucial to invest in flexible platforms and to develop diagnostic tools that can simultaneously test for both gene mutations and gene rearrangements [12, 13].

Genomic classification: Leukemia-associated chromosomal translocations and inversions opened the avenue towards the genetic AML classification reflected in the currently updated World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [5] however, during recent years NGS studies have also been informing disease classification [3, 4, 14]. Beyond currently defined classes (such as the balanced rearrangements, AML with mutated NPM1, or biallelic mutated CEBPA), three more heterogeneous classes emerged, i.e. "AML with mutated chromatin, RNA-splicing genes, or both", "AML with TP53 mutations, chromosomal aneuploidy, or both", and "AML with IDH2R172 mutation" (without other class-defining lesions). Using this classification scheme, at least 80% of AML could ambiguously be categorized in a single group based upon the underlying genetic abnormalities [4].

Genomics informed patient care: Recent advanced proved also that novel genetic information can be successfully applied to inform clinical practice. For example, a large knowledge bank of matched genomic-clinical AML data could be devised to accurately predict likelihoods of remission, relapse and mortality with findings being validated on independent TCGA data [15]. Future models based on increased patient numbers will allow to further reduce the error rate

of such personalized treatment predictions, and European initiatives like HARMONY (Healthcare Alliance for Resourceful Medicines Offensive against Neoplasms in Hematology) are currently capturing, integrating, and harmonizing patient data from large AML cohorts to gain valuable novel insights (<https://www.harmony-alliance.eu/>). Similarly, genomic knowledge does now also facilitate follow-up monitoring of MRD, and highly sensitive digital PCR as well as targeted ultra-deep NGS approaches are valuable novel tools adding to quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and multiparameter flow cytometry (MFC) methods. The NGS-based identification of molecular markers in almost 100% of diagnostic AML cases provides a prerequisite for comprehensive and individualized MRD assessment to identify patients at high relapse risk at early time points and to detect persistent pre-leukemic hematopoiesis [16, 17]. Finally, genomics knowledge will allow us to better guide the use of novel drugs such as protein kinase inhibitors, epigenetic modulators, immune checkpoint inhibitors and cellular immunotherapies [2, 6]. However, selective inhibition may only address distinct leukemia subclones. Thus, future molecularly targeted treatment designs will have to take clonal relationships into account and treatment strategies should be adjusted based on longitudinal clonal monitoring.

Future Perspectives

Given a growing list of disease-relevant genes in AML, NGS-based gene panel diagnostics have started to enter our daily clinical routine. Today, rapid technical NGS advances allow for more accurate MRD assessment and start to offer the possibility to capture leukemia heterogeneity at the single cell level at unprecedented accuracy both at the genomic and transcriptomic level [18, 19]. While current strategies

can already be used for genome-wide unbiased tests at high quality based on which individualized treatment approaches can be further advanced [13], further development of innovative long-read sequencing approaches, such as Oxford Nanopore Technology (ONT), will offer the possibility to use affordable benchtop sequencer for genome-wide transcriptome and whole genome sequencing approaches that can provide real-world results at low consumable costs that can be scaled to individual sample input [20].

REFERENCES

1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. //The New England journal of medicine. – 2015. –Vol.373(12). – P. 1136-52.
2. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2017 –Mar 20;35(9): – P. 934-46.
3. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. // The New England journal of medicine. – 2013. – May 30;368(22): P. 2059-74.
4. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia //The New England journal of medicine. – 2016. – Jun 9;374(23): P. 2209-21.
5. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // Blood. – 2016. – May 19;127(20): P. 2391-405.
6. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel// Blood. – 2017. – Jan 26;129(4):424-47.
7. Shivarov V, Bullinger L. Expression profiling of leukemia patients: key lessons and future directions // Experimental hematology. – 2014. – Aug;42(8):651-60.
8. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence // The New England journal of medicine. – 2014. – Dec 25;371(26):2477-87.
9. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes // The New England journal of medicine. – 2014. – Dec 25;371(26):2488-98.
10. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes // Blood. – 2015. – Jul 2;126(1):9-16.
11. Haferlach T. Advancing leukemia diagnostics: Role of Next Generation Sequencing (NGS) in acute myeloid leukemia // Hematol Rep. – 2020. – Sep 21;12(Suppl 1):8957.
12. McKerrell T, Moreno T, Ponstingl H, Bolli N, Dias JM, Tischler G, et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies // Blood. – 2016. – Jul 7;128(1):e1-9.
13. Duncavage EJ, Schroeder MC, O’Laughlin M, Wilson R, MacMillan S, Bohannon A, et al. Genome Sequencing as an Alternative to Cytogenetic Analysis in Myeloid Cancers // N Engl J Med. – 2021. – Mar 11;384(10):924-935.
14. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. 2016 Jan 7;127(1):29-41.
15. Gerstung M, Papaemmanuil E, Martincorena I, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. 2017 Mar;49(3):332-40.
16. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML // The New England journal of medicine. – 2016. – Feb 4;374(5):422-33.
17. Rücker FG, Agrawal M, Corbacioglu A, Weber D, Kapp-Schwoerer S, Gaidzik VI, et al. Measurable residual disease monitoring in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22.1): results from the AML Study Group // Blood. – 2019. – Nov 7;134(19):1608-1618.
18. Miles LA, Bowman RL, Merlinsky TR, Csete IS, Ooi AT, Durruthy-Durruthy R, et al. Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies // Nature. – 2020. – Nov;587(7834):477-482.
19. Velten L, Story BA, Hernández-Malmierca P, Raffel S, Leonce DR, Milbank J, et al. Identification of leukemic and pre-leukemic stem cells by clonal tracking from single-cell transcriptomics // Nat Commun. – 2021. – Mar 1;12(1):1366.
20. Blau O, Schrezenmeier JF, Liu Y, Sträng JE, Nogai KA, Blau IW, et al. Real time genomic and transcriptomic profiling allows rapid stratification of multiple myeloma // EHA Library. Dolnik A. 06/12/20; 294841; EP924 (Abstract release date: 05/14/20).

Lars Bullinger

Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany.

Phone: +49-30-450-553192, Fax: +49-30-450-553987,

E-mail: lars.bullinger@charite.de

Мотыко Е.В.¹, Блау О.В.², Полушкина Л.Б.¹, Мартыненко Л.С.¹, Бакай М.П.¹, Руженкова Ю.С.¹, Клеина Е.В.¹, Павленко Н.Б.¹, Раджабова А.М.¹, Карягина Е.В.³, Успенская О.С.⁴, Волошин С.В.¹, Бессмельцев С.С.¹, Чечеткин А.В.¹, Мартынкевич И.С.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург;

² Клиника Шарите, Берлинский медицинский университет, Берлин;

³ Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 15», Санкт-Петербург;

⁴ Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ 620 ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ, ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ НА ПРОГНОЗ

Motyko E.V.¹, Blau O.V.², Polushkina L.B.¹, Martynenko L.S.¹, Bakai M.P.¹, Ruzhenkova Yu.S.¹, Kleina E.V.¹, Pavlenko N.B.¹, Radzhabova A.M.¹, Karyagina E.V.³, Uspenskaya O.S.⁴, Voloshin S.V.¹, Bessmeltsev S.S.¹, Chechetkin A.V.¹, Martynkevich I.S.¹

¹ Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint Petersburg

² Charite Clinic, Berlin Medical University, Berlin

³ Municipal Hospital No. 15, Saint Petersburg

⁴ Leningrad Regional Clinical Hospital, Saint Petersburg

MOLECULAR GENETIC PROFILE OF 620 PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA, ASSESSMENT OF THE IMPACT OF MUTATIONS ON PROGNOSIS

Резюме. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является сложным, генетически варибельным, динамическим заболеванием. Важной задачей в настоящее время является создание новой системы классификации больных в группы риска, основанной как на результатах цитогенетического исследования, так и на влиянии дополнительных молекулярных повреждений и их комбинаций на прогноз. Обширное исследование наличия молекулярно-генетических маркеров у больных ОМЛ позволит наиболее тщательно исследовать патогенез заболевания на разных стадиях (дебют, ремиссия, рецидив), предсказать возможные риски и включать таргетные препараты в протокол терапии, а также послужит дополнительным аргументом при выборе кандидатов на аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Цель работы. Анализ прогностической значимости молекулярно-генетических aberrаций у пациентов с ОМЛ.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ результатов обследования 620 больных ОМЛ из гематологических клиник Санкт-Петербурга и клиники Шарите (Германия, Берлин). Всем пациентам было проведено исследование кариотипа с использованием метода G-дифференциального окрашивания хромосом. Aberrации в генах IDH1/2 и DNMT3A детектировали методом секвенирования по Сэнгеру. Скрининг мутаций в генах NPM1 и FLT3 проводили

Abstract. Acute myeloid leukemia (AML) is a complex, genetically variable, dynamic disease. An important task at the moment is to create a new system for classifying patients into risk groups, based both on the results of cytogenetic studies and on the influence of additional molecular alterations and their combinations on the prognosis. An extensive study of molecular genetic markers in patients with AML will allow the most thorough investigation of the pathogenesis of the disease at different stages (debut, remission, relapse), to predict possible risks and include targeted drugs in the therapy protocol, and will serve as an additional argument in choosing candidates for allogenic hemopoietic stem cells (allo-THSC).

The aim of our study was to analyze the prognostic significance of molecular genetic aberrations in patients with AML.

Materials and methods. The retrospective analysis of the screening results of 620 patients with AML from hematological clinics of St. Petersburg and Charite clinic (Germany, Berlin) was carried out. In all patients we examined karyotype using G-differential chromosome staining. Aberrations in the IDH1/2 and DNMT3A genes were detected by Sanger sequencing. Mutations in the NPM1 and FLT3 genes were screened by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length analysis.

Results. Mutations in FLT3, DNMT3A, IDH1/2, NPM1 genes were detected in 55.3% of patients. Mutations in studied genes had a high incidence in

методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа длин рестрикционных фрагментов.

Результаты. Мутации в генах FLT3, DNMT3A, IDH1/2, NPM1 выявлены у 55,3% больных. Мутации в исследованных генах имеют высокую частоту встречаемости в группе больных промежуточного риска и существенно влияют на прогноз заболевания, при этом имеет значение тип мутации, ее аллельная нагрузка и наличие дополнительных мутаций. Выявление двух мутаций у одного больного значительно снижает общую выживаемость (ОВ) по сравнению с пациентами с одной мутацией. Худший прогноз имеют больные с сочетанием мутаций NPM1+/FLT3-ITD+, NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+, DNMT3A+/FLT3-ITD+.

Заключение. Полученные данные позволяют говорить о высокой значимости наиболее частых мутаций при ОМЛ и их сочетаний для прогнозирования течения заболевания, выявления рисков развития рецидива и подбора адекватной терапии.

Ключевые слова. Острые миелоидные лейкозы, молекулярно-генетические aberrации, прогностическое значение мутаций.

Введение. Наиболее распространенным типом острого лейкоза у взрослых является острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), который возникает в среднем в возрасте 68 лет [1]. Несмотря на существенную схожесть клинической картины заболевания у различных подтипов ОМЛ в классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), оптимальное ведение взрослых пациентов с ОМЛ осложняется гетерогенным молекулярно-генетическим профилем ОМЛ, разделяя его на подмножества молекулярных заболеваний (в отличие от четко охарактеризованного вклада цитогенетического риска) с разным ответом на стандартные терапевтические средства. Также дополнительные трудности возникают из-за предположительной разницы во вкладе отдельных молекулярных событий у пациентов старшего возраста по сравнению с более молодыми больными и ограниченными данными относительно предсказания ответа на лечение у пациентов, получающих неинтенсивную терапию [2-6].

Подчеркивая важное прогностическое значение молекулярных событий при ОМЛ, Европейское сообщество ELN в 2017 году пересмотрело классификацию ОМЛ, добавив мутации в генах RUNX1, ASXL1 и TP53 к ранее идентифицированным категориям молекулярного риска, определяемого мутациями в генах NPM1, SEVPA и FLT3-ITD. Данная классификация стратифицирует пациентов в зависимости от наличия цитогенетических и молекулярных aberrаций на 3 прогностические группы (благоприятный, промежуточный и неблагоприятный прогноз) на основании разного

the group of patients with intermediate risk and significantly affect the prognosis of the disease, considering the importance of the type of mutation, its allelic ratio, and the presence of additional mutations. Identification of two mutations in one patient significantly reduced overall survival (OS) compared to patients with one mutation. Patients with a combination of NPM1+/FLT3-ITD+, NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+, DNMT3A+/FLT3-ITD+ mutations had a worse prognosis.

Conclusion. We observed high significance of the most frequent mutations in AML and their combinations for prognosis of the disease course, identification of the risk of relapse and selection of an adequate therapy.

Key words. Acute myeloid leukemia, molecular genetic aberrations, prognostic value of mutations.

ответа на стандартную терапию и выживаемости [6]. В рутинной практике исследование данной панели генов занимает от 1 до 3х недель. Однако, в настоящее время, например, для мутаций в генах FLT3 и, возможно, IDH1/2, могут быть оправданы более быстрые методы тестирования, позволяющие незамедлительно включать таргетные препараты в схему терапии. Несмотря на включение в классификацию ОМЛ дополнительных мутаций, улучшивших прогнозирование больных ОМЛ [7,8], требуется ее дальнейшее расширение в связи с тем, что гораздо большее число генов участвует в патогенезе лейкемии, а также потенциально является мишенями для таргетных препаратов [2,9]. Дополнительную сложность вносит информация о том, что эпигеном ОМЛ обладает собственными гетерогенными подгруппами и функционируют независимо от генетического разнообразия ОМЛ [10].

Следует отметить, что модель прогнозирования ELN 2017 учитывает наличие только 1 мутации или сочетания 2х мутаций у больных ОМЛ, однако на момент постановки диагноза в среднем пациент имеет 3 мутации (диапазон 0-9 мутаций) [2,11,12]. У пациентов старшего возраста в основном на 1 мутацию больше, чем у более молодых больных, при этом увеличение числа мутационных событий связано с ухудшением прогноза [2,12]. Основываясь на значительном объеме проведенных исследований о влиянии различных молекулярных событий на исход ОМЛ, можно говорить о том, что большинство из них могут существенно дополнить существующие прогно-

стические модели, что позволит более эффективно внедрить их использование в стандартную рутинную практику [8].

Секвенирование генома пожилых и молодых людей без гематологических злокачественных новообразований и оценка аллельной нагрузки мутаций у пациентов с ОМЛ выявили онтогенную иерархию приобретенных мутаций и олигоклональность при ОМЛ, существенно влияющие на рецидив и резистентность к проводимой терапии. Дальнейшие исследования помогут объяснить причины того, что обнаружение определенных мутационных событий, таких, например, как клональный гемопоэз неопределенного пролиферативного потенциала (CHIP) во время полной ремиссии (ПР), не связаны с прогнозом заболевания, тогда как другие предсказывают в дальнейшем развитие рецидива [13-17]. На основании этих данных становится очевидным, что тщательный анализ молекулярного профиля пациентов с ОМЛ в дебюте заболевания, а также в ремиссии и при рецидиве, может существенно улучшить понимание патогенеза заболевания и потенциально улучшить подход к ведению пациента.

Материалы и методы. В исследование включены 620 больных ОМЛ: 169 больных, прошедших обследование в гематологических клиниках Санкт-Петербурга и 451 пациент – в клинике Шарите (Берлин). Медиана возраста больных составила 57 лет (16-85 лет), среди них – 330 (53,2%) мужчин и 290 (46,8%) женщин. de novo ОМЛ верифицирован у 483 (77,9%) больных и вторичный ОМЛ из предшествующих миелодиспластического синдрома (МДС) или лимфомы – у 137 (22,1%) больных. Верификация диагноза ОМЛ осуществлялась на основании исследования общего анализа крови и с помощью морфологических, цитохимических, цитогенетических и молекулярно-биологических методов исследования. Терапия пациентов включала стандартные программы – этапы индукции и консолидации, основанные на рекомендациях ELN 2010/2017.

Кариологический анализ проводили на клетках костного мозга (КМ) с исследованием не менее 20 метафазных пластин для каждого больного. Цитогенетические препараты окрашивали GTG дифференциальным методом и интерпретацию патологии кариотипа проводили в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2013).

Выделение геномной ДНК из периферической крови (ПК) или КМ проводили методом хлороформной экстракции. Для выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции использовали набор АмплиСенс Лейкоз Квант (Интерлабсервис). Подбор праймеров для проведения ПЦР осуществляли с помощью про-

граммного обеспечения VectorNTI, PrimerBlast. Для исследования мутационного статуса генов FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1/2 использовали метод ПЦР. Наличие внутренней tandemной дупликации в гене FLT3 (FLT3-ITD) идентифицировали на электрофорезе в 6% полиакриламидном геле. Определение замены аспарагина в 835 положении в гене FLT3 (FLT3-TKD) проводили методом ПЦР, с последующим анализом длин рестрикционных фрагментов (эндонуклеаза рестрикции EcoRV, Thermo Fisher Scientific). Анализ наличия инсерций (в основном четырех пар нуклеотидов) в гене NPM1 выполнен с помощью обратнотранскриптазной ПЦР и визуализации продуктов реакции на электрофорезе. Скрининг aberrаций в генах DNMT3A, IDH1/2 проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Данные секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения SequenceScanner и баз данных NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org>). Аллельную нагрузку мутации FLT3-ITD определяли с помощью ПЦР, используя прямой праймер с флуоресцентной меткой и метода фрагментного анализа на анализаторе Applied Biosystems.

Обработка данных и статистический анализ выполнен с использованием программы StatSoft Statistica 10. Непараметрические данные сравнивали путем построения таблиц сопряженности признаков по критерию χ^2 Пирсона. Для определения выживаемости строили кривые по методу Каплана-Мейера. Для сравнительного анализа выживаемости различных групп использовали двухсторонний лог-ранговый тест. Безрецидивную выживаемость (БРВ) определяли от начала лечения до возникновения рецидива заболевания, а общую выживаемость (ОВ) – от начала лечения до даты построения кривых или до смерти больного. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. На основании результатов кариотипирования больные распределены в следующие прогностические группы: 68 (11,0%) больных - с благоприятным, 417 (67,2%) – с промежуточным, 135 (21,8%) – с неблагоприятным прогнозом. При этом нормальный кариотип имели 52,9% (328/620) пациентов. Мутации обнаружены у 55,3% (343/620) больных. Найдены как одиночные повреждения генов – у 58,0% (199) больных, так и различные комбинации мутаций: 2 мутации – у 99 больных, 3 мутации – у 31, 4 мутации – у 13 и 5 мутаций – у одного пациента. Чаще всего встречались следующие сочетания мутаций: NPM1+/FLT3-ITD+ (20,8% (30/144)), NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+ (8,3% (12/144)) и FLT3-ITD+/DNMT3A+ (8,3% (12/144)). Достоверно чаще мутации в генах NPM1, DNMT3A, IDH2 и FLT3-ITD выявляли сочетано с другими мута-

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

циями ($p=0,001$), а не одиночно. Показано, что у больных с НК мутации определялись достоверно чаще – у 220 из 328 изученных пациентов с НК

($p=0,001$) по сравнению с больными с неблагоприятным кариотипом (мутации выявлены у 50 из 135 больных) (рисунок 1).

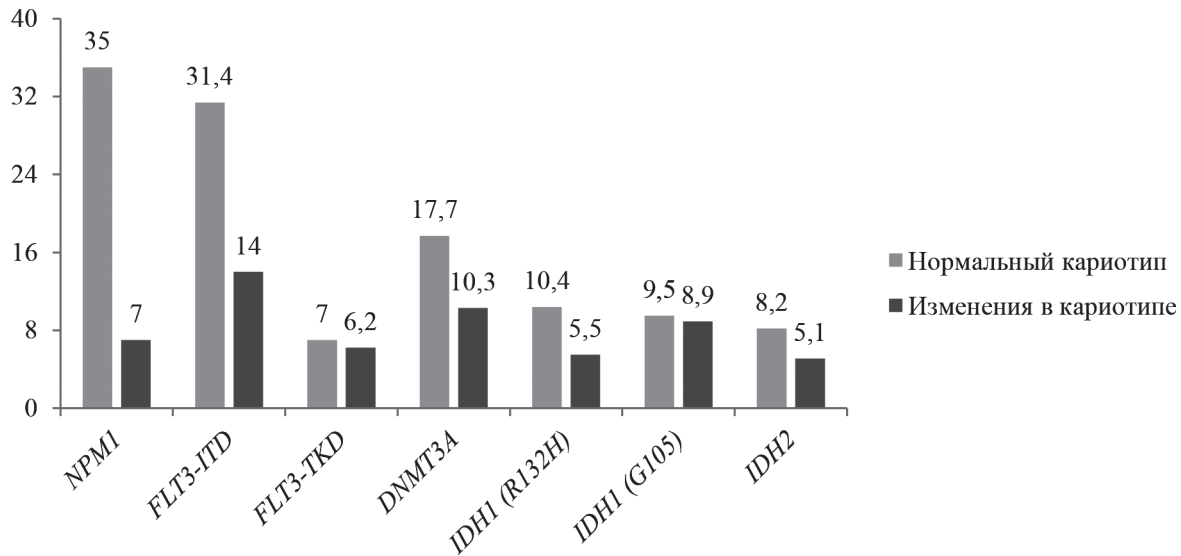


Рисунок 1. Встречаемость мутаций в генах FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1/2 у пациентов с нормальным кариотипом и хромосомными аномалиями (в %).

В исследуемой группе больных ОМЛ наиболее часто встречались мутации в генах FLT3 и NPM1 (внутренние тандемные дупликации FLT3-ITD – у 23,2%, точечная замена FLT3-TKD – у 6,6% больных и инсерции в 12 экзоне гена NPM1 обнаружены у 21,8% пациентов). Мутации в 23 экзоне (чаще в 882 кодоне) гена DNMT3A выявлены у 14,2% больных, в 4-м экзоне гена IDH1 – у 15,6% (в основном IDH1R132 и однонуклеотидный полиморфизм rs11554137), в 4-м экзоне гена IDH2 – у 6,8% (в основном в локусах R140 и R172).

В настоящее время есть информация о принципиальном значении аллельной нагрузки мутации FLT3-ITD (соотношение мутантного аллеля ITD к аллелю дикого типа (ITD-AR)) при распределении больных в прогностические группы. В связи с этим мы распределили пациентов с мутациями FLT3-ITD в две группы (пороговый уровень 0,5): с высоким уровнем (равен или более 0,5) и с низким уровнем аллельной нагрузки (менее 0,5). При этом 83 (57,6%) пациента имели низкий уровень аллельной нагрузки (ITDниз) и 61 (42,4%) – высокий уровень (ITDвыс). У больных с ITDвыс обнаружены увеличение процента бластов в КМ и количества лейкоцитов в ПК по сравнению с больными с ITDниз: $71,1 \times 10^9/\text{л}$ и $39,3 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,002$), и 90,2% и 81,1% ($p=0,052$), соответственно. Медианы ОБ больных с ITDвыс, ITDниз и ITD- распределились соответственно: 10,4, 11,9 и 15,8 месяцев ($p=0,016$); для БРВ – 9,1, 10,4 и 13,3 месяца, соответственно ($p=0,032$). При объединении в общую группу больных с ITDниз и ITD- выявили значимое ее отличие в длительности ОБ

по сравнению с пациентами с ITDвыс ($p=0,028$) (рисунок 2). При исследовании прогноза у пациентов с FLT3-TKDвыс и FLT3-TKDниз обнаружили тенденцию к ухудшению ОБ у больных с высокой аллельной нагрузкой мутации FLT3-TKD (7,4 и 9,0 месяцев, $p=0,220$, соответственно).

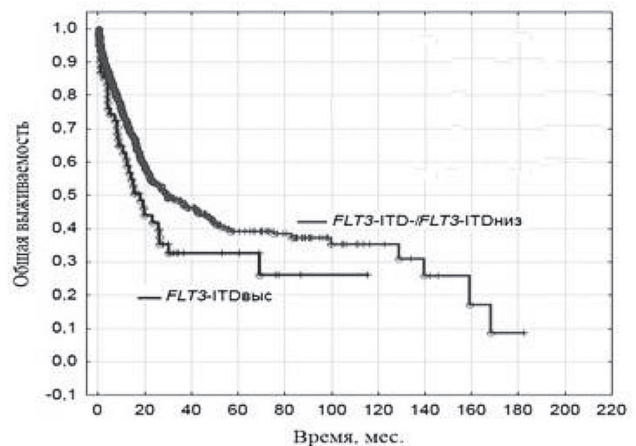


Рисунок 2. ОБ больных ОМЛ в зависимости от уровня аллельной нагрузки FLT3-ITD ($p=0,028$).

У больных с мутациями FLT3-ITD и FLT3-TKD был обнаружен высокий уровень лейкоцитов по сравнению с пациентами без мутации: $56,2 \times 10^9/\text{л}$ и $7,0 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,001$) и $33,1 \times 10^9/\text{л}$ и $10,2 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,002$), соответственно. У пациентов с FLT3-ITD процент бластов в КМ был выше по сравнению с пациентами без мутации: 90,3% в сравнении с

80,1%, соответственно ($p = 0,001$). Больные с мутацией FLT3-ITD были младше больных без мутации (медиана возраста составила 56,8 лет по сравнению с 60,1 годами, соответственно ($p=0,021$)). Мутации FLT3-ITD достоверно чаще обнаруживались у больных с первичными ОМЛ и редко встречались у больных с вторичными ОМЛ ($p=0,002$).

Провели сравнение результатов цитогенетического и молекулярно-генетического исследований и получили следующие результаты: нормальный кариотип детектировали у 71,5% пациентов с мутацией FLT3-ITD ($p=0,001$) и только у 6,9% больных неблагоприятный и благоприятный кариотипы ($p=0,001$ и $p=0,078$, соответственно). У пациентов с FLT3-TKD чаще детектировали про-

межуточный кариотип ($p=0,238$). Достоверно чаще мутации в гене FLT3 встречались в сочетании с мутациями в других исследованных генах, а не одиночно. Так, мутации FLT3-ITD и FLT3-TKD часто детектировались в сочетании с NPM1+ больными ($p=0,001$ и $p=0,017$, соответственно), а также FLT3-ITD+ с DNMT3A+ ($p=0,001$). Мутации FLT3-TKD не найдены в комбинации с мутациями в гене IDH1 ни у одного больного ($p=0,05$). Анализ прогностической значимости мутаций FLT3-ITD показал уменьшение медианы ОБ и БРВ пациентов с FLT3-ITD по сравнению с больными без мутации: 11,3 и 15,8 месяцев, и 10,0 и 13,3 месяцев, соответственно ($p=0,005$ и $p=0,009$, соответственно) (рисунки 3).

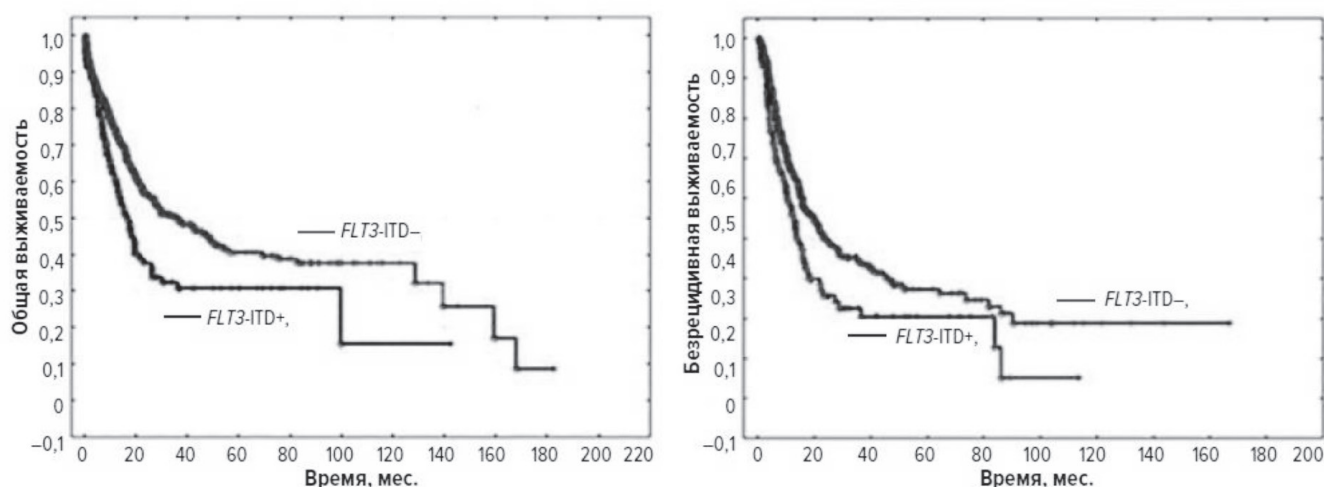


Рисунок 3. Прогностическое значение мутаций FLT3-ITD: ОБ ($p=0,005$) и БРВ ($p=0,009$) больных.

Мутации в гене NPM1 редко выявлялись у больных с вторичными лейкозами ($p=0,001$) и ассоциировались с ОМ5Л ($p=0,024$). У NPM1+ пациентов преимущественно детектировали дополнительные мутации: FLT3-ITD, DNMT3A+, IDH1+, IDH2+ ($p=0,001$ для всех указанных), FLT3-TKD ($p=0,017$). Достоверно чаще мутации в гене NPM1 находили у пациентов с промежуточным прогнозом в соответствии с результатами цитогенетического анализа (133/135 (98,5%); $p=0,001$). Больные с NPM1+ достоверно чаще достигали полной ремиссии (ПР) по сравнению с больными без мутации в гене NPM1 – 94,8% и 83,1%, соответственно ($p=0,001$). Медианы ОБ и БРВ у больных с NPM1+ были выше, чем у пациентов без мутации – 16,8 и 13,6 месяцев, 13,3 и 12,2 месяцев, соответственно ($p=0,485$ и $p=0,352$, соответственно). В группе больных в возрасте до 60 (включительно) лет установлено наибольшее благоприятное влияние наличия мутаций в гене NPM1 – медиана ОБ составила 22,7 (NPM1+) и 19,1 (NPM1-) месяцев ($p=0,184$). У пациентов с одиночной мутацией NPM1+ выявили значительно лучшую ОБ и БРВ по сравнению с другими больными (27,4 и 13,9 месяцев, $p=0,040$ и 19,3 и 12,0 месяцев,

$p=0,049$, соответственно) (рисунок 4).

В дебюте заболевания пациенты с DNMT3A+ имели высокий уровень лейкоцитов в ПК и blasts в КМ по сравнению с больными без мутации ($38,1 \times 10^9/\text{л}$ и $9,0 \times 10^9/\text{л}$, $p=0,001$; 81,4% и 80,0%, $p=0,111$ соответственно). Показана тенденция к увеличению возраста больных с мутацией в гене DNMT3A (62,1 год по сравнению с 59,0 годами у пациентов без мутаций, $p=0,138$). Достоверно чаще мутации встречались сочетано с мутациями FLT3-ITD, NPM1+ ($p=0,001$) и IDH2+R140 ($p=0,056$) и у больных с НК ($p=0,001$). Выявили тенденцию к ухудшению ОБ пациентов с мутацией в гене DNMT3A по сравнению с больными без мутации – 12,0 (DNMT3A+) и 15,0 (DNMT3A-) месяцев ($p=0,112$).

Пациентов с абберациями в гене IDH1 распределили в две группы: с мутациями (в основном в локусе R132) и с полиморфизмом rs11554137 (G105). Мутации в гене IDH2 встречались в основном в локусе R140 (36 больных), а также в R172 (3 больных) и у 3-х пациентов – в других кодонах. Больные с мутациями в генах IDH1 и IDH2 были старше больных без мутаций (62,1 и 60,0 лет,

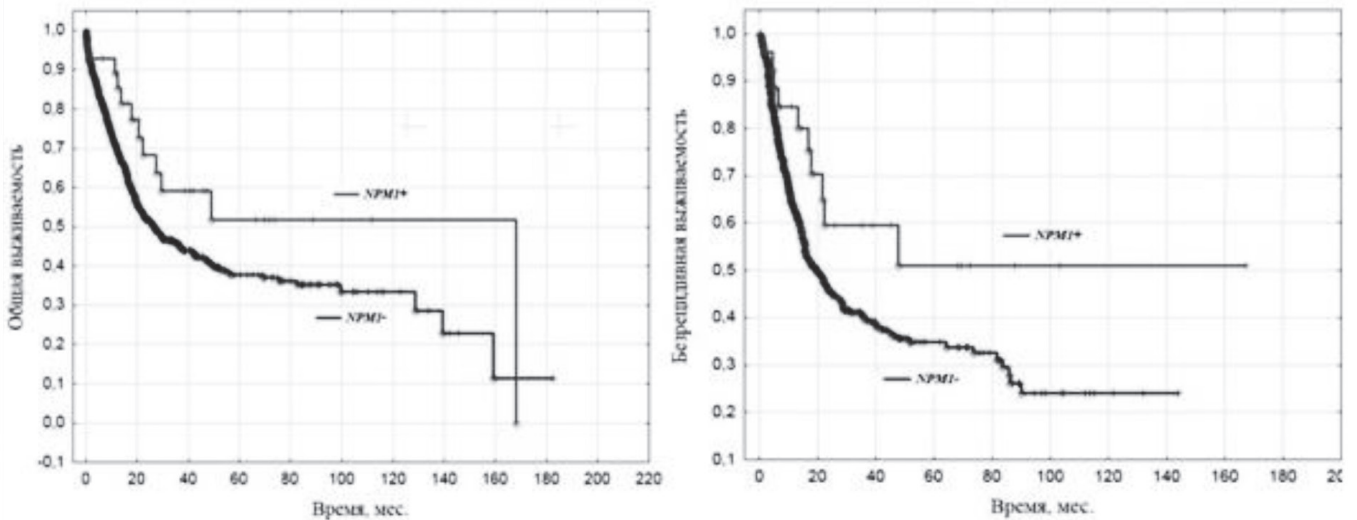


Рисунок 4. Прогностическое значение мутаций в гене *NPM1* (одиночно) у пациентов с ОМЛ: ОВ ($p=0,040$) и БРВ ($p=0,049$).

$p=0,147$ и 63,0 и 59,2 года, $p=0,069$, соответственно). У больных с *IDH1+* количество лейкоцитов в ПК было достоверно ниже по сравнению с *IDH1-* пациентами ($5,1 \times 10^9/\text{л}$ и $12,0 \times 10^9/\text{л}$, $p=0,003$). Большинство пациентов с *IDH1+* и *IDH2+* имели НК ($p=0,026$ и $p=0,126$, соответственно). Выявили тенденцию к увеличению числа пациентов, достигших ПР в группе больных с *IDH1+* по сравнению с пациентами без мутации (92,0% и 83,1%, соответственно ($p=0,181$)). Наличие полиморфизма *rs11554137* в гене *IDH1* ассоциировалось с тенденцией к ухудшению ОВ в группе больных с НК (12,2 и 15,5 месяцев, $p=0,186$) и наоборот наличие мутаций в гене *IDH1* коррелировало с лучшей ОВ по сравнению с группой без мутаций (19,3 и 14,3 месяца, $p=0,092$).

В связи с тем, что примерно у половины больных детектировали наличие нескольких мутаций в разных генах, причем прогностическое значение этих мутаций могло быть прямо противоположным, мы изучили, как влияют на прогноз сочетания некоторых мутаций. Для анализа выбрали

мутации *NPM1+*, *FLT3-ITD* и *DNMT3A+*, которые наиболее выражено влияли на прогноз и часто встречались сочетано с другими абберациями. На рисунке 5 показаны графики ОВ для различных сочетаний мутаций. Выявили, что больные, у которых находили одну мутацию имели значительно более длительную ОВ по сравнению с пациентами с 2-мя мутациями (18,1 и 12,2 месяца, $p=0,003$). Таким образом, наличие любой дополнительной мутации к *NPM1+*, *FLT3-ITD* и *DNMT3A+* ухудшало медиану ОВ. При этом для больных с *NPM1+* наиболее неблагоприятной дополнительной мутацией была *FLT3-ITD* (медиана ОВ 27,4 месяца для *NPM1+/др-* и 9,2 месяца для *NPM1+/FLT3-ITD+*, $p=0,019$), а также сочетание *NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+* (медиана ОВ 14,6 месяцев, $p=0,141$). Пациенты с *DNMT3A+* имели худшую ОВ при наличии мутации *FLT3-ITD* (медиана ОВ 17,3 месяца для *DNMT3A+/др-* и 7,1 месяца для *DNMT3A+/FLT3-ITD+*, $p=0,074$). Для больных с *FLT3-ITD* наличие дополнительных мутаций значимой роли не играло.

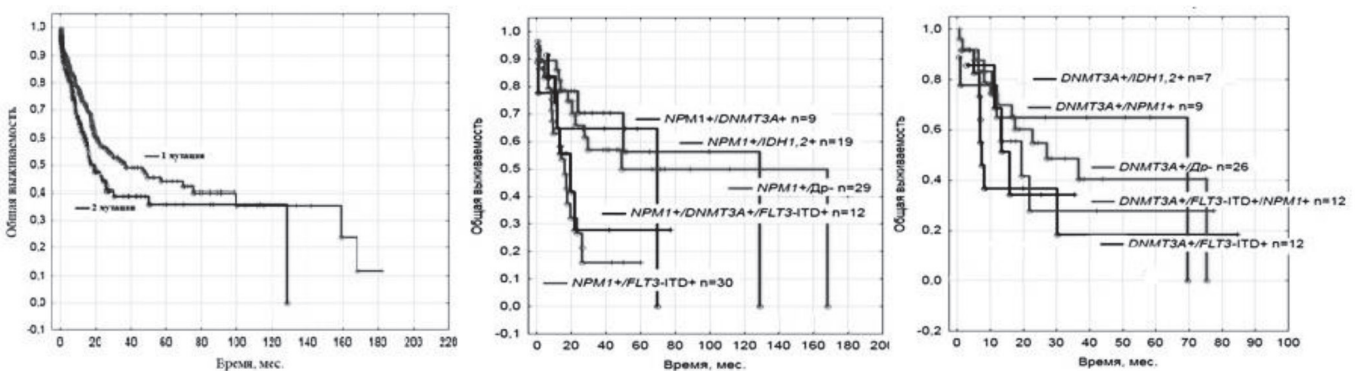


Рисунок 5. ОВ больных с одиночной и с 2-мя мутациями ($p=0,003$). ОВ больных с мутациями в гене *NPM1* и влияние дополнительных мутаций на прогноз. ОВ больных с мутациями в гене *DNMT3A* и влияние дополнительных мутаций на прогноз.

Обсуждение. За последние десятилетия большой прогресс достигнут в области лечения ОМЛ, включая использование таких методов, как трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), включение в стандартные протоколы новых таргетных препаратов, например, ингибиторов BVCL-2, IDH1/2 и FLT3, антител, гипометилирующих агентов, что привело к значительному улучшению выживаемости больных [18]. Тем не менее, прогноз пожилых пациентов с ОМЛ остается удручающим, с долгосрочной выживаемостью менее 15% [19]. Высокая гетерогенность ОМЛ, включающая в себя не только физическое состояние и коморбидность больного, но и множественные цитогенетические и молекулярно-генетические aberrации, серьезно осложняет выбор тактики лечения больных ОМЛ. Поэтому прогностическая модель, включающая эти хорошо известные факторы, необходима для точной стратификации пациентов на группы риска для реализации наиболее оптимальных терапевтических решений.

В нашем исследовании проанализированы 620 больных ОМЛ. Выявили высокую частоту встречаемости мутаций в генах NPM1, FLT3, DNMT3A – более 10%, что соответствует ранее представленным данным [20]. Больные из группы промежуточного риска и с НК значительно чаще имели мутации по сравнению с пациентами с благоприятным и неблагоприятным кариотипами, и в частности, со сбалансированными перестройками, что согласуется с данными литературы [21].

В настоящее время исследователи обращают внимание на уровень аллельной нагрузки мутации FLT3-ITD и размер инсерции [22, 23]. Нами также обнаружена связь уровня аллельной нагрузки FLT3-ITD с длительностью ОВ: группа больных с FLT3-ITDниз/ FLT3-ITDжила значительно дольше, чем с FLT3-ITDвыс. Пациентам с FLT3-ITDвыс рекомендована аллотГСК в ПР, которая значительно улучшает БВ и ОВ [24].

Различные комбинации мутаций выявили у 42,0% пациентов, причем наиболее часто встречались сочетания мутаций в гене DNMT3A с мутациями в генах NPM1 и FLT3, а также FLT3-ITD+/NPM1+, что коррелирует с данными литературы [25]. Е. Poraemanuil с соавт. [12] опубликовали данные о том, что при ОМЛ с NPM1+ основным фактором влияния на прогноз являются дополнительные генетические мутации, а не хромосомные перестройки, то есть эта группа больных может классифицироваться вне зависимости от результатов кариотипирования. В рекомендациях ELN2017 выделяется группа больных с NPM1+/FLT3-ITD- или NPM1+/FLT3-ITDниз, которая имеет благоприятный прогноз и группа NPM1+/FLT3-ITDвыс, которая имеет промежуточный прогноз [6]. Больных с NPM1-/FLT3-ITDниз относят в группу промежуточного прогноза, тогда как пациентов с NPM1-/FLT3-ITDвыс – неблагоприятного [22, 26]. В нашем исследовании пациенты с одиночной мутацией NPM1+ имели значительно более длительные ОВ и БРВ по

сравнению с остальной группой, независимо от варианта кариотипа. Однако прогноз больных с NPM1+/FLT3-ITDниз и NPM1+/FLT3-ITDвыс не отличался. В настоящее время применение комбинации химиотерапии и ингибиторов тирозинкиназы FLT3 позволит улучшить результаты терапии в группе больных с FLT3-ITD.

Мутации в генах DNMT3A, IDH1/2 на данный момент не включены в классификацию ELN2017 из-за противоречивости разных исследований об их влиянии на прогноз. В нашем исследовании негативное влияние (тенденция) мутаций в гене DNMT3A прослеживалось при оценке ОВ пациентов – 12,0 (DNMT3A+) и 15,0 (DNMT3A-) месяцев ($p=0,112$), что соответствует данным литературы [27, 28]. Обнаружили тенденции к тому, что наличие мутаций в гене IDH1 коррелировало с лучшей ОВ по сравнению с группой без мутаций ($p=0,092$), а наличие полиморфизма rs11554137 в гене IDH1, наоборот, с ухудшением ОВ в группе больных с НК ($p=0,186$). Несмотря на то, что есть данные как об отсутствии, так и о неблагоприятном влиянии мутаций в гене IDH1 на прогноз, исследователи предполагают, что решающую роль в распределении в группу риска играют изменения в кариотипе и наличие дополнительных мутаций [29, 30].

В настоящее время активно продолжается разработка новых препаратов направленного действия на конкретные онкогенные белки и микроокружение для больных ОМЛ: ингибиторов протеинкиназ, эпигенетических модуляторов, митохондриальных ингибиторов, антител и иммунотерапии [31]. Как известно, важной особенностью мутаций в гене DNMT3A является их стабильность на разных этапах заболевания, даже при ремиссии, и как следствие могут быть причиной резистентности к химиотерапии [32]. Таким образом, ингибирование этих генетических аномалий позволит воздействовать на «founding» клон. Тогда как таргетное воздействие на мутации в рецепторных тирозинкиназах (FLT3), которые, как правило, встречаются на более поздней стадии болезни, приведет к эрадикации основной массы опухолевых клеток.

Конфликты интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Источник финансирования

Исследование не имело источника финансирования

Вклад авторов

Концепция и дизайн: *все авторы*

Сбор и обработка данных: *Мотыко Е.В., Блау О.В.*

Представление материалов исследования: *все авторы*

Анализ и интерпретация: *все авторы*

Подготовка рукописи: *все авторы*

Окончательное одобрение рукописи: *Чечеткин А.В., Бессмельцев С.С., Мартынкевич И.С.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и др. // Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. М. – 2018. – Практика.
2. Eisfeld A., Kohlschmidt J., Mrozek K. et al. Mutation patterns identify adult patients with de novo acute myeloid leukemia aged 60 years or older who respond favorably to standard chemotherapy: an analysis of Alliance studies. // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32, No. 7. – P. 1338-1348.
3. Unnikrishnan A., Papaemmanuil E., Beck D. et al. Integrative genomics identifies the molecular basis of resistance to azacitidine therapy in myelodysplastic syndromes. // *Cell Reports*. – 2017. – Vol. 20, No. 3. – P. 572-585.
4. Uy G., Duncavage E., Chang G. et al. Dynamic changes in the clonal structure of MDS and AML in response to epigenetic therapy. // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31, No. 4. – P. 872-881.
5. Welch J., Petti A., Miller C. et al. TP53 and decitabine in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol. 375, No. 21. – P. 2023-2036.
6. Dohner H., Estey E., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. // *Blood*. – 2017. – Vol. 129, No. 4. – P. 424-447.
7. Harada Y., Nagata Y., Kihara R. et al. Japan Adult Leukemia Study Group JALSG. Prognostic analysis according to the 2017 ELN risk stratification by genetics in adult acute myeloid leukemia patients treated in the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG) AML201 study. // *Leuk Res*. – 2018. – Vol. 66. – P. 20-27.
8. Wang M., Lindberg J., Klevebring D. et al. Validation of risk stratification models in acute myeloid leukemia using sequencing-based molecular profiling. // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31, No. 10. – P. 2029-2036.
9. Talati C., Lancet J.E. CPX-351: changing the landscape of treatment for patients with secondary acute myeloid leukemia. // *Future Oncol*. – 2018. – Vol. 14, No. 12. – P. 1147-1154.
10. Li S., Garrett-Bakelman F.E., Chung S.S. et al. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. // *Nat Med*. – 2016. – Vol. 22, No. 7. – P. 792-799.
11. Eisfeld A., Mrozek K., Kohlschmidt J. et al. The mutational oncoprint of recurrent cytogenetic abnormalities in adult patients with de novo acute myeloid leukemia. // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31, No. 10. – P. 2211-2218.
12. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol. 374, No. 23. – P. 2209-2221.
13. Bhatnagar B., Eisfeld A., Nicolet D. et al. Persistence of DNMT3A R882 mutations during remission does not adversely affect outcomes of patients with acute myeloid leukaemia. // *Br J Haematol*. – 2016. – Vol. 175, No. 2. – P. 226-236.
14. Balsat M., Renneville A., Thomas X. et al. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: a study by the Acute Leukemia French Association Group. // *J Clin Oncol*. – 2017. – Vol. 35, No. 2. – P. 185-193.
15. Jongen-Lavrencic M., Grob T., Hanekamp D. et al. Molecular minimal residual disease in acute myeloid leukemia. // *N Engl J Med*. – 2018. – Vol. 378, No. 13. – P. 1189-1199.
16. Morita K., Kantarjian H., Wang F. et al. Clearance of somatic mutations at remission and the risk of relapse in acute myeloid leukemia. // *J Clin Oncol*. – 2018. – Vol. 36, No. 18. – P. 1788-1797.
17. Wong T., Miller C., Klco J. et al. Rapid expansion of preexisting nonleukemic hematopoietic clones frequently follows induction therapy for de novo AML. // *Blood*. – 2018. – Vol. 127, No. 7. – P. 893-897.
18. DiNardo C., Perl A. Advances in patient care through increasingly individualized therapy. // *Nat Rev Clin Oncol*. – 2019. – Vol. 16, No. 2. – P. 73-74.
19. Short N., Rytting M., Cortes J. Acute myeloid leukaemia. // *Lancet*. – 2018. – Vol. 392, No. 10147. – P. 593-606.
20. Metzeler K., Herold T., Rothenberg-Thurley M. et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. // *Blood*. – 2016. – Vol. 128, No. 5. – P. 686-698.
21. Kihara R., Nagata Y., Kiyoi H. et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. // *Leukemia*. – 2014. – Vol. 28, No. 8. – P. 1586-1595.
22. Schlenk R., Kayser S., Bullinger L. et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, No. 23. – P. 3441-3449.
23. Linch D., Hills R., Burnett A. et al. Impact of FLT3ITD mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, No. 2. – P. 273-276.
24. Brunet S., Labopin M., Esteve J. et al. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. // *J Clin Oncol*. – 2012. – Vol. 30, No. 7. – P. 735-41.
25. Islam M., Mohamed Z., Assenov Y. Differential analysis of genetic, epigenetic, and cytogenetic abnormalities in AML. // *Int J Genomics*. – 2017. – ID. 2913648. – P. 1-13.
26. Pratorcorona M., Brunet S., Nomdedeu J. et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: Relevance to post-remission therapy. // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, No. 14. – P. 2734-2738.
27. Ibrahim L., Mahfouz R., Elhelw L. et al. Prognostic significance of DNMT3A mutations in patients with acute myeloid leukemia. // *Blood Cells Mol Dis*. – 2015. – Vol. 54, No. 1. – P. 84-89.
28. Ley T., Ding L., Walter M. et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. // *N Engl J Med*. – 2010. – Vol. 363, No. 25. – P. 2424-2433.
29. Willander K., Falk I., Chairati R. et al. Mutations in the isocitrate dehydrogenase 2 gene and IDH1 SNP 105C>T have a prognostic value in acute myeloid leukemia. // *Biomark Res*. – 2014. – Vol. 2, No. 18. – P. 1-9.
30. Xu Q., Li Y., Lv N. et al. Correlation between isocitrate dehydrogenase gene aberrations and prognosis of patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. // *Clin Cancer Res*. – 2017. – Vol. 23, No. 15. – P. 4511-4522.
31. Stein E.M., Tallman M.S. Emerging therapeutic drugs for AML. // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, No. 1. – P. 71-78.
32. Gaidzik V., Weber D., Paschka P. et al. Monitoring of minimal residual disease (MRD) of DNMT3A mutations (DNMT3Amut) in acute myeloid leukemia (AML): a study of the AML Study Group (AMLSG). // *Blood*. – 2015. – Vol. 126, No. 23. – Abstract 226.

Грицаев С. В., Романенко Н. А., Зенина М. Н.

ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России»

ХРОНИЧЕСКИЙ МИЕЛОМОНОЦИТАРНЫЙ ЛЕЙКОЗ: ДИАГНОСТИКА, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ЛЕЧЕНИЕ (ЛЕКЦИЯ)

Gritsaev S.V., Romanenko N. A., Zenina M. N.

CHRONIC MYELOMONOCYTIC LEUKEMIA: DIAGNOSIS, PROGNOSIS, AND TREATMENT

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of Russia

Резюме. В лекции обобщены современные данные о диагностике хронического миеломоноцитарного лейкоза и его отдельных вариантов, о шкалах, используемых для прогнозирования течения заболевания, и методах лечения. Лекция предназначена для врачей-гематологов, слушателей курсов повышения квалификации, клинических ординаторов и врачей широкого профиля.

Ключевые слова. Хронический миеломоноцитарный лейкоз, прогнозирование, лечение.

Summary. In the lecture generalized modern diagnostic data on diagnosis of chronic myelomonocytic leukemia and its individual variants, on the scales used for forecasting to predict the course of the disease and treatments methods. The lecture is intended for hematologists, students of advanced training courses, clinical residents, and general practitioners.

Key words. Chronic myelomonocytic leukemia, prognosis, treatment.

Определение, диагностика, варианты

Хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММоЛ) – клональная миелоидная неоплазия, характеризующаяся дисплазией клеток периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ), избыточной продукцией и циркуляцией в ПК моноцитов и риском трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Медиана возраста больных с впервые выявленным ХММоЛ составляет 71–73 года. Заболевание диагностируется преимущественно у мужчин: соотношение с женщинами составляет 1,5–3:1. Заболеваемость ХММоЛ оценивается приблизительно как 4/100 000 населения в год.

Помимо de-novo ХММоЛ в 10% случаев заболевание может быть следствием ранее проведенного генотоксического лечения, т.е. речь идет о вторичном ХММоЛ. Данный вариант характеризуется частым обнаружением неблагоприятных хромосомных aberrаций и короткой выживаемостью.

В течение длительного времени ХММоЛ, согласно классификации FAB, входил в состав миелодиспластического синдрома (МДС) [1]. Явным недостатком этого было несоответствие между характерной для классических вариантов МДС цитопенией и пролиферативного компонента в виде моноцитоза у больных ХММоЛ.

В 2001 году международными экспертами был предложен ряд принципиальных изменений, касающихся миелоидных неоплазий, которые нашли отражение в классификации ВОЗ. Одно из них – снижение разграничительного числа бластных

клеток между МДС и ОМЛ с 30% до 20%. Другое, примирившее сторонников и противников включения ХММоЛ в состав МДС – формирование новой группы, известной как миелодиспластическая/миелолипролиферативная неоплазия (МДС/МЛП) [2]. Тем самым была решена проблема сосуществования признаков дисплазии и пролиферации.

Наряду с ХММоЛ в состав МДС/МЛП или смешанных миелоидных неоплазий вошли атипичный хронический миелоидный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз и неклассифицируемый вариант МДС/МЛП. В последней версии классификации ВОЗ 2016 года список смешанных миелоидных неоплазий пополнился еще одним вариантом: МДС/МЛП с кольцевыми сидеробластами и тромбоцитозом [3,4].

Подчеркивая факт преимущественного обнаружения нормального кариотипа, международными экспертами сделан акцент на вероятность выявления более чем у 80% больных МДС/МЛП мутаций генов SRSF2, TET2, ASXL1 и реже генов SETBP1, NRAS/KRAS, RUNX1, CBL, EZH2. Необходимо подчеркнуть, что выявление мутаций отдельных генов методом секвенирования должно рассматриваться только как дополнительный фактор и только в совокупности с другими клиническими и лабораторными находками. Это вполне объяснимо: указанные aberrации нередко встречаются у вполне здоровых лиц старшего возраста в виде так называемого клонального гемопоэза неустановленного значения (CHIP).

Согласно рекомендациям классификации ВОЗ

2016 года диагностика ХММол основывается прежде всего на обнаружении моноцитоза: $\geq 1 \times 10^9$ /л и $\geq 10\%$ от общего числа лейкоцитов. Другое важное условие – персистенция моноцитоза в ПК в течение не менее 3-х месяцев.

Сохраняется выделение двух морфологических вариантов: пролиферативного и диспластического. Это обосновано различием не только в клиническом, но и в биологическом фенотипах, в частности, в характере повреждения сигнального пути RAS/MAPK.

Пролиферативный вариант ХММол характеризуется лейкоцитозом $\geq 13 \times 10^9$ /л.

При диспластическом варианте количество лейкоцитов менее $< 13 \times 10^9$ /л.

Частой молекулярной находкой у больных пролиферативным вариантом ХММол являются мутации генов сигнального пути RAS (NRAS, KRAS, CBL и RPTN11) и уникальный профиль экспрессии генов. Для них характерны лейкоцитоз, гепато- и спленомегалия, а также конституциональные симптомы в виде слабости, ночной потливости, тяжести в подреберьях, ослагии, потери веса, кахексии.

Для диспластического варианта ХММол типичны цитопении, низкая толерантность физической нагрузки, легко возникающая кровоточивость, ча-

стые инфекции, потребность в частых переливаниях компонентов крови.

Нередко при осмотре больных ХММол на коже обнаруживаются лейкемиды.

Учитывая сопряженность количества бластных клеток с риском прогрессии в ОМЛ, выделяют 3 прогностических варианта ХММол.

Первый, так называемый ХММол-0, характеризуется $< 2\%$ бластов в ПК, включая промоноциты, и $< 5\%$ бластов в КМ.

Отличительными признаками ХММол-1 является количество бластов от 2% до 4% в ПК, включая промоноциты, и/или от 5% до 9% в КМ.

Для диагностики ХММол-2 необходимо обнаружение от 5% до 19% бластных клеток в ПК, от 10% до 19% бластных клеток в КМ и/или палочек Ауэра.

Не менее важным условием корректной диагностики ХММол является обязательное исключение других миелопролиферативных неоплазий. В связи с этим во всех случаях в обязательном порядке должно быть выполнено исследование на химерный ген BCR-ABL, а при выявлении эозинофилов – на реаранжировки генов PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 и химерный ген PCM1-JAK2. Критерии диагностики ХММол согласно классификации ВОЗ 2016 года представлены в *таблице 1*.

Таблица 1

Критерии диагностики ХММол [3]

Персистирующий в ПК моноцитоз $\geq 1 \times 10^9$ /л при условии содержания моноцитов в $\geq 10\%$ от общего числа лейкоцитов
Несоответствие критериям BCR-ABL1 ⁺ ХМЛ, первичного миелофиброза, истинной полицитемии или эссенциальной тромбоцитемии*
Отсутствие реаранжировок генов PDGFRA, PDGFRB, FGFR1 или химерного гена PCM1-JAK2 (обязательное исключение при эозинофилии)
Менее 20% бластов в ПК и КМ †
Дисплазия в $\geq 10\%$ клетках одного или более миелоидных ростков. При отсутствии или минимальных признаках дисплазии диагностика ХММол возможна при наличии других критериев и
Обнаружении в кроветворных клетках приобретенных клональных цитогенетических или молекулярных aberrаций
или
Моноцитоз (сформулирован выше) персистирует не менее 3-х месяцев
Исключены другие возможные причины моноцитоза

Примечания. * Миелопролиферативные неоплазии могут быть ассоциированы с моноцитозом или моноцитоз может обнаруживаться в процессе естественного течения заболеваний. Эти случаи могут симулировать ХММол. Указание в анамнезе на МПН исключает диагноз ХММол. Обнаружение признаков МПН в КМ и/или мутаций, ассоциированных с МПН (JAK2, CALR, MPL), дает основание заподозрить МПН с моноцитозом нежели ХММол. † Бласты и морфологические эквиваленты бластов, включая миелобласты, монобласты и промоноциты. Патологические моноциты, которые могут быть обнаружены в ПК и КМ, из подсчета количества бластов исключаются. ‡ Обнаружение мутаций в генах, часто ассоциированных с ХММол (например, TET2, ASXL1, SETBP1), может быть использовано для подтверждения диагноза ХММол при наличии других критериев. Необходимо помнить, многие из этих мутаций могут быть возрастными находками или присутствовать в субклонах. Т.е. необходима взвешенная интерпретация данных находок.

Принимая во внимание большое число нерешенных вопросов при верификации ХММол и его вариантов, в 2019 году в журнале Haematologica было опубликовано заключение международной консенсусной группы, которое, по мнению авторов, должно облегчить диагностику и прогнозирование

течения ХММол [5].

Так признавая жизнеспособность критериев классификации ВОЗ 2016 года для постановки диагноза классического ХММол, предложен ряд дополнительных критериев, которые следует учитывать, например, при недостаточном процентном содер-

жании клеток с признаками дисплазии, т.е. менее 10%. В этой ситуации предлагается ориентироваться на результаты стандартного кариотипирования или метода FISH для обнаружения типичных для ХММоЛ хромосомных aberrаций, на находки при изучении гистологических и иммуногистохимических препаратов КМ, а также на данные иммунофенотипирования клеток ПК и КМ. Немаловажным является подтверждение клональности миелоидных клеток методом секвенирования: обнаружение мутаций генов TET2, ASXL1 и SETBP1 с минимальной аллельной нагрузкой в 10%.

В случаях, когда содержание бластных клеток в препаратах ПК и КМ не соответствуют ни одному из 3 предложенных прогностических вариантов (например, 4% бластов в КМ и 6% бластов в ПК) оправданным признается ориентация на больший

количественный показатель. При этом эксперты предлагают ограничить круг применения градации ХММоЛ по процентному содержанию бластных клеток только классическими случаями заболевания.

Выделение специальных вариантов ХММоЛ обосновано случаями несоответствия классическим критериям. Например, когда один из двух принципиальных для диагностики ХММоЛ показателей, а именно абсолютное и процентное количество моноцитов в ПК, не достигает минимального уровня. Или, когда обнаружение мутации JAK2V617F ассоциировано с морфологическими находками, типичными для ХММоЛ. Или сочетание признаков нескольких заболеваний, например ХММоЛ и МПН или ХММоЛ и мастоцитоза. Обобщенные данные о специальных вариантах ХММоЛ представлены в *таблице 2*.

Таблица 2

Специальные варианты ХММоЛ [5]

Варианты	Основные диагностические признаки, отличающие от классического ХММоЛ
Олигомоноцитарный ХММоЛ	Абсолютное число моноцитов в ПК $<1 \times 10^9$ /л
Системный мастоцитоз с сопутствующим ХММоЛ	Соответствует критериям системного мастоцитоза согласно классификации ВОЗ, в моноцитах большинства больных обнаруживается мутация KITD816V
ХММоЛ с сопутствующей миелоидной неоплазией с экспрессией классических для МПН драйверных мутаций, таких как JAK2V617F, BCR-ABL или реаранжировкой генов PDGFRA/B или FGFR1	Одновременное наличие критериев для классических МПН, таких как хронический миелолейкоз, первичный миелофиброз или МПН с реаранжировкой генов PDGFRA/B, и критериев для ХММоЛ
ХММоЛ с экспрессией молекулярных драйверов типичных для МПН: ХММоЛ с JAK2F617F или ХММоЛ с реаранжировкой генов PDGFRA/B или ХММоЛ с реаранжировкой гена FGFR1	Обнаружение типичных для классических МПН молекулярных драйверов, таких как JAK2F617V или реаранжировки генов PDGFRA/B при отсутствии диагностических критериев, соответствующих классическим МПН, но есть критерии ХММоЛ
ХММоЛ с сопутствующей лимфоидной/лимфопрлиферативной неоплазией	Наличие критериев лимфоидной неоплазии

Результаты молекулярно-генетических исследований представляют возможность выявить сопряженность биологического фенотипа с клинико-гематологической картиной ХММоЛ. Примером могут быть случаи с мутацией гена SF3B1, частота обнаружения которой среди больных ХММоЛ не превышает 5%. Для этих больных типичны преимущественно диспластический вариант заболевания, низкая частота мутаций гена ASXL1, высокая частота мутации JAK2V617F, низкая вероятность прогрессии в ОМЛ [6]. Вопрос о целесообразности выделения самостоятельных вариантов ХММоЛ по соматическому статусу отдельных генов требует обобщения значительных по объему данных.

Накопленная в течение последних лет информация позволяют высказаться в пользу поэтапного развития миелоидных неоплазий, включая не только МДС и МПН, но и МДС/МПН. На ранних стадиях, когда отсутствуют явные признаки за-

болевания, возможно обнаружить соматические мутации (типа passenger), которые нередко выявляются и у больных с развернутой клинической картиной, например, мутации гена TET2. Данные находки обозначаются как клональный гемопоэз неопределенного значения (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP). Если же клональный гемопоэз сопровождается цитопенией, то такое состояние именуется уже как клональная цитопения неизвестного значения (clonal cytopenia of unknown significance, CCUS). Тот факт, что указанные мутации обнаруживаются преимущественно у лиц старшего возраста, дает основание интерпретировать находки как ассоциированный с возрастом клональный гемопоэз (age-related clonal hematopoiesis, ARCH). Редкие случаи обнаружения в небольшом количестве лейкоцитов здоровых лиц потенциально онкогенных драйверных мутаций, например BCR-ABL, интерпретируются как

клональный гемопоэз с онкогенным потенциалом (clonal hematopoiesis with oncogenic potential, CHOP). Такие состояния как CHIP, CCUS и CHOP рассматриваются как возможная префаза ХММОЛ.

По аналогии с клональной цитопенией неизвестного значения для случаев персистирующего моноцитоза неустановленной этиологии предлагается термин идиопатический моноцитоз неизвестного значения (idiopathic monocytosis of unknown significance, IMUS). Для выделения данного состояния, рассматриваемого также как потенциальная префаза ХММОЛ, рекомендованы следующие критерии. Персистирующий в течение не менее 3-х месяцев моноцитоз: $\geq 10\%$ и $> 0,5 \times 10^9/\text{л}$. Отсутствие признаков дисплазии и миелопролиферации. Отсутствие признаков и критериев миелоидных или других неоплазий кроветворной ткани. Отсутствие изменений при проточной цитометрии или соматических мутаций, ассоциированных с миелоидными, лимфоидными или тучно-клеточными неоплазиями. Отсутствие реактивной природы моноцитоза (табл. 3).

На этапе диагностики необходимо помнить о состояниях, которые внешне, по клинико-лабораторным показателям, напоминают ХММОЛ. Это могут быть хронические бактериальные инфекции, например туберкулез или подострый эндокардит, грибковые и вирусные инфекции, хронические аутоиммунные заболевания и негематологические неоплазии. Моноцитоз является нередкой находкой у реконвалесцентов после вирусной инфекции или при восстановлении костномозгового кроветворения после химиотерапии.

После исключения вышеуказанных возможных причин моноцитоза диагностический акцент должен быть сделан на клональных гематологических

неоплазиях, имитирующих ХММОЛ. В первую очередь речь идет о Ph+ хроническом миелолейкозе: высокий абсолютный моноцитоз является частой находкой у больных с продукцией белка p190.

При наличии значительной эозинофилии целесообразен поиск реаранжировок с вовлечением гена PDGFR/A (хромосома 4q12) и гена PDGFR/B (хромосома 5q31-q32), обнаружение которых исключает диагноз ХММОЛ, несмотря на моноцитоз и диспластические изменения в клетках КМ, и сопряжено с эффективностью иматиниба. К другим aberrациям, поиск которых оправдан у больных с моноцитозом и эозинофилией, являются реаранжировки гена FGFR1 и химерный ген PCM1-JAK2. Моноцитоз может быть также находкой у больных первичным миелофиброзом и истинной полицитемией, что значительно ухудшает показатели выживаемости.

Как и при других миелоидных неоплазиях при анализе мазков ПК и КМ рекомендован дифференцированный подсчет не менее 100 лейкоцитов и не менее 200–500 ядерных клеток соответственно. По аналогии с МДС не менее 10% клеток одного из миелоидных ростков (эритроидного, нейтрофильного и/или мегакариоцитарного) должны быть с признаками дисплазии.

у больных ХММОЛ к бластным клеткам принято относить миелобласты, монобласты и промоноциты. Следует выделять нормальные (зрелые) и патологические (незрелые) моноциты. Несмотря на трудности, возникающие при морфологическом разделении моноцитов, промоноцитов и монобластов, рекомендовано прикладывать максимум усилий для корректного выполнения дифференцированного подсчета клеток.

Таблица 3

Предшествующие ХММОЛ клональные и неклональные состояния [5]

Критерии	IMUS	ICUS	CCUS	CHIP/CHOP	CMUS ¹	О-ХММОЛ ²	ХММОЛ
Абсолютный моноцитоз, $\geq 0,5 \times 10^9/\text{л}$	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+
Значительный моноцитоз, $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$	+/-	-	-	-	+/-	-	+
Моноцитоз $> 10\%$	+	-	-	-	+	+	+
Дисплазия*	-	-	-	-	-	+	+
Цитопения(-и)**	-	+	+	-	-	+/-	+/-
Бласты в КМ	<5%	<5%	<5%	<5%	<5%	<20%	<20%
Изменения при проточной цитометрии	-	-	+/-	+/-	-	++	++
Цитогенетические aberrации, ≥ 1	-***	-***	+/-	+/-	-***	++	++
Молекулярные aberrации****	-	-	+	+	+****	++	++

Примечания. ¹ clonal monocytosis of unknown (undertermined) significance. ² олигомоноцитарный ХММОЛ. * не менее 10% клеток с признаками дисплазии от всех клеток эритроидного, нейтрофильного и/или мегакариоцитарного ростка. ** персистирующая(-ие) в течение не менее 4-х месяцев. *** в отдельных случаях возможно обнаружение небольшого клона методом FISH. **** мутации, ассоциированные с ХММОЛ

и МДС, с аллельной нагрузкой $\geq 2\%$. Если для верификации префазы ХММОЛ необходимый уровень аллельной нагрузки составляет $\geq 2\%$, то минимальный уровень для диагностики ХММОЛ – 10%. У больных с явным ХММОЛ обнаруживаются множественные генетические мутации и aberrации. При обнаружении более одной мутации, типичной для СНР, необходимо подумать о диагностике олигомоноцитарного ХММОЛ.

Таблица 4

Морфологическая характеристика бластных клеток и моноцитов больных ХММОЛ [5]

Клетки	Форма ядра	Хроматин	Цитоплазма	Размер по отношению к зрелым моноцитам
Бластные клетки				
Миелобласты	Округлые/овальные	Нежный с ядрышками (нуклеолами)	Базофильная с / без азурофильными гранулами	Меньше
Монобласты	Округлые/овальные	Тонкий/кружевной с ядрышками (нуклеолами)	Базофильная с редкими азурофильными гранулами	Больше (20–30 мкм)
Промоноциты	Складчатые/ с углублениями ¹	Тонки / кружевной с ядрышками (нуклеолами)	Варибельная базофилия, возможны азурофильные гранулы	Больше
Моноциты				
Атипичные / незрелые	Складчатые/ с углублениями	Более конденсированный, единичные нуклеолы	Промежуточная базофилия	Меньше
Зрелые	Дольчатые, лобулярные/ с углублениями	Конденсированный, без нуклеол	Серая или розоватая с редкими азурофильными гранулами и вакуолями	–

Примечание. 1 – отличительная особенность промоноцитов и моноцитов

В таблице 4 представлены морфологические характеристики бластных клеток и моноцитов больных ХММОЛ. Для выделения отдельных субпопуляций моноцитов можно воспользоваться результатами цитохимического исследования с окраской клеток на неспецифическую эстеразу.

Процентное содержание костномозговых моноцитов *per se* не имеет принципиального значения для диагностики ХММОЛ. Тем не менее знание числа моноцитов в КМ важно, т.к. в большинстве случаев отмечается их корреляция с количеством моноцитов в ПК.

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование препаратов КМ – необходимое условие для подтверждения диагноза ХММОЛ, исключения ОМЛ и заболеваний, которые могут протекать под маской ХММОЛ. Также можно получить информацию о фиброзе КМ, фокусной аккумуляции бластных клеток, усилении ангиогенеза, атипичных (диспластических) мегакариоцитах, клеточности КМ и сопутствующем мастоцитозе. Для проведения иммуногистохимического исследования можно ограничиться минимальной панелью, включающей антитела к CD14, CD34, CD117/KIT, триптазе и мегакариоцитам (CD41, CD42 или CD61). В затруднительных ситуациях рекомендовано расширить диагностическую панель путем добавления анти-

тел к CD3, CD20 или CD25 (при подозрении на мастоцитоз).

Клональные цитогенетические aberrации обнаруживаются у 20–30% больных ХММОЛ, из которых наиболее частые трисомия 8 и 21 хромосом, изменения 7 хромосомы (-7/del7), потеря Y хромосомы и комплексный кариотип. В отличие от больных МДС изолированная делеция длинного плеча 5 хромосомы (del5q) и комплексный кариотип – редкие находки у больных ХММОЛ. Применение метода FISH оправдано в отдельных случаях с нормальным кариотипом и должно охватывать регионы 5q31, ser7, 7q31, 20q, ser8, serY и p53. Особое внимание следует уделять криптическим делециям в генах TET2 (4q24), NF1 (17q11) и ETV6 (12p13).

Согласно шкале, предложенной Испанской группой по стратификации больных ХММОЛ, представляется возможным выделить 3 группы больных с разной прогностической ценностью результатов цитогенетического исследования. В группу высокого риска включены трисомия 8 хромосомы, aberrации 7 хромосомы и комплексный кариотип. Группа низкого риска объединяет нормальный кариотип и -Y. Остальные aberrации вошли в группу промежуточного риска. 5-летняя общая выживаемость (ОВ) больных в группах составила 4%, 35% и 26% соответственно.

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

По данным Mayo Clinic-French Consortium Study хромосомные аномалии выявляются у 30% больных ХММОЛ. К наиболее частым находкам относятся +8 (23%),

-Y (20%), -7/7q- (14%), 20q- (8%), +21 (8%) и der(3q) (8%). Авторам также удалось сформировать 3 группы, различающиеся по выживаемости. Группа высокого риска составлена из комплексного и моносомного кариотипов. В составе группы низкого риска – нормальный кариотип, одиночная -Y и одиночная der(3q). Все остальные поломки вошли в группу промежуточного риска. Медиана ОВ в группах была 3, 41 и 21 месяц соответственно.

У большинства больных ХММОЛ выявляются соматические мутации генов, наиболее частые из которых TET2 (60%), SRSF2 (50%) и ASXL1 (40%). Ассоциация мутаций генов SRSF2 и TET2 четко коррелирует с фенотипом ХММОЛ. В свою очередь мутации генов TET2 и ASXL1 сопряжены с префазными по отношению к ХММОЛ состояниями, таким как CHIP и ARCH. Тем не менее следует отметить, что только обнаружение мутаций гена ASXL1 из перечисленных свидетельствует о крайне неблагоприятном прогнозе. Характеристика часто выявляемых мутаций у больных ХММОЛ представлена в таблице 5.

Таблица 5
Гены, мутации которых наиболее часто обнаруживаются у больных ХММОЛ [5]

Ген	Класс гена и его функции	Частота	Клиническое значение
ASXL1	Эпигенетическая регуляция Модификация гистона	40%*	Неблагоприятный прогноз** CHIP / ARCH***
EZH2	Эпигенетическая регуляция Модификация гистона	5%	
TET2	Эпигенетическая регуляция Модификация гистона	60%*	CHIP / ARCH***
DNMT3A	Эпигенетический регулятор Метилирование ДНК	5%	Неблагоприятный прогноз** CHIP / ARCH***
IDH1	Эпигенетический регулятор	1%	Лекарственная мишень
IDH2	Эпигенетический регулятор	5–10%	Лекарственная мишень
CBL	Сигналинг	15%	Сигнальный путь RAS
NRAS	Сигналинг	15%	Неблагоприятный прогноз** Сигнальный путь RAS
KRAS	Сигналинг	10%	Сигнальный путь RAS
PTPN11	Сигналинг	5%	Сигнальный путь RAS
FLT3	Сигналинг	<5%	Ассоциирован с ОМЛ Лекарственная мишень
SRSF2	Сплайсинг пре-мРНК	50%*	
SF3B1	Сплайсинг пре-мРНК	5–10%	
U2AF1	Сплайсинг пре-мРНК	5–10%	
ZRSR2	Сплайсинг пре-мРНК	5%	
RUNX1	Транскрипция гена	15%	Неблагоприятный прогноз** Ассоциирован с ОМЛ
SETBP1	Транскрипция гена	15%	Неблагоприятный прогноз**
TP53	Повреждение ДНК	1%	Неблагоприятный прогноз**
PHF6	Адаптер хроматина	5%	

Примечания. * типичные для ХММОЛ, за исключением мутаций гена SRSF2, которые могут рассматриваться в качестве классических находок при CHIP/ARCH состояниях. ** независимые неблагоприятные факторы, ассоциированные с выживаемостью больных ХММОЛ. *** часто обнаруживаются при CHIP и ARCH состояниях. Тем самым их диагностическая значимость может быть ниже по сравнению с другими (ХММОЛ-ассоциированными) мутациями.

Приблизительно у 9% больных ХММОЛ обнаруживаются драйверные мутации, типичные для хронических миелопролиферативных неоплазий: преимущественно JAK2V617F и в редких случаях MPLW515L. Выявление мутации JAK2V617F – основание для дифференциальной диагностики между

ХММОЛ и ХМПН с моноцитозом. Большинство случаев ХММОЛ с мутацией JAK2V617F относятся к пролиферативным вариантам и характеризуются высоким уровнем гемоглобина и гематокрита, лейкоцитозом и тромбоцитозом, а редким выявлением пальпируемой селезенки и нарушениями кари-

отипа. Низкая аллельная нагрузка JAK2V617F дает основание предположить наличие субклона.

При прогрессии ХММОЛ, в частности, при трансформации в ОМЛ, а также при терапии нередки случаи клональной эволюции. Речь, в частности, касается возможной экспансии ранее небольшого клона вследствие резистентности его клеток к проводимой терапии.

Одним из стандартных методов обследования больных с подозрением на ХММОЛ, префазу или специальные варианты ХММОЛ является много-

цветная проточная цитофлуориметрия (ПЦФ). Использование ПЦФ позволяет распознавать случаи ОМЛ, а также выделять отдельные популяции моноцитов. Моноциты характеризуются экспрессией на своей поверхности кластеров дифференцировки CD14 и CD16. Дальнейший анализ дает основание выделить субпопуляции классических (MO1: CD14^{bright}/CD16⁻), промежуточных (MO2: CD14^{bright}/CD16⁺) и неклассических (MO3: CD14^{dim}/CD16⁺) моноцитов (табл. 6)

Таблица 6

Иммунофенотипическое распределение моноцитов у больных ХММОЛ и в контроле [5]

Субпопуляции моноцитов	Фенотип	Частота обнаружения у больных		Реактивные состояния КМ
		ХММОЛ	МДС и МПН	
Классические, MO1	CD14 ^{bright} /CD16 ⁻	≥94%	70–97%	<94%
Промежуточные, MO2	CD14 ^{bright} /CD16 ⁺	<20%	5–20%	5–15%
Неклассические, MO3	CD14 ^{dim} /CD16 ⁺	<5%	5–10%	5–20%

Моноциты разных субпопуляций отличаются друг от друга разным профилем экспрессии генов, экспрессией хемокиновых рецепторов и фагоцитарной активностью.

Во многих случаях на опухолевых моноцитах можно выявить aberrантную экспрессию CD2, CD5, CD10, CD23 и/или CD56, из которых последний наиболее часто выявляется у больных ХММОЛ. Помимо этого, целесообразно принимать во внимание факт сниженной экспрессии отдельных антигенов на поверхности патологических моноцитов по сравнению с нормальными клетками крови: CD13, CD14, CD15, CD33, CD38, CD45, CD64.

Прогнозирование

Прогнозирование течения заболевания так же, как и других миелоидных неоплазий, в частности МДС, является обязательным элементом алгоритма лечения больных ХММОЛ. Несмотря на предложенное значительное число прогностических шкал, следует признать, что ни она из них не заняла прочное место в повседневной клинической практике (табл. 7).

В 2002 году было констатировано, что в отличие

от выделения диспластического и пролиферативного вариантов ХММОЛ, манипуляция процентным содержанием бластных клеток в КМ и количеством лейкоцитов в ПК позволяет распознавать группы больных с разным вариантом течения заболевания. В том же году гематологами M.D. Anderson Cancer Center для стратификации больных в группы риска было предложено использовать такие показатели как анемия, абсолютное число лимфоцитов в ПК более 2,5x10⁹/л, число бластных клеток в КМ менее 10% и наличие незрелых миелоидных клеток, циркулирующих в ПК. В состав шкалы, предложенной Mayo Clinic, входили повышенное содержание моноцитов в ПК, анемия и тромбоцитопения. В последующем к показателям, полученным при исследовании ПК и КМ, были добавлены результаты исследования кариотипа и мутационного статуса гена ASXL1, зависимость от трансфузий. Так в 2014 году в состав пересмотренной шкалы Molecular Mayo Model был включен мутационный статус гена ASXL1, а в 2016 году состав шкалы CPSS пополнился данными изучения мутационного статуса уже 4-х генов, включая, помимо ASXL1, также NRAS, RUNX1 и SETBP1.

Таблица 7

Шкалы для определения прогноза ХМПН [7]

Шкала	Бласты	Цито-пения	Гемо-глобин	Тром-боциты	Циркул-е незре-лые кл	АЧН	АЧЛ	ЛДГ	Воз-т	Транс-фузии	Общий статус	Мут-я ASXL1	Цито-гене-тика
IPSS	+	+	+	+		+			+				
WPSS	+	+	+							+			
MDA-LR	+	+	+	+					+				
MDAPS	+		+		+		+						

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

MDAPS-M1			+		+		+	+					
MDAS	+	+	+	+		+			+	+	+		
FPSS	+	+							+	+			
IPSS-R	+	+	+	+		+			+		+		+
CPSS	+	+	+			+			+				
MMD			+	+	+							+	
CPSS-mol	+								+				+

Примечания. Циркул-е незрелые кл – циркулирующие незрелые клетки. АЧН – абсолютное число нейтрофилов. АЧЛ – абсолютное число лимфоцитов. Воз-т – возраст. Трансфузии – зависимость от трансфузий. Мут-я – мутация. IPSS – International Prognostic scoring System. WPSS – WHO Classification-Based Prognostic Scoring System. MDA-LR – M.D. Anderson Lower-Risk MDS Prognostic Scoring System. MDAPS – M.D. Anderson Prognostic Scoring System. MDAPS-M1 – Modified M.D. Anderson Prognostic Scoring System. MDAS – Global M.D. Anderson Risk Model Score for MDS. FPSS – French prognostic Scoring System. IPSS-R – Revised International Prognostic Scoring System. CPSS – Chronic Myelomonocytic (CMML) Leukemia Prognostic Scoring System. MMD – Molecular Mayo Model. CPSS-mol – CMML-specific Prognostic Scoring System Molecular.

Таким образом удалось скомпилировать клинико-гематологические и молекулярно-генетические показатели (табл. 8,9), в результате чего были сформированы 4 группы: низкого, промежуточного-1, промежуточного-2 и высокого риска. Общая выживаемость больных (HR = 2.69, p < 0.001) и кумулятивная частота трансформации в ОМЛ (HR = 3.84, p < 0.001) значительно различались между указанными группами. Так если медиана ОБ больных с низким прогностическим вариантом не была достигнута,

то в других группах она составила 64, 37 и 18 месяцев соответственно. Кумулятивная частота прогрессии в ОМЛ в течение 48 месяцев была 0%, 3%, 21% и 48% соответственно.

Несмотря на столь обнадеживающие результаты, признается, что необходимо дальнейшее накопление клинических данных и результатов молекулярно-генетических исследований для последующего усовершенствования прогностических шкал.

Таблица 8

Мутационный статус генов и их прогностическое значение в шкале CPSS [8]

Баллы	Цитогенетические группы риска CPSS*	ASXL1	NRAS	RUNX1	SETBP1
0	Низкий	Мутация (-)	Мутация (-)	Мутация (-)	Мутация (-)
1	Промежуточный	Мутация (+)	Мутация (+)	-	Мутация (+)
2	Высокий	-	-	Мутация (+)	-
Группы риска	Баллы				
Низкий	0				
Промежуточный-1	1				
Промежуточный-2	2				
Высокий	≥3				

Примечания. * - цитогенетические группы риска. Низкий – нормальный кариотип или изолированная -Y. Промежуточный – другие. Высокий – трисомия 8 хромосомы, комплексный (≥3 аберраций), аберрации 7 хромосомы.

Таблица 9

Шкала CPSS-mol [8]

Баллы	Генетический вариант риска*	Бласты в КМ	Лейкоциты	Зависимость от трансфузий
0	Низкий	<5%	<13x10 ⁹ /л	Нет
1	Промежуточный-1	≥5%	≥13x10 ⁹ /л	Да
2	Промежуточный-2	-	-	-

3	Высокий	-	-	-
Вариант риска по шкале CPSS-mol	Баллы			
Низкий	0			
Промежуточный-1	1			
Промежуточный-2	2-3			
Высокий	≥4			

Примечания. * - генетический вариант риска см таблица 8.

Трансформация ХММОЛ в острый миелоидный лейкоз

Частота трансформации ХММОЛ в ОМЛ варьирует в диапазоне от 15% до 20%. Вероятность прогрессии ассоциирована с характером цитогенетических аномалий (вариант риска), количеством циркулирующих в ПК бластов и незрелых клеток, абсолютным числом моноцитов ($>10 \times 10^9/\text{л}$), мутациями генов ASXL1, RUNX1, NRAS, SETBP1, DNMT3A и NPM1. За исключением аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АллоТГСК) другие варианты терапевтического пособия, включая лечение по протоколам ОМЛ, дают крайне низкие показатели выживаемости больных ХММОЛ после бласттрансформации: менее 10% в течение 5 лет. Ухудшающими прогност факторами являются предшествующее

назначение гипометилирующих препаратов (ГМП), а также неэффективность проводимого лечения [9].

Оценка эффективности лечения больных ХММОЛ

Во многих работах при оценке эффективности лечения больных ХММОЛ используются критерии, предложенные для больных МДС, а именно рекомендации MDS International Working Group (IWG) 2000 и 2006 годов. В то же время, учитывая тот факт, что наряду с диспластическим вариантом выделяют еще и пролиферативный вариант ХММОЛ, представляется корректнее воспользоваться критериями, предложенными специально для больных смешанными (МДС/МПН) неоплазиями (табл.10) [10]. В свою очередь в таблице 11 представлены критерии, позволяющие констатировать прогрессию МДС/МПН.

Таблица 10

Критерии оценки эффективности лечения взрослых больных смешанными (МДС/МПН) неоплазиями [10]

Полная ремиссия (наличие всех критериев)*
Костный мозг: миелобласты $\leq 5\%$ (включая моноциты у больных ХММОЛ) с нормальным созреванием всех клеточных линий и нормализация клеточности*. Отсутствие остеомиелофиброза или допустим умеренный ретикулиновый фиброз (≤ 1 степень фиброза) †
Периферическая кровь:
Лейкоциты $\leq 10 \times 10^9/\text{л}$
Гемоглобин ≥ 110 г/л
Тромбоциты $\geq 100 \times 10^9/\text{л}$; $\leq 450 \times 10^9/\text{л}$
Нейтрофилы $\geq 1,0 \times 10^9/\text{л}$
Бласты 0%
Снижение предшественников нейтрофилов до $\leq 2\%$
Моноциты $\leq 1 \times 10^9/\text{л}$
Экстрamedулярные проявления: полное разрешение экстрамедулярных проявлений болезни, имевших место до начала терапии (кожные проявления, выпоты в серозные полости), включая пальпируемые гепато- и спленомегалию
Предполагаемые (возможные) варианты полных ремиссий с разрешением симптомов: ПР как описано выше и полное разрешение симптомов, ассоциированных с заболеванием, как предложено в шкале MPN-SAF TSS.
Персистирующие минимальные проявления дисплазии допустимы при субъективной оценке дисплазии
Полная цитогенетическая ремиссия
Отсутствие ранее обнаруживаемых хромосомных aberrаций (ассоциированные с МДС, миелопролиферативными неоплазиями или МДС/МПН) при классическом кариотипировании с анализом не менее 20 митозов или FISH исследовании §

ГЕМАТОЛОГИЯ: ВЧЕРА, СЕГОДНЯ, ЗАВТРА

Частичная ремиссия
Нормализация состава периферической крови и отсутствие гепатоспленомегалии при снижении количества бластных клеток (и их морфологических эквивалентов) на 50%, но сохраняющемся уровне более 5% за исключением случаев с $\leq 5\%$ костномозговых бластов в дебюте
Костномозговой ответ
Оптимальный костномозговой ответ: наличие всех костномозговых критериев, необходимых для констатации полной ремиссии без нормализации показателей периферической крови как указано выше.
Частичный костномозговой ответ: снижение костномозговых бластов (и их морфологических эквивалентов) на 50%, но сохраняющийся уровень $>5\%$ или снижение степени фиброза от исходного при двукратном исследовании КМ с интервалом не менее 2 месяцев
Клиническое улучшение
Необходимо соответствие одному из указанных критериев при отсутствии прогрессии или полного или частичного ответа, независимо от костномозгового ответа
Эритроцитарный ответ
Повышение гемоглобина на ≥ 20 г/л
Независимость от трансфузий в случае потребности в ≥ 4 дозах эритроцитов в течение предшествующих 8 недель
Только трансфузии, основанные на решении лечащего врача для коррекции гемоглобина ≤ 85 г/л, могут рассматриваться при оценке зависимости от трансфузий ¶
Тромбоцитарный ответ
Независимость от трансфузий при предшествующей потребности в трансфузиях не менее 4 доз тромбоконцентрата в течение предшествующих 8 недель
Количество тромбоцитов $\leq 20 \times 10^9$ /л до лечения: повышение от $< 20 \times 10^9$ /л до $> 20 \times 10^9$ /л и не менее чем на 100%
Количество тромбоцитов $> 20 \times 10^9$ /л, но $\leq 100 \times 10^9$ /л до лечения: абсолютное повышение на $\geq 30 \times 10^9$ /л ¶
Нейтрофильный ответ
Количество нейтрофилов $\leq 0,5 \times 10^9$ /л до лечения: повышение не менее чем на 100% и повышение абсолютного числа на $\geq 0,5 \times 10^9$ /л
Количество нейтрофилов $> 0,5 \times 10^9$ /л и $\leq 1,0 \times 10^9$ /л: повышение не менее чем на 50% и повышение абсолютного числа нейтрофилов на $\geq 0,5 \times 10^9$ /л ¶
Ответ селезенки
Или уменьшение селезенки не менее чем на 50% от исходного размера (10 см ниже реберной дуги), или селезенка не пальпируется если исходно выступала на 5 см
Клиническое улучшение
Улучшение симптомов в виде снижения на $\geq 50\%$ по шкале MPN-SAF TSS. Индекс < 20 признан непригодным для оценки клинического улучшения

Примечания.* Диспластические изменения, которые могут быть интерпретированы в рамках нормальных изменений, могут присутствовать при констатации полной ремиссии. Клеточность КМ должна соответствовать возрастным величинам. † При отсутствии исходного фиброза нет целесообразности выполнения повторной трепанобиопсии для оценки разрешения фиброза. Оценка фиброза выполняется согласно критериям European Consensus System. § Отсутствие цитогенетических аберраций (при классическом кариотипировании или методе FISH), указывающих на неблагоприятный прогноз, необходимо для констатации полной цитогенетической ремиссии. Снижение объема хромосомных аберраций на $\geq 50\%$ (при классическом кариотипировании или методе FISH) расценивается как частичный цитогенетический ответ. ¶ Нормализация показателей ПК должна персистировать при выполнении не менее 2-х исследований с интервалом не менее 8 недель. В случае пролиферативного МДС/МПН полная ремиссия должна включать разрешение тромбоцитоза до нормальных показателей ($150-450 \times 10^9$ /л) и лейкоцитоза до $\leq 10 \times 10^9$ /л, но $\geq 1,5 \times 10^9$ /л. Гемоглобин должен поддерживаться на уровне > 110 г/л и тромбоциты $\geq 100 \times 10^9$ /л без поддержки трансфузий. Клиническое улучшение может иметь место, когда эти изменения происходят при отсутствии других изменений, необходимых для констатации полной ремиссии или костномозгового ответа. Независимость от трансфузий донорских эритроцитов и тромбоконцентрата следует учитывать при клиническом улучшении. Снижение содержания миелоидных предшественников (промиелоцитов, миелоцитов, метамиелоцитов, ядерных эритроидных клеток) до менее чем заметных показателей ($\leq 2-3\%$) и/или 1×10^9 /л при отсутствии инфекций, лечении цитокинами и других реактивных состояниях.

Критерии прогрессирования МДС/МПН [10]

Комбинация 2 больших критериев, 1 большого и 2 малых критерия или 3 малых критерия
Большие критерии
Повышение числа бластных клеток *
<5% бластов: увеличение на $\geq 50\%$ и до $> 5\%$
5–10% бластов: увеличение на $\geq 50\%$ и до $> 10\%$
10–20% бластов: увеличение на $\geq 50\%$ и до $> 200\%$
20–30% бластов: увеличение на $\geq 50\%$ и до $> 30\%$ †
Признаки цитогенетической эволюции ‡
Появление ранее обнаруживаемых или новых цитогенетических поломок методом FISH или классическим кариотипированием в случае полной цитогенетической ремиссии
Увеличение объема цитогенетических поломок на $\geq 50\%$ методом FISH или стандартным кариотипированием в случае частичной цитогенетической ремиссии
Новые экстрамедуллярные очаги
Увеличение размеров селезенки
Прогрессирование спленомегалии согласно рекомендациям IWG-MRT: появление ранее отсутствующей спленомегалии, пальпируемой на > 5 см ниже реберной дуги, или увеличение минимум на 100% ранее пальпируемой селезенки, выступающей на 5-10 см, или увеличение минимум на 50% ранее пальпируемой селезенки, выступающей на > 10 см
Экстрамедуллярные очаги вне селезенки
Включая появление или дальнейшее увеличение размеров печени, гранулоцитарная саркома, поражения кожи и т.д.
Малые критерии
Зависимость от трансфузий §
Значительное снижение показателей периферической крови: снижение на $\geq 50\%$ от максимального уровня гранулоцитов и тромбоцитов при констатации ремиссии
Снижение уровня гемоглобина на ≥ 15 г/л от наилучшего ответа или от исходного уровня
Ухудшение симптомов на $\geq 50\%$ по шкале MPN-SAF TSS
Признаки клональной (молекулярной) эволюции ¶

¶ **Примечания.** * Количество бластов в костномозговом пунктате. † Больные с трансформацией МДС/МПН в острый лейкоз. ‡ Увеличение объема цитогенетических поломок на $\geq 50\%$ (методом FISH или классическим кариотипированием). § Зависимость от трансфузий – указание на трансфузии не менее 2 доз донорских эритроцитов за последний месяц при гемоглобине < 85 г/л, не обусловленного явным кровотечением. Цитопения вследствие проведенной терапии не должна рассматриваться как прогрессия. ¶ Идентификация новых аберраций при использовании метода полиморфизма одиночного нуклеотида или секвенирования, или увеличение аллельной нагрузки ранее детектированной мутации.

Лечение

Выбор лечебной тактики зависит от нескольких факторов, включая возраст и соматический статус больного, прогностический вариант, наличие донора(-ов) гемопоэтических стволовых клеток. Немаловажным является и предпочтения больного.

При наличии умеренной цитопении или признаков пролиферации, которые не оказывают негативного влияния на повседневный образ жизни, вполне можно обойтись тактикой «наблюдай и жди». Отчасти это обусловлено отсутствием количественных значений форменных элементов крови, дальнейшее снижение которых могло бы быть

основанием, например, для инициации трансфузионной терапии. При оценке признаков пролиферации основанием для начала лечения обычно служит симптоматическая спленомегалия и/или наличие экстрамедуллярных очагов, включая поражение кожи. Вопрос о специфической терапии целесообразно обсудить также при констатации выраженных конституциональных симптомов.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток рассматривается на данный момент как единственная лечебная опция, которая сопряжена с вероятностью выздоровления больных ХММoЛ. Вопрос о целесообразности выполнения

АллоТГСК должен решаться на основании анализа общесоматического статуса больного и состояния болезни. Это позволяет спрогнозировать риски возможных осложнений, выбрать режим предтрансплантационной подготовки (режим кондиционирования) соответствующей интенсивности и определить тактику посттрансплантационной терапии.

Частота ответа на АллоТГСК в разных исследованиях варьирует от 17% до 50%, смертность – от 12% до 52%, 10-летняя выживаемость составляет 40%. Старший возраст, высокий индекс коморбидности и неблагоприятные хромосомные aberrации ассоциированы с худшими результатами: высокой смертностью и низкой беспрогрессивной выживаемостью (БПВ). В то же время улучшение ОВ более характерно для больных с высоким CPSS риском [11].

Желательным условием проведения АллоТГСК является максимальное снижение объема опухолевых клеток, что ассоциировано с уменьшением риска рецидива заболевания и улучшением БПВ. В качестве предтрансплантационной подготовки может быть выбрана стандартная индукционная химиотерапия или назначены ГМП, в частности 5-азациитидин. Выбор одного из двух возможных индукционных режимов должен проводиться с учетом объема лейкозной массы, соматического статуса больного. Так ГМП представляются более приемлемыми для больных с отягощенной коморбидностью, мутацией гена TET2 и диким типом гена AXSL1 или на время поиска потенциально донора в качестве “bridge therapy”. Не исключено, что применение ГМП в индукционном периоде может снизить частоту посттрансплантационных рецидивов, не оказывая при этом негативного влияния на частоту летальных исходов, связанных с проведением трансплантации.

Несмотря на то, что вопрос об оптимальных сроках проведения АллоТГСК у больных ХММОЛ остается открытым, предполагается, что выполнение трансплантации в более раннем периоде сопровождается лучшими результатами. Porphali P. с соавт. [12] по результатам ретроспективного анализа данных 70 больных ХММОЛ с медианой возраста 58 (18–73) лет на момент диагностики заболевания продемонстрировали значимое улучшение выживаемости в случае выполнения трансплантации в хронической фазе. Так если медиана ОВ больных хронической фазой ХММОЛ была 70 месяцев, то больных, у которых АллоТГСК была проведена в период трансформации в ОМЛ – 32 месяца; $p=0,001$. 5-летняя ОВ и БПВ в посттрансплантационном периоде в группах составила 51% и 19% соответственно и 47% и 12% соответственно. Основной причиной смерти больных с бластным кризом была прогрессия заболевания. Показатели посттрансплантационной выживаемости больных хронической фазой ХММОЛ зависели, прежде всего, от прогностического варианта и наихудшими были у

больных высокого CPSS риска.

Преимущественным источником гемопоэтических стволовых клеток для выполнения АллоТГСК рассматривается ПК, что приводит к укорочению периода приживления трансплантата и меньшей частоте посттрансплантационных рецидивов по причине заготовки большого числа Т-клеток. В то же время это приводит к увеличению частоты случаев хронической реакции трансплантат против хозяина (РТПХ) по сравнению с трансплантацией клеток КМ. Костный мозг как источник гемопоэтических стволовых клеток в совокупности с неблагоприятным вариантом прогноза по шкале CPSS и низкий общий статус по шкале Карновского рассматриваются как негативные предикторы ОВ больных ХММОЛ после АллоТГСК.

Больным с сохраненным соматическим статусом чаще проводят миелоаблативные режимы кондиционирования, основу которых составляет бусульфан или тотальное облучение тела. Применение режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью позволило значимо увеличить список больных, которым выполняется АллоТГСК, за счет лиц старшего возраста с отсутствием и/или минимальной коморбидностью. В то же время надо помнить, что снижение интенсивности режима кондиционирования может быть сопряжено с высоким риском прогрессирования заболевания по причине недостаточного подавления клеток патологического клона.

Тенденция постоянного увеличения числа выполняемых трансплантаций от гаплоидентичных доноров коснулась и больных ХММОЛ. Так в ретроспективном исследовании, выполненном в Пекинском университете, сообщается о 19 больных ХММОЛ, которым трансплантация была выполнена в соответствии с так называемым Пекинским протоколом. За период наблюдения от 448 до 2738 дней 3-хлетняя ОВ и безлейкозная выживаемость (БЛВ) составили $64\pm 12\%$ и $57\pm 12\%$ соответственно. Причина смерти 5 из 7 больных была расценена как следствие выполнения трансплантации: церебральное кровоизлияние (2 больных), инфекция (2 больных) и облитерирующий бронхолит (1 больной). Расчетная кумулятивная частота смертности от выполнения ТГСК в первые 100 дней, за 1, 2 и 3 года была $10,5\pm 1,0\%$, $15,8\pm 1,5\%$, $21,1\pm 1,8\%$ и $27,3\pm 2,3\%$ соответственно [13].

Одним из способов снижения токсичности предтрансплантационной подготовки и одновременного сохранения миелосупрессивной активности рассматривается включение ГМП в состав режима кондиционирования. Сао Y. с соавт. [14] перед инфузией гемопоэтических стволовых клеток, заготовленных от доноров разной степени родственности и HLA-совместимости, 44 больным МДС и 4 больным ХММОЛ проводили миелоаблативный курс, который включал: децитабин 20 мг/м^2 с -9 по

-5 дни, флударабин 30 мг/м² с -6 по -4 дни, бусульфид 3,2 мг/кг с -9 по -7 дни, циклофосфан 40 мг/кг с -3 по -2 дни и цитарабин 2 г/м² с -9 по -7 дни. Доза химиопрепаратов, кроме децитабина, рассчитывалась на идеальные физические показатели больного. Если донор был неродственным или несовместимым дополнительно назначали кроличий антитимоцитарный глобулин 2,5 мг/кг/день с -5 по -2 дни. С целью профилактики РТПХ больные получали такролимус 0,03 мг/кг с -5 дня и метотрексат 15 мг/м² в день +1 и 10 мг/м² в дни +3, +6 и +11. Для профилактики цитомегаловирусной инфекции и *Pneumocystis carinii* назначались ганцикловир в низких дозах и ко-тримоксазол перед началом режима кондиционирования и ацикловир после завершения режима кондиционирования. Приживление нейтрофилов было констатировано у 47 (98%) больных в сроки от 10 до 22 дней (медиана 12 дней) и тромбоцитов у 46 (96%) больных в сроки от 11 до 227 дней (медиана 14 дней). За исключением одного больного, умершего в ранние сроки после ТГСК, донорский химеризм был зарегистрирован у всех больных на 12–287 день (медиана 14 день). При медиане наблюдения в 522 (15–1313) дня показатели ОБ и БРВ составили 86% и 77% соответственно. Число умерших от осложнений, связанных с проведением трансплантации, было 5 и, тем самым, смертность вне рецидива составила 12%.

Причинами смерти были инфекции (2 больных) и РТПХ (3 больных). Авторы не обнаружили влияния мутаций генов U2AF1, ASXL1 и WT1 на показатели выживаемости. Сделано заключение о том, что добавление децитабина в состав миелоаблативного режима кондиционирования при приемлемом профиле токсичности может быть эффективным у больных с прогностически неблагоприятными мутациями.

Спрогнозировать течение посттрансплантационного периода представляется возможным при помощи недавно предложенной шкалы, которая основана на результатах изучения мутационного статуса генов ASXL1 и/или NRAS, подсчета процентного содержания бластных клеток в КМ и пролонгированной оценки индекса коморбидности [15]. По сумме баллов, присвоенных каждому из описанных показателей, удается стратифицировать больных на 5 групп, различающихся по показателям 5-летней ОБ и смертности вне рецидива (табл.12). Несмотря на ряд недостатков, в частности, отсутствие анализа интенсивности режима кондиционирования и расчета показателей других, нежели общая, видов выживаемости, данная шкала может способствовать модификации отдельных этапов выполнения АллоТГСК у конкретного, отдельно взятого, больного ХММОЛ и, тем самым, снизить вероятность развития нежелательных осложнений.

Таблица 12

Шкала прогнозирования выживаемости больных ХММОЛ при проведении АллоТГСК [15]

Показатели	Баллы	Группы риска, сумма баллов	5-л ОБ	5-л смертность вне рецидива
Индекс коморбидности*	1	0–1	81%	5%
Бласты в костном мозге ≥2%	4	2–4	49%	22%
		5–7	43%	31%
Мутация гена ASXL1 и/или гена NRAS	4	8–10	31%	46%
		>10	19%	51%

Примечание. * По шкале НСТ [16]. Увеличение индекса коморбидности на каждую единицу сопровождается увеличением числа баллов, присваиваемых данному показателю, на 1.

Наряду с мутационным статусом генов, указанных в вышеприведенной шкале, вероятность рецидива ассоциирована с мутационным статусом и других генов. Тем не менее в ряде исследований было продемонстрировано значение не столько поврежденных отдельных генов, сколько негативное влияние числа мутированных генов. Так при мутациях в 4 и более генах, регулирующих эпигенетические процессы, риск рецидивирования значительно возрастает.

Индукционная терапия преследует цель снижения объема бластных клеток в КМ с достижением полной ремиссии (ПР). Важно помнить, что ХММОЛ относится к миелоидным неоплазиям с минималь-

ной вероятностью излечения при проведении только химиотерапии, несмотря на вероятность достижения ПР у 40% больных. Ремиссии обычно короткие и проведение высокодозных курсов не снижает вероятность прогрессирования. Тем менее интенсивная химиотерапия оправдана при подготовке к АллоТГСК (bridge therapy), так как позволяет значимо редуцировать число бластных клеток. Проведение интенсивной химиотерапии оправдано также и при затруднительном разграничении ХММОЛ-2 от острого миелоцитарного лейкоза (M4 вариант по FAB классификации).

Широкое распространение в лечении больных ХММОЛ получили ГМП: 5-азациитидин и децитабин.

Частота достижения общего ответа и ПР составляют приблизительно 50% и 25% соответственно, а медиана ОВ не превышает 20 месяцев. Предполагается меньшая эффективность ГМП при пролиферативных вариантах. Тем не менее, назначение ГМП больным пролиферативным вариантом сопровождается лучшими показателями выживаемости, нежели при приеме гидроксимочевины. Применение 5-азацитидина и децитабина сопровождается снижением числа лейкоцитов, уменьшением размеров селезенки, разрешением кожных поражений. Лечение характеризуется приемлемым профилем токсичности: гематологические осложнения 3–4 степени констатируются не более чем у 15–50% больных, инфекционные – у 15% больных. Целесообразность назначения ГМП на период подготовки к АллоТГСК – окончательно нерешенный вопрос.

К молекулярно-генетическим маркерам эффективности ГМП можно отнести мутационный статус гена TET2: мутация гена TET2 в совокупности с диким геном ASXL1 ассоциирована с большей частотой ПР и общего ответа и незначительным улучшением выживаемости. Напротив, низкая выживаемость констатирована у больных с мутациями генов RUNX1 и CBL. Отсутствие или потеря ответа на ГМП в большинстве случаев сопряжена с трансформацией в ОМЛ и наихудшим прогнозом: медиана выживаемости не превышает 7 месяцев. Вероятность улучшения ответа и выживаемости при смене одного ГМП на другой сомнительна.

Фактором, ассоциированным с вероятностью достижения ответа, может рассматриваться уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке крови: менее 250 Ед/л. Высокий уровень гемоглобина (≥ 80 г/л) ассоциирован с улучшением ОВ, а в совокупности с абсолютным числом моноцитов менее 3×10^9 /л – с улучшением БПВ.

По данным ретроспективного анализа результатов лечения 151 больного ХММол, которые получали 5-азацитидин или децитабин в монорежиме или в комбинации с другими препаратами в MD Anderson Cancer Center, частота общего ответа после 1–24 курсов (медиана 3 курса) составила 75%, включая ПР в 41% случаев. Стабилизация заболевания была верифицирована у 15% больных и прогрессия во время лечения у 10%. Вероятность достижения одного из вариантов ответа была ассоциирована только с вариантом ХММол по классификации ВОЗ. Медиана ОВ, БЛВ и бессобытийной выживаемости была 24, 39 и 14 месяцев соответственно. Достижение одного из вариантов ответа было сопряжено с улучшением ОВ: 25 месяцев и 13 месяцев при неэффективности; $p=0,001$. По результатам многовариантного анализа факторами, влияющими на показатели ОВ, были возраст более 75 лет, низкий уровень гемоглобина, бластемия и неблагоприятный прогностический вариант. Достижение цитогенетического ответа в случае обнаружения хро-

мосомных aberrаций не оказывало влияния на ОВ. Полученные данные позволили авторам сделать заключение о целесообразности поиска новых лечебных опций для больных ХММол [17].

Терапией выбора для большинства больных ХММол со значительным лейкоцитозом или органомегалией остается химиотерапия низкой интенсивности и, прежде всего, назначение гидроксимочевины. Ранее был продемонстрирован несомненный приоритет гидроксимочевины, назначаемой в суточной дозе 1 грамм, над этопозидом, назначаемого по 150 мг в неделю внутрь: медиана ОВ составила 20 и 9 месяцев соответственно.

Назначение гидроксимочевины должно быть взвешенным и основанным на сопоставлении, с одной стороны, вероятного улучшения показателей крови, а с другой – возможного ухудшения в виде значимого снижения количества лейкоцитов. Доза гидроксимочевины должна модифицироваться или препарат следует отменить при усилении потребности в компонентах крови.

Рандомизированных исследований, оценивающих эффективность эритропоэстимулирующих препаратов у больных ХММол, нет. Не исключено, что по аналогии с МДС эффективность эритропоэстимулирующих препаратов наиболее вероятна у больных с прогностически благоприятными вариантами ХММол и низким уровнем эндогенного эритропоэтина.

Преимущественным способом коррекции анемии являются трансфузии донорских эритроцитов, которые регулярно получают около 60% больных ХММол. При обосновании необходимости трансфузионной терапии следует учитывать, что в ряде случаев конституциональные симптомы, аналогичные тем, которые встречаются у больных ХМПН, могут проявляться в виде слабости и недомогания при отсутствии анемии. Следует также помнить о секвестрации значительного объема эритроцитов в увеличенной селезенке, что приводит к повышению частоты трансфузий, а также о возможном снижении показателей крови при циторедуктивной терапии.

Несмотря на отсутствие исследований по изучению частоты накопления избыточного, посттрансфузионного, железа в организме больных ХММол, тактика введения больных с большим числом трансфузий донорских эритроцитов идентична той, которая применяется у больных МДС: хелаторная терапия показана в случае переливаний более 20 доз донорских эритроцитов и/или уровне сывороточного ферритина более 1000 нг/мл.

Коррекция тромбоцитопении агонистами рецепторов тромбопоэтина не рекомендована по причине отсутствия соответствующих клинических исследований. При необходимости возможны короткие курсы кортикостероидов.

В последнем разделе лекции вниманию чита-

телей предлагаются результаты исследований, которые в декабре 2020 года были представлены на 62 ежегодной конференции American Society Hematology.

Согласно базе данных SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results), в которой за период с 2004 по 2015 г было зарегистрировано 4437 больных ХММОЛ, медиана их возраста на момент диагностики заболевания была 76 лет. Мужчин было 63%. Частота заболеваемости составила 1 случай на 1 000 000 населения. При медиане наблюдения 5,8 лет медиана ОВ составила 1,3 года [95%CI: 1,3–1,4]. Умерло 3635 больных (82%), включая 2016 (55%) от причин, связанных непосредственно с ХММОЛ. Трансформация в ОМЛ имела место у 229 (5,2%) больных с медианой времени до прогрессии 1,2 года.

Согласно базе данных National Cancer Database (NCDB) период времени, в течение которого был диагностирован ХММОЛ, коррелировал с улучшением выживаемости. Так если однолетняя ОВ была 53% в 2004–2007 гг., то 56% в 2008–2011 гг. и 60% в 2012–2015 гг. В первой линии терапии АллоТГСК была выполнена 4%. Одно-, 5 и 10-летняя ОВ была 57%, 18% и 4% у больных, которые не получали химиотерапию, 56%, 14% и 7% у больных, получивших химиотерапию, и 79%, 44% и 38% у больных, которым была выполнена АллоТГСК. К факторам, наличие которых сопровождалось значимым снижением ОВ, относились не только возраст 65 лет и старше, но, в частности, отсутствие государственной страховки и лечение вне академических центров.

При сравнительном анализе результатов обследования 30 больных олигомоцитарным ХММОЛ и 271 больного классическим ХММОЛ не удалось выявить разницу в частоте обнаружения мутаций в генах ASXL1, SRSF2, TET2 и RUNX1. Вместе с тем, несмотря на отсутствие значимых различий, мутации генов сигнального пути RAS (NRAS, KRAS, CBL, NF1, SETBP1, RPTN11) чаще выявлялись у больных классическим вариантом: 51,4% vs 20,0%; $p=0,053$.

Несомненный интерес представляют окончательные результаты многоцентрового исследования второй фазы по изучению эффективности элтромбопага у больных ХММОЛ с тяжелой тромбоцитопенией (NCT02323178). Критериями включения были: отсутствие предшествующей терапии, тромбоциты менее $50 \times 10^9/\text{л}$, blasts в КМ $\leq 5\%$, размеры селезенки менее 16 см, низкий или промежуточный-1 вариант прогноза по шкале IPSS (диспластический вариант) и отсутствие или наличие не более 1 отягощающего показателя у больных пролиферативным вариантом (гемоглобин менее 100 г/л, абсолютное число нейтрофилов более $16 \times 10^9/\text{л}$, хромосомные поломки, экстрамедуллярные очаги). Элтромбопаг назначался по 100 мг в день с эскалацией дозы до 300 мг в день в течение не менее 12 недель. При достижении ответа лече-

ние продолжалось до прогрессии, потери ответа или развития токсичности. Прием препарата (в течение 12 недель медиана суточной дозы составила 150 мг) сопровождался тромбоцитарным ответом у 14 (46,7%) из 30 больных, развитие которого не зависело от трансфузионного статуса. Ответа не было ни у одного из 5 больных с мутацией гена RNF6. Медиана длительности ответа была 3,4 месяца [95%CI: 1,7–11,6 месяца]. Причинами отмены терапии были снижение тромбоцитов (11 больных), потребность в трансфузиях (5 больных) и прогрессия заболевания (3 больных). За 12 недель эпизоды кровоточивости имели место у 38% больных без ответа и 29% больных с ответом. В качестве возможной причины смерти прием элтромбопага не был зарегистрирован ни в одном случае. Кумулятивная частота прогрессии в ОМЛ за 12 месяцев составила 7% [95%CI: 1–21%], в то время как в группе больных с такими же проявлениями заболевания, но не принимавших элтромбопага – 10% [95%CI: 0–23%]. Не удалось выявить предикторов лейкозной трансформации. Двухлетняя ОВ и БПВ были 47% и 28% соответственно. Сделано заключение о том, что лечение элтромбопагом – безопасная и эффективная лечебная опция, не увеличивающая риск трансформации в ОМЛ, но с короткой длительностью ответа. Это позволило авторам рекомендовать прием элтромбопага в случае подготовки больных к оперативному вмешательству.

Значительное число сообщений посвящено изучению эффективности ГМП в лечении больных ХММОЛ, в том числе и низкого риска. Так в исследовании 2-ой фазы 113 больных МДС и ХММОЛ низкого и промежуточного-1 риска по шкале IPSS получали курсы с ежедневным введением децитабина по 20 мг/м² или 5-азациитидина по 75 мг/м² в течение трех последовательных дней. Длительность курса – 28 дней. Медиана времени наблюдения 59 месяцев. Общий ответ был констатирован у 67% больных из группы децитабина и 48% больных из группы 5-азациитидина; $p=0,042$. Из 59 больных, нуждавшихся в регулярных переливаниях компонентов крови, независимость от трансфузий была достигнута у 19 (32%). Медиана ОВ была 30 и 37 месяцев при назначении 5-азациитидина и децитабина соответственно; $p=0,625$ и показатели 5-летней ОВ были 32% и 33% соответственно. По результатам многофакторного анализа предикторами ОВ были вторичная природа заболевания, зависимость от трансфузий, мутации генов DNMT3A, TP53, U2AF1 и полный ответ на ГМП. При этом вид препарата, 5-азациитидин или децитабин, значения не имел. При сравнении с историческим контролем выявлено значимое улучшение выживаемости больных. Авторы делают вывод о терапевтическом потенциале низких доз ГМП в лечении больных МДС низкого риска с уменьшением трансфузионной зависимости и улучшением выживаемости.

Результаты ретроспективного анализа данных 165 больных, из которых 74% имели промежуточный-2 или высокий вариант по шкале CPSS, подтвердили эффективность ГМП в лечении больных ХММОЛ неблагоприятного прогноза. Общий ответ и ПР при назначении 5-азациитидина, децитабина или гуадецитабина в монорежиме были констатированы у 60% и 34% больных соответственно, при комбинации с другими препаратами – у 65% и 22% больных соответственно. Медиана ОВ была значительно выше у больных низкого и промежуточного-1 риска по сравнению с больными неблагоприятными вариантами: 50,2 против 25,5 месяцев соответственно; $p=0,003$. Показатели БПВ были значительно выше у больных диспластическим вариантом нежели пролиферативным: 31,4 и 19 месяцев соответственно; $p=0,005$. По заключению авторов эффективность ГМП у больных ХММОЛ не зависит от морфологического и прогностического варианта.

В одном из сообщений сделано заключение, что несмотря на эффективность, назначение ГМП не предупреждает риск прогрессии ХММОЛ в ОМЛ и не улучшает показатели ОВ. В другом сообщается, что на фоне терапии ГМП возможны новые повреждения в генах сплайсинга. Тем самым, несомненный интерес представляют результаты обследования и лечения больных ХММОЛ, потерпевших неудачу на терапии ГМП. По данным одновариантного анализа предикторами первичной и вторичной неудачи следует рассматривать мутации гена ASXL1 ($p=0,016$) и гена SRSF2 ($p=0,084$), а также пролиферативный вариант заболевания ($p=0,065$). Напротив, мутации гена IDH1 ассоциировались с высокой вероятностью трансформации в бластный криз, частота которой составила 14%.

Частота общего ответа на последующую после неудачи терапию составила 16%. Из 6 больных, кому была выполнена АллоТГСК, умер только один больной, причиной смерти которого была инфекция. Снижение ОВ было ассоциировано с приобретением новых хромосомных aberrаций, мужским полом, анемией и мутациями генов RUNX1 и TP53.

Вышеизложенные находки оправдывают поиск новых терапевтических опций, включая назначение лекарственных препаратов и схем, применяемых для лечения больных ОМЛ. Речь, прежде всего, идет о совместном назначении 5-азациитидина с венетоклаксом, чему посвящено 3 сообщения. Так в одном из них приводятся данные нерандомизированного исследования I/II фазы в котором комбинированная терапия назначалась ранее нелеченным больным МДС и ХММОЛ высокого риска, и больным с неудачей на ГМП. 5-азациитидин в дозе 75 мг/м^2 вводился в вену или подкожно в 1–5 дни каждого цикла. Венетоклакс назначался по 100, 200 или 400 мг в 1–7 или 1–14 дни каждого цикла. Первичной целью исследования было определение максимально переносимой дозы и дозолимитиру-

ющей токсичности венетоклакса в комбинации с 5-азациитидином, а также частоты общего ответа, включая полную, костномозговую, частичную ремиссию и гематологическое улучшение длительностью ≥ 4 недель. Частота общего ответа достигла показателя 100% (во всех случаях костномозговая ремиссия) у ранее нелеченных больных и 75% у больных с неудачей ГМП. Медиана ОВ не была достигнута, БПВ составила 4,6 месяцев. Несмотря на обнадеживающие результаты, небольшое число включенных в исследование больных и короткий срок наблюдения не дают основания для окончательного заключения.

Авторы другого, ретроспективного, исследования обращают внимание на одинаковую эффективность комбинированной терапии больных ХММОЛ и вторичного ОМЛ из предшествующего ХММОЛ. Одновременно подчеркивается непродолжительность ответа в случае отсутствия последующей консолидирующей терапии. Сделан акцент на факт негативного влияния мутаций генов сигнального пути RAS на вероятность достижения ответа, в то время как мутации гена NPM1 ассоциированы с вероятностью ответа на лечение, мутации гена RUNX1 – с высокой частотой общего ответа. Практически важным является замечание авторов о высокой частоте инфекционных осложнений по причине нейтропении, что требует корректного подбора дозы венетоклакса.

Другими лекарственными препаратами, активность которых изучается у больных ХММОЛ, являются липосомальная форма комбинации цитарабина с даунорубицином (CPX-351), певонедистат (селективный ингибитор Nedd8-активирующего фермента), гуадецитабин (гипометилирующий препарат следующего поколения, SGI-110), децитабин 35 мг в комбинации с цедазуридином (ингибитор цитидиндеаминазы) 100 мг для приема внутрь (ASTX727).

Результаты, посвященные роли АллоТГСК в лечении больных ХММОЛ, свидетельствуют об улучшении ОВ и БРВ, а также снижении кумулятивной частоты рецидивов при использовании в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток полностью совместимого (10/10) неродственного донора. Ретроспективный анализ результатов гаплоидентичной АллоТГСК подтвердил эффективность включения циклофосфана, назначаемого в посттрансплантационном периоде, для профилактики РТПХ. Вместе с тем высокая кумулятивная частота рецидивов (43%) при немиелоаблативном режиме кондиционирования является основанием сделать авторами акцент на модификации стратегии лечения больных в посттрансплантационном периоде.

Заключение.

Хронический миеломоноцитарный лейкоз – клональная миелоидная неоплазия, характеризую-

щаяся уникальным клинико-гематологическим фенотипом в виде сочетания признаков дисплазии и миелопролиферации, которое не соответствует ни одному из известных самостоятельных вариантов МДС и ХМПН. Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют об этапном сценарии развития ХММОЛ, когда в результате клональной эволюции и усугубления степени поражения клеток гемопоэтической ниша происходит трансформация префаза, представленной в виде CNIP или CMUS, в клинически проявляющуюся форму заболевания. Алгоритм терапии больных ХММОЛ предполагает решение вопроса о целесообразности инициации лечения и, при необходимости, выборе интенсивности лечебного пособия, а также, если оправданно, определении показаний и сроков выполнения АллоТГСК. Вместе с тем следует признать, что многие вопросы остаются нерешенными, включая своевременную диагностику и корректное определение прогностического варианта. Неудовлетворительными остаются и результаты лечения больных ХММОЛ по причине ограниченного списка зарегистрированных лекарственных препаратов. Предполагается, что дальнейшее накопление данных, полученных с использованием современных

молекулярно-генетических методов исследования и в результате проведения проспективных рандомизированных клинических исследования, будет способствовать расширению знаний о патобиологических механизмах возникновения и развития ХММОЛ и обеспечит значимое улучшение выживаемости больных с данным вариантом смешанных миелоидных неоплазий.

Конфликты интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Источник финансирования

Исследование не имело источника финансирования

Вклад авторов

Концепция и дизайн: *все авторы*

Сбор и обработка данных: *все авторы*

Представление материалов исследования: *все авторы*

Анализ и интерпретация: *все авторы*

Подготовка рукописи: *все авторы*

Окончательное одобрение рукописи: *Грицаев С. В.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bennett J, Catovsky D, Daniel M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes // Br. J. Haematol. – 1982. – 51(2). – 189-199.
2. Vardiman J, Harris N, Brunning R. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms // Blood. – 2002. – 100(7). – 2292-2302.
3. Arber D, Orazi A, Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // Blood. – 2016. – 127(20). – 2391-2405.
4. Patnaik M, Tefferi A. Chronic myelomonocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and management // Am. J. Hematol. – 2020. – 95(1). – 97-115.
5. Valent P, Orazi A, Savona M. et al. Proposed diagnostic criteria for classical chronic myelomonocytic leukemia (CMML), CMML variants and pre-CMML conditions // Haematologica. – 2019. – 104(10). – 1935-1949.
6. Wudhikarn K, Loghavi S, Mangaonkar A. et al. SF3B1-mutant CMML defines a predominantly dysplastic CMML subtype with a superior acute leukemia-free survival // Blood. Adv. – 2020. – 4(22). – 5716-21.
7. Smith B, Savona M, Komrokji R. Challenges in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) // Clin. Lymphoma. Myeloma. Leuk. – 2019. – 19(1). – 1-8.
8. Shiara E, Galli A, Such E. et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia // Blood. – 2016. – 128(10). – 1408-1417.
9. Itzykson R, Fenaux P, Bowen D. et al. Diagnosis and treatment of chronic myelomonocytic leukemias in adults. Recommendations from the European Hematology Association and the European LeukemiaNet // Hemasphere. – 2018. – 29(6). – e150.
10. Savona M.R., Malcovati L., Komrokj R. et al. An international consortium proposal of uniform response criteria for myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN) in adults // Blood. – 2015. – 125(12). – 1857-1865.
11. Gagelmann N., Bogdanov R., Stolzel F. et al. Long-term survival benefit after allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia // Transplant. Cell. Ther. – 2021. – 27(1). – :95.e1-95.e4.
12. Pophali P, Matin A, Mangaonkar A. et al. Prognostic impact and timing considerations for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in chronic myelomonocytic leukemia // Blood. Cancer. J. – 2020. – 10(11). – 121.
13. Sun Y, Zhao C, Wang Y. et al. Haploidentical stem cell transplantation in patients with chronic myelomonocytic leukemia // Sci. China Life Sci 2020;63:1261-4.
14. Cao Y, He Y, Zhang C. et al. Conditioning regimen of 5-day decitabine administration for allogeneic stem cell transplantation in patients with myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms // Biol. Blood. Marrow. Transplant. – 2020. – 26(2). – 285-91.
15. Gagelmann N, Badbaran A, Beelen D. et al. A prognostic score including mutation profile and clinical features for patients with CMML undergoing stem cell transplantation // Blood. Adv. – 2021. – 5(6). – 1760-9.
16. Sorrow M, Maris M, Storb R. et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT // Blood. – 2005. – 106(8). – 2912-19.
17. Alfonso A., Montalban-Bravo G., Takahashi K. et al. Natural history of chronic myelomonocytic leukemia treated with hypomethylating agents // Am. J. Hematol. – 2017. –

**VI ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«ГЕНЕТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ –
ОТ ДИАГНОСТИКИ К ТЕРАПИИ»**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
28–29 МАЯ 2021 Г.**

Г.Ж. Абылдинова, Ж.М. Жабакова, А.В. Боровикова

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНА BCR-ABL
В КАЗАХСТАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ СРЕДИ БОЛЬНЫХ ХМЛ**

*Республиканское государственное предприятие «Больница Медицинского центра управления делами
Президента Республики Казахстан», г. Нур-Султан*

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) - клональное миелопролиферативное заболевание, в основе которого лежит поражение плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки. Ключевое значение в патогенезе ХМЛ имеет химерный ген BCR-ABL, образованный в результате реципрокной хромосомной транслокации между геном ABL на хромосоме 9 и геном BCR на хромосоме 22. Своевременная диагностика и обнаружение различных вариантов химерного транскрипта важна для прогноза, контроля таргетного лечения, достижения большого молекулярного ответа и своевременного обнаружения рецидива после лечения.

Немаловажное значение имеет, что различные типы перестройки гена BCR-ABL связаны с различным клиническим течением и прогнозом. Кроме того, частота ХМЛ и распространенность транскриптов гена BCR-ABL отличаются в разных этнических группах.

Цель. Определение частоты встречаемости транскриптов химерного гена BCR-ABL у пациентов с ХМЛ в Казахстане.

Материалы и методы. Для количественного учета экспрессии гена BCR-ABL использовали метод обратной транскриптазной полимеразной цепной реакции (RT-PCR). В местах сбора биологического материала пациенты заполняли информированное согласие. Образцы крови были направлены в медицинскую организацию из различных гематологических центров страны. Пациенты имели хроническую фазу ХМЛ, критерии включения в исследование: наличие реципрокной транслокации t(9;22)q(34;q11) в дебюте. Возрастной диапазон пациентов и средний возраст (\pm SD) составляли от 21 до 77 лет и $45,89 \pm 15,60$ года соответственно. РНК выделяли из стабилизированной крови набором GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit, обратная транскрипция проводилась с использованием набора High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Termo Fisher), согласно рекомендациям производителя. Для детекции и количественного учета транскриптов гена BCR-ABL проводили RT-ПЦР. ABL ген использовали как контрольный ген. Детекцию продуктов (все типы транскриптов) осуществляли с помощью ПЦР-RT QuantStudio 12 Flex (Applied biosystem). Метод не стандартизирован по международной шкале (IS), результаты анализа уровня экспрессии представляли в процентах. Расчет процентного соотношения проводился с использованием формулы $\Delta\Delta Ct$.

Результаты. Анализ полученных результатов показал, что в исследуемой группе в 49% случаев обнаружено по одному транскрипту: b2a2, b3a2 и e1a2 с частотой 44,7%, 2,8% и 1,5%, соответственно. В 51% случаях (72 пациента) обнаружена ко-экспрессия, от 2 и более транскриптов. Так, у 29 (20,6%) пациентов обнаружена ко-экспрессия транскрипта b2a2/b3a2, у 21 (14,9%) пациента обнаружена ко-экспрессия b2a2/b3a2/e1a2 и у 22 (15,6%) пациентов - b2a2/e1a2.

Нами изучена зависимость типа транскрипта от пола и возраста. Среди 141 пациента 72 пациента составили лица мужского пола, у 32 обнаружен транскрипт b2a2 (44,4%), у 4 - b3a2 (5,5%) и у 1 (1,4%) - e1a2. У 35 пациентов (51%) диагностирована ко-экспрессия, в 15 (20,8%) случаях обнаружена ко-экспрессия транскрипта b2a2/ b3a2, в 10 случаях (13,9%) - b2a2/b3a2/ e1a2 и в 10 случаях (13,8%) - b2a2/e1a2.

В группе исследования 69 пациентов – женского пола. Наиболее часто диагностирован транскрипт b2a2 у 31(44,9%) пациента. В 53,6% случаях обнаружена ко-экспрессия, так у 14 пациентов диагностирован транскрипт b2a2/ b3a2 в 20,3% случаях, у 11 - c/b3a2/190 - (15,9%) и у 10 - b2a2/ e1a2 (17,4%). В одном случае обнаружен транскрипт e1a2 белка p190.

Изучена зависимость частоты транскриптов от возраста. Среди обследуемых 37% составили пациенты моложе 45 лет и 63% - старше 45 лет. В структуре транскриптов у молодых (<45) - 37%, превалировала ко-экспрессия, частота ее составила 65,3%, и транскрипты b2a2/b3a2, b2a2/b3a2/e1a2, b2a2/ e1a2 встречались с частотой - 21,1%, 21,1% и 19,2%, соответственно. В данной группе транскрипт b2a2 диагностирован в 34,6%, b3a2 – 3,8% случаях. У пациентов старше 45 лет в структуре транскрипт b2a2 составил 50,5%, частота ко-экспрессии - 34,6%, наиболее часто диагностирован транскрипт b2a2/b3a2 – 20,2%.

Выводы. Анализ полученных результатов показал, что в исследуемой казахстанской группе пациентов с ХМЛ частота химерного белка p210 составила – 97%, p190 - 3%, наиболее часто диагностирован транскрипт b2a2 – 47,5% и частота ко-экспрессии – 51%. В структуре транскриптов независимо от пола и возраста превалирует транскрипт b2a2, ко-экспрессия преобладает у мужчин (51%) и у лиц моложе 45 лет – 65%.

Э.П. Адильгереева¹, А.Г. Никитин², Д.Г. Жегло¹, О.А. Шухов³, С.А. Смирнихина¹,
Е.Ю. Чельшева³, А.В. Лаеров¹, А.Г. Туркина³, С.И. Куцев¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

¹Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства», г. Москва

³Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Введение. Разработка таргетных препаратов ИТК позволила значительно улучшить эффективность терапии ХМЛ. Несмотря на впечатляющие успехи лечения ХМЛ, по данным разных авторов, от 5-25% пациентов резистентны к проводимой терапии. На сегодняшний день перед нами стоит задача в определении прогностических факторов неудачи терапии на этапе диагностики заболевания. Геномные исследования могут заложить основу для улучшения диагностики риска неудачи терапии для более точного раннего выявления устойчивости к ИТК.

Материалы и методы. В исследование было включено 60 пациентов с впервые выявленным ХМЛ. Диагноз был подтвержден цитогенетическими и молекулярно-генетическими методами. Минимальный срок наблюдения 12 месяцев. Эффективность терапии оценивали каждые 3 месяца, согласно критериям ELN2013. Спустя 12 месяцев терапии пациенты были разделены на 3 группы: группа оптимального ответа, в которую вошли 33 пациента; группа предупреждения – 15 пациентов; группа резистентных к терапии – 12 пациентов. Периферическую кровь забирали в пробирки с ЭДТА в момент установления диагноза до начала терапии ИТК. В качестве контрольной ткани было произведено взятие букального эпителия. ДНК выделяли с использованием набора Quick-gDNATM Blood Mini Prep (Zymo Research), согласно протоколу производителя. Приготовление библиотек проводилось с использованием набора TruSeq® DNA Library Kit, (Illumina). Секвенирование экзона проводилось на платформе Illumina NextSeq® 550 Sequencing System, с использованием NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles), (Illumina). Пробоподготовка и последующее секвенирование проводились по стандартному протоколу. Среднее покрытие составляет 80x. Этапы биоинформационного анализа включали: удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством прочтения; картирование прочтений на референсную последовательность генома человека при помощи алгоритма BWA-MEM; проверка качества исходных данных, выравнивания, обогащения и покрытия целевых регионов с помощью FastQC, BAMQC и NGSrich, маркировка дубликатов, поиск нуклеотидных вариаций с помощью GATK HaplotypeCaller + Freebayes + Strelka2 (с получением объединенного VCF-файла); обработка консенсусного VCF-файлов с помощью предобученной нейронной сети для фильтрации ложноположительных результатов; аннотирование с помощью SnpEff (анализ всех транскриптов),

ANNOVAR (анализ частот аллелей в ExAC, 1000G и ESP6500, алгоритмы проверки функциональной значимости SIFT, PolyPhen2, MutationTaster, FATMM, CADD, DANN, REVEL и M-CAP) и Alamut Batch (влияние на сплайсинг, базы данных dbSNP, ClinVar, COSMIC, HGMD Professional).

Результаты. По результатам анализа экзотов нам удалось обнаружить семь вариантов, два из которых хорошо описаны и являются патогенными и пять вариантов патогенны, согласно предсказательным программам. У двух пациентов из группы с оптимальным ответом на терапию было выявлено два патогенных варианта, ранее описанных при других онкологических заболеваниях: с.1849G>T p.V617F в гене JAK2; с.5266dupC p.Q1756fs в гене BRCA1. В группе пациентов, резистентных к терапии, нами было обнаружено 5 вариантов у 4 человек в 2 генах: ASXL1 и DNMT3A. Варианты в данных генах встречаются при различных онкологических заболеваниях, в том числе при миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе. У трех пациентов встретилось 2 разных варианта в 12 экзоне гена ASXL1, приводящие к потере функций, у одного пациента встретился миссенс вариант в 4 экзоне гена ASXL1. Экзом опухоли одного из пациентов содержал одновременно варианты в 12 экзоне гена ASXL1 и 22 экзоне гена DNMT3A. Все пациенты имели смену нескольких линий терапии. Мы провели валидацию найденных вариантов секвенированием по Сенгеру в образцах крови. Также нами была проведена валидация в образцах букального эпителия для двух пациентов, для двух других пациентов материал был недоступен. По результатам валидации миссенс вариант в 4 экзоне гена ASXL1 является герминальным, тогда как вариант в 12 экзоне – соматическим.

Выводы. На основании проведенной работы можно предположить, что выявленные варианты генов ASXL1 и DNMT3A могут быть ассоциированы с резистентностью к терапии ИТК и являться прогностическими маркерами эффективности терапии ИТК на этапе диагностики заболевания. Основываясь на результатах, полученных нами и другими исследователями в области онкологических заболеваний, можно утверждать, что при помощи геномных исследований мы можем обнаружить молекулярно-генетические маркеры эффективности терапии, что, в свою очередь, позволит обеспечить персонализированный подход к назначению таргетных препаратов.

ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО НАЗНАЧЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ДОЛГОСРОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С Rh-ПОЗИТИВНЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

*«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии имени Р.М. Горбачевой»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург*

Введение. Широкое внедрение в практику таргетных препаратов – ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) в сочетании с химиотерапией и последующей аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) привели к значительному улучшению результатов терапии у части пациентов с Rh-позитивным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Таким образом, на современном этапе долгосрочная выживаемость пациентов из данной подгруппы может быть сопоставлена с выживаемостью пациентов с Rh-негативным ОЛЛ. Тем не менее, рецидивы после алло-ТГСК остаются основной причиной неудач лечения и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Одной из возможных опций профилактики посттрансплантационных рецидивов является поддерживающая терапия с применением ИТК после алло-ТГСК, однако в настоящее время в литературе данные об оптимальных режимах их назначения ограничены.

Цель. Оценить влияние назначения ИТК в посттрансплантационном периоде на долгосрочные результаты терапии после алло-ТГСК у рецидивентов с Rh-позитивным ОЛЛ.

Материалы и методы. В данном исследовании проведен ретроспективный анализ 96 пациентов с Rh-позитивным ОЛЛ с медианой возраста 30 лет (18-57 лет), которым алло-ТГСК выполнена от полностью совместимого родственного донора (n = 24), гаплоидентичного донора (n = 12) или неродственного донора (n = 60) в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой с 2007 по 2019 год. Медиана наблюдения за пациентами составила 24,8 месяца (1-98 месяцев). К моменту выполнения алло-ТГСК 54 (56%) пациента были в 1 полной ремиссии, 16 (17%) пациентов – во 2 ремиссии, 10 (10%) пациентов – в 3 или последующих ремиссиях, 16 (17%) пациентов – в активной фазе заболевания (рецидив/резистентность/прогрессирование). 88 (92%) пациентов до алло-ТГСК получали терапию ИТК 1, 2 или 3 поколения. 36 (38%) пациентов к моменту выполнения алло-ТГСК находились в МОБ-отрицательном статусе (по данным ПЦР на определение химерного транскрипта BCR/ABL), 39 (40%) пациентов сохраняли МОБ-позитивность на фоне проведенной терапии, для 21 (22%) пациента МОБ статус не

оценивался. В посттрансплантационном периоде 60 (63%) пациентов получали ИТК (иматиниб или дазатиниб). Целями посттрансплантационного назначения ИТК были: профилактическая – у 43 (72%) пациентов, превентивная – у 8 (13%) пациентов, лечение рецидива – у 9 (15%) пациентов. Медиана назначения ИТК составила 60 дней (30 до 125 дней) после алло-ТГСК. Пациенты, не достигшие приживления, были исключены из анализа. Для оценки результатов выполнено сравнение групп пациентов, которые получали и не получали ИТК в посттрансплантационном периоде с использованием лэндмарк анализа.

Результаты. В общей группе пациентов 5-летняя общая выживаемость (ОВ), бессобытийная выживаемость (БСВ), частота рецидивов составили 59,4%, 45,8% и 35,4%, соответственно. При сравнении выживаемости в группах пациентов, которым ИТК были назначены после алло-ТГСК в качестве профилактики, с пациентами, которые не получали ИТК в качестве профилактики, получены статистически достоверные различия в 5-летней БСВ: в 1-й группе БСВ составила 63,3%, во 2-ой группе 29% (p<0,001). 5-летняя частота рецидивов в 1-й и 2-й группах составила 28,6% и 51,6%, соответственно (p<0,001). Кроме того, выявлена тенденция, демонстрирующая, что поколение ИТК (1 или 2) после алло-ТГСК не влияло на результаты ОВ и БСВ (p<0,427 и p<0,463, соответственно).

Выводы. Полученные нами данные указывают на клиническую значимость назначения ИТК после алло-ТГСК, отражающуюся в значительном улучшении показателей БСВ и частоты рецидивов у пациентов, которые получали терапию ИТК 1 или 2 поколения с профилактической целью. Основываясь на представленных данных, можно заключить, что с целью улучшения долгосрочных результатов терапии у пациентов с Rh-позитивным ОЛЛ, предпочтительным является профилактическое назначение ИТК не позднее, чем через 60 дней после алло-ТГСК, в случае отсутствия других факторов, ограничивающих их назначение (гематологическая/негематологическая токсичность ИТК, гипофункция трансплантата и др.).

*Э.П. Адильгереева¹, А.Г. Никитин², Д.Г. Жегло¹, О.А. Шухов³, С.А. Смирнихина¹,
Е.Ю. Чельшева³, А.В. Лавров¹, А.Г. Туркина³, С.И. Куцев¹*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДИКТОРЫ ПЕРВИЧНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА К ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

¹Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г.Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства», г. Москва

³Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Москва

Введение. Разработка таргетных препаратов ИТК позволила значительно улучшить эффективность терапии ХМЛ. Несмотря на впечатляющие успехи лечения ХМЛ, по данным разных авторов, от 5-25% пациентов резистентны к проводимой терапии. На сегодняшний день перед нами стоит задача в определении прогностических факторов неудачи

терапии на этапе диагностики заболевания. Геномные исследования могут заложить основу для улучшения диагностики риска неудачи терапии для более точного раннего выявления устойчивости к ИТК.

Материалы и методы. В исследование было включено 60 пациентов с впервые выявленным ХМЛ. Диагноз был под-

твержден цитогенетическими и молекулярно-генетическими методами. Минимальный срок наблюдения 12 месяцев. Эффективность терапии оценивали каждые 3 месяца, согласно критериям ELN2013. Спустя 12 месяцев терапии пациенты были разделены на 3 группы: группа оптимального ответа, в которую вошли 33 пациента; группа предупреждения – 15 пациентов; группа резистентных к терапии – 12 пациентов. Периферическую кровь забирали в пробирки с ЭДТА в момент установления диагноза до начала терапии ИТК. В качестве контрольной ткани было произведено взятие буккального эпителия. ДНК выделяли с использованием набора Quick-gDNATM Blood Mini Prep (Zymo Research), согласно протоколу производителя. Приготовление библиотек проводилось с использованием набора TruSeq® DNA Library Kit, (Illumina). Секвенирование экзона проводилось на платформе Illumina NextSeq® 550 Sequencing System, с использованием NextSeq® 500/550 High Output Kit v2 (75 cycles), (Illumina). Пробоподготовка и последующее секвенирование проводились по стандартному протоколу. Среднее покрытие составляет 80х. Этапы биоинформационного анализа включали: удаление адаптеров и последовательностей с низким качеством прочтения; картирование прочтений на референсную последовательность генома человека при помощи алгоритма BWA-MEM; проверка качества исходных данных, выравнивания, обогащения и покрытия целевых регионов с помощью FastQC, BAMQC и NGSrich, маркировка дубликатов, поиск нуклеотидных вариаций с помощью GATK HaplotypeCaller + FreeBayes + Strelka2 (с получением объединенного VCF-файла); обработка консенсусного VCF-файлов с помощью предобученной нейронной сети для фильтрации ложноположительных результатов; аннотирование с помощью SnpEff (анализ всех транскриптов), ANNOVAR (анализ частот аллелей в ExAC, 1000G и ESP6500, алгоритмы проверки функциональной значимости SIFT, PolyPhen2, MutationTaster, FATMM, CADD, DANN, REVEL и M-CAP) и Alamut Batch (влияние на сплайсинг, базы данных dbSNP, ClinVar, COSMIC, HGMD Professional).

Результаты. По результатам анализа экзотов нам уда-

лось обнаружить семь вариантов, два из которых хорошо описаны и являются патогенными и пять вариантов патогенны, согласно предсказательным программам. У двух пациентов из группы с оптимальным ответом на терапию было выявлено два патогенных варианта, ранее описанных при других онкологических заболеваниях: c.1849G>T p.V617F в гене JAK2; c.5266dupC p.Q1756fs в гене BRCA1. В группе пациентов, резистентных к терапии, нами было обнаружено 5 вариантов у 4 человек в 2 генах: ASXL1 и DNMT3A. Варианты в данных генах встречаются при различных онкогематологических заболеваниях, в том числе при миелодиспластическом синдроме и остром миелоидном лейкозе. У трех пациентов встретилось 2 разных варианта в 12 экзоне гена ASXL1, приводящие к потере функций, у одного пациента встретился миссенс вариант в 4 экзоне гена ASXL1. Экзом опухоли одного из пациентов содержал одновременно варианты в 12 экзоне гена ASXL1 и 22 экзоне гена DNMT3A. Все пациенты имели смену нескольких линий терапии. Мы провели валидацию найденных вариантов секвенированием по Сенгеру в образцах крови. Также нами была проведена валидация в образцах буккального эпителия для двух пациентов, для двух других пациентов материал был недоступен. По результатам валидации миссенс вариант в 4 экзоне гена ASXL1 является герминальным, тогда как вариант в 12 экзоне – соматическим.

Выводы. На основании проведенной работы можно предположить, что выявленные варианты генов ASXL1 и DNMT3A могут быть ассоциированы с резистентностью к терапии ИТК и являться прогностическими маркерами эффективности терапии ИТК на этапе диагностики заболевания. Основываясь на результатах, полученных нами и другими исследователями в области онкологических заболеваний, можно утверждать, что при помощи геномных исследований мы можем обнаружить молекулярно-генетические маркеры эффективности терапии, что, в свою очередь, позволит обеспечить персонализированный подход к назначению таргетных препаратов.

Б.В. Бидерман, Е.Б. Ликольд, Н.А. Северина, Т.Н. Обухова, А.Б. Судариков

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ ХЛЛ С НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫМИ СТЕРЕОТИПНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

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

Введение. Хронический лимфоцитарный лейкоз отличается от других лимфолифферативных заболеваний экстрамалым сужением репертуара генов IGHV. В настоящее время показано, что фракция стереотипных антигенных рецепторов (САР) – В-клеточных рецепторов с высокомолекулярным строением – составляет более 40% от всех случаев ХЛЛ, при этом 29 таких наиболее распространенных подгрупп составляют более 13% всех случаев ХЛЛ. Часть таких САР уже выделены как независимые факторы прогноза при ХЛЛ (CLL#1, CLL#2, CLL#8 демонстрируют крайне агрессивное течение заболевания, CLL#4 – индолентное). Также было выявлено, что подгруппы САР различаются по частоте встречаемости генетических нарушений.

Цель. Определить частоту встречаемости мутаций в генах TP53, NOTCH1, SF3B1 и делеции 17p13/TP53 у больных ХЛЛ с экспрессией групп САР, образованных с участием одинаковых IGHV.

Материалы и методы. В исследование включены 88 больных с ХЛЛ. Мутационный статус генов IGHV всех пациентов был исследован в ФГБУ «НМИЦ Гематологии» МЗ РФ с 2012 по 2020гг. Нуклеотидные последовательности генов IGHV и САР определяли согласно методике, рекомендован-

ной ERIC. Мутации в гене NOTCH1 (34 экзон) исследовали методом фрагментного анализа, либо методом NGS с помощью праймеров Campregher et al. Мутации в гене TP53 (2-11 экзона) определяли с помощью NGS согласно Pavlova et al. Мутации в гене SF3B1 (14-16 экзона) исследовали у 26 пациентов методом NGS. 66-ти больным выполнено FISH-исследование на наличие делеции 17p13/TP53 (Abbott, USA).

Результаты. В данной работе исследовался материал 32 пациентов с CLL#1, 17 с CLL#6, 15 с CLL#3, 12 с CLL#99 и 12 CLL#28A. CDR3 в подгруппах CLL#1 и #99 имеют сходный мотив, отличаются только на 1 аминокислоту и образуются с использованием генов IGHV 1го клана (чаще IGHV1-2). CLL#28A также образуется на основе гена IGHV1-2, в основе CLL#3 и #6 – IGHV1-69.

Мутации в гене TP53 были выявлены с высокой частотой в подгруппах CLL#6, #1, #99 и #28A – соответственно в 6 (35,3%), 1 (34,3%), 4 (33,3%) и 2(16%) случаев. При этом у всех пациентов в подгруппах #99 и #28A были обнаружены только минорные мутации (VAF<5%). У большинства пациентов подгрупп #1 и #6 VAF>10%. У двух пациентов с CLL#6 и одного с CLL#99 наблюдалось по 2 клона. В подгруппе CLL#3 было выявлено только 2 случая с мутациями в данном гене,

но у одного было 2 клона, а у другого 4.

Мутации в гене NOTCH1 выявлялись у пациентов с CLL#99, #6, #1, #28A, #3 с частотой, соответственно 3(25%), 4 (23,5%), 7(21,8%), 2(16%) и 2(13%). В большинстве случаев выявлялась широко распространенная мутация с.7544_7545delCT. Также были обнаружены мутации (по 1 случаю) с.7558_7561delCTTC и p.Q2444X у пациентов в CLL#1 и с.7547_7551del у пациента с CLL#28A. Одновременное наличие мутаций в генах TP53 и NOTCH1 было обнаружено у 4 пациентов – по 2 случая подгруппах CLL#1 и CLL#6.

Мутации в гене SF3B1 были выявлены у 8 (53,3%) пациентов с CLL#3. В подгруппах CLL#6 (исследовали 11 пациентов), #99 и #28A мутаций в данном гене обнаружено не было. В подгруппе #1 мутации в гене SF3B1 не исследовали.

Делеция 17p13/TP53 была обнаружена у 9 из 27 исследованных больных с CLL#1 (33%), и у 4 из 14 больных с CLL#6 (28,5%). В группе CLL#3 данная делеция была выявлена у

только 1 больного из 12, а среди пациентов с CLL#99 и #28A (9 и 4 исследованных случаев) она обнаружена не была.

Выводы. Наши результаты показывают, что в подгруппах CLL#1, CLL#6, CLL#3 генетические нарушения встречаются значительно чаще, чем в целом у пациентов с ХЛЛ, по литературным данным. Возможно, это связано с тем, что часть пациентов в нашей выборке имели рецидив после режима FCR. В подгруппе CLL#99, также как и в сходной по строению рецептора подгруппе CLL#1, мутации в гене TP53 встречаются аномально часто, но с низкой VAF, что в настоящее время не имеет доказанного негативного клинического значения. Интересно, что две подгруппы с геном IGHV1-69 в основе SAR демонстрируют абсолютно противоположную картину по частоте встречаемости нарушений в исследуемых генах. Дальнейшее изучение генетических нарушений при этих и других группах CAP поможет в будущем оптимизировать терапию и углубить понимание патогенеза заболевания.

А.В. Боровикова, Ж.М. Жабаква, Г.Ж. Абильдинова

ЧАСТОТА ВЫЯВЛЯЕМОСТИ МУТАЦИИ JAK2 В КАЗАХСТАНЕ

Республиканское государственное предприятие «Больница Медицинского центра управления делами Президента Республики Казахстан», г. Нур-Султан, Казахстан

Введение. Миелопролиферативные заболевания представляют собой группу гематологических заболеваний, характеризующихся первичным расстройством кроветворных стволовых клеток, приводящим к росту одного или нескольких типов клеток крови. Наиболее важным критерием в диагностике миелопролиферативных заболеваний является мутация V617F в 14 экзоне гена Jak2, который кодирует рецепторную тирозинкиназу, участвующую в передаче сигнала от рецепторов цитокинов и факторов роста к ядру клетки и экспрессирован в ранних предшественниках гемопоэза.

Цель. Определить частоту встречаемости гена JAK2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях.

Материалы и методы. Молекулярно-генетическое исследование проведено 259 пациентам. Выделение ДНК проводили из 500 мкл крови с использованием набора реагентов PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Scientific, США) и в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК оценивали с помощью прибора Qubit4 (Thermo Scientific, США). При интерпретации результатов учитывали «Серую зону» - образцы, имеющие долю мутантного аллеля от 4 до 7%. При наличии «Серой зоны» пациенты проходили повторное исследование через 6 месяцев. Детекцию и количественный учет гена JAK2 проводили с помощью ПЦР-RT

QuantStudio 12 Flex (Applied biosystem). Возрастной диапазон пациентов и средний возраст (\pm SD) составляли от 28 до 80 лет и $45,89 \pm 15,60$ года соответственно.

Результаты исследования. Группу исследования составили 269 человек, из них 133 (49,4%) пациентов с подозрением на истинную полицитемию (ИП) и 132 (49%) пациента на с подозрением на первичный миелофиброз и 4 (1,5%) пациента с Ph-негативным хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Частота выявляемости в группе исследования мутации в 14 экзоне гена JAK2 составила 47% (127). Среди 133 пациентов с ИП мутация JAK2 обнаружена у 66 пациентов, что составило 49,6%, у 132 пациентов с ПМФ – у 58 (43,9%). В группе первичных больных, обследованных с целью дифференциальной диагностики при Ph (-) ХМЛ, мутация была выявлена у 3 (75%) из 4 пациентов, что позволило достоверно подтвердить диагноз.

Изучена частота мутации JAK2 в зависимости от возраста и пола. Возрастной пик обнаружения мутации V617F гена JAK2 у заболевших находится между 40 и 70 годами с преобладанием заболеваемости у женщин после 60 лет.

Выводы. Частота мутации JAK 2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях составила в исследуемой группе 47%, чаще диагностируется у женщин старше 60 лет.

*И.А. Булдаков¹, С.В.Волошин¹, В.А. Шуваев^{1,2}, С.В.Петров¹, М.С.Фоминых¹
С.С. Бессмельцев¹, А.В. Четкин¹, И.С. Мартынкевич¹*

СЕКВЕНИРОВАНИЕ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ В ОПРЕДЕЛЕНИИ BCR-ABL-НЕЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ ИТК У ПАЦИЕНТОВ С ХФ ХМЛ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница имени В.В. Вересаева» Департамента здравоохранения г. Москвы

Введение. С каждым годом накапливается все больше данных о механизмах развития первичной и вторичной резистентности к терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) у пациентов с ХМЛ. Технология секвенирования следующего поколения (NGS) позволяет обнаруживать мутации в киназном домене BCR-ABL химерного гена у значительной части пациентов с резистентностью к терапии ИТК. Но, по-

прежнему остаются неясными причины резистентности у пациентов без мутаций в киназном домене BCR-ABL.

Цель. Определить BCR-ABL-независимые молекулярно-генетические маркеры резистентности к терапии ИТК у пациентов с ХМЛ с применением NGS.

Материалы и методы. Мы исследовали образцы крови 15 пациентов с резистентным течением ХФ ХМЛ (8 мужчин

и 7 женщин) в возрасте от 32 до 59 лет (Me=44 года). Резистентность к терапии ИТК определяли по критериям ELN 2013. 2 пациента получили терапию двумя ИТК, 8 пациентов – тремя ИТК, 3 пациента – 4 ИТК и 2 пациента получили – 5 ИТК (Me=3 ИТК). У 3 пациентов при цитогенетическом исследовании выявлялась дополнительная 8 хромосома. У 1 пациента однократно обнаружена мутация T315I. Пациентам было выполнено NGS исследование миелоидной панели, включающей 55 генов, со средней глубиной прочтения 1000x на приборе MiSeq (Illumina). При анализе полученных данных применялся 2% порог частоты встречаемости аллеля (VAF). Клиническая значимость мутаций устанавливалась по базам данных COSMIC, ClinVar и OMIM.

Результаты. Использование NGS позволило выявить генетические aberrации у всех исследуемых пациентов: в среднем по 5 мутаций (от 1 до 10 у одного больного). Всего было выявлено 77 мутаций с неясной клинической значимостью: из них 54 миссенс-мутации, 22 – синонимичных мутации и 1 вариант со сдвигом рамки считывания. Наиболее часто аномалии обнаруживались в генах NF1 (10), TET2 (8), ATRX (7) и STAG2 (6). У 2 пациентов обнаружено сочетание мутаций в генах ATRX и NF1, у них наблюдалось первично-резистентное течение заболевания, БМО не был достигнут даже на 3 и 4-й линиях таргетной терапии. У 3 пациентов выявлено одновременное наличие мутаций в генах NF1 и STAG2, у двух из них также отмечалось первично-резистентное течение заболевания и у одного из них зарегистрирована резистентность ко всем 5 ИТК. У 2 пациентов с одновременным наличием мутаций в генах ATRX и TET2 зарегистрирована резистентность к 2 ИТК, ПЦО без БМО достигнут только при применении Понатиниба. У 3 пациентов с одиночными мутациями в STAG2 БМО достигнут на третьей линии ИТК. У 1 пациента с

3 мутациями в TET2 БМО также достигнут только на третьей линии ИТК.

Мутации в TET2 довольно часто встречаются при Ph-негативных МПН. В нашем исследовании чаще других мутации выявлялись в генах NF1, ATRX и STAG2. Хотя мутации в генах NF1 и ATRX были описаны ранее у ответивших на лечение пациентов с ХФ ХМЛ. В нашем исследовании мутации в этих генах были обнаружены у резистентных к терапии пациентов с неблагоприятным течением заболевания. Ген NF1 кодирует активирующий ГТФазу белок (GAP, GTPase activating protein), который участвует в ингибировании RAS/MAPK пути передачи сигнала в клетку, и является супрессором опухолей. Мутации в данном гене часто ассоциированы с развитием ХММЛ и ЮММЛ, резистентностью к терапии и ухудшением общей выживаемости. Ген ATRX кодирует белок, участвующий в ремоделировании хроматина, регуляции транскрипции, репликации и поддержании структуры теломера. Ген STAG2 кодирует белок, входящий в состав когезинового комплекса.

Возможно, аномалии в данных генах могут принадлежать клону лейкоэмических стволовых клеток, обуславливать их резистентность к ИТК, BCR-ABL-независимый пролиферативный потенциал и их генетическую нестабильность. Это позволило нам предположить прогностическую и терапевтическую ценность мутаций в гене NF1, ATRX и STAG2 у пациентов с ХФ ХМЛ с резистентностью к терапии ИТК.

Выводы. Полученные результаты пилотного исследования применения NGS для прогнозирования BCR-ABL-независимой резистентности к терапии ИТК у пациентов с ХМЛ могут служить основой для дальнейших исследований с целью разработки прогностических моделей и выбора метода лечения при резистентности к таргетной терапии.

Ю.Ю. Власова¹, Е.В. Морозова¹, К.С. Юровская¹, М.О. Иванова², Т.В. Шнейдер³, Т.Л. Гиндина¹, И.М. Бархатов¹, И.С. Мусеев¹, А.Д. Кулагин¹

БОЗУТИНИБ: ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ ОТВЕТОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ (ОПЫТ ЦЕНТРА)

¹«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

²Поликлиника с клинико-диагностическим центром Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница», г. Санкт-Петербург

Введение. Неудача терапии пациентов с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) связана с резистентностью и непереносимостью к терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК). Прогноз пациентов с резистентностью к ИТК 1,2 линии неблагоприятен. Внедрение новых ИТК в рутинную клиническую практику может приводить к высоким уровням цитогенетических и молекулярных ответов, в том числе при множественной резистентности. Согласно данным исследования Buond, отмечено достижение высокого уровня цитогенетических и молекулярных ответов на терапии бозутинибом в качестве 3-4 линии.

Цель. Оценить собственный опыт использования бозутиниба в качестве терапии 3-4 линии, уровень достижения цитогенетических и молекулярных ответов.

Материалы и методы. Для анализа использовались амбулаторные карты 32 пациентов (21 мужчины и 11 женщин, возраст на момент постановки диагноза 4.5-71 год, медиана 36 лет), с диагнозом ХМЛ. 18 пациентов получали только ИТК, у 14 пациентов одним из этапов лечения была алло-

генная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Фаза заболевания к началу терапии бозутинибом: хроническая (ХФ) – у 28 пациентов, акселерации (ФА) – у 4 пациентов. Бозутиниб назначался в следующих линиях терапии: первая – у 1 пациента (в рамках клинического исследования), вторая – у 6 пациентов + 2 пациента после алло-ТГСК, третья – у 12 пациентов, четвертая – у 11 пациентов. Причины перехода на бозутиниб: резистентность к предыдущему ИТК – у 27 пациентов, непереносимость предыдущего ИТК у 5 пациентов.

Результаты. Продолжительность терапии бозутинибом составила 8-144 мес. в группе пациентов без алло-ТГСК. Профиль токсичности и переносимость бозутиниба в рутинной клинической практике соответствовали данным клинических исследований. Гематологической токсичности не зарегистрировано. Негематологическая токсичность – диарея 2 ст. у 4-х пациентов (22%), не требовавшая отмены препарата и редукции дозы; у 1 пациента диарея 3 ст., потребовавшая редукции дозы. Прекращения терапии по причине

нежелательных явлений не зарегистрировано. Частота ответов в данной группе больных составила: полный гематологический (ПГО) – 89%, ПЦО – 78%, молекулярный ответ (БМО+ПМО) – 67%, прогрессия – 11%. Следует отметить, что только у одного пациента после достижения ПЦО зафиксирована прогрессия в бластный криз (БК) с летальным исходом (на фоне переносимой новой коронавирусной инфекции). Алло-ТГСК выполнена 15 пациентам. Фаза заболелания на момент диагностики ХМЛ: ХФ – 9 пациентов, ФА-5, БК – 1. Показания к алло-ТГСК: 13 (86%) пациентов резистентность к ИТК, 2 (14%) – непереносимость ИТК. Бозутиниб в качестве терапии 2 линии перед алло-ТГСК использовался у 1 (7%) пациента, 3 линии – у 4-х (26%) пациентов, 4 линии – у 5 (33%) пациентов. Ответ на терапию ИТК перед выполнением алло-ТГСК: у 5 пациентов – ПГО, у 5 пациентов – ПЦГО. Бозутиниб в посттрансплантационном периоде использовался у 5 (34%) пациентов (терапия МОБ – у 4 –х пациентов, профилактика рецидива в посттрансплантационном периоде у 1 пациента). У 4-х пациентов – летальный исход в раннем посттрансплантационном периоде, 1 летальный исход – экстрамедуллярный бластный криз в позднем посттрансплантационном периоде, у 10 (67%) пациентов – глубокий молекулярный ответ, сохраняющийся по настоящее время.

Е.Н. Воропаева¹, Т.И. Поспелова², В.С. Карпова³, М.И. Воевода¹, Т.А. Агеева², В.Н. Максимов¹

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ С ВТОРИЧНЫМ ВОВЛЕЧЕНИЕМ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: АНАЛИЗ БАЗ И СОБСТВЕННЫЕ ДАННЫЕ

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

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

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», г. Новосибирск

Введение. В настоящее время существует необходимость в разработке разделения пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) на прогностические подгруппы поражения центральной нервной системы (ЦНС) и разработке подходов к целенаправленной терапии опухоли.

Цель. Оценить мутационный профиль ДВККЛ и выделить гены, абберации в которых ассоциированы с высоким риском рецидива лимфомы с вовлечением ЦНС.

Материалы и методы. Выполнено полноэкзомное секвенирование 10-ти образцов ДВККЛ пациентов, у которых развился рецидив с поражением ЦНС. Проанализированы данные CBioPortal for Cancer Genomics database по мутационному профилю ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания (n=48) и без вовлечения нервной ткани (n=355).

Результаты. Анализ данных CBioPortal for Cancer Genomics database показал, что уровень мутационной нагрузки при ДВККЛ не является маркером повышенного риска вторичного вовлечения ЦНС в рецидиве опухоли. Наибольшая частота мутаций в данной группе больных наблюдалась в генах JAK/STAT и BCR/NF-kB-сигнальных путей (MYD88, PIM1, CARD11 и CD79B), эпигенетической регуляции генома (KMT2D, CREBBP, SPEN, ARID1A и SMARCA4), а также онкосупрессоре TP53. Достоверные различия от группы без вовлечения ЦНС были получены по следующим генам, абберации в которых характерны для ABC-like варианта опухоли: MYD88 (p=0,017), PIM1 (p=0,025) и CD79B (p=0,043), а также по двум другим генам – IKKBK (p=0,017) и ETS1 (p=0,039). Кодированный геном IKKBK белок опосредует активацию NF-kB. А ген ETS1 осуществляет прямой контроль экспрессии цитокинов и хемокинов, влияет на дифференцировку, выживание

Гематологическая токсичность наблюдалась у 5 пациентов (33%), негематологическая токсичность (отек Квинке) – у 1 пациента. Прекращения терапии по причине НЯ – 1 (6%). Продолжительность терапии бозутинибом до алло-ТГСК: 2 мес. – 6 мес.; после алло-ТГСК 6-12мес. Наблюдавшаяся в реальной клинической практике эффективность бозутиниба была несколько выше, чем по данным клинических испытаний. Профиль токсичности и переносимости в реальной клинической практике соответствовал данным клинических исследований. Терапия продолжается у 18 (57%) пациентов (в том числе у 3-х из группы алло-ТГСК). Большинство из них достигли стойкого оптимального ответа, который сохраняется на протяжении всего периода лечения.

Выводы. Использование бозутиниба в реальной клинической практике показало его эффективность и безопасность. Отмечен высокий уровень достижения оптимальных ответов в качестве терапии 3-4 линии при благоприятном профиле безопасности. Впервые в Российской Федерации продемонстрирована возможность высокоэффективного использования бозутиниба в качестве «bridge»-терапии при подготовке к алло-ТГСК и профилактики рецидива в посттрансплантационном периоде.

и пролиферацию клеток лимфоидного ряда, а также регулирует ангиогенез. Мутации MYD88, PIM1, CD79B, IKKBK и ETS1 часто сочетались (p<0,05) и в общей сложности встречались в 41,7% случаев ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве. Рекуррентная мутация MYD88 p.L265P являлась наиболее значимым предиктором риска рецидива ДВККЛ с поражением ЦНС (ОШ=10,8. 95% ДИ (4,70;24,92)). Другой функциональной группой генов, мутации в которых чаще обнаруживались в образцах ДВККЛ с рецидивами в ЦНС, были участники комплекса ремоделирования хроматина: ARID1A (p=0,040), INO80 (p=0,028) и SMARCA4 (p=0,087). В совокупности абберации в них были выявлены в трети (33,3%) случаев с вовлечением ЦНС в рецидиве лимфомы (p=0,003).

Полученные в рамках собственного исследования данные согласуются с результатами анализа CBioPortal for Cancer Genomics database. В анализируемых методом высокопроизводительного секвенирования 10-ти диагностических образцах опухолевой ткани ДВККЛ пациентов, у которых в рецидиве заболевания развилось поражение ЦНС, можно выделить четыре основные группы генетических событий: мутации в генах NF-kB сигнального пути (MYD88, NOTCH1, CD79B, CARD11) – 6/10 образцов, онкосупрессорных генах системы ремоделирования хроматина (ARID1A, KMT2D, EP300, SMARCA4) – 5/10 образцов, гене PIM1 сигнального пути JAK-STAT – 4/10 образцов, а также TP53 – 3/10 образцов. При этом мутации в генах NF-kB и JAK-STAT сигнальный путей носили сочетанный характер. В 3/4 случаев выявления мутации в гене MYD88 была зафиксирована замена p.L265P. Мутации SMARCA4 и ARID1A представляли собой небольшие делеции, две из которых вызывают сдвиг рамки считывания и возникновение преждевременных стоп-кодонов, что неми-

нуемо приводит к снижению количественного содержания функционально активного белка.

Выводы. Для случаев ДВККЛ с вовлечением ЦНС в рецидиве характерны аберрации, позволяющие лимфоцитным клеткам не только проникать в нервную ткань, но и успеш-

но сохраняться и расти в условиях специфического бедного на ростовые стимулы микроокружения. Работа выполнена за счет средств гранта Президента РФ МД-2706.2019.7, а также в рамках бюджетной темы по Госзаданию № АААА-А17-117112850280-2.

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

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ В ГРУППАХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРАТИФИКАЦИИ mSMART 3.0

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

Введение. Стратификация риска при множественной миеломе прошла неоднократные обновления в связи с появлением информации о прогностическом воздействии генетических аномалий и других факторов. Разделение пациентов в группы риска на основе генетических маркеров используется многими центрами для выбора и оптимизации тактики лечения. Однако, роль комплексных и сочетанных генетических нарушений, а также аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК) остается до конца неясной.

Цель. Определить влияние генетических аномалий и аутоТГСК на показатели выживаемости пациентов с впервые выявленной множественной миеломой (ВММ), соответственно риск стратификации.

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 87 пациентов с ВММ. Все пациенты получали бортезомиб-содержащие программы первичной противомиеломной терапии (VD, CVD, VMP, PAD).

Результаты. Наличие аберрантного кариотипа (сочетание 2-х аномалий не из группы высокого риска), Double Hit (2 аномалии высокого риска) и комплексного кариотипа (3 и более аномалии) являлось неблагоприятным прогностическим маркером по сравнению с группой стандартного риска (CP) mSmart 3.0 (нормальный кариотип, t(11;14), гиподиплоидия, гипердиплоидия и другие единичные аномалии). Медиана общей выживаемости (ОВ) в данных группах составила: 74, 50, 36 и 14 месяцев (p=0,00011). На основании результатов ОВ и БПВ нами проведена модификация (mod) группы высокого риска (BP) mSMART 3.0 (TP53/del17p, t(4;14), t(4;16), t(14;20), +1q, R-ISS III) с добавлением паци-

ентов, имеющих «комплексный кариотип» и наличие Double Hit.

Медиана ОВ в группе CP mSMART 3.0 (n=53) не была достигнута, в группе BP mSMART 3.0mod (n=34) – 50 месяцев: 5-летняя ОВ составила 61% и 38%, соответственно (p=0,0073).

Медиана БПВ в группе CP mSMART 3.0 (n=53) составила 43 мес., в группе BP mSMART 3.0mod (n=34) – 29 месяцев.

Наилучшие результаты БПВ и ОВ были достигнуты в обеих группах пациентов, которым выполнена аутоТГСК. Медиана ОВ в группе стандартного риска mSMART 3.0 с аутоТГСК (n=37) не была достигнута, в группе высокого риска mSMART 3.0 mod с аутоТГСК – 48 месяцев (n=20); в группе стандартного риска mSMART 3.0 без аутоТГСК – 40 месяцев (n=16); в группе высокого риска mSMART 3.0 mod без аутоТГСК – 22 месяца (n=14); 5 – летняя ОВ составила 81%, 60%, 33% и 28% соответственно (p=0,0015). Медиана БПВ не была достигнута, 46, 22 и 19 месяцев соответственно (p=0,017).

Выводы. Аберрантный кариотип, Double Hit или комплексный кариотип являются неблагоприятным прогностическим маркером по сравнению аномалиями стандартного риска или без них. Это может быть полезно для обновления системы стратификации риска в будущем. Медиана общей и беспрогрессивной выживаемости достоверно выше у пациентов в группе стандартного риска, чем в группе высокого риска по данным mSMART 3.0 mod. Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток может улучшить результаты лечения, особенно у пациентов в группе высокого молекулярно-генетического риска.

М.В. Гаськова, О.И. Солдаткина, Н.М. Тимофеева, Е.А. Зеркаленкова, А.М. Попов, И.И. Калинина, Ю.В. Ольшанская, А.А. Масчан

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ОСТРОГО МЕГАКАРИОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

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

Введение. Острый мегакариобластный лейкоз встречается преимущественно у детей младшего возраста и представляет собой генетически гетерогенную группу заболеваний. У детей с синдромом Дауна (ДС), острый мегакариобластный лейкоз является наиболее частым вариантом лейкоза, клинические и биологические особенности этого варианта лейкоза позволяют рассматривать его отдельно. Острый мегакариобластный лейкоз, не ассоциированный с ДС, характеризуется широким спектром как химерных генов, так и повторяющихся мутаций, что определяет различия в

клиническом течении заболевания.

Цель. Охарактеризовать молекулярно-генетический профиль острого мегакариобластного лейкоза у детей и определить прогностическое значение различных генетических перестроек.

Материалы и методы. С 2014 года по сентябрь 2020 диагноз острого мегакариобластного лейкоза был установлен у 101 пациента, в рамках референсной диагностики острых лейкозов получившего диагностику в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева». 39 пациентов имели синдромом Да-

уна (ДС), медиана возраста в этой группе составила 1,95 года (от 2 дней до 6,6 лет), М:Ж=19:20. Пациентов без синдрома Дауна было 62, медиана возраста составила 3,3 года (от 2 месяцев до 9 лет), М:Ж=42:20. Всем пациентам было проведено кариотипирование, исследование методом FISH и/или ПЦР для выявления известных перестроек и химерных генов. Для обнаружения мутаций во 2 экзоне гена GATA1 выполнили секвенирование по Сэнгеру и фрагментный анализ. Для более подробного изучения мутационного профиля было выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование (ВПС).

Результаты. Конституциональная трисомия 21 (21с) была выявлена у всех пациентов ДС. В 30% случаев была выявлена изолированная 21с (n=13), клональные хромосомные перестройки были представлены в 22% случаев комплексным кариотипом, в 12% трисомией 8 и дериватом 7 хромосомы в 5%(n=2). У 7 пациентов (18%) были обнаружены другие хромосомные aberrации. В 3 случаях стандартное кариотипирование провести не удалось в связи с отсутствием митозов, однако 21с была установлена по результатам FISH исследования. У пациентов без ДС были выявлены перестройки генов CBFA2T3-GLIS2, NUP98, KMT2A и t(1;22)(p13;q13) обнаруженные в 15%, 8%, 7% и 10% случаев, соответственно. Соматическая трисомия 21 хромосомы была выявлена в 7% случаев (n=4), нормальный кариотип – у 1 больного. Пациенты с комплексным кариотипом составили 33% (n=19). Мутации в гене GATA1 у пациентов с ДС обнаружены в 92% случаев (n=36), у пациентов без ДС – в 23% (n=14). В группе пациентов с ДС наиболее частыми были мутации в JAK1, JAK2, JAK3 и MPL генах (38%). Мутации в основных генах – компонентах когезинового комплекса STAG2,

RAD21, CTCF и SMC1A, выявлены в 33% случаев. В 4 случаях (10%) выявлены мутации в генах эпигенетической регуляции (EZH2, SUZ12). Только один больной с ДС с комплексным кариотипом не имел каких-либо мутаций. В когорте больных без ДС мутационный профиль варьировал в зависимости от цитогенетических маркеров. Примечательно, что больные, имеющие транслокации генов CBFA2T3-GLIS2, NUP98, KMT2A и t(1;22)(p13;q13), почти не имели дополнительных мутаций. Подгруппа пациентов с соматической трисомией 21 несла мутации в гене GATA1 и по молекулярному профилю была схожа ДС: все пациенты имели 1-2 дополнительные мутации в генах JAK-STAT пути и генах когезинового комплекса. У пациентов, не имеющих известных транслокаций и мутаций в гене GATA1 (n=23), в 30% случаев обнаружены мутации в генах RAS – сигнального пути (KRAS, NRAS, PTPN11), среди генов когезинового комплекса мутации были обнаружены только в гене CTCF (25%). Мутации в генах JAK-STAT пути по частоте встречаемости преобладали (33%).

Выводы. Острый мегакариобластный лейкоз у детей является генетически гетерогенной группой. Мутации в гене GATA1 – самые частые, как у пациентов с ДС (92%), так и без ДС (23%). Среди дополнительных мутаций, обнаруженных методом ВПС, наиболее часто встречаются мутации в генах JAK-STAT сигнального пути. Пациенты без ДС с химерными онкогенами не имеют дополнительных мутаций, в то время как у пациентов с мутациями в гене GATA1, мутационный профиль схож с таковым у пациентов с ДС. Общая выживаемость (ОВ) ДС пациентов составляет 60%. Среди пациентов без ДС перестройка генов CBFA2T3-GLIS2 определяет неблагоприятный прогноз ОВ (40%), лучше всего выживаемость у пациентов с мутациями в гене GATA1 (90%).

О. С. Глотов^{1,2}, А.Н. Чернов¹, А. И. Чангалиди^{3,4}, Ю. А. Барбитов^{2,4,5}, Р.С. Калинин¹, В.В. Цай¹, С.Г. Щербак^{1,5}, С.П. Уразов¹, А. Ю. Анисенкова^{1,5}, С. В. Мосенко¹, Е. Ю. Гарбузов¹, Д. Н. Хоботников¹, А.С. Глотов^{2,5}

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ COVID-19 У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

¹Санкт-Петербургское городское учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», г. Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», г. Санкт-Петербург

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», г. Санкт-Петербург

⁴Общество с ограниченной ответственностью «Институт биоинформатики», г. Санкт-Петербург

⁵Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург

Введение. Онкологические заболевания представляют серьезную медико-социальную проблему. Их течение, особенно лейкозов, часто сопровождается супрессией иммунной системы пациента и присоединением сопутствующих заболеваний, в том числе вирусных инфекций. В связи с продолжающейся с конца 2019 г. в мире пандемией коронавируса COVID-19 крайне актуальным является выявление генетических предикторов у инфицированных пациентов, которые также составляют группу высокого риска развития онкологических заболеваний.

Цель. Генетический анализ вариантов в геноме пациентов с COVID-19 и в геноме РНК вируса SARS-COV-2, поиск их корреляций с клиническими показателями и степенью тяжести заболевания. Исследование проводили в соответствии с Хельсинской декларацией. У всех пациентов проводили: сбор анамнестических данных с уточнением особенностей течения заболевания, объективный осмотр с оценкой параметров гемодинамики, дыхательной системы (ЧДД, ЧСС, АД, SpO2, степень дыхательной недостаточности), оценку по шкале NEWS (National Early Warning Score), рекомендованной к использованию для пациентов с COVID-19, компьютер-

ную томографию (КТ) органов грудной клетки по 4-значной шкале (КТ-1, КТ-2, КТ-3, КТ-4); лабораторные исследования (клинический анализ крови, биохимический минимум, определение уровней ферритина, С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина-6 (ИЛ-6), лактатдегидрогеназы, Д-димера), ЭКГ, при необходимости использовали дополнительные инструментальные методики. Проведен анализ 766 историй болезни пациентов с COVID-19, находившихся на лечении в ГБУЗ «Городская больница №40» Санкт-Петербурга в период с 18.04.2020 по 31.12.2020.

Материалы и методы. Методом экзомного секвенирования был проведен анализ SNP у 766 пациентов с COVID-19 и 50 геномов РНК COVID-19 соответственно. Результаты данных секвенирования обрабатывали с помощью DeepVariant v.0.10.0, GLnexus v.1.2.6 и GATK v.4.1. Анализ генома вируса проводили с помощью сервиса PANGO lineages и Nextclade, программы Integrative Genomics Viewer (IGV). Анализ ассоциаций клинической информации и SNP в геноме вируса и человека проводили методом корреляционного анализа по Пирсону.

Результаты. Установлена статистически значимая кор-

реляция между степенью тяжести и летальности пациентов COVID-19 и биохимическими маркерами (уровнем СРБ, ИЛ-6 и др.). Проведен анализ не только мутаций, которые могут влиять на вирулентность и тяжесть заболевания путем изменения структуры белка коронавируса, но и на общее количество несинонимичных SNP в ключевых генах коронавируса (S-белка, РНК-полимеразы, геликазы). Обнаружено, что среднее (11-12) количество SNP в геноме COVID-19 положительно коррелирует с одышкой ($p=0,016$), сахарным диабетом ($p=0,016$), показателем тяжести заболевания по шкале компьютерной томографии (КТ 1-4, $p=0,01$) и уровнем Д-димера ($p=0,001$). Среднее количество мутаций в S-белке коррелирует с уровнем ферритина ($p=0,01$). В результате проведенных полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) и анализа ассоциаций редких вариантов (RVAS) с использованием библиотеки Nail для Ruyhon и скриптов собственной разработки были обнаружены сигналы ассоциации с уровнями Д-димера и ферритина и уровнем ИЛ-6. В случае

ИЛ-6 ассоциированные локусы могут иметь связь с компонентами внеклеточного матрикса и метаболическим путем через рецептор ангиотензин-превращающего фермента (ACE2). При анализе суммарной частоты встречаемости редких вариантов на уровне целых генов была обнаружена ассоциация миссенс-вариантов в гене бифункциональной 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатсинтазы-2 (PAPSS2) с низким уровнем лимфоцитов. Также был обнаружен сигнал ассоциации гена интегрина αM (ITGAM) с тяжестью течения, количеством СРБ и «цитокинным штормом».

Выводы. Полученные результаты позволяют предположить наличие генетических факторов риска в геноме человека, определяющих тяжесть течения и исход заболевания. Эти данные, наряду с информацией о структуре генома вируса и лабораторными исследованиями будут способствовать дифференциальной диагностике пациентов по степени тяжести, прогнозу и персонализации терапии, что позволит проводить более эффективное лечение пациентов с COVID-19.

Т.Ю. Грачева, М.В. Латыпова, А.А. Хабибуллина, И.А. Петрова, Д.С. Ильясова, Е.С. Рябикова, Т.Л. Гиндина

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ОМЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА FISH

*«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой»
Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения высшего профессионального образования
«Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург*

Введение. Диагностика хромосомных аномалий с использованием стандартного кариотипирования, в частности, GTG-окрашивания, часто не позволяет идентифицировать скрытые транслокации, несбалансированные обмены, маркерные хромосомы, а также хромосомный состав при сложных хромосомных абберациях (СХА) с тремя и более перестройками. В настоящее время в арсенале цитогенетиков имеется многоцветная флуоресцентная in situ гибридизация (M-FISH), молекулярно-цитогенетическая техника, позволяющая обойти ограничения стандартного кариотипирования благодаря индивидуальному окрашиванию флуорохромами каждой пары хромосом.

Цель. Используя стандартное кариотипирование и M-FISH, изучить структуру хромосомных аббераций в сложных кариотипах (СК) у больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ).

Материалы и методы. В исследование включены 22 пациента с ОМЛ, находящимися под наблюдением в клинике НИИ ДОГиТ им Р.М. Горбачевой с 2010 по 2019 год, у которых с помощью кариотипирования костного мозга выявлены СХА. Среди пациентов было 14 (64 %) мужчин и 8 (36 %) женщин с медианой возраста 43 года (диапазон 3 месяца – 71 год), 17 (73 %) пациентов - с первичным ОМЛ, 5 (23 %) – со вторичным ОМЛ (из МДС). У 6 (27 %) пациентов СК наблюдался в дебюте заболевания, у 16 (73 %) – в рецидивах ОМЛ. Всем пациентам проведена M-FISH, при необходимости до-

полненная интерфазной FISH с локус-специфичными ДНК-зондами к генам TP53, KMT2A, с-MYC и локусам делеций 5q.

Результаты. Комбинация стандартного кариотипирования и M-FISH позволила точно идентифицировать все комплексные хромосомные обмены, при этом во всех наблюдениях результаты кариотипирования были исправлены и дополнены данными FISH анализа. В СХА участвовали все пары хромосом, а наиболее часто участниками были хромосомы 8 ($n=15$, 68 %), 5 ($n=13$, 59 %), 7 ($n=12$, 54 %), 3 ($n=11$, 50 %), 11 ($n=11$, 50 %), 17 ($n=10$, 45 %). Несбалансированные транслокации были наиболее частой находкой и наблюдались у 20 (91%) пациентов. Реципрокные транслокации встречались реже и были зарегистрированы у 7 (32%) пациентов. В 9 (41 %) наблюдениях были выявлены маркерные хромосомы, определенные с помощью M-FISH как производные, состоящие от 3 до 5 сегментов разных хромосом. В таких производных чаще определялись хромосомы 5, 7, 13, 17, 21, маскирующиеся под «псевдомonosомии». Амплификации генов KMT2A и с-MYC были выявлены каждая у одного пациента.

Выводы. Исследование обнаружило цитогенетическую гетерогенность СХА у пациентов с ОМЛ, где несбалансированные обмены хромосом играют центральную роль. Комбинация стандартного кариотипирования и FISH позволяет точно определить хромосомные абберации для определения прогноза и молекулярные мишени для последующего определения минимальной остаточной болезни при ОМЛ.

М.А. Гурьянова, О.А. Шухов, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, К.А. Никифорова,

А.О. Абдуллаев, А.Б. Судариков, Е.Ю. Чельшева, А.В. Быкова, А.Н. Петрова, И.С. Немченко, И.В. Гальцева, А.Г. Туркина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ CD26+ ЛЕЙКОЗНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

Введение. Лейкозные стволовые клетки (ЛСК) при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) находятся в CD34+CD38- фракции лейкозного клона. N.Herrmann и соавт. (2014 г.)

было обнаружено что у 100% пациентов с ХМЛ на ЛСК в периферической крови (ПК) и в костном мозге (КМ) отмечалась экспрессия CD26, которая не выявлялась на нормаль-

ных ГСК и на ЛСК при других миелопролиферативных заболеваниях (МПЗ). M.Vocchia и соавт. (2020 г.) было выявлено, что у 70% пациентов с ХМЛ CD26+ ЛСК обнаруживаются и на фоне терапии ИТК, как в ПК, так и в КМ, вне зависимости от продолжительности лечения и глубины молекулярного ответа (МО).

Цель. Оценить концентрацию CD26+ ЛСК в ПК и в КМ у пациентов в дебюте ХМЛ, на ранних этапах терапии ИТК и у пациентов с глубоким МО.

Материалы и методы. Выявление CD26+ ЛСК в ПК и в КМ осуществлялось при помощи наборов моноклональных антител анти-CD26-PE, CD45-APC-Cy7, CD34-APC и CD38-FITC. Анализ проводился на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter). С августа 2020 по март 2021 года было обследовано 130 пациентов. У пациентов с ХМЛ с длительностью терапии ИТК менее 12 месяцев (мес.) забор образцов (ПК/КМ) проводился в момент диагностики (n=20/8), через 3 мес. (n=11/6), 6 мес. (n=8/0), 9 мес. (n=4/0) и 12 мес. (n=7/0) терапии. У пациентов с длительностью терапии ИТК более 12 мес. и уровнем BCR/ABL1>0,01% (n=16) забор ПК выполнялся однократно. Пациенты с ХМЛ с глубоким МО были разделены на 2 группы: пациенты, получающие терапию ИТК и пациенты в ремиссии без лечения (РБЛ). В первой группе у пациентов выполнялся забор ПК (n=47) и КМ (n=10), во второй группе — только ПК (n=24). В контрольную группу были включены пациенты с другими МПЗ: ПМФ (n=1), ОМЛ (n=2), ХММЛ (n=1), Ph+ОМЛ (n=1); с вторичным тромбоцитозом и с гиперэозинофильным синдромом (n=2), с Ph+ОЛЛ (n=1) и пациенты с ХМЛ с атипичными типами транскрипта BCR/ABL (n=2).

Результаты. У пациентов с ХМЛ в дебюте заболевания

медиана (Me) BCR/ABL составила 81,2% (13,8%-187%), через 3 мес. терапии ИТК — 3% (0%-41,1%), через 6 мес. — 0,7% (0%-17,5%), через 9 мес. — 0,00058% (0%-0,06%) и через 12 мес. — 0,16% (0%-1,6%). CD26+ ЛСК в ПК и в КМ были обнаружены у всех пациентов в дебюте ХМЛ. Me CD26+ ЛСК в ПК составила 32,1/мкл (0-345,7), в КМ — 82,3/мкл (12,5-236,4). Через 3 мес. терапии CD26+ ЛСК были выявлены в КМ только у 1 пациента (5,7/мкл). На сроках терапии ИТК 6, 9 и 12 мес. ни у одного пациента CD26+ ЛСК выявлены не были ни в ПК, ни в КМ. В группе пациентов без глубокого МО с длительностью терапии ИТК ≥12 мес., CD26+ ЛСК в ПК выявлялись только у пациентов с ХМЛ, резистентных к нескольким линиям терапии ИТК и с BCR/ABL1>1%. Me CD26+ЛСК составила 0,1/мкл (0,1-2,9). Ни у кого из пациентов с ХМЛ с глубоким МО, как получающих терапию ИТК, так и в РБЛ, ни в ПК, ни в КМ не были обнаружены CD26+ ЛСК. В контрольной группе CD26+ ЛСК в ПК были выявлены у 1 пациента с Ph+ ОЛЛ (BCR/ABL p190) и у 1 пациента с ХМЛ (BCR/ABL p190).

Выводы. Выявлено, что у 100% пациентов с ХМЛ в дебюте заболевания в ПК и в КМ, выявляются CD26+ ЛСК. Однако установлено, что уже на ранних сроках терапии, при определенном уровне BCR/ABL1, CD26+ ЛСК не обнаруживаются. Интересным фактом является также и то, что у пациентов с глубоким МО ни в ПК, ни в КМ CD26+ ЛСК не выявляются, что противоречит результатам зарубежных исследований (E.Abruzzese и соавт., 2018; M.Vocchia и соавт., 2020; O.Ilhan и соавт., 2020). Планируется продолжение исследования динамики CD26+ ЛСК на фоне терапии ИТК и изучение роли CD26+ ЛСК в развитии молекулярного рецидива после отмены терапии ИТК.

С.Я. Думпис¹, Б.В. Бидерман², Е.Б. Ликольд², А.Б. Судариков²

ПРИМЕНЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОВ IGHV У БОЛЬНЫХ ХЛЛ С ОЛИГОКЛОНАЛЬНЫМИ ПЕРЕСТРОЙКАМИ

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)», г. Москва

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Введение. Мутационный статус генов IGHV и стереотипность В-клеточного рецептора являются ключевыми прогностическими факторами при хроническом лимфоцитарном лейкозе (ХЛЛ). Пациенты с мутированными генами IGHV (M-CLL) характеризуются индолентным течением заболевания с существенно более высокой средней продолжительностью жизни, по сравнению с пациентами с генами IGHV без мутаций (U-CLL). Тем не менее, существующая рутинная лабораторная методика определения мутационного статуса IGHV, основанная на методе секвенирования по Сэнгеру, не дает результатов для некоторых пациентов. В случаях с более, чем одной клональной перестройкой в опухолевых клетках прочитать последовательность можно только для перестроек, образованных с генами IGHV из разных семейств. Однако, около 4% пациентов имеют две клональные перестройки, образованные при участии генов IGHV одного семейства. Кроме того, чувствительность секвенирования по Сэнгеру бывает недостаточной для проведения анализа на ранних стадиях заболевания или в начале рецидива.

Цель. Оценить возможность и целесообразность определения мутационного статуса генов IGHV с помощью рутинной лабораторной технологии секвенирования следующего поколения (NGS) в сложных случаях.

Материалы и методы. В исследование был включен материал 26 пациентов с ХЛЛ для которых секвенирование по Сэнгеру оказалось нерезультативным. Амплификацию локуса IGHV проводили с использованием двух мультиплексных

систем на основе праймеров, рекомендованных Европейской Инициативой Изучения ХЛЛ (ERIC). Подготовку библиотеки для секвенирования осуществляли набором Nextera XT (Illumina, USA) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, USA). Результаты анализировали с помощью свободного программного обеспечения MiXCR software (MiLaboratory, Россия). Определение мутационного статуса генов IGHV и стереотипности рецептора проводили с использованием баз данных IMGTV/V-QUEST и ARRest согласно рекомендациям ERIC.

Результаты. У 20 пациентов были обнаружены по две клональные перестройки, в 18 случаях эти пары были с использованием одного семейства IGHV (y 14 – VH3, y 4 – VH1). У одного пациента были перестройки генов IGHV1-69 и IGHV7-4 (в обычных условиях они амплифицируются с одного праймера) и у одного – IGHV1-69 и IGHV3-73. В 19 случаях только одна перестройка была продуктивной, у одного пациента – обе. Мутационный статус во всех данных перестройках не отличался. Таким образом, мы определили вариант U-CLL для 16 пациентов и M-CLL для 4. Кроме того, среди пациентов с U-CLL мы обнаружили двух со стереотипными рецепторами CLL#2 и одного с CLL#1, отличающимися наиболее агрессивным течением заболевания.

У трех пациентов было выявлено по одной продуктивной клональной перестройке. Вероятно, неудача секвенирования по Сэнгеру в этих случаях была связана с небольшим ко-

личеством опухолевых клеток в образце и высоким поликлональным фоном. Также у троих пациентов было обнаружено по три перестройки. В двух случаях все три перестройки были продуктивными (семейства VH3 и VH4), и количество мутаций относительно герминального гена было высоким. Анализ истории болезни показал, что в одном из этих случаев наблюдается одновременное наличие двух опухолевых заболеваний – ХЛЛ и ЛКМ. Оба эти случая были классифицированы как М-CLL. В третьем случае наблюдался основной клон (91%) с продуктивной перестройкой немутированного гена IGHV3-53 и 2 небольших немутированных клонов (<5%) с IGHV1-69 (продуктивная) и IGHV3-74 (непродуктивная).

Выводы. Наше исследование показало эффективность использования технологии NGS для определения мутационного статуса генов IGHV для случаев, когда исследование по Сэнгеру оказалось неинформативным. Мы обнаружили, что в случаях с двумя перестройками с генами одного семейства IGHV чаще встречаются варианты семейства VH3 (77,7%), варианты без мутаций IGHV также встречаются чаще. Несмотря на то, что в настоящее время метод секвенирования по Сэнгеру более удобен для данного рутинного анализа, для значительного числа сложных случаев исследование при помощи NGS позволит уточнить диагноз пациента и назначить соответствующее лечение.

К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова, В.Л. Сурин, О.С. Пшеничникова, О.А. Гаврилина, Г.А. Исинова, В.В. Троицкая, А.Н. Соколов, Т.Н. Обухова, Е.Е. Никулина, А.Б. Судариков, В.Г. Савченко

СИНДРОМ ЛИ-ФРАУМЕНИ У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

Введение. Синдром Ли-Фраумени (СЛФ) – редкое доминантно наследуемое заболевание, характеризующееся предрасположенностью к опухолям различной природы, в том числе, к опухолям кроветворной ткани. Пациентам с СЛФ и их родственникам требуются генетическое консультирование с последующим наблюдением и выбор оптимальной терапевтической тактики в случае развития онкологического заболевания.

Цель. Оценить мутационный статус гена TP53 у больных de novo Ph-негативным (В- и Т-клеточным) и Ph-позитивным ОЛЛ, лечение которых проводили по протоколам российской исследовательской группы (ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2012, ОЛЛ-2016) в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ и региональных клиниках, участниках многоцентровых исследований.

Материалы и методы. Исследование мутаций гена TP53 было выполнено 180 больным: de novo Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ (n=89), Т-клеточным ОЛЛ (n=64), Ph-позитивным В-клеточным ОЛЛ (n=27). Группа с Ph-негативным ОЛЛ (В- и Т-клеточным) составила 153 больных (85 мужчин и 68 женщин от 16 до 72 лет, медиана возраста – 30 лет): 109 пациентов, включенные в исследование с ноября 2016 г. по январь 2020 г., получали лечение по протоколу ОЛЛ-2016, 44 больных лечение проводили по протоколу ОЛЛ-2009 с марта 2009 г. по август 2016 г. Медиана наблюдения составила 19 мес. (0,57-131,3). В группу с Ph-позитивным В-ОЛЛ включено 27 пациентов (17 женщин и 10 мужчин от 23 до 78 лет, медиана возраста 33 года), им проводили лечение по протоколам ОЛЛ-2009 (n=2) в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) и ОЛЛ-2012 (n=23), двое больных получали терапию по другим протоколам. Медиана наблюдения составила 26 мес. (6,6-123,6).

Результаты. Мутации гена TP53 были обнаружены у 7,8% (n=14) больных de novo ОЛЛ. Для доказательства герминального характера мутаций и подтверждения СЛФ статус гена

TP53 оценивали в ремиссии на образцах костного мозга и периферической крови, на образцах костного мозга после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) и в тканях некроветворного происхождения. Всего в анализ было включено 5 больных (из 14, у которых были обнаружены мутации), не опухолевый биологический материал которых был доступен для исследования. Герминальный характер мутаций, свидетельствующий о наличии СЛФ, был подтвержден у 4 из 5 (В-клеточный ОЛЛ n=3, Т-клеточный ОЛЛ n=1) обследованных пациентов. Достижение ремиссии на стандартных протоколах химиотерапии было констатировано у 3 из 4 больных. Рецидивов за период наблюдения диагностировано не было. Двое больных на настоящий момент живы и находятся в полной ремиссии заболевания. Судьба одной больной, которой была выполнена алло-ТГСК, неизвестна. Только в одном случае отмечалась рефрактерность к стандартной терапии, поэтому лечение по протоколу ОЛЛ-2009 было прекращено и был начат протокол лечения рефрактерных форм ОЛЛ (блинатумомаб в сочетании с сорафенибом) в связи с наличием мутации FLT3-ITD. Была достигнута ремиссия заболевания с последующим выполнением алло-ТГСК от неродственного частично совместимого донора. На сроке +6 месяцев было констатировано отторжение трансплантата, и была выполнена повторная алло-ТГСК от того же донора. Однако, через 9 месяцев пациент умер от инфекционных осложнений вследствие повторного отторжения трансплантата.

Выводы. Гематологические злокачественные новообразования в ряде случаев могут быть обусловлены наследственной предрасположенностью. Практическим выводом работы является наблюдение, что основная часть мутаций гена TP53 у больных Ph-негативным В-клеточным ОЛЛ носит герминальный характер и ассоциирована с синдромом Ли-Фраумени.

А.Н. Зельцер, С.В. Морданов, Ю.В. Шатохин, Е.В. Бурнашева, Е.А. Бурцева, А.А. Мацуга

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ РЕДКОЙ КОМПЛЕКСНОЙ ВАРИАНТНОЙ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ У ПАЦИЕНТА С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону

Введение. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – неопластическое заболевание, для которого специфические генетические и цитогенетические изменения играют важ-

ную роль в патогенезе, прогнозе и лечении заболевания. Клональная гемопоэтическая стволовая клетка, с которой ассоциируется ХМЛ, возникает из-за реципрокной трансло-

кации t(9;22)(q34;q11) между длинными плечами хромосом 9 и 22, обычно известной как филадельфийская (Ph) хромосома. Согласно данным литературы, в 2-10% случаев заболевания ХМЛ слитный ген BCR-ABL образуется в результате так называемой вариантной или сложной транслокации. В настоящее время считается, что вариантная транслокация может затронуть любую хромосому, помимо хромосом 9 и 22. В большинстве случаев вариантная транслокация t(9;22) обнаруживается цитогенетическим методом. Чаще всего при этом дериватная хромосома 9 - der(9)t(9;22) участвует в перестройке с другой хромосомой. У большинства пациентов вариантные транслокации обычно наблюдаются на начальном этапе заболевания в хронической фазе и не обнаруживаются как новые цитогенетические отклонения во время течения заболевания. В данном сообщении описано редкое сочетание комплексных хромосомных перестроек – двухсторонней и вариантной трехсторонней Ph-позитивной транслокации 46,XX,t(6;9)(p21;q34),t(9;11;22)(q34;q13;q11.2) у пациента с ХМЛ.

Материалы и методы. Цитогенетический анализ с использованием GTG-бэндинга проводили на нестимулированной 24-часовой культуре образца аспирата костного мозга в соответствии со стандартными процедурами. Оценивали не менее 20 метафаз. FISH-исследование проводили с использованием зонда LSI BCR/ABL1 Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe (Abbott). Проанализировано 200 интерфазных ядер аспирата костного мозга.

Результаты. Пациентка Т., 1955г. рождения, диагноз ХМЛ, хроническая фаза, установлен в ноябре 2017г. (в возрасте 62 лет). Диагноз подтвержден результатами молекулярно-генетического исследования крови от 23.11.17г.: выявлена экспрессия химерного гена bcr-abl - 86,671%; FISH-исследование костного мозга: nucish(ABL×3),(BCR×3),(ABL1conBCR×1), Ph-хромосома обнаружена в 98% интерфазных ядер. При стандартном цитогенетическом исследовании костного мозга - результат не информативен. С февраля 2018 г. начат прием иматиниба 400 мг в сутки. На фоне терапии через 3 месяца от начала лечения достигнут частич-

ный гематологический ответ. Учитывая низкую комплаентность пациентки, доза иматиниба увеличена до 600 мг. При молекулярно-генетическом исследовании от 22.11.2018 и 18.04.2019 г. экспрессия гена bcr-abl составила 18,215 % и 12,220% соответственно. С ноября 2019 г. иматиниб отменен, начат прием гидроксикарабамида. В феврале 2020 г. консультирована гематологом РостГМУ. При обследовании в общем анализе крови от 25.02.2020г.: гемоглобин 90 г/л, лейкоциты 107,2×10⁹/л (эозинофилы 3%, промиелоциты 2%, миелоциты 17%, юные 15%, п/я 21%, с/я 39%, лимфоциты 2%, моноциты 1%, базофилы – 0%), тромбоциты – 698×10⁹/л. При объективном осмотре спленомегалия пальпаторно не определялась. Экспрессия химерного гена bcr-abl от 4.03.2020 г. составила 30,546%. При исследовании костного мозга 04.03.2020 г. в миелограмме выявлены бласты 3%, промиелоциты 8,9%, базофилы 1%. Результат цитогенетического исследования показал сочетание двухсторонней и трехсторонней транслокации варианта Ph-позитивного комплекса 46,XX,t(6;9)(p21;q34), t(9;11;22)(q34;q13;q11.2) во всех метафазных пластинах. Результат FISH-исследования: nucish(ABL×3),(BCR×3),(ABL1conBCR×1), Ph-хромосома обнаружена в 100% интерфазных ядер. Пациентка переведена на терапию дазатинибом в дозе 100 мг в сутки. Через 1 месяц терапии достигнут полный гематологический ответ, через 4 месяца – экспрессия гена bcr-abl снизилась и составила 0,46%.

Выводы. Появление дополнительных хромосомных aberrаций (ДХА), связанных с развитием ХМЛ, свидетельствует о клональной эволюции и клинически является предвестником прогрессии заболевания. Наличие ДХА в Ph-положительных клетках в дебюте заболевания требует более частого цитогенетического мониторинга, а в случае неудачи терапии иматинибом предпочтение отдается смене ИТК, а не повышению дозы иматиниба. Возможно, выявление данной цитогенетической аномалии у нашей пациентки при выполнении всех необходимых лабораторных исследований на этапе диагностики ХМЛ привело к более тщательному наблюдению и своевременной смене терапии.

Е.А. Зеркаленкова, С.А. Лебедева, А.Н. Борковская, О.И. Солдаткина, Е.В. Михайлова, С.А. Кашпор, А.А. Масчан, М.А. Масчан, Г.А. Новичкова, А.М. Попов, Ю.В. Ольшанская

ОСТРЫЕ ЛЕЙКОЗЫ С ПЕРЕСТРОЙКАМИ ГЕНА KMT2A У ДЕТЕЙ – ИНИЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА И МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

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

Введение. Перестройки гена гистоновой лизин-N-метилтрансферазы 2A (KMT2A) считаются первичными генетическими событиями в ряде острых лейкозов (ОЛ) и особенно распространены у детей. С одной стороны, для них показана высокая клиническая значимость как в определении прогноза заболевания, так и для определения минимальной остаточной болезни (МОБ). С другой стороны, они демонстрируют значительную гетерогенность: для KMT2A известно более 90 партнеров и различные локализации точек разрыва. Эти характеристики затрудняют начальную молекулярную диагностику и мониторинг МОБ у KMT2A-ассоциированных ОЛ.

Цель. Охарактеризовать молекулярный профиль ОЛ с перестройками гена KMT2A у детей в Российской Федерации.

Материалы и методы. В исследование было включено 570 пациентов (274 мальчика, 296 девочек) с KMT2A-положительными ОЛ в возрасте от рождения до 18 лет включительно (медиана возраста 2 года) за период с сентября 2009 года по март 2021 года. Всем пациентам проводили стандартное карiotипирование, флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH), а также ПЦР на 8 основных перестроек

KMT2A. Неизвестные перестройки анализировали высокопроизводительным секвенированием – длинной инвертированной ПЦР с подготовкой библиотек NEBNext UltraII (NEB, Великобритания), якорной мультиплексной ПЦР (ArcherDX, CO, США) или кастомизированной KMT2A-таргетной панелью (Illumina, CA, США). Полученные последовательности использовали для мониторинга МОБ методом ПЦР с пациент-специфической парой праймеров. Данные ПЦР сравнивали с МОБ, определенной методом иммунофенотипирования (ИФТ). ИФТ производили с помощью сухих реагентов Duraclone (Beckman Coulter, США) в двух комбинациях антител: CFU (для определения миелоидных клеток на разных стадиях дифференцировки) и LAIP (для выявления клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом).

Результаты. Перестройки KMT2A наиболее часто встречались у детей первого года жизни (n=165, 28,9%). Преобладающим диагнозом в исследованной когорте был миелоидный (n=287, 50,4%), реже лимфобластный ОЛ (n=257, 45,1%). Наиболее частыми вариантами в каждой группе были острый моноцитарный лейкоз (n=154, 68,1% ОМЛ) и В1-ОЛЛ (n=135, 64,0% ОЛЛ) соответственно. Перестройки

КМТ2А были успешно охарактеризованы в 534 случаях из 570 (93,7%). Всего было обнаружено 37 прямых и 43 реципрокных КМТ2А-химерных гена. Преобладали перестройки КМТ2А-MLLT3 (n=168, 29,5%), КМТ2А-AFF1 (n=97, 17,0%) и КМТ2А-MLL10 (n=82, 14,4%). Был идентифицирован 21 редкий и 8 новых вариантов перестроек КМТ2А, среди них t(11;16)(q23;q23.3)/КМТ2А-USP10, t(X;11)(q22.1;q23.3)/КМТ2А-ВТК и t(10;11)(q23;q23.3)/КМТ2А-NUTM2А. Редкие и новые варианты чаще наблюдались при ОМЛ, чем при ОЛЛ (n=27 против 19) и чаще у детей старше года, чем у детей первого года жизни (n=29 против 19).

Местоположение разрыва КМТ2А было проанализировано у 434 пациентов, в транслокации оказались вовлечены 15 различных интронов КМТ2А. Разрыв чаще располагался в интронах 9 (n=171, 39,5%) и 10 (n=165, 38,1%; нумерация по Meyer et al., 2006). Интрон 11 был задействован в сравнительно небольшой части случаев (n=60, 13,9%). КМТ2А-MLLT3 и КМТ2А-MLLT1 были ассоциированы с разрывом в интроне 10, КМТ2А-MLL10 – в интроне 9. В 17 случаях были найдены перестройки вне главного кластера точек разрыва КМТ2А, чаще при ОЛЛ, чем при ОМЛ (n=12 против 6).

О. Б. Калашникова, М.О. Иванова, Е.В. Кондакова, Т.Л. Гиндина, Е.А. Измайлова, И.М. Бархатов, Е.В. Бабенко, Н.Б. Михайлова, И.С. Мусеев, А.Д. Кулагин

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ РИСК И ПЕРСОНАЛИЗАЦИЯ ТЕРАПИИ РЕЦИДИВОВ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

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

Введение. Благодаря широкому внедрению иммунохимо-терапии (ИХТ) за последние два десятилетия прогноз пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) значительно улучшился. Однако, варианты лечения рецидивов и рефрактерных форм ХЛЛ (Р/Р ХЛЛ) долгое время оставались ограничены, а результаты их терапии неудовлетворительны. Этот сценарий радикально изменился с внедрением в клиническую практику ингибиторов сигнальных путей (ИСП). Согласно обновленным в 2018 году рекомендациям iwCLL для стратификации риска при ХЛЛ, рекомендуется выполнение FISH исследования, дополненного скринингом мутационного статуса гена TP53. Но, в связи с использованием ограниченного набора зондов, этим методом удается выявить аномалии только в пределах четырех часто вовлеченных хромосом. В результате клиницист имеет лишь частичное представление о цитогенетическом пейзаже ХЛЛ. В свете предположения, что комплексный кариотип (КК) является предиктором ответа на терапию, обуславливающим рефрактерность как к ИХТ, так и к ИСП, выявление и определение его прогностической значимости становится все более актуальным.

Цель. 1) определение и оценка значимости факторов, влияющих на эффективность терапии Р/Р ХЛЛ в условиях практического здравоохранения; 2) определение оптимальных условий назначения ИСП у пациентов с Р/Р ХЛЛ; 3) оценка полноты прогностической информации, получаемой перед началом терапии Р/Р ХЛЛ, для выбора терапевтической тактики.

Материалы и методы. Ретроспективно проанализированы данные из первичной медицинской документации 947 больных ХЛЛ, наблюдаемых в ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Терапию получали 443 (47%) из них. Из 267 (60%) пациентов с Р/Р ХЛЛ 180 получали только лекарственное лечение: 113 – только ИХТ, 67-ми пациентам назначались ИСП. В качестве прогностических маркеров оценивались: возраст на начало 2-й линии терапии, ответ на терапию 1-й линии, раннее (<24 мес.) или позднее прогрессирование после терапии 1-й ли-

нотерапии, число линий терапии, наличие дефекта гена TP53 и КК. С учетом клональной эволюции при ХЛЛ, для анализа степени значимости этих предикторов использовался регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса с временно-зависимыми переменными.

Результаты. Независимыми факторами, статистически значимо снижающими риск неблагоприятного исхода, стали: достижение ответа на первую линию терапии (отношение рисков (ОР) 0,38; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,20 – 0,72; p = 0,003) и число линий проводимой терапии (ОР 0,56; 95% ДИ 0,37 – 0,86; p = 0,008). Фактор назначения ИСП не достиг статистической значимости в плане прогностического влияния (p = 0,597). При этом, применение только ИХТ во второй и последующих линиях оказалось значимым предиктором неблагоприятного исхода (ОР 2,25; 95% ДИ 1,09 – 4,63; p = 0,028). Не имели независимого статистического значения в плане прогноза факт рецидива после первой линии терапии и возраст ≥65 лет. Наличие генетического риска с высокой статистической значимостью оказывало влияние на клинический прогноз, как в случае наличия дефекта гена TP53 с исключенным или неизвестным статусом по КК (ОР 10,54; 95% ДИ 4,25 – 26,17; p < 0,001), так и в случае наличия КК (ОР 14,08; 95% ДИ 5,77 – 34,35; p < 0,001). При этом статистическую значимость в качестве предиктора неблагоприятного исхода показал также фактор неизвестного статуса по КК при отсутствии поломки гена TP53 (ОР 4,15; 95% ДИ 1,72 – 10,00; p = 0,002).

Выводы. Молекулярное профилирование КМТ2А-ассоциированных ОЛ выявило их высокую гетерогенность с наибольшей частотой КМТ2А-MLLT3 и вовлечения 9-го интрона КМТ2А. Работа поддержана грантом РФФИ №17-29-06052 и грантом Президента №МК-1645.2020.7.

нии, число линий терапии, наличие дефекта гена TP53 и КК. С учетом клональной эволюции при ХЛЛ, для анализа степени значимости этих предикторов использовался регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса с временно-зависимыми переменными.

Результаты. Независимыми факторами, статистически значимо снижающими риск неблагоприятного исхода, стали: достижение ответа на первую линию терапии (отношение рисков (ОР) 0,38; 95% доверительный интервал (ДИ) 0,20 – 0,72; p = 0,003) и число линий проводимой терапии (ОР 0,56; 95% ДИ 0,37 – 0,86; p = 0,008). Фактор назначения ИСП не достиг статистической значимости в плане прогностического влияния (p = 0,597). При этом, применение только ИХТ во второй и последующих линиях оказалось значимым предиктором неблагоприятного исхода (ОР 2,25; 95% ДИ 1,09 – 4,63; p = 0,028). Не имели независимого статистического значения в плане прогноза факт рецидива после первой линии терапии и возраст ≥65 лет. Наличие генетического риска с высокой статистической значимостью оказывало влияние на клинический прогноз, как в случае наличия дефекта гена TP53 с исключенным или неизвестным статусом по КК (ОР 10,54; 95% ДИ 4,25 – 26,17; p < 0,001), так и в случае наличия КК (ОР 14,08; 95% ДИ 5,77 – 34,35; p < 0,001). При этом статистическую значимость в качестве предиктора неблагоприятного исхода показал также фактор неизвестного статуса по КК при отсутствии поломки гена TP53 (ОР 4,15; 95% ДИ 1,72 – 10,00; p = 0,002).

Выводы. 1) В качестве независимых клинических факторов, снижающих риск неблагоприятного исхода Р/Р ХЛЛ, статистическую значимость показали достижение ответа на терапию первой линии и число линий проводимой терапии. Наибольшую прогностическую ценность в качестве предикторов неблагоприятного исхода ХЛЛ показали дефект гена TP53 и КК с отношениями рисков 10,54 и 14,08, соответственно (p<0,001 для каждого фактора). 2) С учетом независимого неблагоприятного прогностического влияния фактора назначения ИХТ при Р/Р ХЛЛ, оптимальными сроками

применения ИСП можно рассматривать все случаи Р/Р ХЛЛ. В то же время, использование ИСП в качестве единственного агента в случаях неблагоприятного кариотипа не является оптимальным. 3) Текущие клинические рекомендации по обследованию пациентов с ХЛЛ, нуждающихся в терапии,

не дают полной информации в плане предикторов прогноза. Требуется их дальнейшая разработка с учетом имеющейся доказательной базы и современных технологий выявления комплексного кариотипа.

Е.В.Клеина¹, С.В. Волошин¹, Ю.С. Вокуева¹, О.Д. Муштакова¹, Л.С. Мартыненко¹, М.П. Бакай¹, Ю.С. Руженкова¹, Е.В. Карягина³, О.С. Успенская⁴, И.С. Зюзгин⁵, С.С. Бессмельцев¹, А.В. Четчин¹, И.С. Мартынкевич¹

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ ПРИ ЛИМФОМЕ ИЗ КЛЕТОК МАНТИЙНОЙ ЗОНЫ

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

² Клиника Шарите, Берлинский медицинский университет, г. Берлин

³ Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 15», г. Санкт-Петербург

⁴ Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница», г. Санкт-Петербург

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Введение. Лимфома из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ) - В-клеточная лимфома с самой высокой частотой нестабильности генома. Дополнительно к наиболее часто встречающейся транслокации t(11;14)(q13;q32) у большинства пациентов выявляются неблагоприятные вторичные молекулярные изменения и хромосомные aberrации: делеции, дупликации и амплификации участков хромосом, содержащих гены, контролирующие регуляцию клеточного цикла, репарацию поврежденной ДНК, передачу сигнала и апоптоз. Дополнительные хромосомные аномалии ассоциированы с агрессивным клиническим течением опухоли и снижением общей выживаемости.

Цель. Выявить частоту встречаемости хромосомных и молекулярно-генетических aberrаций, обуславливающих крайне неблагоприятное течение лимфомы из клеток мантийной зоны.

Материалы и методы. Приведены результаты цитогенетического и FISH-исследований 75 пациентов с диагнозом ЛКМЗ. Стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ) выполнялось методом G-banding на клетках костного мозга или периферической крови. Транслокация t(11;14)(q13;q22), перестройка локусов генов TP53/17p13, MYC/8q24 определялись FISH исследованием с использованием локус-специфичных ДНК-зондов к комплементарным им нуклеотидным последовательностям.

Результаты. Согласно данным последних международных исследований, среди пациентов с ЛКМЗ выделяют наиболее агрессивную подгруппу «double-hit» ЛКМЗ с плеоморфным/бластотидным морфологическим вариантом опухоли, рефрактерным течением заболевания и крайне неблагоприятным прогнозом. «Double-hit» ЛКМЗ характеризуются наличием транслокаций как с вовлечением гена CCND1/11q13, так и С-MYC/8q24 (перестройка и амплификация).

Стандартное цитогенетическое исследование выполнено у 51 больного ЛКМЗ. Патологический кариотип был обнаружен у 25/51 (49,0%) пациента. Высокоспецифическая транслокация t(11;14)(q13;q22) при исследовании кариотипа выявлялась у 23/51 (45,1%) больных. Комплексные нарушения кариотипа обнаруживались у 16/51 (31,4%) пациентов. Параллельное применение FISH метода позволило выявить транслокацию t(11;14)(q13;q22) дополнительно у 18/51 (35,3%) больных. Это были пациенты с нормальным кариотипом при СЦИ. Таким образом, благодаря комплексному подходу с применением СЦИ и FISH методов в диагностике ЛКМЗ, транслокация t(11;14)(q13;q22) обнаружена у подавляющего количества пациентов 41/51 (80,4%).

Исследование FISH методом перестроек генов С-MYC/8q24, TP53/17p13 и транслокации t(11;14)(q13;q22) показало следующие результаты. Перестройки гена

С-MYC/8q24 выявлены у 16/75 (21,3%) пациентов, из которых 1/16 (6,3%) - транслокация с вовлечением С-MYC/8q24, 15/16 (93,7%) - амплификация гена С-MYC/8q24. В группе пациентов с изменениями С-MYC/8q24 СЦИ выполнено у 11/16 (68,8%) пациентов. Хромосомные aberrации обнаруживались у 7/11 (63,6%) пациентов, из которых в 6/7 (85,7%) случаев выявлялись комплексные изменения кариотипа. По современным представлениям о прогнозе ЛКМЗ, комплексный кариотип также относят к неблагоприятному прогностическому фактору. Важно отметить, что в составе комплексного кариотипа помимо транслокации t(11;14)(q13;q32) обнаруживались и другие aberrации, ассоциированные с крайне неблагоприятным течением заболевания. Это, в первую очередь, численные и структурные изменения хромосомы 17 - у 4/6 (66,7%) исследуемых больных, а также моносомия хромосомы 7 - у 1/6 (16,7%) пациентов. Транслокация t(11;14)(q13;q32) при анализе кариотипа выявлялась у 7/11 (63,6%) пациентов. FISH - методом aberrации, затрагивающие ген TP53/17p13 обнаружены у 8/16 (50,0%) больных. Применение FISH-анализа наряду со СЦИ позволило у всех пациентов выявить также изменения гена С-MYC/8q24, которые не удалось детектировать при исследовании кариотипа, и в ряде случаев с нормальным кариотипом и отсутствием митозов обнаружить транслокацию t(11;14)(q13;q32) и делецию TP53/17p13.

У 59/75 (78,7%) пациентов изменения гена С-MYC/8q24 выявлены не были. В данной группе СЦИ выполнено у 39/59 (66,1%) пациентов. Хромосомные aberrации обнаруживались у 18/39 (46,2%) пациентов, в том числе комплексные изменения кариотипа - в 10/18 (55,6%) случаев. Транслокация t(11;14)(q13;q32) в кариотипе выявлялась у 16/18 (88,9%) пациентов. При этом неблагоприятные дополнительные aberrации (ДХА), такие как del(7q), аномалии хромосомы 3, делеция гена TP53/17p13 обнаруживались у 2/18 (11,1%), 3/18 (16,7%), 3/18 (16,7%) соответственно. FISH - методом делеция 17 хромосомы обнаружилась у 10/59 (16,9%) больных, в том числе у пациентов с отсутствием делящихся клеток и нормальным кариотипом.

Предварительный анализ клинических данных и показателей общей выживаемости пациентов с неблагоприятными генетическими aberrациями в сравнении с группой стандартного риска больных нашей исследуемой группы с ЛКМЗ показал значимое неблагоприятное влияние. Во всех случаях клиническое течение характеризовалось быстрой прогрессией, продвинутыми стадиями заболевания и низкой выживаемостью больных. Медиана выживаемости составила 8 месяцев, в отличие от группы стандартного риска, где медиана общей выживаемости не достигнута.

Выводы. Комплексный подход к генетической диагно-

стике ЛКМЗ с использованием СЦИ и FISH-исследований позволяет выделять группу крайне неблагоприятного прогноза «double-hit» ЛКМЗ и с комплексными нарушениями кариотипа. Также было показано, что в группе пациентов с изменениями гена C-MYC/8q24 чаще выявлялись ДХА, являющиеся неблагоприятным фактором прогноза: комплексные изменения кариотипа (наличие трех и более аберраций) – 85,7% и 55,6%, и аберрации с вовлечением TP53/17p13

– 50,0% и 16,9%. Выявление изменений в данных генах ассоциировано с более короткими показателями общей выживаемости. Полученные результаты исследования позволяют выделить группу пациентов высокого риска с необходимостью безотлагательного применения высокодозной химиотерапии и современных эффективных терапевтических подходов.

Я.А. Кожеевникова¹, Н.В. Рисинская², Е.Б. Ликольд², Б.В. Бидерман²,
И.С. Февралева², А.Б. Сударииков²

ВЕРИФИКАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА HP196–197INS (6 П.Н.) В ДОМЕНЕ TAD2 ГЕНА СЕВРА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

1 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, г. Москва, 2 Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Введение. Ген СЕВРА кодирует транскрипционный фактор С/ЕВР α (ССААТ/enhancer-binding protein alpha), который участвует в дифференцировке клеток миелоидного ряда. С/ЕВР α состоит из С-концевого ДНК-связывающего домена bZIP (basic leucine zipper) и двух доменов трансактивации TAD1 и TAD2 на N-конце. Мутации СЕВРА обнаруживаются в 5–14% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Пациенты с ОМЛ с двойными мутациями СЕВРА отличаются благоприятным прогнозом, что определяет выбор терапии. Было показано, что вставка в 6 п.н. в домене TAD2 (HP196–197ins), приводящая к появлению в белке четырех гистидин-пролиновых повторов вместо трех, распространена как среди пациентов с ОМЛ, так и в здоровой популяции, поэтому на данный момент этот полиморфизм не учитывают при стратификации риска. Рутинно для обнаружения мутаций в гене СЕВРА используется ПЦР с последующим фрагментным анализом. Этот метод позволяет обнаруживать лишь вставки и делеции в участках гена и не выявляет точечные мутации; более того, он не позволяет определить точную локализацию и последовательность вставки/делеции. Таким образом, на данный момент полиморфизм HP196–197ins в домене TAD2 может быть ошибочно принят за мутацию при определении группы риска.

Цель. Сравнить встречаемость вставки 6 п.н. в домене TAD2 гена СЕВРА у пациентов с ОМЛ, здоровых людей контрольной группы и у пациентов с гемобластозом немиелоидного происхождения (хроническим лимфоцитарным лейкозом, ХЛЛ) в российской популяции; разработать тест-систему для подтверждения расположения вставки в области гистидин-пролиновых повторов.

Материалы и методы. В исследование включены 117 пациентов с de novo ОМЛ и 100 пациентов с ХЛЛ (70 пациентов без мутаций в области вариабельных участков тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGHV), 30 пациентов с мутациями IGHV), проходящих лечение в Национальном Медицинском Исследовательском Центре гематологии (Москва, Россия) и 120 здоровых людей из контрольной группы. Геномная ДНК была выделена из образцов костного мозга/периферической крови, взятых во время постановки диагноза; у пациентов с ОМЛ мы также анализировали образцы, взятые после лечения. Тестирование образцов ДНК мы проводили с помощью ПЦР с флуоресцентно меченым прямым (F) праймером FAM-5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3

и обратным (R1) праймером 5'-CGTTGCTGTCTTTGTCCACCGAC TTCTT-3' (T Benthous et al, 2008) с последующим фрагментным анализом (на генетическом анализаторе ABI3130, Thermofisher Scientific, США). Сравнение частот встречаемости вставки у пациентов проводилось с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для верификации вставки 6 п.н. как HP196–197 нами была предложена система праймеров: прямого F (T Benthous et al, 2008) и обратного R 5'-TGCGGGTGC GG GTGC GG GT-3' (был подобран нами комплементарным непосредственно последовательности тандемных гистидин-пролиновых повторов).

Результаты. Вставка 6 п.н. в домене TAD2 была обнаружена у 7 из 117 (6%) пациентов с ОМЛ, у 9 из 120 (7,5%) здоровых контролей и у 10 из 100 (10%) пациентов с ХЛЛ (у 8 из 70 пациентов без мутации IGHV и у 2 из 30 пациентов с мутацией IGHV); различия между этими группами статистически не значимы ($\chi^2 = 1,234$, $df = 2$, $p = 0,540$). Во всех исследованных нами образцах вставка обнаруживалась в гетерозиготной форме. У всех пациентов с ОМЛ с обнаруженной во взятых до лечения образцах вставкой 6 п.н. эта вставка также была обнаружена после лечения. С помощью предложенной нами системы праймеров было подтверждено, что вставка находится в сайте гистидин-пролиновых повторов во всех случаях. Подбор специфичных праймеров затруднен, так как вставка представляет собой дупликацию уже трижды повторяющейся последовательности. Нами подобран праймер, комплементарный и дикому аллелю, и аллелю со вставкой. В результате в случае наличия вставки HP196–197 на электрофореграмме появляются два пика (180 п.н. и 186 п.н.) с соотношением высоты 3:1 (дикий аллель - 180 п.н., мутантный аллель - два продукта (180 и 186 п.н.)).

Выводы. Встречаемость вставки 6 п.н. в домене TAD2 (HP196–197ins) одинакова у пациентов с ОМЛ и контрольных групп и совпадает с данными по европейской популяции. Вставка у пациентов с ОМЛ сохраняется после лечения, что свидетельствует о ее наследственной природе. В исследованных нами когортах во всех случаях обнаруженные в домене TAD2 вставки 6 п.н. являлись полиморфизмами HP196–197ins, что, однако, не исключает появления более редких вариантов вставки 6 п.н. у пациентов с ОМЛ. Предложенная нами система праймеров позволит отделить полиморфизм HP196–197INS от мутаций, возможно, имеющих клиническое значение.

Ж.М. Козич¹, В.Н. Мартинков¹, А.Е. Силин¹, М.Ю. Жандаров¹, Ж.Н. Пугачева¹, Л.Е. Коротаяева¹, Л.А. Смирнова²

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ, ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ И МОНОКЛОНАЛЬНОЙ ГАММАПАТИИ НЕУТОЧНЕННОГО ЗНАЧЕНИЯ У ЖИТЕЛЕЙ ГОМЕЛЬСКОГО РЕГИОНА БЕЛАРУСИ

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

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

Введение. Множественная миелома (ММ) - злокачественная опухоль из В-лимфоцитов, которая в большинстве случаев проходит стадию моноклональной гаммапатии неопределенного значения (МГНЗ). Выявление молекулярно-генетических, цитогенетических маркеров имеет прогностическое и клиническое значение.

Цель. Определить прогностическую значимость возможных факторов риска у пациентов Гомельского региона.

Материалы и методы. В исследование включено 141 человек (102 человека с МГНЗ и 39 человек с впервые выявленной ММ), находившиеся под наблюдением в ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» в период с марта 2018 г. по июнь 2020г. Средний возраст пациентов в группе с МГНЗ составил 60,5 лет, при ММ - 65 лет. Всем пациентам выполнены общеклиническое исследование, иммунофенотипическое, иммуногистохимическое, цитогенетическое и молекулярно-генетическое исследование костного мозга.

Результаты. В нашем исследовании у всех пациентов ММ с выраженной экспрессией CD138 при иммуногистохимическом исследовании отмечалось значимое превышение показателей ФНО, интерлейкина-6, интерлейкина-8 и чаще определялась секреция легких цепей лямбда ($p < 0,001$). В группе МГНЗ выявлена сильная положительная корреляция между повышенной продукцией легких цепей каппа в крови и их экспрессией в костном мозге ($p < 0,001$; $R = 0,790$), а так же между уровнями IL-6 и IL-8 в периферической крови ($p < 0,001$; $R = 0,785$). За время наблюдения у двоих пациентов МГНЗ с данными характеристиками заболевание трансформировалось во ММ. Значительное превышение уровня фактора некроза опухоли (ФНО- α) относительно нормального значения выявлено у пациентов с ММ (59,5%) и МГНЗ (39,1%).

Хромосомные изменения плазматических клеток костного мозга при ММ включали t(4;14) - 1 пациент, у 2 пациентов t(4;16), у 1 пациента делеция 13q и у 1 пациента гиперплоидия и полиплоидия. У одного пациента выявлены нарушения, связанные с 4, 14 и 16 хромосомой. Прогрессия ММ у данного пациента наступила спустя 4 месяца после про-

веденной аутологичной трансплантации периферической стволовой клетки и двух курсов поддерживающей терапии леналидомидом. У пациентки из группы ММ с выявленной делецией 13q заболевание сопровождалось наличием множественных мягкотканых компонентов различной локализации с инфильтрацией мышц спины и ягодичных мышц опухолевыми плазматическими клетками. За период наблюдения и лечения у пациентки развилась резистентность к полихимиотерапии (отсутствие ремиссии после 3 курсов VCD (бортезомиб, дексаметазон, циклофосфан), 1 курса PAD (доксорубин, дексаметазон, бортезомиб)). В течение 3 месяцев заболевание прогрессировало в острый плазмоклеточный лейкоз с последующей гибелью пациентки на фоне острого тромбоза легочной артерии. При исследовании пациентов с МГНЗ, только у 2 выявлены хромосомные изменения в виде полиплоидии. В группе с ММ мутация V600E гена BRAF выявлена у одной пациентки. Клинически заболевание у нее сопровождалось выраженным деструктивным синдромом с наличием множественных мягкотканых компонентов. Мутации гена k-RAS выявлены у 3-х пациентов с ММ. У двоих пациентов из группы заболевание оказалась резистентным к терапии бортезомибом (не достигнута ремиссия после 4 курсов VCD (бортезомиб, дексаметазон, циклофосфан). При тестировании мутаций BRAF и k-RAS в группе МГНЗ у пациентов определен нормальный генотип, возможно мутации не были выявлены по причине относительно небольшого количества плазматических клеток в исследуемых образцах.

Выводы. Выявление цитогенетических и молекулярно-генетических повреждений позволяет уже на первых этапах диагностики ММ и МГНЗ отнести пациентов к группе риска и сделать выбор тактики ведения.

З.В. Конова, Е.Н. Паровичникова, И.В. Гальцева, М.Ю. Дроков, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов, М.В. Довыденко, В.А. Васильева, Л.А. Кузьмина, В.Г. Савченко

НЕБЛАГОПРИЯТНОЕ ВЛИЯНИЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

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

Введение. МОБ-положительный статус является независимым прогностическим фактором для пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), определение минимальной остаточной болезни (МОБ) необходимо для стратификации пациентов на группы риска и принятия решения о модификации терапии на дотрансплантационном этапе. Генетическое и иммунофенотипическое разнообразие ОМЛ представляет собой серьезную проблему для проведения мониторинга МОБ в повседневной клинической практике. Для оценки МОБ наиболее широко применяются методы многоцветная

проточная цитометрия (МПЦ) и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Имеются данные относительно независимого влияния предтрансплантационного МОБ-статуса на результаты трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Цель. Оценить влияние предтрансплантационного МОБ-статуса, определяемого с помощью МПЦ и ПЦР, на долгосрочные результаты алло-ТГСК.

Материалы и методы. В исследование было включено 103 пациента с ОМЛ, которым была выполнена алло-ТГСК в

НМИЦ гематологии в период с сентября 2015 года по декабрь 2020 года. Все пациенты были в первой полной морфологической ремиссии перед алло-ТГСК. Медиана наблюдения за пациентами составила 16,8 (1-55) месяцев. С целью определения МОБ всем пациентам было выполнено иммунофенотипическое исследование образцов костного мозга с помощью 6-цветной МПЦ (BD FACS Canto II, США) непосредственно перед алло-ТГСК. МОБ методом МПЦ выявляли с помощью сочетания двух подходов: метод «пустых мест» и поиск клеток с лейкоз-ассоциированным иммунофенотипом. У 46 пациентов из 103 в дебюте заболевание выявлялись молекулярные маркеры, такие как NPM1, FLT3, RUNX1-RUNX1T1, MLL и CBFB-MYH11, что позволило определить МОБ-статус у этих пациентов с помощью ПЦР. Общую (ОВ) и безрецидивной выживаемость (БРВ), а также вероятность развития рецидива (БРР) рассчитывали по методу Каплана-Майера. Сравнение показателей выживаемости в группах выполняли при помощи log-rank теста. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты. С помощью МПЦ из 103 пациентов у 19 (18,4%) был определен МОБ-положительный статус (МОБ+). Из 42 пациентов, имевших молекулярные маркеры, МОБ методом ПЦР была выявлена у 12 (28,6%) пациентов. У 9 пациентов МОБ выявлялась при МПЦ и ПЦР исследовании (МОБ+/+), 3 пациента были МОБ-положительны только при ПЦР (МОБ ПЦР+МПЦ-), 10 пациентов были МОБ+ только методом МПЦ (МОБ МПЦ+) из них 1 больная имела молекулярный маркер и была МОБ- методом ПЦР, 33 пациента были МОБ-негативны двумя методами (МОБ -/-), 48 пациентов были МОБ- только

методом МПЦ (МОБ МПЦ-), ПЦР исследование им не проводилось. Мы объединили в одну группу всех МОБ+ пациентов, вне зависимости от метода исследования, и сравнили результаты алло-ТГСК МОБ+ пациентов, МОБ МПЦ- и МОБ -/-: у пациентов с МОБ+ статусом была достоверно худшая ОВ (44% против 58% против 92%, $p=0,0035$), БРВ (30% против 52% против 92%, $p<0,0001$) и более высокую БРР (67% против 16% против 0%, $p<0,0001$). Кроме того, необходимо отметить, что МОБ-/- пациенты имели достоверно лучшую БРВ по сравнению с МОБ МПЦ- пациентами (92% против 52%, $p=0,0096$). Мы проанализировали результаты алло-ТГСК у МОБ+ и МОБ- пациентов в зависимости от метода детекции МОБ и получили схожие данные, статистический анализ выявил значимые различия между МОБ+ и МОБ-негативными пациентами, вне зависимости от метода исследования: у пациентов с МОБ+ статусом была худшая ОВ (МПЦ: 35% против 67%, $p=0,0003$; ПЦР: 59% против 92%, $p=0,0059$), БРВ (МПЦ: 20% против 63%, $p<0,0001$; ПЦР: 40% против 88%, $p<0,0001$) и более высокую БРР (МПЦ: 77% против 11%, $p<0,0001$; ПЦР: 56% против 5%, $p<0,0001$).

Выводы. Детектируемая перед алло-ТГСК МОБ – прогностический фактор риска развития рецидива, оказывающий влияние на ОВ и БРВ, вне зависимости от метода определения (МПЦ или ПЦР). Исследование МОБ у пациентов с ОМЛ непосредственно перед выполнением трансплантации аллогенного костного мозга может использоваться для стратификации риска алло-ТГСК и выявления пациентов, которым необходимо проведение профилактической посттрансплантационной терапии с целью предотвращения рецидива заболевания.

Д.В. Курочкин¹, Т.Н. Субботина^{1,2}, Е.А. Дунаева³, К.О. Миронов³, А.С. Хазиева⁴, Е.В. Васильев⁴

СКРИНИНГ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ CALR С ПОМОЩЬЮ HRM-АНАЛИЗА

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

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

³Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

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

Введение. В соответствии с клиническими рекомендациями ВОЗ, анализ соматических мутаций в гене CALR, а также мутаций в генах JAK2 и MPL включен в список критериев диагностики Ph-миелопролиферативных новообразований (Ph-МПН). В гене CALR было обнаружено более 50 различных вариантов мутации, среди которых наиболее частыми являются делеция 52 п.н. (p.L367fs * 46), также называемая типом 1, и вставка 5 п.н. (p.K385fs * 47), также называемая типом 2 (88%). Остальные 12% – это менее частые вставки, делеции или их комбинации. Поэтому важно разработать недорогой скрининговый тест, который может обнаружить любые мутации в анализируемом фрагменте ДНК гена CALR.

Цель. Целью этого исследования был скрининг CALR мутаций с помощью HRM-анализа с использованием термомодулятора CFX96 и программного обеспечения Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США) у пациентов с Ph-МПН.

Материалы и методы. В исследование были включены 12 CALR«+» образцов ДНК с различными вариантами мутаций от пациентов с диагнозом Ph-МПН. Уровень аллельной нагрузки находился в диапазоне 27 - 50%. HRM-анализ выполняли с использованием набора реагентов Precision Melt Supermix в присутствии красителя Eva Green (Bio-Rad, США). ПЦР с дополнительной стадией плавления с высоким разрешением проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: денатурация при 95° С в течение 2 минут, затем 40 циклов при 95° С в течение 10 секунд, 57° С

в течение 30 секунд и 72° С в течение 30 секунд. Программа плавления с высоким разрешением состояла из денатурации при 95° С в течение 30 секунд, ренаатурации при 60° С в течение 1 минуты и плавления при 60-95° С с градиентом 0,2° С в 10 секунд. Для наиболее распространенных вариантов CALR мутаций (с.1092_1143del и с.1154_1155insTTGTC) был проанализирован порог обнаружения мутантного аллеля. Для этого было выполнено разведение законтроированных образцов дикого типа и с мутацией для получения проб с различными уровнями аллельных нагрузок 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13% несущих выявленные ранее мутации.

Результаты. По результатам анализа CALR «+» образцов в программе «Precision Melt Analysis» все кривые плавления продуктов амплификации четко разделены на 3 кластера относительно образцов без мутаций. В частности, три CALR«+» образца с классической мутацией типа 2 (с.1154_1155insTTGTC) и образец с мутацией (с.1154_1155insGTGTC) были отнесены в единый кластер №1. Шесть других образцов с мутацией типа 1 (с.1092_1143del) и образец с мутацией (с.1111_1141del) также были отнесены к одному кластеру №2. Образец с сочетанными мутациями (с.1128_1129insCTTTGCTT и с.1131_1133delAGA) был отнесен к отдельному кластеру №3. Порог обнаружения в случае анализа мутаций с.1092_1143del и с.1154_1155insTTGTC составил 12,5% наличия мутантного аллеля в образце.

Выводы. Используемый метод позволил выявить все варианты мутаций в гене CALR. Таким образом, HRM-анализ, проведенный на CFX96, позволяет проводить скрининг высокоспецифичных мутаций в 9 экзоне гена CALR для диагно-

стики Ph-МПН. Включение такого скринингового исследования в алгоритм лабораторного тестирования повышает эффективность и доступность молекулярно-генетических технологий в диагностике Ph-МПН.

О.В. Лазарева¹, Е.С. Малолеткина¹, В.Н. Девирнык¹, Т.Ц. Гармаева^{1,2}, В.Г. Савченко¹

ДОСТУПНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ (ЦГ) И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ (МГТ) НА ЭТАПАХ ОКАЗАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ ВЫСОКОТЕХНОЛОГИЧНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ (СМП И ВМП) ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ВЫЕЗДНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ В 80 СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

²Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Введение. В рамках проведения выездных мероприятий (ВМ) с целью организационно-методического и научно-методического руководства медицинскими организациями (МО) субъектов РФ по повышению качества, эффективности и доступности оказания СМП и ВМП по профилю «гематология/онкология» осуществлена оценка использования ЦГ и МГТ в диагностике, определении тактики лечения и прогноза, мониторинге минимальной остаточной болезни (МОБ) при гемобластозах в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями.

Цель. Оценить возможности применения ЦГ и МГТ в диагностике и мониторинге терапии больных гемобластозами в 80 субъектах РФ по результатам ВМ.

Материалы и методы. Организация проведения ВМ осуществлялась в соответствии с регламентами Минздрава России. Участниками ВМ проведена экспертная оценка качества оказания и организации гематологической службы в регионе, в том числе на основе разработанных чек-листов, опросников, данных федеральной статистической отчетности, анализа медицинской документации, обсуждений основных проблем диагностики сложных случаев, контроля выполнения рекомендаций экспертов НМИЦ гематологии по заключениям телемедицинских консультаций в части лабораторно-диагностических возможностей, а также оснащенности, инфраструктуры лабораторных служб МО субъектов РФ, маршрутизации профильных и смежных пациентов и логистике их биологических образцов для верификации диагноза, выбора программной терапии, мониторинга МОБ, эффективности терапии на время визитов во все профильные и смежные подразделения всех МО гематологической и смежных служб субъектов РФ.

Всего посетили 80 субъектов РФ, 90 городов и городских округа, 3 филиала НМИЦ гематологии – Алтайский (г. Барнаул), Красноярский (г. Красноярск) и Северный (г. Архангельск).

Результаты. За 2019-2020 годы проведено 96 ВМ, из них в профильные МО 3 уровня (областные, краевые, республиканские, окружные больницы) – 80, МО 2 уровня (городские больницы) – 26, МО 1 уровня (поликлиники) – 36, онкологические диспансеры – 52, учреждения переливания крови – 85, федеральные центры и клиники – 5 (гг. Чебоксары, Уфа, Саратов, Благовещенск, Чита). По предварительной оценке возможностей лабораторно-диагностических служб 80 субъектов РФ показано: цитологические исследования, включая анализ признаков дисплазии ростков кроветворения, выполняют в полном объеме в 31 из 80 субъектов РФ (39%); цитохимические исследования в полном объеме – в 35 (44%), вообще не проводят эти исследования в Чукотском

АО, Республике Ингушетия; иммунохимические исследования сыворотки крови и мочи в полном объеме – в 28 (35%), лекарственный мониторинг с определением концентраций метотрексата, циклоспорина – в 21 (26%), в 14 из 21 (66,7%) выполняют только один из указанных тестов); проточная цитофлуориметрия по чек-листам внедрена в 52 субъектах РФ, однако, только в половине из них присутствуют необходимое оборудование и обученный персонал. ЦГ и МГ исследования больным гемобластозами возможно выполнить в 21 из 80 субъектов РФ (26%), но в половине из них определяют только единичные маркеры хронических миелопролиферативных заболеваний. При анализе маршрутизации профильных пациентов и биоматериала выявлено, что большинство МО 80 субъектов РФ направляют на ЦГ и МГ исследования в федеральные центры гг. Москва и Санкт-Петербург. Ключевым вопросом доступности диагностики и охвата ЦГ и МГТ больных на всех этапах оказания СМП и ВМП в регионах, включая определение МОБ при гемобластозах, является финансирование оплаты исследований. В ряде субъектов РФ частично решают эти вопросы, заключая договоры на выполнение ЦГ и МГ методов исследований в центрах Москвы и СПб, исключительно на момент диагностики заболевания. Для большинства же пациентов (65% субъектов РФ, где данные вопросы не решены), финансирование возможности/необходимости выполнения и транспортировки биообразцов на ЦГ и МГ исследования происходит за счет собственных средств больного и родственников, включая оценку эффективности лечения и мониторинга МОБ.

Выводы. При описательном анализе данных возможностей современной лабораторно-диагностической службы субъектов РФ по определению МОБ больным гемобластозами с помощью ЦГ и МГТ представлен довольно низкий уровень доступности выполнения высокотехнологичных методов исследований на этапах оказания СМП и ВМП, что, несомненно, влияет на качество оказания медицинской помощи профильным больным в субъектах РФ.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ АБЕРРАЦИЙ НА РЕЗУЛЬТАТЫ АЛЛО-ТГСК У ПАЦИЕНТОВ С МДС

«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой» Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова», г.Санкт-Петербург

Введение. Цитогенетические aberrации являются важным прогностическим фактором у пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС). Однако, существующая схема оценки цитогенетического риска основана на группах пациентов, леченных с помощью поддерживающей терапии, а не аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Цель. Оценить влияние хромосомных aberrаций на результаты алло-ТГСК в смешанной когорте пациентов с миелодиспластическим синдромом.

Материалы и методы. В исследование включено 70 пациентов с различными вариантами МДС, которым в период с 2008 по 2020 годы была проведена алло-ТГСК в клинике НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой. Возраст больных варьировал от 1 года до 67 лет (медиана – 36 лет). Среди них было 14 (20%) детей и 56 (80%) взрослых с первичным и вторичным МДС (62 и 8 больных соответственно). Трансформация в ОМЛ после алло-ТГСК имела место у 5 (7%) пациентов. Алло-ТГСК от совместимого неродственного и совместимого родственного доноров была проведена у 51 (73%) и 13 (18%) больных соответственно. У 6 (9%) пациентов ТГСК выполнена от гаплотипичного донора.

Результаты. Численные и структурные хромосомные аномалии были обнаружены у одинакового числа больных (n=19, 27%). Сочетание численных и структурных хромосомных нарушений имело место у 14 (20%) пациентов. Нормальный кариотип был представлен в 18 (26%) наблюдениях. Цитогенетические аномалии на момент алло-ТГСК были выявлены у 45 (64%) больных. По структуре выявленных цитогенетических нарушений когорты пациентов распреде-

лена на 5 групп по прогностической системе оценок IPSS-R. В группы «очень хорошего» и «хорошего» прогноза вошли 2 (3%) и 23 (33%) пациента соответственно. Группа «промежуточного» прогноза состояла из 11 (16%) пациентов, в то время как группы «плохого» и «очень плохого» прогноза были представлены 27 (38%) и 7 (10%) пациентами соответственно. Комплексный кариотип (с тремя и более aberrациями хромосом на метафазу) наблюдался у 8 (11%) пациентов. Один аномальный цитогенетический клон был выявлен у 41 (58%) больных, а два и более – у 11 (16%). Однофакторный анализ показал, что вероятность 3-летней общей выживаемости (ОВ) в объединенных группах «очень хорошего» и «хорошего», «промежуточного», «плохого» и «очень плохого» цитогенетического риска составила 63%, 45% и 25% соответственно (p=0,015). Вероятность 3-летней ОВ в отдельных цитогенетических группах пациентов: с моносомией 7, перестройкой локуса 3q26, делецией 5q, комплексным кариотипом, моносомным кариотипом и прочими aberrациями составила 54%, 26%, 25%, 25%, 66%, 69% (p=0,03) соответственно, а 3-летней бессобытийной выживаемости – 38%, 42%, 0%, 25%, 33%, 51% (p=0,016) соответственно. Пациенты без комплексного кариотипа имели ОВ достоверно выше, чем без него (56% против 25%, p=0,015).

Выводы. Исследование показало, что прогностическая ценность хромосомных aberrаций сохраняет свое значение в трансплантационной когорте пациентов с МДС. Комплексный, моносомный кариотип, перестройки локуса 3q26, делеция 5q оказывают неблагоприятный прогноз на выживаемость этой группы пациентов.

И.Е. Маслюкова¹, Т.Н. Субботина^{1,2}, Е.В. Мартынова³

ОПЫТ АНАЛИЗА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», г. Красноярск

³Краевое государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница», г. Красноярск

Введение. Мутации в генах FLT3 и NPM1 чаще остальных обнаруживают при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ): в 30-40 и 25-30 % случаях, соответственно. NPM1 мутации ассоциированы с благоприятным прогнозом и, как правило, не сочетаются с хромосомными перестройками. В свою очередь пациенты с FLT3 мутациями, а именно FLT3-ITD, имеют плохой прогноз, а также их рекомендуют определять при рецидиве ОМЛ. Одновременное присутствие FLT3-ITD и NPM1 мутаций повышает выживаемость, в отличие от FLT3-ITD в отсутствии NPM1. Также обращают внимание на FLT3-TKD мутации, которые могут быть ассоциированы с резистентностью к ингибиторам тирозинкиназы. Данные об эффекте сочетания NPM1 и FLT3-TKD на выживаемость в исследованиях разнятся.

За рубежом и в Европейской части России для обнаружения и количественного анализа FLT3 и NPM1 мутаций используют фрагментный анализ (предел обнаружения от

5-10% мутантного аллеля). В Красноярском крае пациентам с ОМЛ данный вид анализа ранее не проводился.

Цель. Провести анализ соматических мутаций в генах FLT3 и NPM1 у пациентов с ОМЛ в Красноярском крае.

Материалы и методы. Было исследовано 6 пациентов (возраст от 19 до 65 лет) проходивших лечение в 2020 году в КГБУЗ «Краевая клиническая больница». Пациент №1 имел вторичный ОМЛ в исходе из миелодиспластического синдрома с избытком бластов 1, пять остальных пациентов – первичный ОМЛ с разными фенотипами (№2 – M3, №3 – M2, №4 – M4, №5 – M0, №6 – не определен). Мутации FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, а также уровень аллельной нагрузки определяли методом фрагментного анализа. Для этого ПЦР-продукты с 5'-FAM флуоресцентными метками смешивали с GeneScan™ 500LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, USA) и подвергали капиллярному электрофорезу с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, USA).

Для анализа FLT3-TKD флуоресцентно-меченные ампликоны дополнительно гидролизывали рестриктазой EcoRV (СибЭнзим, Россия). Положительные образцы секвенировали с использованием BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

Результаты. В результате проведения фрагментного анализа, исследуемые мутации были выявлены у троих из шести пациентов с ОМЛ. Наличие мутаций у этих пациентов было подтверждено секвенированием по Сенгеру. У пациента №1 с ранним рецидивом обнаружена FLT3-ITD мутация с.1774_1838-1dup, не представленная в COSMIC. Длина тандемного повтора (ITD) составила 153 bp и по данным секвенирования включает часть 14 экзона и весь 14 интрон. Уровень аллельной нагрузки мутации составил 18%. До нашего исследования образец костного мозга пациента был направлен в The Laboratory for Personalized Molecular Medicine (Germany). Диагностический тест методом ПЦР подтвердил наличие FLT3-ITD мутации. Также у этого пациента была обнаружена самая распространенная NPM1 мутация типа A с.860-863dup с аллельной нагрузкой 34%. Данные об анализе исследуемых мутаций у пациента в дебюте заболевания отсутствуют, однако хромосомных аномалий у него нет. У

пациента №2 с поздним рецидивом обнаружена наиболее распространенная FLT3-TKD с.2503G>T с уровнем аллельной нагрузки более 50%. Полученные данные были подтверждены методом аллель-специфичной ПЦР Лабораторией молекулярной гематологии НМИЦ Гематологии (Москва). Также есть данные, что у этого пациента выявлен PML-RARA.

У пациента №6 с ранним рецидивом обнаружена FLT3-ITD мутация с ITD длиной 99 bp и аллельной нагрузкой 5%. Секвенирование подтвердило наличие мутации, т.к. на секвеннограмме видно окончание фрагмента дикого типа и продолжение мутантного фрагмента. Но из-за аллельной нагрузки, ниже порога обнаружения метода, достоверно определить вариант мутации не представляется возможным. Также есть данные, что в дебюте у этого пациента выявлен RPN1-EVI1.

Выводы. Впервые в Красноярском крае был использован метод фрагментного анализа для обнаружения и количественной оценки FLT3 и NPM1 мутаций у пациентов с ОМЛ. Использованный метод позволил выявить мутации у троих из шести пациентов с ОМЛ и провести количественную оценку уровня аллельной нагрузки. Кроме того, была выявлена новая FLT3-ITD мутация, не представленная в COSMIC и затрагивающая интронную область.

В.А. Мисюрин¹, И.В. Ярош^{2,3}, М.В. Дмитриева¹, А.А. Рудакова¹, И.И. Краснюк³, М.А. Барышникова¹

СИСТЕМА ДОСТАВКИ БЕЛКОВ С ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

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

²Акционерное общество «Р-Фарм», г. Москва

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва

Введение. Гранзим В (Гр В) является мощнейшим инициатором каспазного каскада и запуска апоптоза в клетке. Благодаря этому Гр В может использоваться как противоопухолевое средство. В настоящее время для доставки Гр В в опухолевую клетку используются CAR-T-лимфоциты. Подобные вакцины эффективны, но их производство сложно и требует больших затрат.

Цель. Разработать контейнеры для доставки Гр В и других протеолитических белков в опухолевую клетку.

Материалы и методы. В нашем исследовании использовались мышинный Гр В и трипсин. Эти белки были упакованы в липосомы по протоколу, предложенному Бенгхемом. Липосомы, содержащие трипсин, были добавлены в культуральную среду с клетками меланомы mel Kog и клеткам рака молочной железы SK-BR-3. Цитотоксический тест проводился методом МТТ. Для статистического анализа использовался критерий Уилкоксона.

Результаты. Эффективность включения Гр В и трипсина в липосомы составляла более 90%. Размер полученных липосом составлял около 320 нм. Клетки линий mel Kog и SK-BR-3 погибали в присутствии липосом с трипсином ($p < 0,01$ для обеих линий). Цитотоксичность 0,5 мг/мл липосом на линии mel Kog составила 22%. IC50 определить не удалось, так как не наблюдалось гибели 50% клеток.

Выводы. Как Гр В, так и трипсин могут быть помещены в липосомы, причём липосомы с трипсином обладали цитотоксической активностью. В дальнейших экспериментах мы планируем создать липосомы с рекомбинантным гранзимом В человека, и добавить к поверхности липосом антигена к антигену CD22. Планируется определить цитотоксическую активность полученной лекарственной формы на клетках CD22-экспрессирующих лимфом и В-клеточных лимфоидных лейкозов.

М.А. Михалева¹, И.С. Мартынкевич¹, Е.В. Мотыко¹, С.В. Петров¹, И.А. Булдаков¹, А.Ю. Кузшинов¹, С.В. Волошин^{1,2,3}

МУТАЦИОННЫЙ СТАТУС ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА: АПРОБАЦИЯ ТАРГЕТНОЙ NGS-ПАНЕЛИ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства Обороны Российской Федерации», г. Санкт-Петербург

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации», г. Санкт-Петербург

Введение. Технологии секвенирования нового поколения (Next-generation sequencing, NGS) произвели революцию в подходах к молекулярно-генетическим исследованиям, сделав возможным определение мутационного статуса, генетической и

эпигенетической изменчивости хронического лимфолейкоза (ХЛЛ). Идентификация драйверных мутаций позволяет глубже понять патогенез ХЛЛ, стратифицировать пациентов на прогностические группы и выбирать терапию в соответствии

с молекулярным профилем заболевания. Кроме того, данные исследования способствуют созданию и внедрению в клиническую практику новых таргетных препаратов и их комбинаций для лечения ХЛЛ.

Цель. Апробировать «Лимфоидную таргетную NGS панель генов» у пациентов с ХЛЛ, оценить мутационный профиль и изучить его возможную корреляцию с клиническими характеристиками заболевания.

Материалы и методы. В исследование было включено 27 пациентов с ХЛЛ: нелеченные (n=19) и рецидивирующие/рефрактерные (n=8). Всем пациентам диагноз ХЛЛ был верифицирован в соответствии с критериями iwCLL (iwCLL, Hallek et al., 2018). Согласно цитогенетическому анализу, пациенты были разделены на три прогностические группы: благоприятная (n=16), нейтральная (n=2) и неблагоприятная (n=9). При этом, 20 из 27 пациентов были разделены на две прогностические группы с учетом данных о мутационном статусе вариабельной области тяжелой цепи иммуноглобулина (IGHV): благоприятная (n=8) и неблагоприятная (n=12). У семи пациентов данные о мутационном статусе IGHV отсутствуют. Все пациенты имели показания к началу лечения. Схемы лечения: стандартные ритуксимаб-содержащие (n=16) и таргетные препараты (ибрутиниб (n=3), венетоклак (n=1), акалбрутиниб (n=5), комбинация венетоклак и акалбрутиниб (n=2)). Секвенирование «Лимфоидная таргетная NGS панель генов» была разработана как комплексная панель генов 117 генов, часть из которых играет ключевую роль в сигнальных клеточных путях. Образцы ДНК пациентов были получены из В-лимфоцитов крови стандартным фенол-хлороформным методом. Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina, USA) со средней глубиной прочтения 1000x. При анализе полученных данных применялся 2% порог частоты встречаемости аллеля (VAF). Клиническая значимость выявленных мутаций оценивалась с помощью баз данных COSMIC, ClinVar, gnomAD с применением in silico анализа (Cscape, Cancer Genome Interpreter, SNPs&Go).

Результаты. Было выполнено секвенирование 18 образцов пациентов. Генетические aberrации были обнаружены во всех образцах ДНК. Мы идентифицировали 776 вариантов в 85/117 генах. Частыми мутациями были KMT2C (13,7%), FAT1 (13,2%), и RYR1 (4,3%). Клиническая значимость 81,9% вариантов была определена как вероятная доброкачественная (n=370) и доброкачественная (n=258). Значение 16% (n=123) мутаций определено как неизвестное. Патогенные и вероятные патогенные мутации были идентифицированы у 72,2% пациентов (13/18) с неблагоприятным прогнозом (неблагоприятный прогноз по цитогенетике/FISH с мутированным IGHV или без него). Патогенные мутации 1,7% (n=13): SF3B1 K700E (n=3), SF3B1 G742D, TP53 Lys120Glu, NOTCH1 P2514fs*4, NOTCH1 Q2404*, BRAF D594G, BRAF K601N, PTEN (c.1321-2A> T), MGA R1246X, JAK3 V722L, IDH2 T352P. Вероятно патогенными вариантами (n=3) были ATM Y2080, CNF1 M2217V и XPO1 E571K. Обнаруженный вариант мутации (Lys120Glu) в гене TP53 часто связан с наличием делеции 17p13, что подтверждено методом FISH и коррелирует с неблагоприятным клиническим течением заболевания у пациента CLL-024. У трех пациентов с del13q14 была патогенная мутация SF3B1 K700E, которая ускоряет развитие ХЛЛ за счет альтернативного сплайсинга РНК и активации mTORC1. Следует отметить, что у двух пациентов (CLL-023, CLL-024) с неблагоприятным прогнозом были обнаружены мутации в генах BCR и NOTCH2 неопределенной значимости. Существующий подход к интерпретации результатов не позволяет сделать однозначный вывод о клинической значимости вариантов в генах IDH2 и JAK3, несмотря на известное патогенное действие вариантов.

Выводы. Полученные данные демонстрируют апробацию «Лимфоидной таргетной NGS панели генов» и возможность применения NGS в рутинной клинической практике. Учитывая, что клиническое значение части мутаций в настоящее время не определено, необходимы дальнейшие исследования с использованием технологии NGS.

Е.В. Морозова, Ю.Ю. Власова, М.В. Барабанщикова, Т.А. Рудакова, К.С. Юровская, Д.К. Жоголев, И.О. Туртанова, Т.Л. Гиндина, И.М. Бархатов, И.С. Моисеев, А.Д. Кулагин

РОЛЬ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ С АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

*«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова», г. Санкт-Петербург*

Введение. Дополнительные хромосомные aberrации (ДХА) высокого риска служат одним из предикторов развития бластного криза и входят в число неблагоприятных прогностических факторов у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). Многие пациенты приобретают ДХА на «продвинутых» фазах заболевания, большинству из них показано проведение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Цель. Оценить эффективность алло-ТГСК в ретроспективной когорте пациентов с ДХА.

Материалы и методы. В исследованную когорту включены 42 пациента, у которых на этапе до алло-ТГСК были выявлены ДХА. В 37 (88%) случаях были выявлены ДХА, ассоциированные с высоким и в 5 (12%) случаев – с низким риском. После выявления ДХА терапия менялась в 41 (98%) случае. В 38 (91%) случаях ДХА были выявлены в Ph-положительных, и в 4 (9%) – в Ph-отрицательных клетках. У большинства (26, 62%) пациентов определялся комплексный кариотип. Все пациенты получили алло-ТГСК с режимом кондиционирования со сниженной интенсивностью доз, состоящим из флударабина в дозе 180 мг/м² и бусульфана (8-12 мг/кг) или мелфалана (140 мг/м²).

Хромосомные aberrации описывались согласно критериям ISCN 2016. Стратификация ДХА по группам риска выполнялась согласно рекомендациям R. Nehlmann и соавт. (2020 г.). Общая выживаемость (ОВ) определялась как число дней от даты алло-ТГСК до даты смерти, а безрецидивная выживаемость (БРВ) – как число дней с момента проведения алло-ТГСК до рецидива или смерти.

Результаты. Медиана срока наблюдения после алло-ТГСК составила 31 (1-123) месяц. Приживление трансплантата зафиксировано у 38 (91%) пациентов. Кумулятивный риск смерти, не связанной с рецидивом заболевания, к дню +100 и через 1 год после алло-ТГСК составил 10% и 20% соответственно. Острая реакция трансплантат-против-хозяина (oРТПХ) 2-4 степени была зафиксирована у 9 (21%), oРТПХ 3-4 степени – у 7 (17%), а легкая, средняя или тяжелая форма хронической РТПХ – у 2 (5%), 5 (14%) и 1 (3%) пациента соответственно. Трехлетний кумулятивный риск рецидива составил 46%. В 4 случаях развился молекулярный (MP), в 3 – цитогенетический (CP) и в 10 – гематологический рецидив (GR). В 7 случаях при рецидиве были зафиксированы ДХА, аналогичные в 5 случаях с теми, что выявлялись перед алло-ТГСК. Во всех случаях кроме одного ДХА выявлялись при GR. В этих случаях в даль-

нейшем наблюдалось прогрессирование заболевания вне зависимости от применяемой противорецидивной терапии: повторная алло-ТГСК в 2, применение ранее применявшихся ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) в 1 или ИТК следующей линии в 2, инфузии донорских лимфоцитов (ИДЛ) в 1 случае. У одного пациента удалось успешно вылечить ЦР заболевания за счет применения ИДЛ. Как правило, ДХА определялись в течение первого года после алло-ТГСК с медианой срока выявления на +228(40-1058) день. У пациентов без ДХА на этапе после алло-ТГСК в 3 случаях развился МР, в 2 –ЦР и в 5 –ГР. В этой группе в 6 случаях наблюдалось прогрессирование и в 4 случаях был достигнут полный молекулярный ответ на фоне проводимой терапии.

Е.В. Мотыко¹, О.В. Блау², Л.Б. Полушкина¹, Л.С. Мартыненко¹, М.П. Бакай¹, Ю.С. Руженкова¹, Е.В. Клеина¹, Н.Б. Павленко¹, А.М. Раджабова¹, Е.В. Карягина³, О.С. Успенская⁴, И.С.Зюзин⁵, С.В. Волошин¹, С.С. Бессмельцев¹, А.В. Четкин¹, И.С. Мартынкевич¹

ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АБЕРРАЦИЙ НА ПРОГНОЗ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ МИЕЛОБЛАСТНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург;

²Клиника Шарите, Берлинский медицинский университет, г. Берлин;

³Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 15», г. Санкт-Петербург;

⁴Городское бюджетное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница», г. Санкт-Петербург

⁵Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

Введение. Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) являются злокачественными заболеваниями крови, требующими тщательного и персонализированного подхода к лечению, включающего как стандартные протоколы химиотерапии, так и использование таргетных препаратов, а также трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Известно, что в группе больных с промежуточным прогнозом наблюдается высокая гетерогенность течения заболевания, ответов на проводимую терапию и клинических исходов. Это обусловлено наличием в популяции лейкозных клеток опухолевых клонов с различными мутациями, которые могут появляться на разных этапах развития заболевания. В связи с этим в 2017 году европейским сообществом ELN была предложена классификация, включающая мутации в ряде генов, имеющие значительное влияние на прогноз. Несмотря на это, в настоящее время, когда секвенирование нового поколения дает возможность оценить все многообразие имеющихся у пациента aberrаций, требуется расширять данную классификацию, что позволит принимать наиболее оптимальные решения в назначении терапии больным ОМЛ.

Цель. Проанализировать влияние ряда типичных для больных ОМЛ мутаций на прогноз заболевания.

Материалы и методы. В исследование включено 620 пациентов с ОМЛ: 169 больных, проходивших обследование в РНИИГТ (Санкт-Петербург), и 451 больной – в клинике Шарите (Берлин). Цитогенетическое исследование выполнено методом G-дифференциального окрашивания хромосом. Скрининг aberrаций в генах FLT3, NPM1, DNMT3A, IDH1/2 проводили методом ПЦР и прямого секвенирования.

Результаты. Мутации обнаружены у 343/620 (55,3%) больных. Одиночные повреждения генов детектировались у 199/343 (58,0%) пациентов. Достоверно чаще мутации определялись у больных с НК ($p=0,001$). Наличие мутации FLT3-ITD ассоциировалось с ухудшением медиан общей и безрецидивной выживаемости (ОВ и БРВ): 11,3 и 15,8 месяцев (FLT3-ITD-), $p=0,005$; 10,0 и 13,3 месяцев (FLT3-ITD+), $p=0,009$, соответственно. Также детектировали связь уровня аллельной нагрузки FLT3-ITD (пороговый уровень – ITDвыс $\geq 0,5$, ITDниз $< 0,5$) с длительностью ОВ: группа с ITDниз/ITD- жила значительно дольше, чем с ITDвыс ($p=0,028$). Группа пациен-

Пятилетняя ОВ составила 40% (95%CI 22%-57%), 5-летняя БРВ – 28% (95%CI 13%-46%). Между группами пациентов с ДХО высокого и низкого риска не было выявлено статистически достоверной разницы в ОВ (60% и 34%; $p=0,6$) или БРВ (40% и 28%; $p=0,8$).

Выводы. Алло-ТГСК эффективный метод лечения для значительной части пациентов с ДХА высокого риска. В большинстве случаев появление ДХА на этапе после алло-ТГСК ассоциировано с развитием рефрактерного к лечению ГР. Раннее направление пациентов в трансплантационный центр при выявлении ДХА высокого риска и своевременное проведение алло-ТГСК могут улучшить прогноз в этой группе.

тов с одиночной мутацией NPM1+ показывала значительно лучшую ОВ и БРВ по сравнению с другими больными (27,4 и 13,9 мес., $p=0,040$; 19,3 и 12,0 мес., $p=0,049$, соответственно). Негативное влияние (тенденция) мутаций в гене DNMT3A прослеживалось при оценке ОВ пациентов – 12,0 (DNMT3A+) и 15,0 (DNMT3A-) мес. ($p=0,112$). Обнаружили тенденции к тому, что наличие IDH1+ мутаций коррелировало с лучшей ОВ по сравнению с группой без мутаций ($p=0,092$), а наличие полиморфизма rs11554137 в гене IDH1 – с ухудшением ОВ в группе больных с НК ($p=0,186$).

У 144 пациентов обнаружили различные комбинации мутаций (от 2-х до 5-ти). Показано, что мутации в генах FLT3 (FLT3-ITD), NPM1, DNMT3A и IDH2 достоверно чаще выявлялись сочетано с другими мутациями ($p=0,001$). Чаще встречались следующие комбинации мутаций: NPM1+/FLT3-ITD+ (20,8%), NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+ (8,3%) и FLT3-ITD+/DNMT3A+ (8,3%). Больные с выявленной одиночной мутацией имели значительно более длительную ОВ по сравнению с пациентами с 2-мя мутациями (18,1 и 12,2 мес., $p=0,003$). Для больных с NPM1+ наиболее неблагоприятной по длительности ОВ дополнительной мутацией была FLT3-ITD (27,4 и 9,2 мес., $p=0,019$), а также сочетание NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+ (27,4 и 14,6 мес., $p=0,141$). Пациенты с DNMT3A+ имели тенденцию к ухудшению ОВ при наличии мутации FLT3-ITD (17,3 и 7,1 мес., $p=0,074$).

Выводы. Мутации в генах FLT3, DNMT3A, IDH1/2, NPM1 имеют высокую частоту встречаемости в группе больных промежуточного риска, определяя прогноз заболевания. Исследованные мутации существенно влияют на прогноз, при этом важно учитывать тип мутации, ее аллельную нагрузку и наличие дополнительных мутаций. Наличие 2-х мутаций у одного больного значительно снижает ОВ по сравнению с пациентами с одной мутацией. Худший прогноз имеют больные с сочетанием мутаций NPM1+/FLT3-ITD+, NPM1+/FLT3-ITD+/DNMT3A+, DNMT3A+/FLT3-ITD+. Тщательный анализ генетических повреждений у больных ОМЛ позволяет наиболее точно установить прогноз и подобрать адекватную терапию.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», г. Алматы, Республика Казахстан

Введение. Лейкоз – это опухолевое новообразование гемопоэтической ткани с первичным поражением костного мозга, морфологическим субстратом которого является бластная клетка. Современные исследования показали, что возникновение опухоли всегда связано с перестройкой генетического аппарата гемопоэтической клетки. Хромосомные и молекулярно-генетические аберрации, играя основную роль в патогенезе острых лейкозов, определяют морфологические, иммунологические и клинические особенности заболевания.

Цель. Ретроспективный анализ структуры и частоты хромосомных аберраций у детей с первично диагностированным острым лейкозом.

Материал и методы. Был проведен ретроспективный анализ историй болезни детей, находившихся на стационарном лечении онкогематологического отделения АО «Научного центра педиатрии и детской хирургии» г. Алматы за период с 2015 по 2017 гг. Было исследовано 310 историй болезни с первично диагностированным острым лейкозом. Материалом исследования послужили клетки костного мозга, полученного при пункционной биопсии грудины или подвздошной кости. Цитогенетические исследования проводились в лаборатории центра стандартным цитогенетическим методом с помощью дифференциального окрашивания хромосом. Хромосомные препараты анализировались на микроскопах исследовательского класса с использованием программ автоматического кариотипирования. При отсутствии митозов, а также при подозрении на определенные варианты острого лейкоза по результатам иммунологических и морфологических исследований и клинических проявлений заболевания при нормальном кариотипе дополнительно проводили исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зондов «Vysis Inc., Abbott Laboratories».

Результаты. Число пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) составило 22,6% (n=70), острый лимфобластный лейкоз – 75,5% (n=234), недифференцированные и бифенотипические варианты (другие виды лейкоза) встречены в 1,9% случаев (n=6). При цитогенетическом и молекулярно-цитогенетическом (методом *in situ* гибридизации) исследованиях опухолевых бластных клеток костного мозга среди 310 пациентов у 158 пациентов (51%) были выявлены

различные хромосомные аберрации. Хромосомные аномалии, ассоциированные с устойчивыми вариантами ОМЛ и ОЛЛ согласно классификации ВОЗ, были обнаружены у 117 больных (74% от всех случаев с хромосомными нарушениями). В 26% (n=41) имели место другие аберрации, не связанные с ВОЗ-вариантами острых лейкозов. Из 117 пациентов с рекуррентными хромосомными перестройками в бластных клетках ОЛ, случаи ОМЛ составили 18% (n=21), ОЛЛ – 82% (n=96). Нормальный кариотип наблюдался у 102 пациентов (33%). Не удалось получить метафазы для цитогенетического анализа у 50 больных (16%). Иммунофенотипирование клеток костного мозга выявило преобладание В-клеточных лейкозов (91,8%) над Т-клеточными лейкозами (8,2%). В структуре В-ОЛЛ доминировали *common* (70,4%) и *pre-B* (13,3%) подварианты. Молекулярно-цитогенетическое исследование методом FISH с ДНК-зондами к известным хромосомным перестройкам было проведено 98 пациентам. У 66 пациентов было обнаружено наличие химерных генов, у 32 пациентов данный метод не обнаружил перестройки генов. Из 66 обнаруженных случаев, у 37 было выявлено ETV6/RUNX1 - t(12;21), у 5 BCR/ABL - t(9;22), у 7 MLL rearranged - t(v;11q23.3), у 2 TCF3-PBX1 - t(1;19), у 3 c-MYC - t(8;14), у 5 RUNX1/RUNX1T1 - t(8;21), у 4 PML/RARA - t(15;17), у 3 CBFB/MYH11 - inv(16).

Выводы. В детской популяции преобладает лимфобластный вариант острого лейкоза (75,5%), занимающий ведущую роль в структуре ОЛ у детей разного возраста. На долю ОМЛ приходится 22,6% всех ОЛ. Самой частой хромосомной перестройкой у пациентов с ОЛЛ была гипердиплоидия хромосом бластных клеток (10,6%), среди структурных перестроек доминирует транслокация t(12;21)(p13;q22)/ETV6-RUNX1, которая была выявлена у 37 (16%) пациентов. Самой частой перестройкой при ОМЛ была t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1, которая идентифицирована у 14 (20%) больных. Таким образом, определенные диагностические хромосомные перестройки связаны с благоприятным прогнозом, тогда как другие предсказывают высокий риск неэффективности стандартного лечения, что изначально помогает клиницистам выбрать более интенсивную терапию (высокодозные режимы химиотерапии, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток).

Е.Е. Никулина, А.С. Пшеничный, Н.В. Рисинская, К.С. Сычевская, Н.В. Рыжикова,
Ю.В. Сидорова, А.Б. Судариков

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ МАЛОКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ

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

Введение. В гематологической лабораторной практике нередко приходится осуществлять диагностику с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) на архивных образцах с низким содержанием клеток, таких как мазки периферической крови (ПК) и костного мозга (КМ), отпечатки лимфатических узлов. Цитологические образцы бывают необходимы при отсутствии иного альтернативного дебутного материала. Важно подобрать эффективную методику выделения нуклеиновых кислот для проведения ПЦР-анализа, обеспечивающую достаточное количество и качество мате-

риала. На данный момент существует большое количество методик выделения нуклеиновых кислот из различных биологических материалов. Однако, не все из них позволяют выделить ДНК/РНК из малого количества материала, в том числе, из образцов изначально не предназначенных для выделения нуклеиновых кислот.

Цель. Сравнить методики экстракции ДНК на твердом носителе (сорбенте) и с помощью протеиназы К из сложного материала с низкой клеточностью: мазки КМ, ПК, ликвора.

Материалы и методы. Проанализированы 23 неокра-

шенных (нативных) и несколько окрашенных мазков костного мозга от пациентов с ОМЛ (в том числе ОПЛ), ОЛЛ, МДС, а также 10 образцов ликвора больных с ЛПЗ, наблюдавшихся в «НМИЦ гематологии» в период с 2020 г. На цитологические мазки наносили 1 каплю (20 мкл) соответствующего буфера, клетки снимали пипетированием с поверхности стекла и переносили в пробирки типа «Эппендорф». Ликвор центрифугировали 5 мин при 7000 тыс. об/мин. Экстракцию ДНК из смывых клеток или ликвора проводили двумя методами: 1 – набором реагентов для экстракции ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ООО «НекстБио», Россия) по протоколу производителя; 2 – методом прямого лизиса клеток с протеиназой К. Во втором случае клетки суспендировали в 20 мкл лизисного буфера (0,5% NP40, 50 mM Трис (pH 8,3), 75 mM KCl, 20 мкг протеиназы К), инкубировали при 56 °C на протяжении 60 мин с последующим нагреванием в течение 15 минут до 100 °C (для инактивации протеиназы К). Лизаты подвергались центрифугированию длительностью 1 мин при 13 000 об/мин. Для каждой реакции использовали по 2 мкл супернатанта (1/10 от общего количества). Количество полученной ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4.0 («Thermo Fisher Scientific», США) с использованием набора для количественной оценки образцов с низким содержанием ДНК и РНК dsDNA HS (на 100 реакций) в соответствии с протоколом производителя. Качество исследованной ДНК оценивали методом определения STR-профилей на основе мультиплексного ПЦР-анализа 19 локусов при помощи наборов COrDIS Plus («СИНТОЛ», Россия) согласно протоколу производителя. Фрагментный анализ ПЦР-продуктов выполняли на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (СИНТОЛ). Для получения полного STR-профиля образца использовали от 0,2 нг (оптимально – от 0,5 нг) недеградированной ДНК. При фрагментном анализе STR-профилей ПЦР-продукт, полученный таким образом, не требует дополнительного разведения.

В.А. Овсепян, Е.В. Трегубова, Н.В. Минаева

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ И РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ С РАЗНЫМИ СТАДИЯМИ В ДЕБЮТЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

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

Введение. Стадия хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) является интегральным клиническим параметром, отражающим степень распространенности опухолевого процесса, величину лимфоцитоза и характер угнетения нормальных ростков гемопоэза. К числу возможных факторов этиопатогенеза злокачественных новообразований относятся конституциональные особенности генома, в частности, функционально значимый полиморфизм генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (ФБК), таких как GSTP1 и NQO, и вовлеченных в регуляцию апоптоза (РА) генов TNFA и MDM2.

Цель. Изучить ассоциации полиморфных локусов 609C>T, 309T>G, -308G>A и 1051Ile>Val соответственно генов TNFA и GSTP1 с разными стадиями ХЛЛ в диагностический период.

Материалы и методы. Материалом для исследования полиморфизмов послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови 235 больных ХЛЛ в возрасте от 33 до 82 лет (медиана возраста – 63 года) и с соотношением мужчин и женщин в диагностический период, равным 139/96. Стадирование болезней проводилось согласно классификационной системе К. Rai. Пациенты были разбиты на 3 группы в соответствии со степенью риска по T.J. Kipps et al. (2017), а именно: 107 больных со стадиями 0 и I составили группу низкого риска, 99 пациентов со стадией II — группу среднего

Результаты. Оба метода сравнимы по затратности и времени исследования (1 ч 15 мин и 55 мин, время выделения ДНК на твердом носителе короче на 20 минут). Методом с использованием протеиназы К была выделена ДНК из 23 (100%) цитологических образцов с концентрацией в диапазоне 0,3–4,6 нг. Экстракция ДНК с использованием твердого носителя (сорбента) была успешной для 20 препаратов из 23 (87%), диапазон концентраций составлял 0,05–1,5 нг. То есть при обработке мазков КМ или ПК выход ДНК методом прямого лизиса в 3 раза превышал таковой при выделении на сорбенте. Выход ДНК из образцов ликвора с применением протеиназы составил в среднем до 10 нг, а на сорбенте – в среднем до 2 нг. Качество ДНК, оцененное по определению STR-профилей на ДНК выделенной на сорбенте и с протеиназой К при низких концентрациях исходного материала (0,27 и 0,3 нг/мл) было одинаковым. ДНК, выделенные из нескольких окрашенных мазков, не отличались существенно по концентрации и качеству от выделенных из нативных (неокрашенных) мазков.

Выводы. Сравнительная оценка методов показала большую эффективность экстракции ДНК методом прямого лизиса клеток с протеиназой К. Его можно рассматривать как эффективную экспресс-методику выделения качественной ДНК из сложного материала с низкой клеточностью. Основным недостатком выделения ДНК на твердом носителе (сорбенте), является низкий выход нуклеиновой кислоты. Метод прямого лизиса с протеиназой К может быть использован для работы с архивными цитологическими образцами для определения аллельной нагрузки различных мутаций при гемобластозах. При этом основная часть мазка КМ или ПК может быть по-прежнему использована для подсчета общего количества клеток и бластных элементов (миелограммы).

риска и 29 больных со стадиями III и IV — группу высокого риска. Группа сравнения состояла из 315 здоровых неродственных жителей Волго-Вятского экономического района России, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Генотипирование полиморфных локусов NQO1*609C>T, MDM2*309T>G и TNFA*308G>A выполняли разными вариантами аллель-специфичной ПЦР, а локуса GSTP1*1051Ile>Val — методом ПЦР-ПДРФ. Ассоциацию полиморфных локусов изучаемых генов с разными стадиями ХЛЛ в период диагностики оценивали по отношению шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при уровне доверия 95%.

Результаты. В ходе проведенного сравнительного анализа распределения частот аллелей полиморфных локусов генов ФБК и РА в группах сравнения и больных ХЛЛ с разными стадиями в диагностический период установлено, что аллель TNFA*308A встречался статистически значимо с большей частотой в основных группах со стадиями 0-I и II, чем в группе сравнения (18,4 vs 6,3%, $\chi^2=27,08$, $p=2,0E-7$, $pcor=6,0E-6$; и 12,1 vs 6,3%, $\chi^2=7,04$, $p=0,008$, $pcor=0,024$ соответственно), а аллель GSTP1*105Val — чаще в основной группе со стадией II, чем в контрольной (45,8 vs 32,5%, $\chi^2=7,04$, $p=0,008$, $pcor=0,024$). Встречаемость аллелей TNFA*308A и GSTP1*105Val была выше и в группе больных со стадиями III-IV по сравнению с группой здоровых лиц, однако межгруп-

повые различия не достигали статистической значимости (соответственно $p=0,1$ и $p=0,13$). Выявлено достоверное различие по частоте встречаемости аллеля GSTP1*105Val между группами больных со стадиями 0-I и II-IV (соответственно 45,1% vs 54,9%, $\chi^2 = 5,6$, $p=0,018$); не обнаружено подобного межгруппового различия в отношении аллеля TNFA*308A. Суммирование приведенных выше данных дает основание считать распределение частот аллеля -308A на всех стадиях болезни в диагностический период равномерным и, наоборот, распределение частот аллеля GSTP1*105Val неравномерным. Согласно показателю отношения шансов, данный аллель ассоциирован с поздними (II-IV) стадиями ХЛЛ (OR=1,58 95%CI: 1,08-2,32, $p=0,018$) в момент постановки диагноза.

Распределение частот вариантов генов NQO1 и MDM2 в группах больных с разными стадиями ХЛЛ в диагностический период статистически значимо не отличалось от такового в

группе сравнения.

Возможный механизм вовлечения аллеля GSTP1*105Val в патогенез ХЛЛ, скорее всего, связан с более быстрым темпом нарастания опухолевой массы у больных при носительстве аллеля 105Val гена GSTP1 по сравнению с 105Ile. Подобное нарастание может быть результатом экспансии более агрессивных опухолевых клонов, появляющихся с большей частотой вследствие неполноценной инактивации экзо- и эндогенных генотоксикантов ферментом 105Val и/или неэффективной элиминации клеток, несущих онкогенные повреждения ДНК и гаплотип GSTP1, содержащий аллель 105Val. В результате этого к моменту диагностики заболевания накапливается опухолевая масса, соответствующая более поздним стадиям.

Выводы. Таким образом, впервые установлена ассоцированность аллеля 105Val гена GSTP1 с поздними (II-IV) стадиями ХЛЛ в момент постановки диагноза.

Н.А. Огнерубов¹, М.А. Огнерубова²

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ И РИСК АНЕМИИ

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина», г. Тамбов

²Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Тамбовский областной онкологический клинический диспансер», г. Тамбов

Введение. В настоящее время разработка ингибиторов контрольных точек иммунного ответа PD-1/PDL-1 представляет крупный прорыв в терапии злокачественных опухолей. Причем этот метод, наряду с полихимиотерапией, является одобренной опцией также и для лечения распространенных стадий опухолевого процесса. При принятии решения о выборе метода в каждом случае необходимо учитывать профиль токсичности препарата, т.е. постоянно взвешивать пользу и риск. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, наряду со специфическими нежелательными явлениями иммуноопосредованного характера, также способны вызывать и общетоксические, включая гематологические проявления, к которым относится анемия. По данным литературы анемия у этой категории больных встречается редко, составляя 0-5 %.

Цель. Изучить частоту анемии у пациентов, получавших иммунотерапию ингибиторами контрольных точек иммунного ответа PD1/PDL-1.

Материал и методы. Исследование проведено у 30 пациентов с различными нозологическими вариантами – меланомой, мелко-, немелкоклеточным раком легкого, раком желудка, почки и мочевого пузыря. У всех больных имел место местнораспространенный (5/16,7 %) и метастатический опухолевый процесс (25/83,3 %). В качестве препаратов для иммунотерапии применяли ниволумаб, пембролизумаб и атезолизумаб в соответствии с принятыми рекомендациями. По критериям ВОЗ, анемия диагностируется при снижении концентрации гемоглобина менее 12 г/дл у женщин и 13 г/дл у мужчин. С целью классификации анемии мы определяли средний объем эритроцитов и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроцитарной массе (МСV, МСНС).

Результаты. Среди обследованных, мужчин было 21/70 %, а женщин - 9/30 %, т.е. имеет место преобладание лиц мужского пола. Возраст больных колебался от 55 до 76 лет, медиана – 66 лет. Среди всех пациентов были предлеченными 24 (80 %), а 6 больным иммунотерапия назначалась в качестве терапии 1 линии. В доступной литературе имеются сообщения, что анемия наблюдается у 1,62 млрд. во всем мире, что составляет 24,8 % глобального населения. Согласно полученным нами данным, анемия I-II степени наблюдалась у 14 (46,7 %) больных, что несколько ниже, чем у пациентов, получавших химиотерапию, у которых она встречалась в 67,2 % случаях. В группе иммунотерапии I степень анемии (по критериям СТСАЕ v. 5.0) преоб-

ладала, составляя 8 (57,1 %) наблюдений, а на долю II степени приходилось 6 (42,9 %) случаев. Различия между ними не достоверны. По среднему объему эритроцитов и среднему содержанию гемоглобина в них, нами установлено достоверное преобладание гипохромной нормоцитарной анемии относительно лиц, получавших химиотерапию ($p=0,01$). Нейтропения диагностирована в 9 наблюдениях, что составило 30 %. При этом, 1 степень была у 8 (88,8 %) больных, а 3 степень наблюдалась только в 1 (11,1 %) случае. Тромбоцитопения выявлена у 2 пациентов. Максимальные проявления гематологической токсичности развивались при проведении первых 4 введений иммунопрепаратов. Увеличение частоты гематологической токсичности в наших наблюдениях, вероятнее всего, обусловлено предлеченностью пациентов.

Выводы. При применении ингибиторов контрольных точек иммунного ответа PD1/PDL-1 у больных злокачественными новообразованиями различных солидных локализаций частота анемии как проявление гематологической токсичности составила 46,7 %. При этом отмечается достоверное преобладание гипохромной нормоцитарной анемии. Нейтропения встречается в 30 % случаев, чаще преобладала 2 степень. Полученные данные необходимо учитывать при выборе оптимального метода лечения у больных с распространенными стадиями с учетом рисков и преимуществ. Коррекция анемии является обязательной опцией сопроводительного лечения при иммунотерапии.

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

ДИНАМИКА МОЛЕКУЛЯРНОГО ОТВЕТА И ЗНАЧЕНИЕ ПОТЕРИ МО4 ДЛЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ БЕЗ МОЛЕКУЛЯРНОГО РЕЦИДИВА У БОЛЬНЫХ ХМЛ ПОСЛЕ ОТМЕНЫ ТЕРАПИИ ИТК В ИССЛЕДОВАНИИ RU-SKI

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

Введение. В различных исследованиях по прекращению терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) у больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) с глубоким молекулярным ответом (МО) критерии молекулярного рецидива различались. В ранних исследованиях молекулярный рецидив констатировали при потере глубокого МО (включая потерю МО4, уровень BCR-ABL > 0,01% по международной шкале IS). В новых рекомендациях ELN (Hochhaus и соавт., 2020) в качестве критерия молекулярного рецидива после отмены ИТК предложено рассматривать потерю большого молекулярного ответа (БМО) – превышение уровня BCR-ABL более 0,1% IS. Варианты кинетики лейкозного клона после отмены ИТК и значение потери глубокого МО для сохранения возможности наблюдения в РБЛ требуют изучения.

Цель. Оценить взаимосвязь потери МО4 с дальнейшей потерей БМО у больных ХМЛ на ранних и поздних сроках после прекращения терапии ИТК и описать варианты динамики опухолевого клона в период наблюдения без терапии.

Материалы и методы. В проспективное исследование RU-SKI включено 98 больных в хронической фазе ХМЛ, получавших терапию любыми ИТК ≥ 3 лет, с глубоким МО (BCR-ABL $\leq 0,01\%$ IS) длительностью ≥ 2 лет. Мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) проводили с помощью количественного определения экспрессии гена BCR-ABL методом ОТ-ПЦР РВ ежемесячно в первые полгода после отмены ИТК, каждые 2 месяца (мес.) с 6 по 12 мес. и 1 раз в 3 мес. после года наблюдения без терапии. Потеря МО4 определялась как уровень BCR-ABL $> 0,01\%$ и $< 0,1\%$. Прием ИТК возобновляли в случае развития молекулярного рецидива, который определялся как потеря БМО (BCR-ABL $> 0,1\%$). Выживаемость без потери БМО рассчитывалась методом Каплана-Майера, для сравнения использовался Лог-ранк критерий.

Результаты. Медиана (Ме) наблюдения после отмены ИТК составила 40 мес. (от 28 до 57 мес.) на момент анализа (июнь 2020). Потеря БМО и МО4 наблюдалась у 48(49%) и 38(39%) больных соответственно. У 42(87%) больных потеря БМО произошла в течение первых 6 мес. после отмены ИТК. Выживаемость без потери БМО во всей группе больных составила 51% (95% ДИ 41 - 61%) через 36 мес. после пре-

кращения терапии ИТК. У 10 (26%) из 38 больных с потерей МО4 сохранялся БМО, в то время как у 28(74%) пациентов с потерей МО4 при последующем наблюдении произошла потеря БМО. Выживаемость без потери БМО от момента первой задокументированной потери МО4 составила 29% (95% ДИ 15 - 44%) и 24% (95% ДИ 10,5 - 38%) через 12 и 36 мес. после отмены терапии соответственно. При сравнительном анализе выживаемости без потери БМО у больных с ранней потерей МО4 на сроках ≤ 3 мес. после отмены ИТК (n=25) и с поздней потерей МО4 на сроках > 3 мес. после отмены ИТК (n=13) отмечено, что выживаемость без потери БМО через 36 мес. была значимо выше в группе больных с поздней потерей МО4 по сравнению с больными с ранней потерей МО4: 53% и 8% соответственно (p=0,0004). У 50 больных с сохранением БМО после отмены ИТК мы выявили 3 основных варианта поведения опухолевого клона: 1) стабильно неопределяемый уровень BCR-ABL в течение всего периода наблюдения без терапии у 17(34%) пациентов; 2) кратковременные или длительные колебания BCR-ABL в пределах МО4 у 23(46%) больных; 3) колебания с временной потерей глубокого МО4, но с сохранением БМО, у 10(20%) больных. Интересно отметить, что у 8 из 10 пациентов с временной потерей МО4 в последующем был достигнут неопределяемый уровень BCR-ABL при продолжении наблюдения без терапии ИТК.

Выводы. Установлено, что потеря МО4 после прекращения терапии ИТК в большинстве случаев (74%) предшествует молекулярному рецидиву – потере БМО. Однако, выживаемость без потери БМО у больных с потерей МО4 на сроках более 3 мес. после отмены ИТК была значимо выше, чем у больных с ранней потерей МО4 (менее 3 мес.), и была сопоставима с выживаемостью без потери БМО во всей группе больных. Мы обнаружили, что у 66% больных наблюдаются колебания уровня BCR-ABL в период наблюдения в РБЛ. При этом около четверти больных (26%) с потерей МО4 могут оставаться в РБЛ и даже достичь неопределяемого уровня МОБ. Таким образом, потеря МО4, особенно на поздних этапах наблюдения после отмены ИТК, не является показанием для возврата к лечению и позволяет продолжить наблюдение без терапии при условии регулярного молекулярного мониторинга МОБ.

И.А. Петрова, М.В. Латыпова, М.Е. Власова, Т.Ю. Грачева, Д.С. Ильясова, Е.С. Рябикова, М.В. Барабанщикова, Е.В. Морозова, Т.Л. Гиндина

ВЛИЯНИЕ НОВОГО МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА НА РЕЗУЛЬТАТЫ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА У ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОФИБРОЗОМ

«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой» Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения Высшего Профессионального Образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова», г. Санкт-Петербург

Введение. Миелофиброз – хроническое Ph-негативное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся неэффективным гемопоэзом, ассоциированным с мегакариоцитарной гиперплазией и дисплазией, а также ретикулиновым фиброзом костного мозга. Наряду с клиническими данными и мутациями генов JAK2, CALR, MPL, цитогенетические аберрации имеют

важное прогностическое значение и учитываются в системах оценок DIPSS plus, GPSS, MIPSS70. Поскольку при разрастании соединительной ткани не всегда удается получить качественный аспират костного мозга для цитогенетического анализа, новый метод 48-часового культивирования клеток крови, предложенный N.R. Singh с соавторами в I. Cytogenetics, 2013], помогает

улучшить результаты кариотипирования.

Цель. Оценить эффективность методики культивирования клеток периферической крови и сопоставить её результаты со стандартными культуральными протоколами костного мозга у пациентов с миелофиброзом.

Материалы и методы. Цитогенетический анализ был проведен 95 пациентам, обследованным в лаборатории цитогенетики и диагностики генетических заболеваний НИИ ДОГиТ им. РМ. Горбачевой с 2009 по 2021 год. Среди пациентов были 55 (58 %) женщин и 40 (42 %) мужчин в возрасте от 28 до 83 лет (медиана 51 год). Для исследования применялась стандартная методика краткосрочного 24-часового культивирования клеток костного мозга у 37 (38,9 %) пациентов, 48-часовое культивирование клеток периферической крови без стимуляторов роста у 34 (35,8 %) и их комбинация – у 24 (25,3%). Окрашивание полученных препаратов проводилось методом GTG-бэндринирования. Хромосомные aberrации описывались согласно критериям ISCN 2016.

Результаты. Из 95 обследованных пациентов у 39 (41 %) были обнаружены численные и структурные перестройки. Из встретившихся аномалий можно выделить: полную или частичную моносомию хромосом 7, 11, 13 (n=9); полную или частичную

трисомию хромосом 1, 8, 9 и 21 (n=13); одиночные аномалии, такие как inv(3), t(5;7), der(9), i(17) (n=5); комплексные перестройки с ≥3 aberrациями (n=12). Трисомия хромосомы 8 наблюдалась чаще других перестроек хромосом (n=11, 27,5 %). Пациенты с очень высоким, высоким, промежуточным и низким цитогенетическим риском по системе оценок DIPSS plus составили 6,3 %, 42,1 %, 6,3 % и 45,3 % соответственно. При кариотипировании клеток крови у 18 (31 %) из 58 пациентов были обнаружены метафазы с тетра- и октаплоидным набором хромосом без структурных перестроек. У 24 (41,4 %) пациентов численные перестройки комбинировались со структурными, причем в 10 наблюдениях хромосомные aberrации определялись как в диплоидных, так и полиплоидных кариотипах. При сравнении эффективности культуральных протоколов возможность обнаружить аномальный кариотип была выше при культивировании клеток крови, дополняя результаты, полученные при кариотипировании клеток костного мозга.

Выводы. Исследование показало, что комбинация культуральных протоколов клеток крови и костного мозга является наиболее эффективным приёмом в цитогенетической диагностике миелофиброза.

М.А. Поспелова¹, К.В. Данилов¹, А.В. Горбунова², И.В. Евсюков¹

ПОИСК НОВЫХ ХИМЕРНЫХ ГЕНОВ В ОБРАЗЦАХ ФОЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЫ МЕТОДОМ РНК-СЕКВЕНИРОВАНИЯ

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», г. Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Введение. По частоте встречаемости фолликулярная лимфома (ФЛ) занимает второе место среди неходжкинских лимфом. В большинстве случаев опухолевые клетки содержат транслокацию t(14;18)(q32;q21), которая активирует BCL2, ключевой ген апоптоза. Однако, существует целый ряд минорных транслокаций. Выявление таких событий у конкретного пациента может повлиять на диагностику, прогноз и лечение рака. Поэтому поиск новых химерных генов очень важен для персонализированного подхода в медицине. В настоящее время поиск новых химерных генов можно осуществлять в данных РНК секвенирования. Найденные таким образом и провалидированные химерные гены могут использоваться в диагностических целях.

Цель. Осуществить поиск новых химерных генов в транскриптомах образцов фолликулярной лимфомы с использованием специализированных биоинформатических программ. Составить список потенциальных новых химерных генов для их дальнейшего подтверждения секвенированием по Сэнгеру.

Материалы и методы. Сбор материала проводился в Северо-Западном государственном медицинском университете им. И.И. Мечникова. У всех пациентов было получено информированное согласие на хранение образцов и их использование для молекулярно-биологических исследований. Стандартное секвенирование РНК было проведено в Ресурсном центре «Биобанк» Санкт-Петербургского Государственного Университета. В анализ было включено 53 образца: 19 образцов ФЛ 1-2 стадии, 16 образцов ФЛ 3 стадии и 18 контрольных образцов, представленных фрагментами лимфоузлов без признаков опухолевого роста. Для контроля качества секвенирования была использована программа FastQC. Индексирование генома и выравнивание прочтений было осуществлено в программе STAR. Для поиска химерных генов были использованы программы STAR-Fusion, Arriba и Fusion Catcher.

Результаты. Чтобы уменьшить количество ложноположительных результатов в итоговом списке химерных генов,

для дальнейшей работы были отобраны только такие события, которые были обнаружены как минимум двумя используемыми в анализе программами и у одного и того же образца. После применения этих критериев были отобраны 19 химерных генов из всех опухолевых образцов, а также 2 химерных гена, найденные в контрольных образцах. Чтобы определить, были ли обнаруженные химерные гены описаны ранее, полученный список проверяли по Атласу Генетики и Цитогенетики в Онкологии и Гематологии, а также по специализированным базам данных (FusionGDB, TCGA Fusion Gene Database и ChimerDB). Было обнаружено, что 5 химерных генов присутствовали хотя бы в одной из баз данных. Среди них IGH/BCL2, результат характерной для ФЛ транслокации t(14;18)(q32;q21) и IGH/BCL6, также часто встречающийся при ФЛ химерный ген. Остальные 16 химерных генов ранее не были описаны в раковых или нормальных тканях. При этом подавляющее большинство генов, входящих в состав новых химерных генов, имеют прямое отношение к канцерогенезу. Так ген MYC является известным протоонкогеном и кодирует ядерный фосфопротеин, играет роль в прогрессии клеточного цикла, апоптозе и клеточной трансформации, а HNRNPA2B1 путем активации циклооксигеназы-2 способствует росту опухоли при раке легкого. Можно предположить, что и образуемый ими химерный ген HNRNPA2B1_MYC может способствовать опухолевому росту. Мутации в гене OSBPL10 служат прогностическими маркерами при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Ген NOP53 является онкогеном при семейном немедулярном раке щитовидной железы, а ANKRD22 способствует прогрессированию немелкоклеточного рака легкого за счет активации транскрипции E2F1.

Выводы. Найденные химерные гены, вероятно, можно будет использовать для персонализации диагностики и терапии фолликулярной лимфомы. Однако, полученные данные являются предварительными и требуют валидации методами молекулярной биологии.

В.Г. Потапенко^{1,3}, В.В. Байков³, А.В. Горбунова², А.В. Климович¹, Ю.А. Криволапов²,
Е.А. Филиппова³, Н.В. Медведева²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ У ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ГИСТИОЦИТОЗАМИ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 31», г. Санкт-Петербург

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

³Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Введение. Описана эффективность таргетных препаратов при выявлении мутаций в генах BRAF, MAP2K1 и ALK у пациентов со злокачественными новообразованиями, в том числе гистиоцитозами.

Цель. Определение потенциальных терапевтических мишеней у больных со злокачественными гистиоцитозами.

Материалы и методы. В исследование включено 8 пациентов: 4 мужчины и 4 женщины, медиана возраста 47 (38-69) лет. У всех на основании критериев ВОЗ диагностированы: болезнь Эрдгейма-Честера (n=1), болезнь Розаи-Дорфмана-Дестомбс (n=2), диссеминированная форма гистиоцитоза из клеток Лангерганса (n=2), недетерминированный (n=2) и ALK-позитивный гистиоцитоз (n=1). Для молекулярного анализа использованы биоптаты опухолевой ткани фиксированные формалином и залитые в парафин. Проведено сек-

венирование нового поколения, а также аллель-специфичная полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения мутаций BRAF, MAP2K1 и ALK.

Результаты. У 5 пациентов выполнена ПЦР для определения мутации BRAFV600E. Мутация обнаружена у 1 больного с болезнью Эрдгейма-Честера. У 4 пациентов проведено секвенирование нового поколения. У обоих больных с болезнью Розаи-Дорфмана выявлены мутации MAP2K1 F53L и I103N (класс патогенности 5), при недетерминированном гистиоцитозе обнаружена мутация BRAF с.[1337C>T; 1340G>A] (класс патогенности 4) и при ALK-позитивном гистиоцитозе – слитный ген SQSTM1-ALK(класс патогенности 5).

Выводы. С помощью методов молекулярной диагностики у 5 из 8 пациентов со злокачественными гистиоцитозами определены потенциальные терапевтические мишени.

А.С. Пшеничный, Н.В. Рисинская, А.А. Юшкова, А.Б. Судариков

СВЯЗЬ ПОТЕРИ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ 13Q И МУТАЦИИ FLT3/ITD В ГЕНОМЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани. Многочисленные исследования показали, что внутренняя тандемная дупликация фрагмента ДНК околомембранного домена гена FLT3 (13q12.2) (FLT3/ITD – internal tandem duplication) является наиболее частой (от 13% до 32%) мутацией у взрослых больных ОМЛ, в том числе с нормальным кариотипом. В мировой практике критерием включения пациентов с FLT3/ITD в группу высокого риска является аллельное отношение AR (allele ratio) выше 0.5. Величина отношения мутантного аллеля гена FLT3 к дикому зависит от двух параметров – доли опухолевых клеток в образце и формы мутации – гомозиготной или гетерозиготной.

Цель. проанализировать аллельное отношение и аллельную нагрузку у пациентов с выявленной мутацией FLT3/ITD и предложить подходы для коррекции этих параметров с учетом количества опухолевых клеток в образце и зиготности мутации.

Материалы и методы. В ретроспективный анализ включен материал от 36 больных ОМЛ, имеющих мутацию FLT3/ITD, выявленную методом ПЦР с последующим фрагментным анализом ПЦР-продуктов на генетическом анализаторе ABI 3130 (ThermoFisher Scientific, USA). Контрольная группа пациентов с ОМЛ без мутации FLT3/ITD включала 27 человек, для которых тоже было проведено исследование STR-профилей опухолевой ДНК. Для двоих пациентов с мутацией FLT3/ITD и выявленной потерей гетерозиготности в STR-локусе D13S317 (13q31.3) был выполнен хромосомный микроматричный анализ (ХМА). Для каждого больного рассчитано отношение аллельной нагрузки к бластозу, и при величине отношения больше 0.5 (в бластах

преобладает мутантный аллель) проведен сравнительный анализ STR профилей данного образца ДНК и контрольного, выделенного из крови или костного мозга этого пациента в ремиссии или буккального эпителия, если ремиссия не доказана.

Результаты. В контрольной группе потеря гетерозиготности в локусе D13S317 была выявлена только у одного пациента из 27 (3.7% против 22% в группе с мутацией FLT3/ITD, p=0.038). Из 8 пациентов с высоким аллельным отношением и аллельной нагрузкой FLT3/ITD у 6 обнаружена потеря гетерозиготности в локусе STRD13S317 (13q31.3), у двоих пациентов этот локус был гомозиготным и в контрольной ДНК. У двух пациентов, которым удалось провести ХМА, была выявлена однородительская дисомия 13q (потеря гетерозиготности с сохранением копийности ДНК 13q). Для всех восьми пациентов были отмечены рецидивы заболевания (в том числе множественные) даже после трансплантации костного мозга. Однако, в рецидивах у некоторых пациентов AR не превышало 0.5 из-за того, что бластоз в момент анализа был еще низким, и соответственно, вклад аллелей дикого типа из здоровых клеток – высоким. Поэтому нами предложен дополнительный параметр – отношение аллельной нагрузки к бластозу, помогающий выявить гомозиготную форму мутации при низком бластозе. Например, при бластозе 25% и гомозиготной форме мутации AR будет 0,33 (отношение суммы мутантных аллелей к сумме диких), аллельная нагрузка 25% (отношение суммарного флуоресцентного сигнала от ампликонов всех мутантных аллелей к сумме сигналов всех аллелей). При делении на долю бластных клеток в образце мы получаем долю мутантных аллелей в

бластных клетках, в данном случае 1. То есть все аллели в кластерах являются мутантными, мутация FLT3/ITD представлена в гомозиготной форме. При нарастании доли бластов AR в этом случае очень быстро вырастет больше критического значения 0.5, но пациент будет отнесен к группе промежуточного риска, если ориентироваться только на аллельное отношение без учета доли бластных клеток.

Выводы. Более 20% (8 из 36) выявленных FLT3/ITD мутаций находятся в гомозиготной форме благодаря одноклеточ-

ской дисомии 13q, не определяемой стандартным цитогенетическим анализом, но являющейся в совокупности с FLT3/ITD фактором плохого прогноза. У пациентов без мутации FLT3/ITD риск потери гетерозиготности 13q значительно ниже (отношение шансов (OR) 7.429). При низком бластозе гомозиготную форму мутации, соответственно, потенциальный рост AR до критического значения 0.5 и выше, может выявить предложенный нами дополнительный параметр – отношение аллельной нагрузки к бластозу.

Ж.З. Рахманова, О.В. Паина, П.В. Кожжикарь, А.С. Фролова, Л.А. Цветкова, К.А. Екушов, Н.В. Субора, Е.В. Бабенко, Т.Л. Гиндина, А.Л. Алянский, И.М. Бархатов, А.Д. Кулагин, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОБ ПЕРЕД АЛЛО-ТГСК С РЕЖИМАМИ КОНДИЦИОНИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

Введение. Выявление минимальной остаточной болезни (МОБ) у детей с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) позволяет использовать риск-адаптированный подход в терапии после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Несмотря на удовлетворительные показатели общей выживаемости (ОВ) у детей в первой и второй ремиссии ОМЛ после алло-ТГСК, безрецидивная выживаемость (БРВ) и выживаемость без РТПХ/рецидива (Graft versus host disease/Relapse Free Survival – GRFS) требует дальнейшего улучшения.

Цель. Оценка результатов алло-ТГСК у педиатрических пациентов с ОМЛ в первой и второй ремиссии с положительным или отрицательным статусом МОБ по данным молекулярно-биологических методов и иммунофенотипирования перед алло-ТГСК с миелоаблативным режимом кондиционирования (МАК) или с режимом кондиционирования со сниженной интенсивностью доз (РИК).

Материалы и методы. Проанализированы данные 87 детей с ОМЛ в первой и второй ремиссии, которым была выполнена аллоТГСК в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой в период с 2008 по 2020 год. Медиана возраста на момент проведения алло-ТГСК составила 8 лет (5 месяцев–19 лет). Статус МОБ- имели 59 (68%) пациентов, у 28 (32%) пациентов был выявлен статус МОБ+ как по данным молекулярно-генетических исследований, так и по данным проточной цитометрии. МАК на основе бусульфана (10-16 мг/кг) получили 40 (46%) пациентов, на основе треосульфана – 10 (11%) пациентов. РИК на основе мелфалана получили 22 (25%) пациентов, на основе бусульфана (8 мг/кг) – 15 (18%) пациентов. Алло-ТГСК от полностью совместимого родственного донора была выполнена 10 (11,5%), полностью совместимого неродственного донора – 37 (42,5%), частично совместимого неродственного донора – 14 (16%), гаплоидентичного донора –

26 (30%) пациентам. Всем пациентам проводили профилактику острой РТПХ: серопрфилактику на основе АТГ использовали у 21 (24%), посттрансплантационного циклофосфида (ПтЦф) у 59 (68%) пациентов, TCR альфа/бета деплеции у 3 (3%) пациентов.

Результаты. При медиане наблюдения 5 лет в когорте пациентов с статусом МОБ+ ОВ составила 67% vs 72% для пациентов с МОБ- статусом (p=0,880). Безрецидивная выживаемость (БРВ) – 60% vs 79%, соответственно (p=0,086). Выживаемость без РТПХ/рецидива в когорте больных с МОБ+ статусом – 39% vs 45% с МОБ- статусом (p=0,586). ОВ в группе пациентов после МАК с МОБ+ статусом 53,8% vs 78,4% с МОБ- статусом (p=0,206), после РИК 83,6% vs 63,6%, (p=0,280) соответственно. БРВ в когорте детей после МАК с МОБ+ статусом 46,2% vs 75% с МОБ- статусом (p=0,070), после РИК 73,3% vs 86,4%, (p=0,358) соответственно. GRFS в группе пациентов после МАК с МОБ+ статусом 30,8% vs 45,9% с МОБ- статусом (p=0,379), после РИК 46,7% vs 45,5%, (p=0,974) соответственно. ОВ у МОБ- статусом пациентов с/без использования ПтЦф 81% vs 52% (p=0,023); БРВ – 80% vs 76%, соответственно. GRFS 54% vs 23% соответственно (p=0,001). ОВ, БРВ, GRFS у МОБ+ статусом пациентов с/без использования ПтЦф – 64%, 64%, 47% vs 72%, 54%, 27% (p>0,05).

Выводы. У пациентов с положительным статусом МОБ перед алло-ТГСК имеется тенденция к снижению показателей БРВ. При алло-ТГСК ОВ, GRFS пациентов с ОМЛ в 1 и 2 ремиссии сопоставимы вне зависимости от статуса МОБ и режима кондиционирования (РИК vs МАК), однако имеется тенденция к более высоким показателям БРВ у больных получивших МАК в МОБ-статусе по сравнению с больными, получившими МАК в МОБ+ статусе. ПтЦф статистически значимо улучшает GRFS и ОВ у детей с ОМЛ при МОБ- статусе перед алло-ТГСК.

Н.В. Рисинская¹, Я.К. Мангасарова¹, Е.Е. Никулина¹, Я.А. Кожжевникова², А.У. Магомедова¹, С.К. Кравченко¹, А.Б. Судариков¹

ПОТЕРЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОСТИ И МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ КОРОТКИХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК ПРИ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИАСТИНАЛЬНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЕ

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

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

Введение. Потеря гетерозиготности (LOH) в локусах коротких tandemных повторов, а также варианты микросателлитной нестабильности EMAST (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats) и MSI (microsatellite

instability) являются уникальными пациент-специфическими молекулярными характеристиками опухоли. Для ряда солидных опухолей показано, что определенные варианты MSI ассоциированы с чувствительностью опухоли к иммунотерапии

ингибиторами контрольных точек. Для первичной медиастинальной В-клеточной крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ) исследование этих молекулярных факторов для определения прогноза заболевания и выбора терапии практически не проводилось. В нашем пилотном исследовании было показано, что стандартный набор из пяти маркеров мононуклеотидных микросателлитных повторов BAT-25, BAT-26, NR21, NR-24 и NR-27, традиционно используемый для анализа MSI в солидных опухолях, не информативен при ПМВКЛ из-за низкой встречаемости MSI при данной патологии (до 5%). Также в половине случаев MSI второй аллель выявляется как в опухоли, так и в контрольном материале, что объясняется наличием у больного редкого герминального варианта микросателлита, а не особенностью опухолевых клеток. Перекрывающиеся комбинации ферментов комплекса репарации ДНК ответственны как за восстановление неспаренных оснований, так и за удаление вставок петель олигонуклеотидов. Несостоятельность ферментов комплекса репарации ДНК может привести как к MSI, так и к EMAS. Возможно, исследование EMAS при ПМВКЛ будет более информативным, чем исследование MSI.

Цель. Проанализировать частоту LOH и EMAS в опухолевых клетках пациентов с ПМВКЛ в дебюте заболевания и проверить возможную ассоциацию с гиперэкспрессией мРНК PD-L1 (лиганда белка программируемой клеточной смерти).

Материалы и методы. STR-профили ДНК опухолевых клеток были проанализированы для когорты из 72 пациентов (медиана возраста 32 года, 23 мужчины, 49 женщин) с диагнозом ПМВКЛ de novo, получавших терапию по протоколу R-DA-EPOCH (n=62) или R-NHL-BFM-90 (n = 10) в Национальном медицинском исследовательском центре гематологии (Москва, Россия). ДНК была выделена из архивных образцов биоптатов опухоли, взятых при установлении диагноза. Контрольные образцы ДНК выделяли из крови пациентов в ремиссии или из буккального эпителия. STR-профили для анализа LOH и

EMAS оценивали с помощью STR-ПЦР, используя мультиплексный набор для амплификации 19 STR-маркеров и локусов амелогенина CoDIS Plus (ООО «Гордиз», Россия). Фрагментный анализ был выполнен на генетическом анализаторе ABI3130. Для 15 пациентов статус LOH и EMAS сравнивали с уровнем экспрессии мРНК PD-L1, определенного ранее, непосредственно в дебюте заболевания, но на тех же образцах.

Результаты. Потеря гетерозиготности выявлена у 37 из 72 пациентов (51,4%). EMAS обнаружили у 40 пациентов (55,5%); у 24 из них в комбинации с LOH. Для всех EMAS-положительных пациентов количество вовлеченных локусов было не более 4 из 19 (EMAS-low, менее трети панели микросателлитных маркеров). Показано, что общая и бессобытийная выживаемость были самыми высокими у пациентов со стабильным STR-профилем опухоли. Среди 15 пациентов с известным уровнем экспрессии мРНК PD-L1 у шести пациентов не было выявлено ни EMAS, ни гиперэкспрессии PD-L1. У трех пациентов EMAS с 2-3 вовлеченными STR-локусами сочетался с гиперэкспрессией PD-L1. Для 4 пациентов была выявлена комбинация EMAS и нормальной экспрессии PD-L1, и для двух пациентов гиперэкспрессия PD-L1 была выявлена при стабильном STR-профиле опухоли. Несмотря на малый объем выборки и невозможность достоверной статистической оценки связи неэффективности стандартной терапии и комбинации EMAS и гиперэкспрессии PD-L1, необходимо отметить, что у всех пациентов этой группы (3 человека) стандартная терапия была неэффективна.

Выводы. LOH и EMAS при ПМВКЛ, возможно, ассоциированы с меньшей эффективностью стандартной терапии у пациентов. Исследование EMAS как варианта микросателлитной нестабильности, особенно в сочетании с оценкой экспрессии PD-L1, может быть важно для прогнозирования ответа на терапию ингибиторами контрольных точек. Работа поддержана грантом Раффонда 2/2020.

Н.Р. Рябчикова¹, Г.Ш. Сафуанова^{1,4}, И.Р. Миннихметов^{2,3}, Э.К. Хуснутдинова², Д.Р. Сафуанова⁵, А.А. Латыпова⁴

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОНКСУПРЕССОРОВ RTPN1 И NF1 В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ K562 В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ

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

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

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

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

⁵Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Введение. Ключевую роль в возникновении онкологических заболеваний играют нарушения функции протоонкогенов, опухолевых супрессоров и так называемых мутаторных генов (Копнин Б.П., 2004). В настоящем исследовании проведен анализ уровня экспрессии генов тирозиновой фосфатазы первого типа RTPN1 и нейрофиброматоза первого типа NF1, предположительно являющихся супрессорами опухолевого роста в развитии многих онкологических заболеваний.

Цель. Провести анализ экспрессии генов онкосупрессоров RTPN1 и NF1 в клеточной линии ХМЛ K562, в лейкоцитах периферической крови больных хронического миелолейкоза (ХМЛ) и индивидов контрольной группы

Материал 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 ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) (согласно национальным клиническим рекомендациям и ELN). Сравнимые группы были рандомизированы и сопоставимы по полу и возрасту. Определение уровня экспрессии генов RTPN1 и NF1 проводилось методом ПЦР, а также в клеточной линии ХМЛ K562, при анализе использовали соответствующие праймеры RT2 gPSR Hrimar Assays, RT2 SYBR Green/Fluorescein gPSR Master Mix (Super Array Bioscience, USA). 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.

Результаты. При анализе уровня экспрессии гена RTPN1 в лейкоцитах периферической крови выявлены статистически значимые различия между контрольной группой и больными, резистентными к терапии ИТК. В клеточной линии K562

наблюдался довольно низкий уровень экспрессии гена RPTN1 по сравнению со всеми исследованными выборками. При анализе уровня экспрессии гена NF1 в лейкоцитах периферической крови выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии между контрольной группой и больными ХМЛ, резистентными к терапии ИТК, а также между контрольной группой и больными с полным молекулярным ответом. В клеточной линии K562 наблюдалось статистически значимое снижение уровня экспрессии гена NF1 по сравнению со всеми исследованными выборками, кроме группы контроля. Ген NF1 действует как негативный регулятор активности Ras белков, и тем самым, проявляет себя в роли онкосупрессора. Повышение уровня экспрессии гена NF1 у больных онкологическими заболеваниями ранее было обнаружено только в исследовании Cacev и соавт. (2005) при развитии рака толстого кишечника (Cacev T. et al., 2005). Увеличение уровня экспрессии данного

гена у больных ХМЛ свидетельствует о важности изучения именно тканеспецифичной экспрессии гена NF1 и необходимости дальнейшего изучения профиля экспрессии данного гена.

Выводы. Таким образом, мутации в киназном домене BCR-ABL являются одной из основных причин резистентности к терапии иматинибом у некоторых пациентов с ХМЛ. Тем не менее, очевидно, что в развитии резистентности к лечению препаратами ИТК и прогрессировании ХМЛ в сторону акселерации и властного криза могут играть важную роль множество других клеточных, генетических и эпигенетических факторов, которые в совокупности определяют индивидуальное развитие болезни у больных ХМЛ. Полученные нами данные о роли онкосупрессоров раскрывают некоторые патогенетические аспекты ХМЛ и вносят вклад в общее представление о молекулярно-генетических основах развития данного заболевания.

Л.В. Сандакова, Л.Р. Ахметова, Э.Г. Багаутдинова, Р.И. Хусаинова, И.Р. Миннихметов

ВЫЯВЛЕНИЕ ВАРИАНТНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ С ОБРАЗОВАНИЕМ ХИМЕРНОГО ОНКОГЕНА BCR-ABL МЕТОДОМ FISH У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Республиканский медико-генетический центр», г. Уфа

Введение. FISH-метод (метод флуоресцентной in situ гибридизации) широко используется в дифференциальной диагностике злокачественных заболеваний. Хромосомные аномалии, выявляемые при FISH, в сочетании с клинической картиной и данными иммуногистохимии являются основой классификации, определения тактики лечения и прогноза лимфо- и миелолифферативных заболеваний. В 2020 году в Медико-генетическом центре Республики Башкортостан (ГБУЗ РМГЦ) впервые в регионе был внедрен метод флуоресцентной гибридизации для исследования костного мозга у пациентов с гемобластомами.

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) – клональное миелолифферативное заболевание, особенностью которого является наличие приобретенной генетической аномалии – «филадельфийской хромосомы» (Ph). В большинстве случаев «филадельфийская хромосома» образуется в результате классической реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11.2) и в некоторых случаях в результате криптической инсерции ABL в район гена BCR, либо вариантной транслокации. Простые вариантные транслокации возникают в результате вовлечения в перестройку хромосомы 22 и любой другой, кроме хромосомы 9. В образовании сложных вариантных транслокаций участвуют не менее трех хромосом, две из которых хромосомы 9 и 22. При этом формируется химерный онкоген BCR-ABL, чаще всего кодирующий белок p210, обладающий тирозинкиназной активностью. Вследствие появления BCR-ABL-тирозинкиназы происходит нарушение нормального функционирования клетки, что приводит к злокачественной трансформации и вытеснению нормальных стволовых клеток. В работе представлены обобщенные результаты первого года диагностики ХМЛ в Республике Башкортостан с применением FISH-технологии.

Цель. Определить частоту встречаемости вариантной транслокации с образованием химерного онкогена BCR-ABL у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы костного мозга 83 пациентов с диагнозом ХМЛ на различных фазах заболевания. В работе использовались locus-специфичные ДНК-зонды фирмы «Kreatech». Зонд ON BCR/ABL t(9;22) Fusion оптимизирован для детекции реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11.2) по двойному сливанию сигналов, в двух цветах, на метафазных и интерфазных клетках мазков крови или костного мозга. Этот набор выявляет и криптическую инсерцию ABL в район гена BCR. Зонд ON BCR/ABL t(9;22), DC, S-Fusion, ES применяется для первичного скрининга пациентов

с ХМЛ. За счет дополнительного зонда, проксимального по отношению к точке разрыва на хромосоме 9q34, набор обеспечивает дополнительный сигнал на aberrантной хромосоме der(9q34) в случае транслокации t(9;22). «Филадельфийская хромосома», der(22q) идентифицируется по слитному сигналу. FISH-анализ проводили согласно протоколу производителя на цитогенетических препаратах, содержащих интерфазные ядра. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа фирмы «Zess» Axio Imager.A2. В каждом случае было проанализировано от 200 до 400 интерфазных ядер. Интерпретация полученных результатов осуществлялась в соответствии с международной цитогеномной номенклатурой хромосом человека (ISCN, 2016).

Результаты. Диагностика хронического миелоидного лейкоза проводилась с помощью FISH-анализа костного мозга в сочетании с молекулярно-генетическим исследованием периферической крови (определением экспрессии химерного транскрипта BCR-ABL p210 методом качественной и количественной ПЦР в реальном времени) и стандартным цитогенетическим исследованием (СЦИ) костного мозга. У 42 (50,6%) пациентов выявлена стандартная Ph-хромосома, образованная в результате классической реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11.2). У 7 (8,4%) пациентов выявлено атипичное распределение флуоресцентных сигналов, что соответствует наличию различных вариантных транслокаций t(9;22). У 34 (41%) пациентов химерный онкоген BCR-ABL не выявлен.

Выводы. Таким образом, в Республике Башкортостан у большинства (50,6%) пациентов с хроническим миелоидным лейкозом при помощи FISH-анализа выявляется классическая реципрокная транслокация t(9;22)(q34;q11.2). Частота встречаемости вариантной транслокации, приводящей к образованию химерного онкогена BCR-ABL составляет 8,4%. У 41% пациентов в результате лечения достигнут полный цитогенетический ответ (ПЦО).

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И АУТОЛОГИЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

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

Введение. Трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) у некоторых пациентов с множественной миеломой (ММ) не приводит к улучшению качества ответа, что может негативно отразиться на эффективности лечения. Участие некоторых цитокинов в регуляции кроветворения и иммунного ответа у больных ММ позволяет предположить их возможную роль в качестве негативных предикторов ответа на терапию.

Цель. Оценить влияние полиморфизма ряда генов иммунной системы (IL-6, TNF-A, IL-1B, IL-10) на эффективность ауто-ТГСК у пациентов с ММ.

Материалы и методы. В исследование включены 28 пациентов с ММ (15 мужчин и 13 женщины, средний возраст 53,7 ± 6,8 года), всем пациентам была проведена ауто-ТГСК. Улучшение качества ответа после первой ауто-ТГСК констатировано у 16 (57,1%) пациентов, тогда как у 12 (42,9%) больных улучшение качества ответа не наблюдалось. Генотипирование аллельного полиморфизма IL-6 -174G /C, TNF-A -308G/A, IL-1B -31T/C, IL-10 -592C/A проводили методом ПЦР-ПДРФ. Для выявления межгрупповых различий в распределении генотипов использовали точный метод Фишера, с определением коэффициента отношения шансов (OR – odds ratio) и р-значения.

Результаты. Частоты встречаемости генотипов TNF-A, IL-1B и IL-10 существенно не отличались в группах пациентов с или без улучшения качества ответа после ауто-ТГСК. Однако доля гомозигот по редкому аллелю -592A гена IL-10 была почти в 3 раза выше у пациентов с улучшением качества ответа, чем у пациентов без него (20,0% против 8,3% соответственно; $p=0,12$; $OR=3,3$). Частота встречаемости генотипа IL-1B -31TT также была увеличена в группе пациентов с эффективной ауто-ТГСК по сравнению с группой «без улучшения» (37,5% против 16,7%, соответственно; $p=0,4$; $OR=3,0$). Статистически значимое различие между группами пациентов было зафиксировано при оценке распределения генотипов IL-6. Доля носителей аллеля IL-6 -174C среди пациентов с улучшением качества ответа была почти в 2 раза выше (81,3% против 41,6% в группе без улучшения; $p=0,05$; $OR=6,1$).

Выводы. Результаты данного исследования позволили обнаружить возможную связь между полиморфизмом гена IL-6 -174G /C и эффективностью ауто-ТГСК у пациентов с ММ. Необходимы дальнейшие исследования, с расширением группы больных для уточнения значимости вариаций генов иммунной системы в прогнозировании эффективности ауто-ТГСК у пациентов с ММ.

Н.А. Северина, Ю.В. Сидорова, Б.В. Бидерман, Н.В. Рисинская, Е.Б. Ликольд, О.А. Глинщикова, А. С. Пшеничный, А.Б. Судариков

СОПОСТАВЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДИК ВЫЯВЛЕНИЯ НЕСТАНДАРТНОЙ ВСТАВКИ ГЕНА NPM1 У БОЛЬНЫХ ОМЛ

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

Введение. NPM1 (нуклеофозмин 1) - онкоген, состоящий из 12 экзонов, расположен в локусе 5q35. Мутация гена NPM1 - самое частое генетическое нарушение при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ), выявляется в 25-30% ОМЛ. До 90% мутаций приходится на 4-х нуклеотидную вставку в положении 956-959 экзона. 75-80% мутаций имеют вставку типа "А" – TCTG, 10-14% приходится на вставки типа "D" и "B" – CCTG и CATG. «Золотой стандарт» исследования мутаций гена NPM1 - метод фрагментного анализа (ФА). Для более точного определения стандартных вставок используют метод аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР). Однако, встречаются нестандартные вставки, отличающиеся по длине, нуклеотидной последовательности и месту расположения от стандартных. Такие образцы требуют проведения секвенирования для уточнения данных о наличии вставки.

Цель. Сопоставление данных различных методик выявления нестандартной вставки гена NPM1 у больных ОМЛ и анализа ее последовательности.

Материалы и методы. Для анализа наличия и типа мутации гена NPM1 исследовали ДНК пациентов с ОМЛ, наблюдавшихся в "НМИЦ Гематологии" в 2020г. При первичной диагностике методом ФА выявляли наличие вставки в 12 экзоне гена NPM1. При отсутствии вставки выявляется 1 продукт длиной 330 пар нуклеотидов (нп), при наличии вставки выявляются 2 продукта, имеющих длину 330 и 334 нп, соответственно. ФА проводили в трех повторах для оценки воспроизводимости результатов и исключения артефактов. АС-ПЦР подтверждали наличие или отсутствие стандартной вставки. Если вставка не подтверждалась АС-ПЦР, данные образцы анализировались

методами секвенирования по Сэнгеру и/или следующего поколения (NGS).

Результаты. За 2020 г. после проведения ФА и АС-ПЦР было выявлено 15 случаев, когда по данным ФА был определен дополнительный продукт, но по результатам АС-ПЦР вставка не подтверждалась: 3 образца с мутантным пиком, отличающимся на 1 нуклеотид (+/-1нп) от дикого, 1 образец со вставкой +2 нп, 1 образец с делецией 4 нп, 10 пациентов со вставкой +4 нп. У всех 10 пациентов со стандартной картиной ФА (+4 нп) было подтверждено наличие вставки в 12 экзоне секвенированием по Сэнгеру. При этом вставка имела либо нестандартную нуклеотидную последовательность, либо нестандартное расположение. В двух случаях из этих 10 было невозможно точно установить нуклеотидную последовательность вставки с помощью секвенирования по Сэнгеру из-за гетерогенности ПЦР-продукта. Наличие поли-Т фрагмента в интроне, близко расположенном к экзону гена NPM1, затрудняет прочтение последовательности в обе стороны. У этих 2-х пациентов с помощью NGS выявили сложный характер изменений в 12 экзоне гена NPM1 (вставка + делеция + нуклеотидные замены). В остальных 5 образцах при секвенировании по Сэнгеру и NGS не выявили вставок /делеций в экзоне. В одном образце была выявлена делеция 4-х нуклеотидов в интроне (в области поли-Т), которая могла привести к ложноположительной картине на ФА со смещением дикого и мутантного пиков относительно референсных значений. В 4х образцах с короткой вставкой/делецией (1-2 нп) были выявлены нуклеотидные замены в интроне. Возможно, они приводили к изменению электрофо-

ретической подвижности продуктов при ФА, создавая картину наличия мутантного пика при исследовании гена NPM1.

Заключение. При проведении анализа гена NPM1 требуется комплексный подход. При выявлении нестандартной картины ФА (вставка меньшей длины, смещение пиков) обязательно требуется подтверждение наличия мутации методом

секвенирования, так как значительная часть этих случаев может оказаться артефактами. Метод секвенирования по Сэнгеру не всегда, в отличие от NGS, позволяет уточнить характер изменений в гене NPM1. Кроме того, метод NGS обладает большей чувствительностью, что может быть принципиальным при анализе мутаций с небольшой аллельной нагрузкой.

Н.А. Северина, Е.С. Нестерова, Б.В. Бидерман, Е. Б. Ликольд, А.Б. Судариков, Т.Н. Обухова, А.М. Ковригина, С.К. Кравченко, Э.Г. Гемджян, В.Г. Савченко

МУТАЦИИ ГЕНА EZH2 И РЕАРАНЖИРОВКА ГЕНА BCL-2 ПРИ ФОЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ

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

Введение. Фолликулярная лимфома (ФЛ) – это вторая по частоте встречаемости В-клеточная неходжкинская лимфома, составляющая 25% от всех впервые диагностированных лимфом в России. Клиническое течение заболевания вариабельно и ассоциировано с морфологией опухоли: прогноз при 1-2 и 3А цитологическом типе благоприятнее, чем при 3В типе и в случае трансформации ФЛ в агрессивные В-клеточные лимфомы. Гетерогенность ФЛ наблюдается и среди случаев индолентной ФЛ (1-2 и 3А цитологический тип). Вариабельность заболевания может объясняться различными патогенетическими механизмами („линейный“ и дивергентный пути) развития опухолевых клеток, что характеризуется определенными генетическими маркерами. BCL-2 и EZH2 – ранние маркеры ФЛ, и изменения, связанные с ними, подтверждают «линейный» путь развития опухолевых клеток. Исследование интронных полиморфизмов гена EZH2 показало, что rs_207240 ассоциирован с риском развития солидных опухолей (рака желудка).

Цель. Исследовать частоту мутаций в 16 экзоне и интронный полиморфизм rs_2072407 гена EZH2 и реаранжировку гена BCL-2 у пациентов с индолентной ФЛ, сравнить полученные результаты с иммуноморфологическими характеристиками опухоли; определить прогностическую значимость выявленных изменений.

Материалы и методы. В проспективное исследование, проведенное с января 2017 г. по декабрь 2020 г., включено 58 больных (23 мужчин и 25 женщин, с медианой возраста 53 года) с впервые диагностированной ФЛ. В биоптатах лимфатических узлов, взятых до начала терапии, был исследован мутационный статус гена EZH2 (16 экзон и интронный полиморфизм rs_2072407) и реаранжировка гена BCL-2 (кариотипирование или FISH исследование). Всем пациентам проводилась химиотерапия антрациклин-содержащими режимами с ритуксимабом (R-СНОР/R-ЕРОСН).

Результаты. К ФЛ 1-2 типа были отнесены 27/58 (47%) больных, 3А типа - 31/58(53%). Реаранжировка гена BCL-2 выявлена у 40/58 (67%): при 1-2 цитологическом - 22/40 (57%) случаях, при 3А типе - в 17/40 (43%). Реаранжировка не выявлена у 18/58 (31%) больных: 4/18 (22%) - при 1-2 цитологическом типе, 14/18 (78%) - при 3А типе. Неблагоприятные события (ранний рецидив/прогрессия/смерть от прогрессии)

зарегистрированы у 13/18 (72%) больных при отсутствии реаранжировки гена BCL-2, и у 5/40 (13%) - при наличии реаранжировки гена BCL-2. Наличие реаранжировки гена BCL-2 ассоциировано с благоприятным прогнозом ($p < 0,001$ по критерию Пирсона).

Мутации в гене EZH2 U646 (mutEZH2) обнаружены у 10/58 (17%) пациентов, у одного пациента было выявлено одновременно 2 мутации: K639N и U646N. В группе mutEZH2 1-2 цитологический тип ФЛ диагностирован в 4/10 (40%) случаях, 3А - 6/10 (60%). Неблагоприятные события наблюдались у 4/10(40%) пациентов с mutEZH2 без реаранжировки гена BCL-2 (2/4). В группе mutEZH2 и с реаранжировкой гена BCL-2 неблагоприятные события - 2/6 (летальных исходов, связанных с прогрессией, не было). Дикий тип EZH2 (wEZH2) диагностирован у 48/58 (83%) пациентов. В этой группе 1-2 цитологический тип ФЛ был диагностирован в 23/48 (46%) случаях, 3А - 25/48 (52%). Реаранжировка гена BCL-2 определялась у 34/48 (71%): при 1-2 цитологическом типе в 20/34 (59%), при 3А типе - в 14/34 (35%). Неблагоприятные события в группе wEZH2 наблюдались у 15/48(25%) пациентов: у 11/15 (73%) при отсутствии реаранжировки гена BCL-2 и 4/15 (27%) при наличии реаранжировки. Аллель GG в rs_2072407 представлен в 18/58 (31%) случаях, AG – у 25/58 (43%) AA у 15/58(26%). Частоты встречаемости аллелей в Европейской популяции GG – 42%, AG – 0,48% и AA-11%. Вариант аллеля GG ассоциирован с наличием реаранжировки гена BCL-2 15/15, wEZH2 14/15(93%) и отсутствием неблагоприятных событий 15/15 ($p < 0,001$ по критерию Пирсона).

Выводы. Мутации в гене EZH2 встречаются в 17% случаев, как при 1-2, так и 3А цитологическом типе ФЛ. Случаи mutEZH2 с реаранжировкой BCL-2 характеризуются длительным, но постоянно рецидивирующим течением. Случаи wEZH2 типа без реаранжировки BCL-2 имеют высокий риск трансформации в ДВКЛ и высокую вероятность летального исхода.

Наиболее значимым фактором, ассоциированным с благоприятным прогнозом, является сочетание реаранжировка BCL-2 с гаплотипом GG rs_2072407 гена EZH2 ($p < 0,001$). Результаты данного исследования планируется подтвердить на большей выборке пациентов и сопоставить с данными различных контрольных групп.

П.А. Сибиряков¹, Г.А. Цаур^{1,2,3}, А.М. Попов⁴, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Ю.В. Румянцева⁴, А.И. Карачунский⁴, Л.Г. Фечина^{1,2}

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К РАЗВИТИЮ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ

¹Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница», г. Екатеринбург

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

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

⁴Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Введение. Известно, что врожденные генетические варианты генов, ответственных за развитие В-клеток, влияют на восприимчивость к острому лимфобластному лейкозу (ОЛЛ) у детей в Европе и США. Известно, что частота риск-аллелей, влияющих на предрасположенность к ОЛЛ в детском возрасте, значительно различаются в зависимости от происхождения. В России со смешанной этнической принадлежностью населения такого рода исследования ранее не проводились.

Цель. Оценить связь между генетическими вариантами генов ARID5B, IKZF1, SEBPЕ, CDKN2B, CDKN2A, GATA3, PIP4K2A, TP63 и предрасположенностью к развитию ОЛЛ у детей.

Материалы и методы. Мы сравнили частоты аллелей следующих 11 SNP: rs4132601, rs11978267 (оба в 7p12.2, IKZF1), rs17756311 (9p21.3, CDKN2B), rs3731249, rs3731217 (оба в 9p21.3, CDKN2A), rs7088318 (10p12.2, PIP4K2A), rs3824662 (10p14, GATA3), rs10821936, rs7089424 (оба в 10q21.2, ARID5B), rs2239633 (14q11.2, SEBPЕ), rs17505102 (3q28, TP63) у 422 детей с ОЛЛ (366 случаев ОЛЛ из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) и 56 детей с Т-линейным ОЛЛ (Т-ОЛЛ)) с медианой возраста 4,5 года (диапазон 1,03-17,8), а также у 427 детей из контрольной группы без ОЛЛ. Риск определяли путем расчета отношения шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ). Информированное согласие было получено в каждом случае.

Результаты. Результаты генотипирования 11 SNP в 8 генах показали, что риск-аллели rs4132601, rs11978267, rs10821936, rs7089424 и rs17505102 достоверно чаще выявлялись у пациентов с ОЛЛ по сравнению с пациентами контрольной группы (ОШ 1,64, 1,67, 1,85, 1,73, 1,38, соответственно; $p < 0,0001$ для первых четырех групп и $p = 0,02233$ для пятой). Два SNP в IKZF1 находились в сильном неравновесном сцеплении, также как 2 SNP в ARID5B ($r^2 > 0,94$ в обоих случаях). Таким образом, rs7089424 и rs11978267 были исключены из дальнейшего анализа. Следует отметить, что rs10821936 в ARID5B и rs4132601 в IKZF1 сохраняли свою значимость не только в общей группе пациентов, но и у пациентов с ВП-ОЛЛ, а также в следующих подгруппах: с транслокацией t(12;21)/ETV6-RUNX1 ($n=91$), высокой гипердиплоидией ($n=72$), в группе другие В-линейные

ОЛЛ ($n=145$), при BCR-ABL1-подобном ОЛЛ ($n=20$), у пациентов моложе 10 лет ($n=300$) ($p \leq 0,0052$ во всех случаях). Ни один из 11 маркеров не был связан с Т-ОЛЛ. За исключением двух вышеуказанных SNP, ни один из оставшихся маркеров не был связан с более высоким риском ОЛЛ с транслокацией t(12;21)/ETV6-RUNX1. rs3731249 в CDKN2A увеличивал риск развития ОЛЛ с высокой гипердиплоидией (ОШ 3,29 $p=0,0078$). Также выявлена ассоциация риск-аллеля rs3824662 в GATA3 и BCR-ABL1-подобного ОЛЛ: риск-аллель в GATA3 значительно чаще обнаруживался при BCR-ABL1-подобном ОЛЛ, чем при ВП-ОЛЛ, а также среди пациентов из группы другие В-линейные ОЛЛ (ОШ 3,68 $p < 0,0001$ и ОШ 2,95 $p=0,0016$, соответственно). Не было обнаружено связи между rs3824662 и ответом на лечение (ответ на дексаметазон на 8 день, статус костного мозга на 15 день, МОБ-позитивность на 15-й, 36 дни). Тем не менее, пациенты с ВП-ОЛЛ, имеющие хотя бы 1 риск-аллель GATA3, имели худший прогноз из-за более низкой БСВ (0,75±0,04, по сравнению с 0,88±0,03 $p=0,012$) и более высокой частоты рецидивов (0,22±0,04, по сравнению с 0,09±0,02 $p=0,002$).

Выводы. Таким образом, мы показали наличие врожденных генетических вариантов, влияющих на предрасположенность к развитию ОЛЛ. Большинство ранее описанных локусов восприимчивости к ОЛЛ не было связано с риском развития ОЛЛ в наблюдаемой группе пациентов, что может отражать реальное генетическое разнообразие и лишь частично объясняться низким количеством наблюдений в основной и контрольной группах. Наиболее сильная связь наблюдалась между наследуемыми генетическими вариантами в IKZF1 и ARID5B и риском развития ОЛЛ у детей. Также была отмечена умеренная ассоциация TP63 SNP rs1505102 с более высоким риском развития ОЛЛ. У 13,6% пациентов с ВП-ОЛЛ, несущих 5 риск-аллелей, было выявлено увеличение риска ОЛЛ в 4,2 раза по сравнению со средним числом аллелей риска ($n=3$) ($p < 0,0001$). rs3824662 в GATA3 связан с риском BCR-ABL1-подобного ОЛЛ, а также неблагоприятным исходом. Также выявлена ассоциация между CDKN2A SNP rs3731249 и риском развития ОЛЛ с высокой гипердиплоидией.

Ю.В. Сидорова, Н.В. Рыжикова, С.Ю. Смирнова, Н.А. Северина, Е.Б. Рыбкина, Е.И. Захарько, В.Н. Двирнык, О.А. Гаврилина, Е.Н. Паровичникова, А.Б. Судариков

ОСОБЕННОСТИ РЕАРАНЖИРОВКИ ГЕНОВ Т-КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ ИЗ РАННИХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ, Т-ОЛЛ С КОЭКСПРЕССИЕЙ МИЕЛОИДНЫХ МАРКЕРОВ И ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ СО СМЕШАНЫМ Т/МИЕЛОИДНЫМ ФЕНОТИПОМ

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

Введение. Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) из ранних Т-клеточных предшественников (ЕТР) – редкая, недавно выделенная подгруппа Т-ОЛЛ, опухолевые клетки которой несут одновременно иммунофенотипические маркеры ранней диф-

ференцировки Т-клеток (сутCD3, CD7) и один или несколько миелоидных маркеров или маркеров стволовых клеток. Прогноз при ЕТР неблагоприятный, а при рецидивах часто наблюдается смена иммунофенотипа (ИФ) на миелоидный. Счита-

ется, что клетка-предшественница ЕТР имеет полипотентные черты как Т-клеток, так и миелоидных предшественников. Одна из черт, характеризующая Т-клетку – реаранжировки генов Т-клеточного рецептора (TCR α), которые происходят уже на самых ранних этапах развития Т-клетки. Клональные TCR α находят у 95% больных с Т-ОЛЛ. При этом неполные перестройки TCRD (V δ 2/D δ 2-D δ 3) не являются линейно-специфичными и могут определяться даже при ОМЛ. Гены δ -цепи TCR (TCRD) – самая ранняя генная перестройка в Т-лимфоцитах, встречается примерно в 50-55% случаев Т-ОЛЛ, гены γ -цепи TCR (TCRG) перестроены у 95% пациентов, гены β -цепи TCR (TCRB) – у 92% пациентов. Частота и характер TCR α при ЕТР-ОЛЛ не изучены, хотя известно, что TCR α происходят значительно реже чем при Т-ОЛЛ. Кроме того, особый интерес представляют данные о стабильности TCR α в рецидивах заболевания со сменой ИФ.

Цель. Определить характер и стабильность клональных реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов у пациентов с ЕТР-ОЛЛ и прочими ОЛЛ с коэкспрессией Т/миелоидных маркеров. Изучить связь между TCR α и иммунологическими маркерами, характеризующими зрелостью Т-лимфоцитов (cyt CD3).

Материалы и методы. Всего исследовано 36 пациентов: 21 ЕТР-ОЛЛ, 10 Т-ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных маркеров и 5 острых лейкозов со смешанным Т/миелоидным фенотипом (ОЛСФ), которые наблюдались в “НМИЦ Гематологии” МЗ РФ с 2015 года. У 14 пациентов проведен сравнительный анализ реаранжировок в дебюте и рецидиве/ах заболевания. Исследование реаранжировок генов TCRD, TCRG и TCRB проводили методом ПЦР по протоколу BIOMED-2 с последующим капиллярным электрофорезом на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems).

Результаты. У 52% (11 из 21) пациентов с ЕТР-ОЛЛ не было выявлено никаких TCR α , т. е. гены TCR находились в герми-

нальном состоянии, либо были выявлены только неполные реаранжировки TCRD, что указывало на отсутствие признаков “генетической дифференцировки” в сторону Т-лимфоцитов. У остальных пациентов выявлялись реаранжировки одной или нескольких цепей TCR. Среднее количество TCR α на одного пациента было самым низким в группе ЕТР-ОЛЛ (1,2), чуть выше у пациентов с Т-ОЛЛ с коэкспрессией миелоидных маркеров (2,1) и в группе с ОЛСФ -3,8, при этом различия были недостоверны из-за малой выборки. Корреляция количества TCR α и cytCD3 отсутствовала ($p=0,2$), т. е. даже при 99,9% экспрессии cytCD3 гены Т-клеточного рецептора могли находиться в герминальном состоянии и наоборот. Мы исследовали и сравнили TCR α в дебюте и в рецидивах заболевания у 14 пациентов. У 4-х пациентов из 14 (29%) мы выявили частичную смену TCR α в рецидиве, в основном за счет приобретения новых, более “зрелых” реаранжировок TCRB, что очевидно можно связать с работой ферментов RAG1 и RAG2, которые отвечают за процесс V-D-J рекомбинации. У 71% (10 из 14) новых TCR α в рецидивах не появилось, а выявленные в дебюте были стабильны. Большинство из этих пациентов (8 из 10) имели “незрелый” характер TCR α , что может указывать на дефицит ферментов RAG1 и RAG2 в опухолевых клетках, как в дебюте, так и в рецидиве заболевания. Мы исследовали TCR α у 3-х пациентов с рецидивами и сменой ИФ. У 100% (3 из 3) при смене ИФ клональные TCR α не изменились, т.е. опухолевый клон в рецидиве остался прежним.

Выводы. ЕТР-ОЛЛ в 52% случаев демонстрирует “незрелый” профиль TCR α (полное отсутствие или наличие только неполной реаранжировки TCRD). При этом четкой связи между наличием TCR α и экспрессией cytCD3 не выявлено. TCR α имеют высокую стабильность при рецидивах, даже в случаях смены ИФ с Т-клеточного на миелоидный, что доказывает полипотентность клеток-предшественников ЕТР-ОЛЛ.

Ю.В. Сидорова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, Н.В. Рисинская, О.А. Глинщикова, А.С. Пшеничный, И.А. Лукьянова, Е.Н. Паровичникова, А.Б. Судариков

МОНИТОРИНГ МУТАЦИИ FLT3-ITD МЕТОДОМ TD-PCR

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

Введение. Мутация FLT3-ITD – внутренняя тандемная дупликация в 14 экзоне/интроне гена FLT3, является одной из самых частых мутаций при остром миелобластном лейкозе (ОМЛ) и встречается в 25-30% случаев. Как фактор неблагоприятного прогноза данная мутация интересна для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ). Однако непостоянное место и переменный размер (от нескольких нуклеотидов до >200 bp) вставки затрудняет ПЦР диагностику. Недавно предложенный метод TD-PCR обладает достаточной чувствительностью 10⁻⁴-10⁻⁵ для отслеживания МОБ. В основе метода – система из 8-ми пар праймеров, которые перекрывают возможную зону дупликации. В каждой паре прямой и обратный праймер комплементарны друг другу, и в случае отсутствия вставки FLT3-ITD ПЦР амплификация не происходит. Если есть дупликация FLT3, то один из праймеров “садится” на дублированный участок, что приводит к появлению амплификата равного длине вставки плюс длина праймера. При помощи капиллярного электрофореза и фрагментного анализа можно выявить амплификат нужной длины. Ниже мы приводим первые результаты применения данного метода для мониторинга МОБ при ОМЛ.

Цель. Оценить возможности метода TD-PCR при оценке МОБ у пациентов с ОМЛ.

Материалы и методы. Всего исследовано 53 пациента с ОМЛ с FLT3-ITD мутацией, наличие которой было доказано методом фрагментного анализа стандартными протоколами. Все пациенты наблюдались или проходили первичное обследование в “НМИЦ Гематологии” МЗ РФ с 2018 года. Для

TD-PCR применяли методику, описанную ранее.

Результаты. У 56,6% (30 из 53 пациентов) с FLT3-ITD удалось выполнить TD-PCR, т.е. при первичном тестировании и также при разведении в 1000/ 10000 раз выявлен амплификат нужной длины. Основная причина невозможности применения данного метода – короткая вставка (у 21 из 53 пациентов – 39,6%). При размере вставки менее 40 нуклеотидов определение специфического продукта при фрагментном анализе невозможно из-за димеров праймеров схожего размера, а также слишком маленькой зоны посадки праймеров. У 2-х из 53 – 3,8% чувствительность метода оказалась недостаточной для определения МОБ, что было показано при первичном тестировании. У 4-х из 4-х пациентов без эрадикации клона FLT3-ITD перед трансплантацией аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), такой же клон продолжал выявляться и после алло-ТГСК, а заболевание рецидивировало в сроки от 5 мес до 2, 5 лет.

Выводы. Метод TD-PCR приемлем для определения МОБ, однако чувствительность определения сильно варьирует от пациента к пациенту и в ряде случаев может быть недостаточной для определения МОБ, что требует первичного тестирования на серии разведений. Метод можно применить примерно у половины пациентов с FLT3-ITD, так как он не рассчитан на определение вставок длиной менее 40 нуклеотидов. Существенным недостатком является то, что метод TD-PCR неколичественный. Метод TD-PCR – универсальный метод для анализа FLT3-ITD, нетрудоемкий, не требующий пациент-специфичных праймеров.

Ю.В. Сидорова, Н.А. Северина, Б.В. Бидерман, Н.В. Рисинская, О.А. Глинщикова, А.С. Пшеничный, О.М. Королева, В.А. Васильева, Л.А. Кузьмина, Е.Н. Паровичникова, А.Б. Судариков

СЛУЧАЙ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ НЕРОДСТВЕННОГО ДОНОРА С МУТАЦИЕЙ DNMT3A

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

Введение. Соматические мутации гена DNMT3A (ДНК-метилтрансфераза 3A) выявляются у 30-36% пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с нормальным кариотипом. При гематологических опухолях на аминокислотную замену в положении 882 приходится 92% всех точечных соматических мутаций гена DNMT3A, по данным базы COSMIC. Мутации гена DNMT3A относят к ранним, предлейкемическим изменениям. Соматические мутации гена DNMT3A p.R882 обнаруживаются у 0,8% здоровых людей старше 55 лет, так называемый клональный гемопоэз, что однако не всегда приводит к развитию опухоли. ДНК-метилтрансферазы отвечают за метилирование ДНК, что играет важную роль в эпигенетическом регулировании экспрессии генов. Считается, что нарушение метилирования ДНК – база для последующих мутационных изменений. Мутации гена DNMT3A являются факторами неблагоприятного прогноза при ОМЛ, а также ассоциированы с появлением других мутационных изменений, чаще в генах NPM1, FLT3, IDH1/2.

Цель. Описание клинического случая трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора с соматической мутацией в гене DNMT3A.

Материалы и методы. Исследована ДНК костного мозга пациентки с ОМЛ, 36 лет, которая проходила лечение в НМИЦ гематологии с 2016 года. Для исследования мутаций применяли методы аллель-специфичной ПЦР (ас-ПЦР) и NGS.

Результаты. В декабре 2016 года у пациентки верифицирован диагноз острого миелоидного лейкоза, трансформация из миелодиспластического синдрома. При первом молекулярно-генетическом обследовании выявлены мутации DNMT3A p.R882L (40%), IDH2 p.R140Q (40,6%), FLT3 p.D835A (1,8%), NPM1 (31,5%). Пациентке успешно было проведено химиотерапевтическое лечение. В материале костного мозга через три месяца от начала лечения не было обнаружено мутаций, выявляемых ранее. Учитывая молодой возраст

больной, неблагоприятный прогноз основного заболевания, в схему лечения решено включить трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного HLA-идентичного донора. Через три года после трансплантации при повторном исследовании у пациентки не обнаружено мутаций в генах NPM1, FLT3, IDH2, однако обнаружена мутация гена DNMT3A с другой аминокислотной заменой p.R882H (6,25%). Эта соматическая мутация гена DNMT3A (p.R882H) была нами выявлена в лейкоконцентрате донора с аллельной нагрузкой 0,6%, но отсутствовала в костном мозге пациентки до алло-ТГСК. Мы исследовали костный мозг пациентки в динамике после алло-ТГСК и обнаружили постепенное увеличение количества клеток с мутацией p.R882H в костном мозге: 0,8%-1,23%-2%-4,4%-6,25%, соответственно через 1 мес, 3 мес, 6 мес, 1,5 года, 3 года после алло-ТГСК. Из осложнений посттрансплантационного периода у пациентки через год после алло-ТГСК развилась изолированная тромбоцитопения (снижение тромбоцитов до 7 тыс. в мкл) с геморрагическим синдромом и гипоплазия костного мозга, по данным трепанобиоптата. Тромбоцитопения была расценена как реакция трансплантат против хозяина. После выполнения процедур экстракорпорального фотофореза количества тромбоцитов практически нормализовалось (105 тыс. в мкл). В настоящее время пациентка находится под наблюдением.

Выводы. Вопрос о генетическом типировании доноров костного мозга возможно станет актуальным уже в ближайшее время. Вероятно, часть осложнений в посттрансплантационном периоде может быть связана с генетическими аномалиями, приобретенными пациентом в ходе ТГСК. В данном случае кроме самого факта пересадки аллогенного костного мозга с мутацией гена DNMT3A, мы наблюдаем постепенный рост клонального гемопоэза, что может привести к развитию миелодиспластического синдрома/вторичного острого лейкоза.

С.Ю. Смирнова, Н.Г. Габеева, Е.Е. Никулина, В.А. Ковалева, Э.Г. Гемдзян, Е.Е. Звонков, А.Б. Судариков

СВОБОДНО-ЦИРКУЛИРУЮЩАЯ ДНК ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ДИФфуЗНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

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

Введение. Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДБККЛ) – гетерогенная группа лимфатических опухолей, различающихся прогнозом и ответом на лечение. На сегодняшний день универсального прогностического маркера для пациентов с ДБККЛ нет. Все больший интерес приобретает изучение свободно-циркулирующей ДНК плазмы крови (сцДНКп). Kurtz и соавт. в своем исследовании показали, что по количеству опухолевой сцДНКп до лечения и скорости ее элиминации в процессе терапии можно прогнозировать течение заболевания. Мы исследовали сцДНКп у пациентов с ДБККЛ, выбрав в качестве маркера опухоли В-клеточную клональность (В-КК).

Цель работы: оценить концентрацию и В-КК сцДНКп у пациентов с ДБККЛ на различных этапах терапии, сравнить их с клиническими данными.

Материалы и методы. В исследование включены 16 пациентов с ДБККЛ и 7 здоровых доноров (ЗД). До лечения у всех больных В-КК исследовали в опухолевом материале (ОМ) и сцДНКп (ПЦР, фрагментный анализ). Плазму получали из цельной крови центрифугированием. СцДНКп выделяли коммерческим набором Quagen, измеряли концентрацию на флуориметре Qubit. Лечение проводили по схеме NHL-BFM-90.

Результаты. У больных с ДБККЛ до начала терапии концентрация сцДНКп была достоверно выше (411 пг/мкл, чем у ЗД (<50 пг/мкл). Начало лечения (2 дня предфазы) значительно увеличило концентрацию сцДНКп – 2800 пг/мкл vs 411 пг/мкл у пациентов без терапии. У 13 из 14 (93%) больных при исследовании В-КК в сцДНКп до начала лечения был выявлен клональный продукт (КП), который по длине совпадал с выявленным в ОМ. У 2 больных при исследовании В-КК

сцДНКп до лечения помимо опухолевого клона были выявлены 2-3 дополнительных КП, что предположительно могло отражать опухолевую гетерогенность. У 1 пациента с изолированным поражением толстой кишки было выполнено радикальное удаление опухоли, после чего В-КК в сцДНКп не выявлялась, а ее концентрация была такой же, как у ЗД. После 1 курса ХТ отмечено увеличение концентрации сцДНКп (М-639 пг/мкл), что вероятнее всего связано с токсическим действием препаратов в том числе и на здоровые ткани, поскольку опухолевого маркера (В-КК) после 1 курса выявлено не было у 7 из 9 (78%) пациентов. После 2 курсов средняя концентрация сцДНКп составила 379 пг/мкл, В-КК выявлена у 1 из 7 (14%) пациентов. После 3 и 4 курсов ХТ концентрация

сцДНКп была сопоставима с концентрацией сцДНКп у ЗД, а В-КК не выявлена ни в одном случае. Связи В-КК, концентрации сцДНКп с распространенностью процесса, экспрессией маркера пролиферации Ki-67, нодальным/экстранодальным поражением и молекулярными маркерами агрессивного течения не выявлено.

Выводы. Исследование сцДНКп у пациентов с ДБККЛ представляется перспективным, доступным при малоинвазивном вмешательстве, но недостаточно изученным диагностическим подходом. Для определения значения сцДНКп как маркера опухолевой гетерогенности и предиктора рецидива необходимы исследования в динамике на более репрезентативных выборках.

К.А. Сычевская, С.К. Кравченко, Е.Е. Никулина, А.Е. Мисюрина, Н.В. Рисинская, А.У. Магомедова, А.Б. Сударииков

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО ПРОФИЛЯ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИМФОМ И ИХ ПРОГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ

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

Введение. Идентификация в дебюте заболевания пациентов с неблагоприятным течением В-клеточных лимфом представляет сложность. Это связано с отсутствием на настоящий момент прогностических шкал, которые бы в полной мере характеризовали биологию опухоли. Система репарации представляет собой сложный аппарат контроля исходной последовательности ДНК. В этом качестве ее значение велико как на этапе возникновения новой опухоли, так и при эволюции опухолевых клонов. Роль нарушений системы репарации неспаренных нуклеотидов и возникающей вследствие этих нарушений нестабильности микросателлитных повторов (MSI – microsatellite instability) уже доказана для солидных опухолей. Поскольку В-клеточные лимфомы характеризуются высокой генетической пластичностью, мы предполагаем, что в их патогенезе могут принимать участие изменения системы репарации, определяющие поведение опухоли и прогноз заболевания.

Цель. Анализ изменений микросателлитного профиля и их прогностического значения у пациентов с агрессивными и индолентными В-клеточными лимфомами.

Материалы и методы. В исследование включили 38 пациентов с диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ), 40 больных В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности (HGBL) и 84 пациента с фолликулярной лимфомой (ФЛ). В последней группе было 28 пациентов с ФЛ 1-2 типа, 25 пациентов с ФЛ 3А типа и 31 пациент с ФЛ 3В и трансформацией ФЛ в крупноклеточную лимфому. Все пациенты дали добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование выполняли с использованием диагностических панелей COrDIS Plus и COrDIS MSI (ООО Гордиз, Россия) в материале опухолевой ткани и клетках периферической крови в качестве контрольного образца. Амплификацию и фрагментный анализ проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США) и генетическом анализаторе Нанофор-05 (ООО Синтол, Россия), соответственно. Статистический анализ был выполнен в программе STATISTICA12 (StatSoft, USA).

Результаты. Выявленные изменения микросателлитного профиля были классифицированы следующим образом: EMAST (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats) – появление нового аллеля тетра-нуклеотидного локуса; LOH (loss of heterozygosity) – аллельный дисбаланс; monoMSI – абберации мононуклеотидных маркеров. В группе ФЛ наблюдались различия между типами с индолентным течением (1-2 и 3А типы) и агрессивной формой

ФЛ (3В и трансформация в крупноклеточную лимфому). Вероятность выявления EMAST, monoMSI и LOH при ФЛ с трансформацией была выше, чем при ФЛ 1-2 и 3А морфологического типа, однако различия не достигали статистической значимости. При сравнении общей группы ФЛ с ДВККЛ и HGBL показана большая вероятность появления аббераций микросателлитов, особенно в отношении феномена EMAST ($p < 0,05$ в тесте χ^2), при ДВККЛ и HGBL. Согласно полученным результатам, можно говорить о том, что при гистологической трансформации ФЛ в геноме не происходит накопления значительного количества аббераций микросателлитов, сравнимого с агрессивными В-клеточными лимфомами de novo. Вероятно, факторы, лежащие в основе появления нестабильности микросателлитных повторов, являются свойством опухоли на ранних этапах ее развития и не приобретаются в процессе опухолевой прогрессии. Поскольку ФЛ 3 типа является гетерогенной по клиническому течению группой лимфом, и разработка новых прогностических моделей представляется актуальной задачей, дополнительно был проведен анализ возможного прогностического значения аббераций микросателлитов. В когорте пациентов с ФЛ 3 типа (3А, 3В и ФЛ с трансформацией) общая выживаемость и бессобытийная выживаемость не различались в группах с наличием или отсутствием аббераций микросателлитных повторов.

Выводы. На основании полученных данных можно утверждать, что феномен нестабильности микросателлитов распространен в группе В-клеточных лимфом. Особенности распределения частот EMAST, MSI и LOH имеют нозологическую специфичность. Данные генетические абберации в большей степени характерны для агрессивных лимфом, возникших de novo, чем для ФЛ с трансформацией в крупноклеточную лимфому. Прогностическая значимость EMAST, monoMSI и LOH не доказана в группе ФЛ 3 типа, однако для формирования окончательного заключения необходимо расширение когорты пациентов и проведение дополнительного анализа.

К.А. Сычевская, С.К. Кравченко, Б.В. Бидерман, Е.Е. Никулина, А.Е. Мисюрин,
Н.В. Рисинская, А.Б. Судариков

НЕСТАБИЛЬНОСТЬ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ И МУТАЦИИ ГЕНОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В ДЕБЮТЕ И РЕЦИДИВЕ/ПРОГРЕССИИ Фолликулярной Лимфомы

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

Введение. Эффективные протоколы лечения пациентов с резистентным течением фолликулярной лимфомы (ФЛ) на настоящий момент не разработаны. Возможность создания новых лекарственных препаратов зависит от прогресса в понимании патогенеза опухоли. Поэтому изучение закономерностей опухолевой эволюции представляется актуальной задачей. Генетические aberrации, определяющие опухолевую резистентность, могут возникать вследствие различных процессов, изменяющих исходную структуру ДНК. Система репарации неспаренных нуклеотидов представляет собой одно из ключевых звеньев генетического гомеостаза. Известно, что дефект этой системы выражается в микросателлитной нестабильности (MSI – microsatellite instability). В-клеточные лимфомы центра фолликула характеризуются высокой вероятностью соматического мутагенеза генов иммуноглобулинов. Возникновение точечных соматических мутаций в области других генов-мишеней может провоцировать опухолевую прогрессию.

Цель. Изучение роли aberrаций микросателлитных повторов и мутаций генов иммуноглобулинов у пациентов с резистентным течением ФЛ.

Материалы и методы. В исследование было включено 19 пациентов с ФЛ. Парные биопсии были выполнены у 10 пациентов в дебюте и рецидиве, у 6 пациентов – в дебюте и прогрессии во время химиотерапии, у 3 пациентов – в дебюте и прогрессии после периода наблюдения без лечения. Все пациенты дали добровольное согласие на участие в исследовании. Исследование микросателлитного профиля выполняли с использованием диагностической панели CorDIS Plus (ООО Гордиз, Россия) в материале опухолевой ткани и клетках периферической крови в качестве контрольного образца. Амплификацию, фрагментный анализ и секвенирование по Сэнгеру генов тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH) проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США) и генетическом анализаторе Нанофор-05 (ООО Синтол, Россия), соответственно.

Результаты. Выявленные изменения микросателлитного профиля были классифицированы следующим образом: EMAST (elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats) – появление нового аллеля тетрануклеотидного локуса; LOH (loss of heterozygosity) – аллельный дисбаланс. Принято

считать EMAST частным вариантом MSI. В целом, при ФЛ наблюдается тенденция к увеличению числа генетических событий в материале повторных биопсий. В случае LOH различия между группами дебюта и рецидива/прогрессии были статистически значимы в тесте χ^2 ($p < 0,05$). Зависимости динамики накопления aberrаций микросателлитного профиля от морфологического типа ФЛ, варианта клинического течения заболевания (рецидив VS прогрессия +/- терапия) в данной когорте больных прослежено не было. У большинства пациентов отмечалось появление новых локусов LOH и EMAST дополнительно к существующим в дебюте aberrациям. Однако, в 3 случаях локусы LOH в дебюте и рецидиве/прогрессии не совпадали. У 7 пациентов технически оказалось возможным провести секвенирование генов IGH. В 4 случаях нуклеотидные последовательности в парных образцах были идентичны. У 2 пациентов в прогрессии заболевания появились единичные новые точечные мутации, и в одном случае последовательности генов дебюта/рецидива существенно различались по нуклеотидным заменам в 41 позиции. Поскольку вероятность “потери” клоном рецидива целого ряда генетических aberrаций, существующих в дебюте заболевания, низка, представляется более вероятным предположить на основании приведенных примеров, что в ряде случаев опухолевая популяция при возврате заболевания может не быть дочерней по отношению к клоноу дебюта и происходит из стволовой клетки опухоли независимо.

Выводы. Для ФЛ показано увеличение степени нестабильности микросателлитных повторов и появление новых соматических мутаций по мере прогрессирования опухоли. Доказана возможность развития опухолевых клонов дебюта и возврата заболевания из более ранней опухолевой клетки-предшественницы. Поскольку возникновение новых генетических нарушений было отмечено, в том числе, у пациентов, у которых обе биопсии были выполнены до начала терапии, эволюция опухолевого клона может происходить без лекарственного цитотоксического давления. При сопоставлении изменений микросателлитного профиля и соматических мутаций генов IGH не отмечено взаимосвязи между процессами появления и накопления локусов MSI и соматического мутагенеза что может быть связано с недостаточным объемом выборки.

С.А. Треглазова, Е.Е. Никулина, Т.В. Макарик, А.О. Абдуллаев, И.Н. Суборцева, А.Л. Меликян, А.Б. Судариков

ДИНАМИКА МУТАЦИИ CALR У РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ С PH-НЕГАТИВНЫМИ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ НА ТЕРАПИИ ИНТЕРФЕРОНОМ-АЛЬФА

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

Введение. Мутации 9 экзона в гене CALR наряду с мутациями гена JAK2 и/или MPL являются рутинными диагностическими маркерами при Ph-негативных миелопролиферативных новообразованиях (МПН). Хотя молекулярный мониторинг минимальной остаточной болезни не входит в общепринятые протоколы лечения МПН, многочисленные научные исследования мутационной нагрузки JAK2 (V617F) показали, что терапия интерфероном- α (ИФН) часто индуцирует как гематологические, так и молекулярные ремиссии. В то же время, значение

мониторинга мутационной нагрузки CALR до сих пор остается спорным.

Цель. Оценить клиренс клонов с мутациями гена CALR у российских пациентов с Ph – негативными МПН, получавших ИФН.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты, с установленными диагнозами в соответствии с классификацией ВОЗ (2017) и получавшие терапию ИФН в амбулаторном отделении НМИЦ гематологии с 2015 по 2020 год

(n=27), у которых удалось отследить динамику мутационного клона. Среди 27 пациентов с МПН 16 случаев были эссенциальной тромбоцитемией (ЭТ), 10 случаев – с первичным миелодисплазией (ПМФ), 1 – с неклассифицированным МПН. Все случаи были проверены на наличие мутаций генов JAK2 (V617F), CALR (экзон 9) и MPL (W515L/K) с помощью аллель-специфической ПЦР или фрагментного анализа. Все пациенты были положительными по CALR (тип 1 или тип 2), при этом JAK2 (V617F) и MPL (W515L/K) мутации отсутствовали на момент диагностики. Соотношение женщины: мужчины - 3,7:1 (22:5; 81%: 19%), средний возраст на момент постановки диагноза составлял 34,6 года (диапазон 18-70 лет). Медиана продолжительности лечения ИФН составила 30,5 мес (диапазон 10-68).

Результаты. Все пациенты в нашем исследовании имели более чем 18% – ный уровень мутантного аллеля CALR исходно (18-62%). На момент второй точки мониторинга (Ме 32 месяца (10-68)) у всех пациентов была констатирована клинико-гематологическая ремиссия. Для оценки молекулярного ответа при лечении ИФН использовались следующие значения снижения аллельной нагрузки относительно первой точки измерения (соответствует дебюту заболевания): полный молекулярный ответ – ПМО (снижение количества клеток с мутацией CALR на 75% и более относительно количества в дебюте), большой молекулярный ответ – БМО (на 50-75%), частичный молекулярный ответ – ЧМО (менее, чем на 50%), минимальный молекулярный ответ – минМО (менее, чем на

25%). У больных с ЭТ так и ПМФ и 1-ым типом мутации CALR хотя бы минимальный молекулярный ответ был получен у 77 и 33% соответственно. При этом у пациентов с ПМФ аллельная нагрузка в начале заболевания была не более 30%. Только 2 пациента ЭТ и мутацией CALR 2-го типа 2 достигли минимального и частичного молекулярного ответа. Оба имели в начале заболевания начальный уровень аллельной нагрузки не более 45%. У пациентов с ПМФ со вторым типом мутации не было достигнуто никакого молекулярного ответа. У пациента с неклассифицируемым МПН после 30 месяцев лечения доля клеток с мутацией CALR 1-го типа выросла с 33% до 43%.

Выводы. Несмотря на полную гематологическую ремиссию, достигнутую всеми пациентами, включенными в исследование, снижение доли клона с мутацией наблюдалось только в случаях с 1-ым типом мутации CALR. У нескольких пациентов (независимо от типа мутации) отмечено возрастание доли мутированных клеток. Можно предположить, что лечение ИФН затрагивает менее дифференцированные клетки с мутациями CALR, и не затрагивает более дифференцированные, что в сумме не приводит к снижению доли клеток, несущих мутацию. Однако, необходимы дальнейшие исследования на большем количестве пациентов, а также с сортированными клеточными популяциями, чтобы подтвердить эту точку зрения и установить необходимость мониторинга мутаций CALR при терапии МПН.

Г.А. Цаур^{1,2,3}, А.М. Попов⁴, Т.Ю. Вержбицкая^{1,2}, Л.В. Мовчан⁵, М.В. Белевцев⁵, О.В. Алейникова^{4,5}, Т.О. Ригер^{1,2}, А.С. Демина^{1,2}, А.М. Кустанович⁶, О.Р. Аракаев^{1,2}, Л.И. Савельев^{1,2,3}, Ю.В. Ольшанская⁴, Ю.В. Румянцева⁴, А.И. Карачунский⁴, Л.Г. Фечина^{1,2}

ОЦЕНКА МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

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

⁵ Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Республика Беларусь

⁶ Институт онкологии Шаретт, Медицинский Центр Хадасса, г. Иерусалим, Израиль

Введение. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) – один из краеугольных показателей, определяющих прогноз острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) у детей.

Цель. Оценить роль МОБ у детей с ОЛЛ старше 1 года.

Материалы и методы. МОБ методом многоцветной (4-10) проточной цитометрии (МПЦ) определяли у 581 пациента в возрасте от 1 до 18 лет, включенных в исследование ALL-MB 2008.

Результаты. Среди 581 пациента с ОЛЛ старше 1 года отсутствие клинико-гематологической ремиссии (КГР) ($\geq 5\%$ бластов по данным цитологического исследования) на 36-й день было выявлено у 17. Из этого числа у 7 пациентов количество бластов по данным МПЦ было $< 5\%$. В этой группе было зафиксировано 2 рецидива (29%). В группе, в которой $\geq 5\%$ бластов было выявлено обоими методами (n=10) зарегистрировано 5 рецидивов (50%). В группе, в которой по данным цитологии было менее 5% бластов, а по данным МПЦ $\geq 5\%$ (n=3) все пациенты рецидивировали (100%). Таким образом, была сформирована группа с отсутствием КГР и/или величиной МОБ $\geq 5\%$ (n=20, 3,44%) с величиной БСВ 38,4%, что было достоверно ниже, чем у пациентов, у которых выявлено менее 5% бластов двумя методами (p<0,0001). Большая часть неудач терапии на 36-й день была выявлена у пациентов с наличием BCR-ABL1-подобного ОЛЛ и делециями IKZF1. Далее мы разделили всех пациентов по величине МОБ на следующие подгруппы менее

0,01%, 0,01%–менее 0,1%, 0,1%–менее 1,0%, 1,0%–менее 10,0%, более 10,0%. При сравнении величины МОБ у пациентов разных генетических подгрупп выявлено, что сходные профили МОБ выявлены у пациентов с высокой гиперплоидией (n=80) и транслокацией t(12;21)/ETV6-RUNX1 (n=115). Эти две группы достоверно отличались от пациентов с транслокацией t(9;22)/BCR-ABL1 (n=15) и перестройками 11q23/KMT2A (MLL) (n=8) (p<0,001 в обоих случаях). На следующем этапе мы провели ROC-анализ для выявления величины МОБ на 36-й день терапии, которая наиболее эффективно разделяет пациентов с разными исходами терапии, и сравнили эту величину с традиционными пороговыми порогами (ПУ) МОБ, кратными 10 (0,01%, 0,1%). Для пациентов с высокой гиперплоидией и транслокацией t(12;21)/ETV6-RUNX1 эти величины совпали и составили 0,03%. В этой объединенной группе низкого цитогенетического (ЦГ) риска доля пациентов с рецидивами у пациентов с МОБ ниже ПУ составила 2,5%, а \geq ПУ – 20,0%. Это деление было более эффективным, чем традиционные ПУ (0,01%, 0,1%). В группе высокого ЦГ риска, которая была образована при слиянии пациентов с транслокацией t(9;22)/BCR-ABL1 и перестройками 11q23/KMT2A ПУ, рассчитанный методом ROC анализа, составил 0,3%. Ни один из 11 пациентов из этой группы с МОБ ниже ПУ не рецидивировал. Доля рецидивов при МОБ \geq ПУ составила 75,0%. Также как и для пациентов низкого ЦГ риска было более эффективным, чем традиционные уровни ПУ. Для группы дру-

гие В-линейные ОЛЛ, объединившей всех оставшихся пациентов, рассчитанный ПУ составил 0,04%. Однако доля рецидивов при этом ПУ и ПУ=0,1% была практически идентичной. Рассчитанные ПУ эффективно делили пациентов с разными исходами терапии в каждой из вышеуказанных ЦГ подгрупп ($p < 0,001$ для каждого сравнения из трех).

Выводы. При комбинированном использовании данных

МОБ и цитологии на 36-й день лечения по протоколу ALL-MB 2009 позволило выделить пациентов с неблагоприятным прогнозом. Дифференциальный подход к выбору ПУ в зависимости от ЦГ подгруппы на 36-й день лечения по протоколу ALL-MB 2009 позволяет более эффективно делить пациентов с благоприятными и неблагоприятными исходами терапии, чем применение традиционных ПУ.

Н.Ю. Цветков, Е.В. Морозова, О.С. Епифановская, Е.В. Бабенко, Е.А. Измайлова, А.И. Шакирова, И.М. Бархатов, М.В. Барабанцикова, К.В. Лепик, Е.А. Бакин, Ю.Ю. Власова, А.Г. Смирнова, И.С. Моисеев

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ВЫСОКОГО РИСКА

*«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой»
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург*

Введение. Определение прогноза имеет решающее значение для принятия решения о терапевтической тактике у пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС).

Цель. Оценка возможности использования данных молекулярной генетики для определения подгрупп пациентов с МДС с различным клиническим течением.

Материалы и методы. У 56 пациентов проспективно выполнялось прямое секвенирование по Сэнгеру геномной ДНК костного мозга на момент постановки диагноза. Исследовались гены SF3B1, DNMT3A, FLT3, SRSF2, TP53, RUNX1, ASXL1. Исследовалось влияние на 2-летние значения общей и безрецидивной выживаемости, кумулятивные частоты рецидива и летальности, связанной с лечением в зависимости от таких факторов, как возраст, пол, тип МДС, группа риска, уровни бластов, тромбоцитов, гемоглобина, нейтрофилов, ферритина в дебюте заболевания, наличие зависимости от гемотрансфузий, терапия гипометилирующими препаратами в анамнезе, факт выполнения алло-ТГСК. Работа поддержана грантом Российского научного фонда №17-75-20145-П.

Результаты. Точечные мутации в генах SF3B1, DNMT3A, FLT3, GATA2, SRSF2, TP53 ($n=33$) чаще встречались у пациентов старшей возрастной группы: медиана возраста 43 года (21 – 59) у пациентов без мутаций против 53 года (36 – 60) у пациентов с мутациями ($p=0,02$). Аналогичная картина наблюдалась для мутаций генов TP53 и SF3B1 в отдельности: медиана возраста 46 лет (21 – 59) у пациентов без мутаций TP53 против 57 лет (51 – 60) у пациентов с мутациями TP53 ($p=0,02$); медиана возраста 45 лет (21 – 60) у пациентов без мутаций SF3B1 против 55,5 лет (47 – 58) у пациентов с мутациями SF3B1 ($p=0,04$). 2-летняя частота рецидивов у пациентов с мутациями гена

TP53 была значимо выше: 75% ($n=4$, 95% ДИ: 12,8 – 96,1) против 17,4% ($n=29$, 95% ДИ: 5 – 36,2) у пациентов без мутаций гена TP53 ($p=0,009$). Количество мутированных генов значимо влияло на 2-летнюю общую и безрецидивную выживаемость: 75,8% ($n=11$, 95% ДИ: 50,8 – 98,7, медиана не достигнута) и 65,5% ($n=11$, 95% ДИ: 23,6 – 88,3, медиана не достигнута), соответственно, для пациентов без мутаций; 60% ($n=5$, 95% ДИ: 12,6 – 88,2, медиана не достигнута) и 60% ($n=5$, 95% ДИ: 12,6 – 88,2, медиана не достигнута), соответственно, для пациентов с 1 мутацией; 0% ($n=3$, медиана 7,5 месяцев) и 0% ($n=3$, медиана 6,4 месяца), соответственно, для пациентов с 2 мутациями ($p=0,0009$ и $p=0,001$, соответственно). Наличие мутаций в гене RUNX1 значимо влияло на 2-летнюю общую и безрецидивную выживаемость: 72,2% ($n=16$, 95% ДИ: 40,8 – 88,9, медиана не достигнута) и 65,6% ($n=16$, 95% ДИ: 34,9 – 84,5, медиана не достигнута), соответственно, для пациентов без мутаций гена RUNX1; 0% ($n=3$, медиана 14,4 месяца) и 0% ($n=3$, медиана 12,4 месяца), соответственно, для пациентов с мутацией гена RUNX1 ($p=0,004$ и $p=0,009$, соответственно). Количество мутированных генов значимо влияло на 2-летнюю частоту рецидивов: 25,4% ($n=11$, 95% ДИ: 3,2 – 58) для пациентов без мутаций; 20% ($n=5$, 95% ДИ: 0,8 – 58,2) для пациентов с 1 мутацией; 100% ($n=3$) для пациентов с 2 мутациями ($p=0,001$).

Выводы. Описанные предварительные результаты подчеркивают важность использования новых методов для прогноза у пациентов с МДС. Необходимы дальнейшие исследования.

Л.А. Цветкова, О.В. Паина, П.В. Кожжожарь, А.С. Фролова, Ж.З. Рахманова, К.А. Екушов, Н.В. Субора, М.Ю. Аверьянова, П.В. Шевелева, М.А. Эстрина, Е.В. Бабенко, А.Д. Кулагин, Е.В. Семенова, Л.С. Зубаровская

ИНФУЗИИ ДОНОРСКИХ ЛИМФОЦИТОВ В ТЕРАПИИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПОСЛЕ АЛЛО-ТГСК У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

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

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) – один из наиболее эффективных методов лечения у пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Однако, несмотря на значимые успехи в использовании данного метода терапии, рецидивы заболевания после алло-ТГСК остаются главной причиной летальности пациентов, а дальнейшие лечебные опции крайне ограничены. Для выявления пациентов, имеющих высокий риск посттрансплан-

тационного рецидива, требующих профилактики и превентивной терапии, используют определение минимальной остаточной болезни (МОБ). Одним из способов терапии МОБ после алло-ТГСК является иммуноадаптивная терапия инфузиями донорскими лимфоцитами (ИДЛ), механизм действия которых основан на способности индуцировать реакцию «трансплантат против лейкоза» (ТПЛ).

Цель. Оценка эффективности и безопасности ИДЛ в те-

рапии МОБ после алло-ТГСК у педиатрических пациентов с острыми лейкозами.

Материалы и методы. В исследование включены 23 ребенка с медианой возраста 8 лет (1-16 лет) с диагнозами ОМЛ (n=10, 43%) и ОЛЛ (n=13, 57%), которые получили первую алло-ТГСК и инфузии донорских лимфоцитов в связи с появлением МОБ. Гаплоидентичная ТГСК проведена 12 (52%) пациентам, родственная полностью совместимая - 4 (17%) пациентам, неродственная полностью совместимая - 5 (22%), неродственная частично совместимая - 2 пациентам (9%). Медиана срока появления МОБ после алло-ТГСК составила 77 дней (30-736). МОБ молекулярно-генетическим методом была определена у 16 (70%) детей, у пациентов с ОЛЛ встречались t (9;22), t (12;21), MLL (KMT2A) реарранжировка, t (1;19), клональные реарранжировки генов иммуноглобулинов. Среди детей с ОМЛ были выявлены: t (8;21), inv 16, MLL (KMT2A) реарранжировка. У одного пациента отмечались только изменения кариотипа в виде трисомии 21 пары хромосомы в 10% метафаз. Остальные 6 (26%) пациентов имели МОБ, установленную методом ИФТ. У всех пациентов сохранялась клиничко-гематологическая ремиссия заболевания на момент введения ИДЛ. Медиана первой дозы ИДЛ составила 1*10⁶ CD3+/кг (1*10⁴ - 1.6*10⁶ CD3+/кг), суммарной дозы - 1.2*10⁶ (1*10⁴ - 1*10⁸ CD3+/кг). Медиана количества введений - 2 (1-6). ИДЛ с эскалацией доз были выполнены 12 пациентам (52%). Медиана дней после алло-ТГСК до введения первой дозы ИДЛ составила 145 дней (45-746). Монотерапию ИДЛ получили 10 пациентов (43%), с гипометилирующими агентами - 5 пациентов (22%), с поддерживающей химиотерапией - 4 пациента (17%), комбинацию с ингибиторами тирозинкиназ - 2 пациента (9%), с интерфероном-гамма (реаферон) - 1 ребенок (4%), с блинатумабом - 1 ребенок

(4%). Для статистического анализа использовались метод Каплана-Мейера и U-критерий Манна-Уитни.

Результаты. При медиане наблюдения 18 месяцев (2-171) ответ был достигнут у 14 (61%) пациентов: 8/13 пациентов с диагнозом ОЛЛ (62%) и 6/10 пациентов с ОМЛ (60%), p=0.89 в виде достижения МОБ отрицательного статуса и/или цитогенетической ремиссии. Общая выживаемость при данной медиане наблюдения составила 65%. Безрецидивная выживаемость - 56,5%. Медиана безрецидивной выживаемости после ИДЛ - 6 месяцев (1-171). Пациенты, достигшие МОБ отрицательного статуса имели достоверно лучшие показатели безрецидивной выживаемости, чем те, которые сохранили позитивный статус МОБ, 78% vs 22%, p=0.03. Индукцию острой РТПХ наблюдали у 3х пациентов (13%), все случаи имели 3-4 степень тяжести. Хроническую РТПХ развили 5 детей (22%), тяжелая форма - у 1 пациента. Наиболее часто встречалась хроническая РТПХ кожи и слизистых. Не было летальных исходов, обусловленных РТПХ. Развитие острой или хронической РТПХ после ИДЛ было ассоциировано с ответом на терапию: 100% против 40% среди пациентов без признаков РТПХ, p=0.023. Безрецидивная выживаемость также была лучше у пациентов с симптомами РТПХ: 75% против 47%, p=0.17. При сравнении БРВ и ОВ пациентов, получивших монотерапию ИДЛ и в терапию ИДЛ в комбинации с другими агентами достоверных различий выявлено не было: 50% vs 61,5%, p=0.2 и 70% vs 61,5, p=0.9, соответственно.

Выводы. Таким образом, ИДЛ могут быть эффективным способом контроля статуса МОБ у детей с острыми лейкозами после алло-ТГСК как в монотерапии, так и в комбинации с другими агентами. Индукция РТПХ после ИДЛ является нечастым осложнением, но ассоциирована с более высоким ответом на проводимую терапию.

Е.Ю. Чельшева¹, А.Н. Петрова¹, О.А. Шухова¹, С.А. Смирнихина², А.В. Быкова¹, И.С. Немченко¹, А.П. Пошивай³, М.С. Фоминых³, И.С. Мартынкевич³, В.А. Шуваев⁴, Н.Н. Цыба¹, С.М. Куликов¹, А.О. Абдуллаев¹, А.Б. Судариков¹, С.И. Куцев², А.Г. Туркина¹

ДИНАМИКА ЛЕЙКЕМИЧЕСКОГО КЛОНА ПОСЛЕ ОТМЕНЫ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ И ФАКТОРЫ СОХРАНЕНИЯ РЕМИССИИ БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ С ГЛУБОКИМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ОТВЕТОМ

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

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

⁴Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москва «Городская клиническая больница им.В.В. Вересаева» Департамента здравоохранения города Москвы, г. Москва

Введение. В рекомендациях по терапии хронического миелолейкоза (ХМЛ) появилась новая опция отмены ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) и наблюдения в ремиссии без лечения (РБЛ) при стабильном глубоком молекулярном ответе (МО). Актуальным вопросом является изучение факторов сохранения РБЛ после отмены ИТК.

Цель. Охарактеризовать кинетику лейкоэмического клона после отмены ИТК у больных ХМЛ со стабильным глубоким МО и определить факторы сохранения РБЛ.

Материалы и методы. В анализ включено 183 больных с хронической фазой ХМЛ и глубоким МО, у которых выполнялась отмена ИТК. Причинами отмены ИТК в исторической группе (ИГ) больных (n=74) с глубоким МО (не менее МО4, BCR-ABL1<0,01%) были токсичность терапии у 30 (41%) больных, беременность у 24 (27%), желание пациентов или административные причины у 20 (32%). В проспективную группу (ПГ, n=109) включено 99 участников проспективного исследования RU-SKI и 10 беременных с ХМЛ, соответствующих основным критериям включения протокола RU-SKI: терапия ИТК> 3 лет,

стабильный глубокий МО> 2 лет. После отмены ИТК в ИГ проводился мониторинг уровня BCR-ABL1 каждые 4-6 недель; в ПГ - ежемесячно в первые 6 мес. после отмены ИТК, каждые 2 мес. до 12 мес. и каждые в 3 мес. после 12 мес. При потере БМО (BCR-ABL1>0,1%) возобновляли прием ИТК. У беременных допускалось возобновление терапии при BCR-ABL1 >1% (потеря МО2). Медиана (Ме) срока терапии ИТК до отмены ИТК составила 7 лет (от 6 мес. до 18 лет), Ме наблюдения после отмены ИТК - 33 мес. (от 1 до 136 мес.).

Результаты. У 92 (50%) больных после отмены ИТК произошла потеря БМО. Прием ИТК возобновлен у 100 (55%) больных: у 92 с потерей БМО и у 8 без потери БМО, по решению врача и пациента. Прогрессии ХМЛ после отмены ИТК не отмечалось. Четверо больных умерли от причин, не связанных с ХМЛ (сердечно-сосудистые заболевания, пневмония). Выживаемость без потери БМО во всей когорте больных составила 62% (95% ДИ 55-70%), через 6 мес., 53% (95% ДИ 38-54%) через 12 мес., 49% (95% ДИ 38-54%) через 24 мес. и 46% (95% ДИ 38-54%) через 36 мес., без существенных различий между ИГ и ПГ. У 70 (76%)

из 92 больных потеря БМО произошла в первые 6 мес. после отмены ИТК; Ме срока до потери БМО составила 4 мес. (от 1 до 31 мес.). После 36 мес. наблюдалось «плато» без потери БМО.

По результатам однофакторного анализа, значимыми факторами для сохранения БМО были длительность терапии ИТК ($p=0,0005$), длительность глубокого МО ($p=0,0095$), глубина МО на момент отмены ИТК ($p=0,0114$) и терапия ИФН в анамнезе ($p=0,0364$). Возраст, пол, группа риска Sokal и ELTS, линия терапии и препарат ИТК, а также резистентность к ИТК в анамнезе, не были значимы. Отмечено, что Ме срока терапии при применении ИТК2 в первой линии, была почти вдвое меньше по сравнению с иматинибом: 41,5 мес. по сравнению с 90,1 мес. ($p<0,0001$). Беременность не оказывала значимого влияния на выживаемость без потери БМО ($p=0,175$). Оптимальное разделение длительности терапии ИТК и длительности глубокого МО, определенное методом наименьшего значения p , составило 6,5 лет и 6,25 лет соответственно. При многофакторном анализе установлено, что длительность терапии ИТК более 6,5 лет и глубина МО4,5 были достоверными факторами, влияющими на сохранение БМО после отмены терапии ($p<0,05$). Выживаемость без потери БМО через 36 мес. после отмены ИТК при наличии двух указанных факторов (низкий риск потери БМО), наличии только одного фактора (промежуточный риск) и отсутствии факторов (высокий риск) составила 65%, 40% и 23% соответственно.

Для определения потенциальных BCR-ABL1-независимых молекулярных предикторов потери БМО выполнялось полноэкзомное секвенирование (ПЭС) образцов ДНК, выделенных из крови 6 больных ХМЛ с глубоким МО после отмены ИТК, у 3 из которых отмечалась потеря БМО, у 3 – потери БМО не было. В

результате биоинформационной обработки и последующего изучения в актуальных базах данных и в научной литературе для валидации отобраны 4 функционально значимых экзомных варианта, связанных с патогенезом онкогематологических заболеваний: генотип Т/Т в гене CYP1B1 (rs1800440), отсутствие делеции в гене ALPK2 (rs67925233) и генотип С/С в гене IRF1 (rs839) в группе с потерей БМО, а также миссенс вариант в гене PARP9 (rs34006803) в группе без потери БМО. Наличие указанных вариантов было подтверждено с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. На втором этапе проводилась валидация отобранных генетических маркеров в подгруппе из 68 больных с глубоким МО, у 33 (48,5%) из которых после отмены ИТК отмечена потеря БМО. При оценке выживаемости без потери БМО в зависимости от наличия предположительно неблагоприятных вариантов в указанных генах достоверных различий для каждого отдельно взятого маркера и в зависимости от числа маркеров не отмечено ($p=0,885$).

Заключение. Изучены основные закономерности поведения остаточного лейкозного клона после отмены ИТК у больных ХМЛ с глубоким МО. Подтверждена безопасность контролируемой отмены ИТК и наблюдения в РБЛ, при обязательном условии регулярного контроле уровня BCR-ABL1. По результатам оценки кинетики лейкозного клона после отмены ИТК у беременных, впервые подтверждено, что беременность не оказывает значимого влияния на сохранение БМО. Определены факторы сохранения БМО после отмены ИТК: длительность терапии ИТК более 6,5 лет и наличие глубокого МО 4,5. BCR-ABL1-независимых маркеров сохранения ремиссии без лечения при полноэкзомном секвенировании выявить не удалось.

О.А. Шухов¹, М.А. Гурьянова¹, Е.Ю. Чельшева¹, А. Н. Петрова¹, А.В. Быкова¹, И.С. Немченко¹, Н.Н. Цыба¹, А.О. Абдуллаев¹, А.Б. Судариков¹, А. Никифорова², С. Горбачева², Д. Гребенкин², В. Казей², АГ. Туркина¹

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РОССИЙСКОГО ПРОСПЕКТИВНОГО НЕРАНДОМИЗИРОВАННОГО СТРАТИФИЦИРОВАННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ READIT ПО РЕДУКЦИИ ДОЗ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗИ И ОТМЕНЕ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ СО СТАБИЛЬНЫМ ГЛУБОКИМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ОТВЕТОМ

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

² Биоаналитическая лаборатория «Echaste Labs», г. Москва

Введение. Возможность снижения дозы ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) как этап перед полной отменой была продемонстрирована в нескольких клинических исследованиях, однако единой схемы для каждого ИТК не разработано. Также не описано влияние концентрации ИТК в плазме крови на сниженных дозах на сохранение молекулярного ответа.

Цель. Представить первые промежуточные результаты проспективного нерандомизированного стратифицированного исследования READIT по редукции доз ингибиторов тирозинкиназы и отмене терапии у больных хроническим миелоидным лейкозом со стабильным глубоким молекулярным ответом (NCT 04578847): частоту молекулярных рецидивов после снижения доз ИТК и первые данные о концентрации иматиниба (ИМ) в плазме крови при снижении дозы.

Материалы и методы. В исследовании запланированы две последовательные фазы: 1) фаза снижения дозы ИТК в течение не менее 12 месяцев, 2) наблюдение ремиссии без лечения (РБЛ). Фаза снижения дозы ИТК состоит из двух этапов продолжительностью 6 месяцев каждый. На первом этапе происходит снижение доз ИМ до 300 мг, nilотиниба (НИЛ) до 400 мг, дазатиниба (ДАЗ) до 50 мг для и босутиниба (БОЗ) до 300 мг. На втором этапе снижение дозы ДАЗ до 25 мг и до 200 мг для ИМ, НИЛ и БОЗ. Критерии включения: взрослые пациенты с ХМЛ в хронической фазе, терапия ИТК > 3 лет, большой моле-

кулярный ответ (БМО, BCR-ABL1 $\leq 0,1\%$) более 2 лет и глубокий молекулярный ответ (ГМО, BCR-ABL1 $\leq 0,01\%$) более 1 года. Набор пациентов, уже получающих сниженные дозы, был возможен при условии продолжительности текущей терапии не менее 6 мес. Возобновление терапии ИТК в случае подтвержденной потери БМО (BCR-ABL1 > 0,1% в двух последовательных анализах) проводится в дозах предыдущего этапа с последующей рескалацией при отсутствии восстановления БМО через 3 месяца. Концентрацию ИМ в плазме измеряли через 24 ± 2 часа (Cmin) и 4 часа (Cmax) после приема препарата. Для сравнительного анализа концентрации использовали U-критерий Манна-Уитни.

Результаты. Всего с декабря 2019 г. по март 2021 г. было включено 70 пациентов с ХМЛ. Исходные характеристики: мужчины 41%, медиана (Ме) возраста 56 лет (23-74); Ме длительности терапии ИТК 6,3 года (2,5-18,9); Ме продолжительности БМО и ГМО составила 3,3 года (2-11,2) и 2 года (1-11,2) соответственно. На момент включения в исследование 46 (66%) пациентам проводилась терапия ИМ (39 пациентов в дозе 400 мг, 3 пациента - 300 мг, 4 пациента - 200 мг) и 24 (34%) пациентам терапия ИТК второго поколения (ИТК2). НИЛ получали 13 пациентов (6 пациентов в дозе 800-600 мг, 6 пациентов - 400 мг, 1 пациент - 200 мг), ДАЗ получали 6 пациентов (4 балла - 100-70 мг, 2 балла - 50 мг), БОС 5 баллов (1 балл -

500 мг). мг, 2 балла – 300 мг, 2 балла – 200 мг). Тридцать шесть пациентов завершили 1-й этап снижения дозы. Три пациента, снизивших дозу ИМ на первом этапе, потеряли ГМО, ни одного случая потери ГМО в группе ИТК2 не отмечено. Двадцать один пациент завершил 2-й этап снижения дозы. Два пациента потеряли ГМО через 3 месяца после снижения дозы (по одному на ИМ и ДАЗ). Случаев подтвержденной потери БМО на этапах снижения доз не было. Была проанализирована концентрация ИМ в 98 пробах (Стах - в 32 пробах, Сmin - в 66 пробах). Была выявлена значительная разница в Сmin для доз ИМ 400 мг, 300 мг и 200 мг ($p = 0,0019$). В свою очередь, не было разницы в

Стах для доз ИМ 300 мг и 200 мг ($p = 0,078$). Различий в концентрации ИМ (Сmin и Стах) на дозах 300 мг и 200 мг в группе пациентов с потерей и без потери ГМО не выявлено. Как и не выявлено различий в концентрации (Сmin) ИМ в дозе 400 мг у пациентов с нежелательными явлениями и без ($p = 0,26$).

Выводы. Первые данные исследования показали, что снижение доз ИТК не приводит к потере БМО, что говорит о безопасности такого подхода в терапии пациентов с стабильным ГМО. В будущем мы планируем оценить, как поэтапное снижение доз повлияет на вероятность сохранения БМО после прекращения терапии ИТК.

К.С. Юровская, М.В. Барабанщикова, Е.В. Морозова, Н.Ю. Цветков, Т.Л. Гундина, И.М. Бархатов, В.В. Байков, И.С. Мусеев

МДС НИЗКОГО И ПРОМЕЖУТОЧНОГО-1 РИСКА: РЕЗУЛЬТАТЫ ТЕРАПИИ (ОПЫТ ЦЕНТРА)

«Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой» Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения Высшего Проффессионального Образования «Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет имени академика И.П. Павлова», г. Санкт-Петербург

Введение. Клиническое течение заболевания у пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС) низкого и промежуточного-1 риска, как правило, является благоприятным. Однако в ряде случаев наблюдается осложнения связанные и не связанные с прогрессированием заболевания.

Цель. Оценить общую выживаемость, время до прогрессирования, эффективность терапии в ретроспективной когорте пациентов с МДС низкого и промежуточного-1 риска IPSS.

Материалы и методы. В исследование были включены данные о 151 пациенте с МДС, мужчины/женщины 69/82, медиана возраста 46 лет (от 18 до 70 лет), варианты МДС согласно классификации ВОЗ: МДС с однолинейной дисплазией (ОЛД) $n=16$, МДС с мультилинейной дисплазией (МЛД) $n=69$, МДС с изолированной делецией 5q- (5q-) $n=28$, МДС с кольцевыми сидеробластами (КС) $n=11$, МДС с избытком бластов (ИБ) $n=25$. Распределение по IPSS: низкий риск $n=34$, промежуточный-1 $n=117$. Оценка эффективности терапии проводилась согласно критериям International Working Group (IWG) 2006. Общая выживаемость (ОВ) определялась как время от даты диагноза до даты последнего визита или смерти, кумулятивная частота прогрессирования - время от даты диагноза до трансформации в ОМЛ, смерть от различных причин выступала в качестве конкурирующего риска.

Результаты. Медиана наблюдения составила 52,3 месяца. Анемия являющаяся наиболее распространенной цитопенией при МДС, отмечена у 124 пациентов (82%). Трансфузионная зависимость отмечена в 126 случаях. Пациенты получали терапию эритропоэстимулирующими агентами (ЭСА) $n=26$, ответ на терапию отмечен в 35% случаев, во всех случаях у пациентов выявлялся низкий уровень эндогенного эритропоэтина сыворотки крови, менее 400 мМЕ/

мл. Пациенты низкого и промежуточного-1 риска получали терапию: циторедуктивную (гидроксикарбамид, малые дозы цитозинарабинозида, гипометилирующие агенты), $n=31$, терапию цислоспорином-А $n=35$, хелатерную терапию $n=35$, терапию леналидомидом $n=20$. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) была выполнена у 24 пациентов. У пациентов с низким и промежуточным-1 риском отмечен фиброз в костном мозге по данным гистологического исследования в 33/151 (22%) случаях, а в 31 случае выявлялись кариологические поломки промежуточного и высокого риска. В 19 случаях выполнялось молекулярно-генетическое исследование на наличие мутации SF3B1, выявлена в 5 случаях, из 17 исследований на наличие мутации SRSF2 выявлена в 2 случаях, в 2 случаях выявлена мутация ASXL1 из 11 выполненных исследований, мутация IDH1 определялась в 2 случаях из 18, TP53 в 1 случае из 18 проведенных исследований. Пятилетняя общая выживаемость (ОВ) в общей группе составила 57,5%, кумулятивная частота прогрессирования (КЧП) 22,3%, ОВ МДС с ОЛД составила 77%, КЧП - 25%, ОВ в группе МДС с МЛД - 57,5%, КЧП - 15,1%, ОВ у пациентов с МДС-5q- составила 87,2%, КЧП - 15%, ОВ в группе МДС с КС 64,8%, КЧП 20%, медиана выживаемости в группе пациентов низкого риска IPSS с избытком бластов составила 547 дней, КЧП в данной группе пациентов 30%.

Выводы. Прогноз пациентов с низким и промежуточным-1 риском не всегда благоприятен. Необходим мониторинг с выполнением цитогенетического, молекулярно-генетического исследования для раннего решения о смене терапии и решения вопроса о проведении алло-ТГСК.

РЕЗОЛЮЦИЯ СОВЕТА ЭКСПЕРТОВ ПО ПРОБЛЕМЕ ТЕРАПИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ, ОСЛОЖНЕННОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

ПРОТОКОЛ СОВЕТА ЭКСПЕРТОВ

Тема Совета экспертов: «Особенности терапии рецидива множественной миеломы у пациентов с нарушением функции почек»

Дата проведения: «12» февраля 2021 г.

Место проведения: онлайн мероприятие.

Количество участников: 17

Участники Совета экспертов:

1. Бессмельцев Станислав Семенович, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н, профессор, академик РАЕ, главный внештатный специалист-гематолог ФМБА России, заместитель директора по научной работе ФГБУ РосНИИ ГТ ФМБА России, Санкт-Петербург (председатель)

2. Салогуб Галина Николаевна, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой внутренних болезней ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург.

3. Шатохин Юрий Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий гематологическим отделением клиники ФГБОУ ВО «РостГМУ» Минздрава России, Ростов-на-Дону.

4. Новицкий Андрей Викторович, д.м.н., главный внештатный специалист-гематолог Санкт-Петербурга, главный врач ГУЗ «Городская больница №15», Санкт-Петербург.

5. Фролова Мария Владимировна, врач-гематолог медицинского центра «Ваш доктор», Вологда.

6. Шнейдер Татьяна Владимировна, главный внештатный специалист-гематолог Ленинградской области, заведующий онкогематологическим отделением №1 ГБУЗ ЛОКБ, Санкт-Петербург.

7. Байгишиева Наида Джупаловна, к.м.н., заведующий отделением гематологии и химиотерапии ГБУ РД «Республиканская клиническая больница», Махачкала.

8. Гарифуллин Андрей Дамирович, к.м.н., врач-гематолог, ФГБУ РосНИИ ГТ ФМБА России, Санкт-Петербург.

9. Пирогова Ольга Владиславовна, к.м.н., старший научный сотрудник клиники НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург.

10. Кобиясов Владимир Аркадьевич, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ «Псковская областная клиническая больница», Псков.

11. Сердюк Ольга Дмитриевна, главный внештатный специалист-гематолог Министерства здравоохранения Краснодарского края, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1», Краснодар.

12. Сычева Татьяна Михайловна, главный внештатный специалист-гематолог Астраханской области, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ АО «Алек-

сандро-Мариинская областная клиническая больница», Астрахань.

13. Клиточенко Татьяна Юрьевна, к.м.н., заведующий отделением гематологии ГБУЗ «ВОКОД», Волгоград.

14. Нередько Юлия Сергеевна, заведующий гематологическим отделением ГБУЗ СК «Ставропольский краевой онкологический диспансер», Ставрополь.

15. Ясакова Зимани Зинкерхановна, заведующий отделением гематологии ГБУ «Республиканская клиническая больница им. Ш.Ш. Эпендиева», Грозный.

16. Комарцева Елена Юрьевна, заведующий гематологическим отделением ГБУ РО «РОКБ», Ростов-на-Дону.

17. Чупракова Алина Сергеевна, врач-гематолог, зав. отделением гематологии, ГБУЗ КО «Центральная городская клиническая больница», Калининград.

Цели Совета экспертов:

1. Получить мнение экспертов по подходам к терапии и неудовлетворенным медицинским потребностям при ведении пациентов с рецидивом множественной миеломы (ММ) и нарушением функции почек в реальной клинической практике в Северо-Западном и Южном федеральных округах Российской Федерации.

2. Получить мнение экспертов о применении Иксасомиба в терапии рецидива ММ у пациентов с нарушением функции почек.

Задачи Совета экспертов:

1. Обсудить особенности мониторинга заболевания у пациентов с ММ и хронической болезнью почек (ХБП) в рутинной клинической практике в Северо-Западном и Южном федеральных округах Российской Федерации.

2. Узнать мнение экспертов о существующих подходах к терапии рецидивов ММ у пациентов с нарушением функции почек.

3. Обсудить с экспертами проблемы при лечении пациентов с рецидивом ММ и ХБП в рутинной клинической практике.

4. Получить мнение экспертов о преимуществах и барьерах применения триплета с иксасомибом при проведении лечения пациентов с рецидивом ММ и нарушением функции почек.

Протокол Совета экспертов:

Заседание Экспертного Совета открыл председатель Бессмельцев С.С., который поприветствовал участников и обозначил основные цели и задачи мероприятия. Поражение почек с развитием хронической почечной недостаточности у больных множественной миеломой (ММ) бывает нередко. Уже при впервые выявленной ММ почечная недостаточность регистрируется, примерно, у 30% больных, а в продвинутых стадиях, прогрессии ММ, частота ее удваивается. Почечная не-

достаточность – это независимый фактор неблагоприятного прогноза, существенно снижающий общую выживаемость больных ММ. Основные патогенетические механизмы поражения почек при ММ связаны с гиперпродукцией и избыточной экскрецией легких цепей (иммуноглобулинов), отложением парапротеинов в форме амилоидных фибрилл и/или фрагментов легких цепей в почечных сосудах, и/или базальной мембране клубочков, канальцев, непосредственной инфильтрацией плазматическими клетками паренхимы почки, развитием иммунокомплексного гломерулонефрита. Наиболее частой причиной ее развития является cast nephropathy (цилиндровая нефропатия) – 33%. Почечная недостаточность ассоциируется с развитием анемии, присоединением инфекционных осложнений, что утяжеляет состояние пациентов. В связи с этим актуальность современных подходов к терапии рецидива ММ у пациентов с почечной недостаточностью, наряду с возможностью коррекции нарушения функции почек не вызывает сомнений. Важно определить какие мы можем использовать препараты в случае выявления у больных ММ почечной недостаточности и насколько обратима почечная недостаточность?

Шатохин Ю.В. в своем выступлении подробнее раскрыл тему актуальности обсуждаемой проблемы. Спикер отметил, что, несмотря на тенденцию к уменьшению возраста дебюта ММ, для пациентов с ММ любая сопутствующая патология остается одним из важных факторов, влияющих на прогноз и выбор терапии, поскольку около 2/3 всех больных на момент постановки диагноза старше 65 лет (медиана возраста 69 лет), а с повышением возраста распространенность и тяжесть коморбидных состояний только увеличивается. Докладчик подчеркнул, что для пациентов с сопутствующими заболеваниями и/или тяжелым общим состоянием основными целями терапии являются повышение продолжительности жизни на фоне сохранения качества жизни и хорошего профиля переносимости лечения.

По мнению эксперта, помимо коморбидности на выбор терапии оказывают влияние распространенность и тяжесть ММ, а также предшествующая терапия. Несмотря на довольно широкий выбор опций терапии для пациентов, их эффективность оказалась недостаточной для излечения пациентов, при этом возможности использования новых комбинаций лекарственных средств для терапии ограничены зарегистрированными показаниями.

При рецидиве ММ ключевыми факторами, которые влияют на принятие решения о выборе схемы терапии следующей линии, являются сопутствующие заболевания и ожидаемая длительность терапии (с учетом безопасности). В то же время по данным ряда исследований повышение длительности терапии и обеспечение ее непрерывности связаны с лучшими результатами лечения. Прекращение приема терапии из-за нежелательных явлений коррелирует с повышенным риском

смерти, который особенно высок уже в первые 6 мес. В практике лечения ММ ведущими факторами, которые могут влиять на преждевременное завершение терапии, являются общее состояние пациента и почечная недостаточность. При этом нарушение функции почек само по себе ухудшает прогноз пациента. Эксперт отметил, что в момент постановки диагноза ММ нарушение почечной функции обнаруживают у 20–25% пациентов, а у 2–5% – терминальная стадия почечной недостаточности, требующая проведения диализа. Кроме того, почечная недостаточность может ухудшать течение других сопутствующих заболеваний, главным образом сердечно-сосудистых.

Выступающий обратил внимание на потенциал использования схем на основе иксазомиба для терапии рецидива при нарушении функции почек. В исследовании TOURMALINE-MM1 на фоне увеличения эффективности схемы Rd (леналидомид+дексаметазон), которое наблюдали при добавлении к терапии иксазомиба, у пациентов сохранялось приемлемое качество жизни, а частота нежелательных явлений была сопоставима с терапией плацебо-Rd. При этом в популяционном исследовании фармакокинетики доказали, что системный диализ не оказывает влияния на содержание иксазомиба в плазме крови, то есть у данной группы пациентов нет необходимости в коррекции дозы препарата (в то же время, у пациентов со средне-тяжелой/тяжелой ХБП рекомендовано использование стартовой дозы иксазомиба 3 мг вместо 4 мг). Докладчик также обратил внимание на то, что пероральный прием препарата у пациента с терминальной ХБП существенно повышает удобство и доступность лечения в связи с отсутствием потребности в длительной госпитализации для проведения химиотерапии.

Эксперт наметил подход к рациональному выбору лечения. Данные из реальной практики показывают, что до второй линии терапии доживает лишь 61% больных ММ, а до третьей линии – менее 40%. С учетом показанной в ряде исследований максимальной пользы от назначения наиболее эффективной терапии в первой линии лечения, в рутинной практике необходимо использовать лучшие доступные варианты терапии как можно раньше. В заключении выступающий подчеркнул, что у пожилых пациентов с ММ коморбидность не является барьером для назначения терапии, а требует учета всех существенных факторов для подбора эффективной и переносимой стратегии лечения. Триплет Иксазомиб + Леналидомид + Дексаметазон – опция выбора терапии для коморбидных пациентов с рецидивами/рефрактерными формами множественной миеломы.

Общая дискуссия

Вопрос 1. Разграничиваете ли вы в своей практике острое повреждение почек (ОПП) и ХБП?

Эксперты высказали различные позиции в отношении рациональности разделения данных синдромов при лечении больных ММ. Так, **Кобиясов В.А.** отметил, что не проводит разграничения, поскольку оно не ока-

зывает существенного влияния на подход к терапии. В то же время **Бессмельцев С.С.** и другие эксперты обратили внимание на то, что ХБП и ОПП отличает друг от друга обратимость последнего. **Клиточенко Т.Ю.** заметила, что чаще всего по доступным данным пациента невозможно дифференцировать ХБП и ОПП. В практике своей клиники специалист госпитализирует всех больных ММ с существенным нарушением почечной функции для как можно раннего начала противоопухолевой терапии. После достижения ответа на лечение, о наличии у пациента ХБП или ОПП можно сделать вывод по восстановлению функции почек или его отсутствию. При этом эксперт при поддержке других коллег указала на то, что в настоящее время зачастую не составляет организационных сложностей одновременное использование заместительной почечной терапии и специальной терапии, в частности по схеме IxаRd (Иксазомиб+л еналидомид+дексаметазон). **Пирогова О.В.** добавила, что в ее центре пациенты с нарушением функции почек, особенно ОПП, чаще всего изначально попадают к специалистам-нефрологам. Причем нефрологи, зачастую считают, что в первую очередь следует использовать терапию, направленную на восстановление функции почек, улучшение состояния больного, и лишь затем начинать специфическую терапию. Между тем ОПП, как и нарастание тяжести хронической почечной недостаточности, является показанием к началу противоопухолевой терапии. В связи с этим важен контакт нефролога с гематологом, и дальнейшее ведение пациентов совместно.

Таким образом, заключил **С.С. Бессмельцев**, разграничение ОПП (длительность до 3 мес.) и ХБП необходимо. Поражение почек расценивается как наиболее частое клиническое, морфологическое и лабораторное проявление множественной миеломы и в то же время как одно из наиболее тяжелых и неблагоприятных в прогностическом отношении осложнений ММ. Поэтому для восстановления функции почек прежде всего необходимо добиться редукции опухолевой массы, уменьшение продукции свободных легких цепей. Поэтому выявление ОПП является показанием к немедленному началу специфической терапии с целью снижения опухолевой нагрузки.

Вопрос 2. По вашему мнению, какова доля пациентов с рецидивом ММ и ОПП/ХБП?

Пирогова О.В. отметила, что в ее центре за 2020 год нарушение функции почек при рецидиве ММ зарегистрировали у 31% пациентов, при этом большинство поступивших пациентов госпитализировали с 3 или последующим рецидивом.

Вопрос 3. Каковы особенности мониторинга заболевания у пациентов с ММ и ХБП?

Сердюк О.Д. отметила, что в ее центре ведение почечной патологии осуществляют врачи нефрологического отделения. При этом гематологи проводят контроль всех стандартных показателей, необходимых для мониторинга основного заболевания. Другие эксперты высказали согласованное мнение о том, что задача ве-

дения ХБП или ОПП при доступности нефрологической службы является прерогативой профильных специалистов. Важно контролировать и противоопухолевый ответ, и функциональные показатели почек. При тяжелой почечной недостаточности, потребности в гемодиализе, лечение больного необходимо осуществлять совместно гематологом и нефрологом. **Салогуб Г.Н.** при этом указала на то, что для нефрологов дифференциальный диагноз ХБП и ОПП нередко является необходимым для правильного формирования стратегии терапии.

Салогуб Г.Н. представила доклад на тему «ОПП у больных с множественной миеломой. Актуальность проблемы. Необходимость достижения быстрого контроля заболевания. Алгоритм терапии». Спикер указала на то, что нарушение функции почек при ММ отмечают в 20–40% случаев уже в момент дебюта заболевания, и подчеркнула важность правильной диагностики и терапии основного заболевания и почечной недостаточности, поскольку функция почек является предиктором прогноза для пациента. При этом показатели распространенности ОПП у больных ММ существенно варьируют в зависимости от используемых критериев (критерии диагноза ММ, разработанные Международной рабочей группой по миеломе [International myeloma working group, IMWG], риск, повреждение, недостаточность, утрата функции почек, терминальная почечная недостаточность [Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, and End-stage kidney disease, RIFLE], оценка скорости клубочковой фильтрации [СКФ]). В соответствии с рекомендациями KDIGO (международной группы экспертов Kidney Disease Improving Global Outcomes), для ОПП характерно наличие как минимум одного из следующих критериев: нарастание сывороточного креатинина $\geq 0,3$ мг/дл ($\geq 26,5$ мкмоль/л) в течение 48 час; или нарастание сывороточного креатинина $\geq 1,5$ раза от исходного, которое, как известно или предполагается, произошло в течение 7 суток, или объем мочи $< 0,5$ мл/кг/ч в течение 6 час.

В структуре причин ОПП ММ составляет существенную долю (около 15% вместе с лимфомами). Основными причинами ОПП у пациентов с ММ являются cast-нефропатия легких цепей (light chain cast nephropathy, LCCN), AL-амилоидоз, а также болезнь легких цепей. Следует отметить, что самым благоприятным синдромом в отношении вероятности восстановления функции почек является LCCN: при своевременном начале адекватной терапии вероятность регресса изменений составляет около 50%, однако при старте терапии с диализа показатель не превышает 20%.

При оценке ОПП у пациента с ММ часто необходимо проведение биопсии почки для установления причин почечной недостаточности. Биопсия почки часто выполняется при наличии у пациента другой патологии. Часто необходима при подозрении на амилоидоз, особенно при сочетанной патологии. Возможна одновременная оценка прогноза терапии ОПП. Так, в случае LCCN степень формирования каст и степень интерстициального фиброза/тубулярной атрофии являются

предикторами почечного ответа.

Одним из важнейших факторов успеха терапии эксперт считает время начала специфического лечения. По оценочным данным, период с момента постановки диагноза до начала химиотерапии при ММ в России может составлять до 1,5 месяцев, в то время как в Германии показатель не превышает 1 суток. Для диализ-зависимых пациентов основной целью терапии следует считать отказ от проведения диализа. Стратегия лечения ОПП зависит от преобладающих синдромов и может включать проведение регидратации при гиповолемии, использование диуретиков при гиперволеми, использование бисфосфонатов (предпочтительно применение памидроновой кислоты в связи с большей безопасностью для почек в сравнении с золедроновой кислотой) или деносумаба при гиперкальциемии.

Эксперт заметила, что целью лечения ММ при ОПП необходимо считать уменьшение продукции свободных легких цепей на 90% и более в течение первых двух курсов химиотерапии. Ведущее место в терапии отводят дексаметазон-содержащим схемам с использованием ингибиторов протеасом. Спикер подчеркнула, что при использовании карфилзомиба существует риск микрососудистого повреждения почек, поэтому предпочтение необходимо отдавать альтернативным препаратам. Схема IxaRd является безопасной и эффективной для пациентов с рецидивом ММ и почечной недостаточностью. Необходимо помнить о коррекции дозы леналидомида в зависимости от СКФ. Также возможно применение доксорубицина и циклофосфида, однако последний в исследовании с использованием бортезомиба и дексаметазона не повышал эффективность лечения.

Общая дискуссия

Вопрос 1. Какие схемы (дуплеты, триплеты) Вы наиболее часто применяете в терапии пациентов с рецидивом ММ и ОПП?

Байгишиева Н.Д. отметила, что в ее клинике доступными и наиболее часто используемыми опциями терапии рецидива ММ являются бортезомиб-содержащие схемы (VCD – бортезомиб+циклофосфамид+дексаметазон) или схема Rd (леналидомид+дексаметазон), при этом иксазомиб в настоящее время недоступен, однако запланировано начало его использования в 2021 году. **Пирогова О.В.** также отметила, что в основном для терапии рецидива используют схемы VCD, Rd, помалидомид-содержащие схемы, в последнее время наметилась тенденция к увеличению использования даратумумаба (например, в комбинации с Rd или в виде монотерапии). **Комарцева Е.Ю.** указала на то, что до настоящего времени ее клиника не получила положительного опыта использования даратумумаба, поскольку у обоих пациентов, которые получали препарат, констатировали неэффективность терапии. **Сердюк О.Д.** и другие эксперты также отметили, что в основном в настоящее время применяют схемы терапии, основанные на бортезомибе.

Вопрос 2. Ваше мнение относительно эффективности и безопасности полностью перорального три-

плета IxaRd при лечении пациентов с рецидивом ММ и ОПП?

Несмотря на ограниченность опыта применения схемы IxaRd или отсутствие иксазомиба в программе региональных закупок лекарственных средств в ряде регионов (например, Дагестан, Краснодарский край), большинство экспертов отметили высокую эффективность и приемлемую безопасность использования схемы IxaRd для терапии рецидива ММ.

Бессмельцев С.С. выступил с сообщением на тему «Подходы к терапии пациентов с рецидивом ММ и ХБП. Возможность достижения длительного контроля заболевания». Спикер напомнил, что в структуре причин смерти при ММ почечная недостаточность имеет высокую значимость, а ее доля составляет около 28%, выше показатели только для инфекционных осложнений (45%). Причем больше летальных исходов от инфекционных осложнений наблюдалось у пожилых пациентов и среди пациентов с почечной недостаточностью. Риск развития почечной недостаточности является высоким для пациентов, у которых уровень СЛЦ превышает 1500 мг/мл, хотя уже при уровне в 500 мг/мл отмечают канальцевое повреждение. Диагностические критерии хронической почечной недостаточности: повышение креатинина сыворотки крови > 2 мг/дл (>177 мкмоль/л); расчетная скорость клубочковой фильтрации < 60 мл/мин/1,73 м²; клиренс креатинина < 40 мл/мин.

Нарушение функции почек необходимо всегда учитывать при формировании стратегий терапии рецидива ММ. Для леналидомида следует использовать рекомендованные режимы дозирования в соответствии уровнем СКФ. Леналидомид выводится в основном через почки (82%). При снижении клиренса креатинина период его полувыведения увеличивается в 2-3 раза, а толерантность к терапии снижается. В то же время коррекция дозы помалидомида при почечной недостаточности не требуется.

Наиболее безопасными препаратами, препаратом выбора у больных ММ с хронической почечной недостаточностью, в том числе у больных, нуждающихся в гемодиализе, являются ингибиторы протеасом, которые при этом обеспечивают быстрое наступление ответа на терапию. Бортезомиб в клинических исследованиях не оказывал влияния на функцию почек, его клиренс не зависит от функционального состояния почек. Имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что нет необходимости понижать дозу карфилзомиба у пациентов с почечной недостаточностью. Карфилзомиб безопасен для пациентов с легким нарушением функции почек, однако при почечной недостаточности ≥3 степени необходим тщательный мониторинг СКФ в связи с возможным ухудшением функциональных показателей почек. В случае выявления тяжелой токсичности и прогрессии почечной недостаточности возможна эскалация дозы карфилзомиба в 3 последовательных циклах - 27 → 20 → 15 мг/м². При улучшении функции почек доза препарата увеличивается до стандартной.

Спикер обратил внимание на то, что эффективность и безопасность иксазомиба изучили в обширной программе клинических исследований. Фармакокинетика иксазомиба сходна у пациентов с нормальной функцией почек и пациентов с нарушениями функции почек легкой или умеренной степени тяжести (клиренс креатинина >30 мл/мин). Основным механизмом выведения иксазомиба считают метаболизм под действием множественных ферментов семейства цитохрома - CYP и не-CYP белков (изоформ CYP с оценочными долями участия: 3A4 (42 %), 1A2 (26 %), 2B6 (16 %), 2C8 (6 %), 2D6 (5 %), 2C19 (5 %) и 2C9 (< 1 %)). Неизменный иксазомиб, выведенный с мочой, составлял <3,5% введенной дозы. В исследовании MC1181 (II фаза) на фоне использования иксазомиба частота тяжелых нарушений функции почек составила около 3%. В исследовании TOURMALINE-MM1 безопасность в отношении почек при терапии IxaRd или Rd была сопоставимой на фоне повышения частоты ответов, при этом схема IxaRd была более токсичной лишь за счет некоторого увеличения частоты гематологических нежелательных явлений.

Эксперт отметил, что длительность терапии при ММ является одним из ключевых факторов ее эффективности, в то время как раннее прекращение терапии существенно снижает продолжительность ответа и выживаемость. При сопоставлении результатов исследований триплетов, содержащих иксазомиб, карфилзомиб и бортезомиб было установлено, что средняя длительность терапии IxaRd составляла 12,3 месяца, VRd (бортезомиб+леналидомид+дексаметазон) – 10 месяцев, а KRd (карфилзомиб+леналидомид+дексаметазон) – 7,2 месяца, что указывает на лучшую переносимость перорального триплета IxaRd.

Рекомендуемая первоначальная доза иксазомиба равна 4 мг. В исследовании с эскалацией дозы показано, что первое уменьшение дозы – 3 мг, второе – 2,3 мг. Различные уровни доз иксазомиба обладают сопоставимой эффективностью. При изучении фармакокинетики и переносимости иксазомиба при почечной недостаточности было установлено, что средняя концентрация иксазомиба в плазме крови после перорального приема 3 мг, 2,3 мг, 4 мг иксазомиба у пациентов с нормальной функцией почек, тяжелой степени и крайне тяжелой, нуждающихся в гемодиализе сопоставима. Иксазомиб был связан с белками плазмы (~ 99%) во всех группах почечных функций. Однако системные воздействия иксазомиба были на 38% и 39% выше у пациентов с тяжелой/требующей диализа почечной недостаточностью. Поэтому рекомендуется уменьшить начальную дозу до 3 мг для таких пациентов (при почечном клиренсе <30 мл/мин или необходимости диализа), что обеспечит системные воздействия (AUC) иксазомиба сопоставимые с теми, которые наблюдаются у пациентов с нормальной функцией почек после приема дозы 4 мг. При этом гемодиализ не оказывает влияния на показатели фармакокинетики иксазомиба, т.е. концентрации иксазомиба перед диализом, во время и после его проведения сходны, что свидетельствует о том, что иксазомиб не

выводится при проведении диализа.

В случае выявления почечной недостаточности у больного ММ рекомендуется:

- установить этиологию
 - факторы, связанные с болезнью vs другие причины
 - связанные ММ = возможность восстановления (ОПП, связанная с cast нефропатией потенциально обратима. ХБП характеризуется необратимой утратой функциональной ткани почек).
- Необходимо раннее начало терапии множественной миеломы (!)
- При выборе метода лечения следует определить:
 - цель терапии
 - коморбидность
 - оптимальную маршрутизацию
 - конкурентные лечебные подходы (целесообразнее ингибиторы протеасом)
 - для быстрого снижения уровня легких цепей лечение можно начать с дексаметазона
- Оптимизации функции почек
 - гидратация
 - суточный объем мочи ~ 3000 мл
- Контроль кальция
- Плазмаферез, как дополнительный метод (NCCN, категория 2B)
 - Избегать использования нестероидных противовоспалительных препаратов и в/в рентгеноконтрастных исследований
 - При использовании бисфосфонатов – контроль функции почек, целесообразнее использовать памидронат или деносумаб

В заключении своего доклада **С.С. Бессмельцев** обратил внимание на следующее.

Почечную недостаточность при ММ следует рассматривать как неотложное медицинское состояние, при котором первым шагом является установление этиологии почечной недостаточности, так как в отличие от болезни почек, развивающейся на фоне сопутствующих заболеваний (артериальная гипертензия, сахарный диабет и др.), почечная недостаточность на фоне ММ может быть обратимой при соответствующем адекватном лечении основного заболевания, что приводит к увеличению выживаемости больных.

При выборе терапии ММ необходимо учитывать выявленную почечную недостаточность, контролировать клиренс креатинина и уровень сывороточного креатинина, использовать препараты, не ухудшающие функцию почек (ингибиторы протеасом, моноклональные антитела).

Важное преимущество иксазомиба – отсутствие почечной токсичности и пероральная форма применения. Стартовая доза иксазомиба при КК < 30 мл/мин составляет 3 мг. Гемодиализ не влияет на фармакокинетику иксазомиба.

Общая дискуссия

Вопрос 1. Учитываете ли вы сопутствующую ХБП при определении тактики терапии пациентов с рецидивом ММ?

Эксперты высказали согласованное мнение о том, что нарушение функции почек необходимо учитывать при формировании тактики ведения пациента с рецидивом ММ. Выбор терапии должен опираться на действующие клинические рекомендации в соответствии с локальной доступностью препаратов выбора, а также потребностями каждого пациента. **Клиточенко Т.Ю.** указала на то, что в настоящее время у пациентов с ОПП чаще всего используют схемы, основанные на применении помалидомида в комбинации с антрациклинами.

Вопрос 2. В каких ситуациях необходимо использование дозы иксазомиба (3 мг) у пациентов с рецидивом ММ?

Участники Экспертного Совета отметили, что использование дозы 3 мг необходимо для пациентов с тяжелым нарушением функции почек (диализ-зависимое состояние или почечный клиренс менее 30 мл/мин), а также нарушением функции печени (общий билирубин выше чем $1,5-3 \times \text{ВГН}$) или тяжелыми (общий билирубин выше чем $3 \times \text{ВГН}$). **Пирогова О.В.** обратила внимание на личный опыт использования сниженной дозы иксазомиба у пациента с почечной недостаточностью 3 стадии, при этом переносимость оказалась приемлемой, в то время как эффективность не была высокой, однако этот пациент получал препарат для лечения заболевания на продвинутых стадиях.

Вопрос 3. Какие вы видите проблемы при лечении пациентов с рецидивом ММ и ХБП в рутинной клинической практике?

Эксперты из большинства региональных центров отметили сложности с обеспечением непрерывного доступа ко всем необходимым препаратам для обеспечения необходимых вариантов терапии рецидива ММ. Кроме того, существенную проблему представляет маршрутизация пациентов, поскольку нередко врачи сталкиваются с необходимостью проведения терапии в условиях стационара наряду с диализом, не всегда доступным в гематологическом центре. По мнению **Шатохина Ю.В.**, наиболее полную и правильно организованную помощь пациент может получать только в условиях крупного многопрофильного центра. В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции существенную проблему стала представлять необходимость максимально минимизировать потребность пациента в посещении медицинских организаций. **Сычева Т.М.** отметила, что схема IxaRd в комбинации с проведением мониторинговых диагностических обследований амбулаторно с забором материалов на дому позволяет эффективно достигать указанной цели.

В заключение **С.С. Бессмельцев** подвел итоги, еще раз обратив внимание на то, что почечная недостаточность нередко выявляется уже при первичной диагностике ММ, а при рецидивирующих формах ММ частота ее увеличивается. Почечная недостаточность является фактором неблагоприятного прогноза при ММ, существенно снижающим общую выживаемость больных ММ. Следует помнить о том, что выявление почечной недостаточности – это один из факторов клинического

рецидива, требующий немедленного начала терапии. Риск прогрессии почечной недостаточности снижается с редукцией опухолевой нагрузки. Достижение противоопухолевого ответа является залогом улучшения или даже восстановления функции почек. В свою очередь достижение почечного ответа сопровождается увеличением выживаемости. Использовать нужно препараты, которые не ухудшают функциональное состояние почек. В этой связи следует обратить внимание на ингибиторы протеасомы и, в частности, иксазомиб. Добавление иксазомиба к Rd, по данным исследования TOURMALINE-MM1, привело к существенному увеличению беспрогрессивной выживаемости и частоты ответа. В то же время применение схемы IxaRd сопровождалось ограниченным увеличением токсичности по сравнению с режимом плацебо-Rd. Частота тяжелых инфекционных осложнений составила 1,0 %. Эффективность иксазомиба не зависит от функционального состояния почек, однако не следует забывать, что доза иксазомиба при клиренсе креатинина менее 30 мл/мин составляет 3 мг. Триплет иксазомиб + Rd привлекает к себе внимание еще и тем, что это пероральные формы лекарственных препаратов, применение их возможно в амбулаторных условиях. Это позволяет минимизировать контакты больных с другими пациентами, что важно в настоящий период пандемии коронавирусной инфекции.

Общее заключение:

1. Проблема мониторинга ММ у пациентов с ХБП в рутинной практике гематологов России хорошо разработана и изучена, врачи используют современные подходы к ведению и терапии пациентов.

2. Существующие подходы к терапии пациентов с рецидивом ММ и нарушением функции почек позволяют получать хорошие результаты лечения, вместе с тем, данные клинических исследований по терапии у данной группы больных в настоящее время ограничены и требуют дополнения и расширения, особенно в отношении безопасности и подходов к коррекции доз препаратов, входящих в схемы терапии рецидивов.

3. Эксперты отмечают ограниченную доступность современных схем терапии рецидива ММ при ХБП в рутинной практике и рекомендуют предпринимать шаги по увеличению доступности терапии для улучшения результатов лечения пациентов.

4. Полностью пероральный триплет с иксазомибом (IxaRd) представляет собой эффективную и безопасную опцию терапии рецидива ММ у пациентов с нарушением функции почек. Вместе с тем, медицинское сообщество испытывает потребность в получении более детальных данных о безопасности и эффективности данного вида лечения у больных с ХБП и ОПП, в том числе стратегиях коррекции дозирования лекарственных средств для профилактики развития токсичности на фоне нарушенной почечной функции.

**Резолюцию подготовил
С.С. Бессмельцев**