

РАДЖАБОВА АСИЯТ МАЛИКОВНА

**РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗЕ
ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ**

3.1.28. Гематология и переливание крови

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

Научные руководители:

Сидоркевич Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, доцент

Мартынкевич Ирина Степановна – доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Бондаренко Сергей Николаевич – доктор медицинских наук, заместитель директора по лечебной работе «Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой», доцент кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии с курсом детской онкологии факультета послевузовского образования имени профессора Б.В. Афанасьева Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Гиршова Лариса Леонидовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 68.1.007.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (www.bloodscience.ru).

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета 68.1.007.01
доктор медицинских наук

Глазанова Татьяна Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – клональное опухолевое, гетерогенное по клинико-морфологическим параметрам заболевание системы крови, характеризующееся наличием морфологически незрелых кроветворных клеток-предшественников (бластов) в костном мозге и/или в периферической крови. ОМЛ – орфанное заболевание, однако по частоте встречаемости занимает одно из первых мест среди онкогематологических заболеваний (5 случаев на 100 000 населения в год).

Современная терапия ОМЛ является строго стандартизованной. С учетом подходов к выбору тактики лечения пациенты разделены на 2 основные группы: старше 60 лет и моложе 60 лет. Традиционной схемой химиотерапии (ХТ) на сегодняшний день для пациентов моложе 60 лет признана программа «7+3» (круглосуточное введение цитарабина 100-200 мг/м² и антрациклина) с последующей консолидирующей терапией (Савченко В.Г. и соавт., 2016; Burnett A.K. et al., 2015). Терапия пациентов возрастной группы интенсивными курсами ХТ сопряжена с увеличением токсичности и риском смерти (Грицаев С.В. и соавт., 2010), следовательно, данной группе рекомендовано применение длительной терапии малоинтенсивными ротирующими курсами: гипометилирующие агенты, ингибиторы BCL-2, малые дозы цитарабина (МДЦ).

Расшифровка генома человека позволила глубже понять патогенетические механизмы развития ОМЛ, что предписывало необходимость внедрения в клиническую практику молекулярно-генетических методов исследования, включая флуоресцентную гибридизацию *in situ* (fluorescent *in-situ* hybridization, FISH), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование нового поколения (next-generation sequencing, NGS) (Петрова Е.В. и соавт., 2016; Мотыко Е.В. и соавт., 2019). Молекулярные методы в дополнение к стандартному кариотипированию позволяют не только достоверно диагностировать ОМЛ, но и разделять пациентов на прогностические группы, мониторировать минимальную остаточную болезнь (МОБ).

Совершенствование и внедрение в клиническую практику молекулярно-генетических методов, прежде всего, ПЦР в режиме реального времени, позволяет у большинства больных ОМЛ определять уровень аллельной нагрузки (АН) мутаций в различных генах, таких как *FLT3*, *NPM1* и других диагностически и прогностически значимых маркеров. Вместе с этим, на сегодняшний день широкое применение в клинической практике при диагностике ОМЛ получило NGS исследование, которое позволяет определять нуклеотидные последовательности ДНК и РНК, способствуя тем самым выявлению большого спектра соматических мутаций в опухолевых клетках.

Эволюция представлений о патогенезе острых миелоидных заболеваний нашла отражение в новой классификации ELN 2022 (ELN – European Leukemia Net, Европейская организация по изучению и лечению лейкозов). В 2022 г. ELN с целью более точного прогнозирования течения ОМЛ, представила новую классификацию молекулярно-генетических групп риска (Dohner H. et al., 2022), в которой установлено, что пациенты с мутацией в гене *FLT3*, независимо от соотношения мутантного аллеля ITD к аллелю дикого типа (пороговый уровень 0,5), отнесены в промежуточную группу риска. При этом остается малоизученной динамика изменения уровней АН мутации в гене *FLT3* на фоне проводимого лечения и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Благодаря возможностям молекулярно-генетических технологий и современным терапевтическим подходам к терапии ОМЛ, меняется отношение к влиянию генетических маркеров на течение заболевания, что подтверждается 5 пересмотром ВОЗ классификации ОМЛ (2022 г.) (Khoury J.D. et al., 2022). Изменения отражают современное понимание молекулярной биологии ОМЛ и позволяют безошибочно диагностировать подтип заболевания, прогнозировать его течение и оптимизировать терапию для каждого пациента. Ключевые аспекты классификации гласят, что ОМЛ необходимо относить к категории «ОМЛ

с изменениями, связанными с миелодисплазией» не только морфологически охарактеризовав опухолевый субстрат, но также важна молекулярно-генетическая приверженность и определяющие цитогенетические аномалии, ассоциированные с миелодисплазией.

Это, как правило, некоторые несбалансированные и сбалансированные перестройки (транслокации) и определенные мутации в генах – *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, *STAG2*, более 95% из которых присутствуют конкретно в ОМЛ, возникающем после миелодиспластического синдрома (МДС) или МДС / МПН (миелопролиферативного новообразования) (Xiao C. et al., 2021; Khoury J.D. et al., 2022).

Полученные данные о специфических мутациях предполагают необходимость разработки высокоэффективных таргетных лекарственных препаратов, которые при использовании в виде монотерапии или в сочетании со стандартными программами цитостатической терапии и/или алло-ТГСК способны снижать величину мутационной нагрузки до порогового уровня чувствительности стандартных методов исследований, тем самым увеличивая показатели безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ). Это рассматривается как возможная платформа для устойчивого МОБ-негативного статуса.

Таким образом, революционные технологические возможности генетической диагностики заболевания позволяют не только своевременно выявлять группы неблагоприятного прогноза, но и способствуют выбору наиболее эффективной персонализированной терапии с ее интенсификацией, а также присоединением таргетных препаратов и алло-ТГСК. По мере развития молекулярных технологий накапливаются данные о влиянии генетических маркеров на развитие заболевания и эффективность современной терапии ОМЛ, что существенным образом меняет подходы к классификации, стратификации рисков и терапевтических подходов к лечению ОМЛ. Новые данные о молекулярно-генетическом ландшафте заболевания, о роли мутаций генов и их АН, о сочетании влияния хромосомных аномалий и молекулярно-генетических маркеров существенно расширяют наше понимание патогенетических особенностей течения ОМЛ и требуют дополнительных исследований.

Степень разработанности темы исследования

Молекулярно-генетический ландшафт ОМЛ гетерогенный и его изучение является необходимым не только на этапе диагностики в дебюте ОМЛ, но и является важным методом исследования на всех этапах мониторинга результатов терапии. Наличие молекулярно-генетических аномалий определяет прогноз заболевания, доказательством чего служат многочисленные отечественные и зарубежные исследования о прогностической значимости мутаций различных генов. Одним из наиболее неблагоприятных прогностических маркеров является мутированный ген *FLT3*, определяемый у одной трети больных ОМЛ и оказывающий неблагоприятное влияние на течение заболевания, а также на показатели БРВ и ОВ. По данным ELN 2022 величина аллельной нагрузки мутаций в гене *FLT3* на сегодняшний день уже утратила значение в прогнозе заболевания, выделяя пациентов в одну общую промежуточную группу прогноза (Dohner H. et al., 2022).

Тем не менее, до настоящего времени остается неизученным вопрос мониторинга величины аллельной нагрузки у больных ОМЛ с мутациями в гене *FLT3* на различных этапах терапии и в зависимости от варианта проводимого лечения (стандартная ХТ, таргетная терапия, алло-ТГСК), что позволит выявлять группу пациентов с неблагоприятным прогнозом и своевременно обосновать показания для проведения алло-ТГСК.

Несмотря на стандартизированные подходы к лечению пациентов ОМЛ, использование только возраста в качестве определения интенсивности терапии недостаточно для выбора адекватных программ терапии, т.к. упускается при этом принципиальный на сегодняшний день такой фактор, как мутационный статус пациента.

Внедрение в реальную клиническую практику метода NGS позволяет в короткие сроки детектировать множество различных соматических мутаций, правильно стратифицировать и прогнозировать течение заболевания.

Эффективность лечения больных ОМЛ в зависимости от мутационного статуса определяется комплексным подходом на всех этапах диагностики и лечения, при котором

информация о состоянии принципиальных для прогноза генов наряду с хромосомными аномалиями является неотъемлемой частью представления и о больном, и о его болезни. Несмотря на это, в настоящее время отсутствует унифицированный, научно обоснованный подход, обеспечивающий глубокое понимание патогенетических характеристик заболевания и, следовательно, выбор оптимальной терапевтической тактики лечения пациентов ОМЛ.

Цель исследования

Установить роль генетических технологий в верификации диагноза, прогнозировании течения заболевания и выборе персонализированного подхода к лечению пациентов с острыми миелоидными лейкозами.

Задачи исследования

1. Провести верификацию диагноза острого миелоидного лейкоза на основе комплексной оценки морфологических, иммунологических и генетических характеристик заболевания.

2. Определить взаимосвязь мутационного статуса генов *FLT3* и *NPM1* с клинико-гематологическими и цитогенетическими характеристиками, а также их влияние на показатели выживаемости у больных острыми миелоидными лейкозами.

3. Предложить на основании результатов секвенирования нового поколения спектр возможных дополнительных молекулярных аномалий, имеющих прогностическое значение на течение заболевания у пациентов с острыми миелоидными лейкозами.

4. Оценить влияние опухолевой мутационной нагрузки различных генов на показатели выживаемости у пациентов с острыми миелоидными лейкозами.

5. Разработать алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острого миелоидного лейкоза на основе выявленных генетических характеристик с использованием современных методов исследования, включая секвенирование нового поколения.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые:

- изучена динамика величины аллельной нагрузки мутантного гена *FLT3-ITD* у пациентов с ОМЛ на фоне различных протоколов лечения;
- выявлена частота встречаемости и аллельная нагрузка мутаций генов у пациентов с ОМЛ с применением метода секвенирования нового поколения;
- доказана прогностическая роль мутаций в генах *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2* у пациентов с ОМЛ в независимости от проводимой терапии;
- определен пороговый уровень опухолевой мутационной нагрузки и ее прогностическая значимость у пациентов с ОМЛ;
- разработан и предложен алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров ОМЛ на основе выявленных генетических характеристик с использованием секвенирования нового поколения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведённой работы отражают современное представление о молекулярных механизмах патогенеза ОМЛ и эволюции их генетического ландшафта. В ходе проведённого анализа установлено, что мутации в гене *FLT3* характеризуются высокой частотой встречаемости. Особое значение имеет выявленная закономерность сочетания мутаций: *NPM1* чаще наблюдались в группе *FLT3-ITD*, что подтверждает концепцию взаимодействия мутаций в патогенезе ОМЛ и позволяет рассматривать их как ключевые мишени для персонализированной терапии и прогностической стратификации. Выделение двух подгрупп в зависимости от величины аллельной нагрузки *FLT3* позволило установить биологическую агрессивность опухолевого клона: *FLT3-ITD^{ВЫС}* является маркером неблагоприятного течения ОМЛ и ассоциирована с лейкоцитозом и бластозом костного мозга. Изучена динамика аллельной нагрузки мутантного гена *FLT3* на фоне различных протоколов лечения. Сочетание мутаций *FLT3-ITD^{НИЗ}/NPM1⁺* имели большую частоту достижения полной клинико-гематологической ремиссии в сравнении с *FLT3-ITD^{ВЫС}/NPM1⁺*, что подтверждает ключевую роль аллельной нагрузки даже при благоприятных сопутствующих мутациях.

Установлено, что *FLT3-ITD^{выс}* имели худшие показатели ОВ по сравнению с группой *FLT3-ITD^{низ}*, при этом проведение алло-ТГСК способствовало улучшению показателей ОВ.

В ходе исследования получены новые данные о частоте и спектре соматических мутаций, о взаимосвязи между мутационным профилем, опухолевой мутационной нагрузкой и клиническими исходами заболевания. Показано, что определённые молекулярные аномалии – в частности, мутации в генах *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA*, *SRSF2*, а также уровень опухолевой мутационной нагрузки ≥ 4 мутаций на образец – обладают независимым прогностическим значением в отношении ОВ пациентов. Изучена концепция клональной эволюции и значимости динамичности мутаций при прогрессировании заболевания.

В научной работе отражена возможность использования комплексной оценки мутационного профиля и мутационной нагрузки в качестве интегративного биомаркера, отражающего генетическую нестабильность и потенциальную терапевтическую резистентность. На основе полученных результатов разработан протокол, позволяющий своевременно выделить неблагоприятные прогностические группы, а также выявить новые мишени таргетного воздействия и группы пациентов, нуждающихся в проведении алло-ТГСК.

Методология и методы исследования

Проведенное исследование основывалось на комплексном применении различных методов исследования, включающих клинико-лабораторные, цитоморфологические, цитофлуорометрические и генетические методы. В рамках генетического анализа выполнялось стандартное цитогенетическое исследование, ПЦР, FISH и NGS исследования. Для обработки полученных результатов использовались методы статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации в генах *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2* оказывают неблагоприятное влияние на показатели общей выживаемости пациентов с острым миелоидным лейкозом.
2. Пороговый уровень опухолевой мутационной нагрузки составляет 4 мутации на каждого пациента, высокая опухолевая нагрузка имеет худшие показатели безрецидивной и общей выживаемости пациентов с острым миелоидным лейкозом.
3. К неблагоприятным прогностическим факторам общей выживаемости относятся возраст пациента, наличие делеции 17p, перестройка 11q23/*KMT2A* гена, мутации в генах *FLT3* и *DNMT3A*, а также высокая опухолевая мутационная нагрузка (>5 мутаций). Безрецидивная выживаемость достоверно ассоциирована с мутациями в генах *ASXL1*, *IDH2*, *KMT2D* и уровнем опухолевой мутационной нагрузки (>5 мутаций), что подтверждает их прогностическую значимость.
4. Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острых миелоидных лейкозов с интеграцией методов ПЦР, FISH и NGS, обеспечивает стратификацию пациентов на группы неблагоприятного прогноза, с последующим рассмотрением вопроса о назначении таргетной терапии и алло-ТГСК.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности определена ретроспективными и проспективными анализами клинических наблюдений, использованием современных методов исследования и соответствующей статистической обработкой полученных данных.

Материалы диссертации были представлены на IV Научно-практической конференции «Актуальные вопросы высокотехнологичной помощи в терапии» (Санкт-Петербург, 2020); II Научно-практической конференции «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021); III Московской гематологической школе (2023), II Московской гематологической школе молодых ученых и врачей (2023); «Актуальные вопросы лечения острых миелоидных лейкозов и сопроводительной терапии» (Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва, 2023); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2023); III Научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2024).

Результаты исследования были представлены в виде тезисов на российских и международных конференциях: 22-ой, 23-ий, 24-ый и 28-ой Конгресс Европейской Гематологической Ассоциации, Испания 2017, Швеция 2018, Нидерланды 2019, Франкфурт 2023 (22th, 23th, 24th, 28th Congress of European Hematology Association); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы» (Санкт-Петербург, 2017); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященная 85-летию Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, 2017); Материалы IV Конгресса гематологов и III Конгресса трансфузиологов России (Москва, 2022); 10-ое ежегодное собрание Общества гематологической онкологии, Хьюстон, 2022 (Tenth Annual Meeting of the Society of Hematologic Oncology (SOHO)).

По теме диссертации опубликовано 19 научных печатных работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28 – Гематология и переливание крови, 3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28 – Гематология и переливание крови, п. 6 и п. 13, специальности 3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика, п. 3 и п. 11.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в практическую и научно-исследовательскую работу клинического отделения гематологии, химиотерапии и трансплантации костного мозга с блоком интенсивной терапии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, гематологических отделений Ленинградской областной клинической больницы и городской больницы №15 г. Санкт-Петербурга.

Личный вклад автора

Автором лично проведены: анализ источников литературы, планирование диссертационного исследования, ретроспективный и проспективный анализ амбулаторных карт и историй болезней пациентов, обследование, установление диагноза. Выполнен сбор биологических образцов костного мозга и крови, участие в проведении и интерпретации результатов цитогенетических и молекулярно-генетических исследований, назначение циторедуктивной и сопроводительной терапии. Создана база данных, проведен последующий статистический анализ и интерпретация полученных результатов исследования.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 160 страницах машинописного текста и состоит из введения, главы обзора литературы, описания методологии и методов исследования, собственных результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Список литературы содержит 218 источников, из них 10 отечественных и 208 зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 43 рисунками и 14 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследуемой группы пациентов

В исследование было включено 311 пациентов с ОМЛ, получавших лечение в гематологической клинике ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Ленинградской областной клинической больнице и городской больнице №15 г. Санкт-Петербург. Возраст больных на момент установления диагноза был от 18 до 86 лет (медиана возраста – 55 лет). Обследованная группа пациентов состояла из 133 мужчин и 178 женщин.

В ходе выполнения FISH исследования у 22 пациентов с целью выявления хромосомных aberrаций, которые не были выявлены при стандартном кариотипировании, были получены следующие результаты: t(15;17)(q22;q11-q21) у 7/22 (31,8%) пациентов;

inv(16)(p13.1q22); t(16;16)(p13.1;q22) – 5/22 (22,7%); перестройка *KMT2A*-гена – 3/22 (13,6%); t(8;21)(q22;q22.1) – 2/22 (9,1%); моносомия 7 хромосомы – 2/22 (9,1%); трисомия 8 хромосомы – 2/22 (9,1%); del 17p13.1 – 1/22 (4,6%).

ПЦР исследование проводилось 311 пациентам с ОМЛ. Специфические мутации генов и химерные гены обнаруживались: *FLT3-ITD* – у 121 больного (38,9%); из них *FLT3-ITD^{HL3}* – у 50 (16%), *FLT3-ITD^{BYC}* – у 41 (13,1%); *FLT3-TKD* – у 26 (9,3%); *NPM1* – у 62 (19,9%); *CBFB-MYH11/inv 16;t(16;16)* – у 8 (2,5%), *PML-RARA/t(15;17)* – у 15 (4,8%); *RUNX1:RUNX1T1/t(8;21)* – у 9 (2,9%), *C-KIT (D816V)* – у 1 (0,3%). Анализ NGS был выполнен 33 пациентам. Согласно классификации ELN 2022 пациенты распределились в группы: с благоприятным прогнозом – 10 (32,2%); с промежуточным – 3 (9,7%); с неблагоприятным – 20 (58,1%).

Для лечения больных ОМЛ использовали стандартный индукционный курс «7+3», включающий 7-дневное введение цитарабина в дозе 100-200 мг/м² (суточная инфузия) в сочетании с 3-х дневным введением антрациклинов (Burnett A.K. et al., 2015). Указанную схему ХТ «7+3» получили 215 (69,1%) пациентов. Пациенты старшей возрастной группы получали ХТ низкой интенсивности (n=53; 41,4%): «5+2», «5+3», МДЦ, децитабин, азациитидин, гилтеритиниб, гидроксикарбамид и другие. Алло-ТГСК была выполнена 45 пациентам.

Молекулярно-цитогенетические исследования

Кариотипирование костного мозга проводилось по стандартной методике. В каждом исследовании было проанализировано не менее 20 метафазных пластинок.

Анализ мутаций в гене *FLT3* (ITD и TKD) первоначально проводили методом качественной ПЦР. При определении мутации *FLT3-ITD* качественным методом в дальнейшем выполнялась ПЦР с праймерами с флуоресцентной меткой (FAM) и методом фрагментного анализа (разделение фрагментов в секвенаторе методом капиллярного электрофореза), чтобы определить АН мутации как соотношение областей под пиками, соответствующими мутантному и дикому типам.

NGS проводилось на платформе NextSeq (Illumina, США) с использованием технологии синтеза. ДНК выделяли из периферических мононуклеаров крови, полученных методом градиентного центрифугирования, с использованием Ficoll-Paque. Пробоподготовка включала гибридизационное селективное обогащение фрагментов ДНК, относящихся к кодирующим областям 118 генов, ассоциированных с гемобластомами:

<i>ABL1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CUX1</i>	<i>GNAS</i>	<i>KIT</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>RAD21</i>	<i>STAG2</i>
<i>AKT3</i>	<i>BRAF</i>	<i>DDX3X</i>	<i>FBXW7</i>	<i>KLF2</i>	<i>NPM1</i>	<i>RB1</i>	<i>STAT3</i>
<i>ALK</i>	<i>BTK</i>	<i>DEK</i>	<i>HIST1H1A</i>	<i>KMT2A</i>	<i>NRAS</i>	<i>RHOA</i>	<i>STAT6</i>
<i>APC</i>	<i>CALR</i>	<i>DIS3</i>	<i>HRAS</i>	<i>KMT2C</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RPS15</i>	<i>SUZ12</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CARD11</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>ID3</i>	<i>KMT2D</i>	<i>PHF6</i>	<i>RUNX1</i>	<i>SYK</i>
<i>ATM</i>	<i>CBL</i>	<i>EP300</i>	<i>IDH1</i>	<i>KRAS</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>RYR1</i>	<i>TET2</i>
<i>ATRX</i>	<i>CCND1</i>	<i>ETV6</i>	<i>IDH2</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PIM1</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CD79B</i>	<i>EZH2</i>	<i>IRF4</i>	<i>MEF2B</i>	<i>PKHD1</i>	<i>SETBP1</i>	<i>TP53</i>
<i>B2M</i>	<i>CD58</i>	<i>FAM46C</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MGA</i>	<i>PLCG2</i>	<i>SF3B1</i>	<i>U2AF1</i>
<i>BCL2</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>FAT1</i>	<i>IKZF3</i>	<i>MPL</i>	<i>POT1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>WHSC1</i>
<i>BCOR</i>	<i>CDX2</i>	<i>FLT3</i>	<i>ITPKB</i>	<i>MSN</i>	<i>PRDM1</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>WT1</i>
<i>BCORL1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>GATA1</i>	<i>JAK2</i>	<i>MYC</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SMC1A</i>	<i>XPO1</i>
<i>BCR</i>	<i>CIITA</i>	<i>GATA2</i>	<i>JAK3</i>	<i>MYD88</i>	<i>PTEN</i>	<i>SMC3</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>BIRC3</i>	<i>CREBBP</i>	<i>GJB2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>NF1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SOCS1</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>CSF3R</i>	<i>GNA13</i>	<i>KDR</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTPRD</i>	<i>SRSF2</i>	

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных использовали пакет статистических программ SPSS Statistics 20 (IBM Corp., США), Jamovi (версия 2.4.8.0), GraphPad Prism 10 (версия 10.1.1), R Studio (версия 4.4.2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота встречаемости мутаций в гене *FLT3* у больных острыми миелоидными лейкозами

Для решения поставленной задачи был проведен ретроспективный и проспективный анализ частоты встречаемости мутаций в гене *FLT3* у 199 пациентов с ОМЛ. Больные были разделены на 2 основные группы.

- пациенты, у которых в дебюте заболевания выявлены мутации в гене *FLT3*⁺ (ITD и TKD) – 61 случай (30,5%);
- больные, у которых данные типы мутаций отсутствовали – 138 случаев (69,5%).

В группе *FLT3*-позитивных (*FLT3*⁺) пациентов выделены подгруппы, в которых анализ мутационного статуса показал следующее распределение:

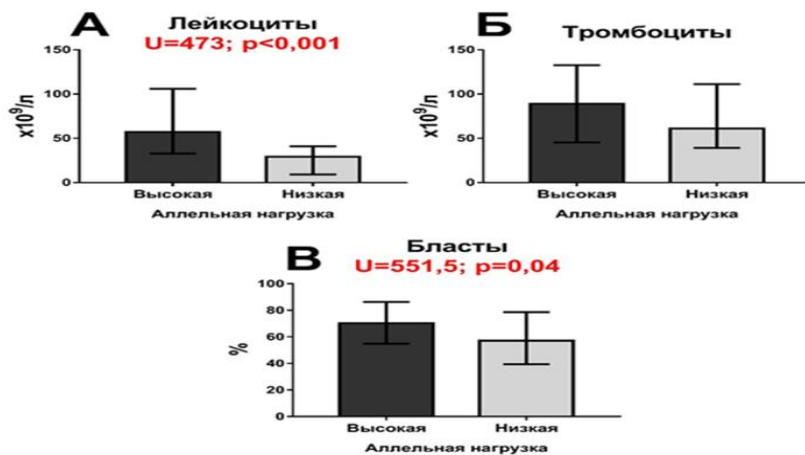
- *FLT3*-ITD⁺ – 48 случаев (24%);
- *FLT3*-TKD⁺ – 11 пациентов (5,5%);
- *FLT3*-ITD⁺/TKD⁺ – 2 пациента (1%).

Величина аллельной нагрузки мутантного *FLT3*-ITD гена у больных острыми миелоидными лейкозами

В ходе исследования выделена группа из 91 пациента, у которых в дебюте заболевания были выявлены мутации в гене *FLT3*-ITD. У пациентов этой группы мы определяли величину АН мутации *FLT3*-ITD. Уровни АН оценивали как в дебюте заболевания, так и в динамике, на фоне проводимой ХТ. Средний уровень АН до лечения составил 0,547 при медианном значении 0,450 (0,008-3,877). АН мутации *FLT3*-ITD обычно определялась как соотношение сигнала мутантного аллеля к аллелю дикого типа. Для оценки прогностической значимости был установлен уровень \geq или $<0,5$ (Dohner H. et al., 2010). Выделены 2 группы больных в зависимости от исходных уровней АН мутации *FLT3*-ITD⁺: группа из 50 пациентов (55%) с низкой АН ($<0,5$) и группа из 41 пациента (45%) с высокой АН ($\geq 0,5$).

Клинические особенности течения острых миелоидных лейкозов в зависимости от наличия мутаций *FLT3* и величины аллельной нагрузки, их влияние на безрецидивную и общую выживаемость пациентов

При сравнении показателей гемограммы и миелограммы пациенты, имевшие высокую АН в гене *FLT3*, по сравнению с пациентами с низкой АН, отличались более высокими уровнями лейкоцитов (Рисунок 1, А) и бластных клеток костного мозга (Рисунок 1, В) (соответственно, $U=473$; $p<0,001$ и $U=551,5$; $p=0,04$), но не отличались по уровню тромбоцитов (Рисунок 1, Б).



А – концентрации лейкоцитов; Б – уровни тромбоцитов; В – процент бластных форм костного мозга.
U – критерий Манна-Уитни. На диаграммах представлены значения медиан и квартили.

Рисунок 1 – Показатели крови у лиц с высокой ($n=41$) и низкой ($n=50$) величиной аллельной нагрузки мутаций в гене *FLT3*

Наличие мутации в гене *FLT3* снижает вероятность достижения ПР, а влияние мутаций *FLT3* на данный показатель наиболее ярко проявляется у пациентов моложе 60 лет. Проанализирована частота достижения ПР в зависимости от мутационного статуса пациентов на фоне проведения стандартных режимов ХТ, т.е. «7+3» (Рисунок 2). Пациенты с сочетанием мутаций в гене *FLT3-ITD^{низ}/NPM1⁺* чаще достигали ПР по сравнению с группой пациентов со статусом *FLT3-ITD^{выс}/NPM1⁺*, при частоте ПР, соответственно, 71,4% и 16,0% ($\chi^2=11,2$; $p=0,04$).

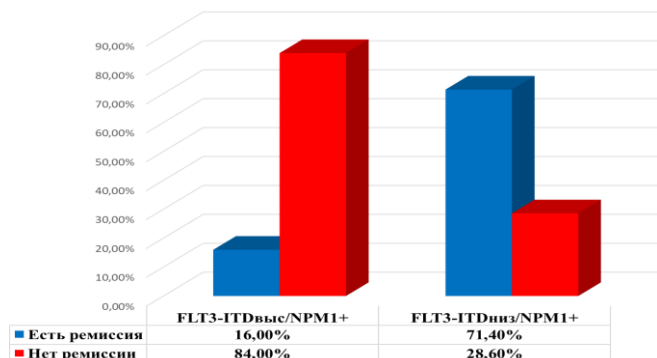
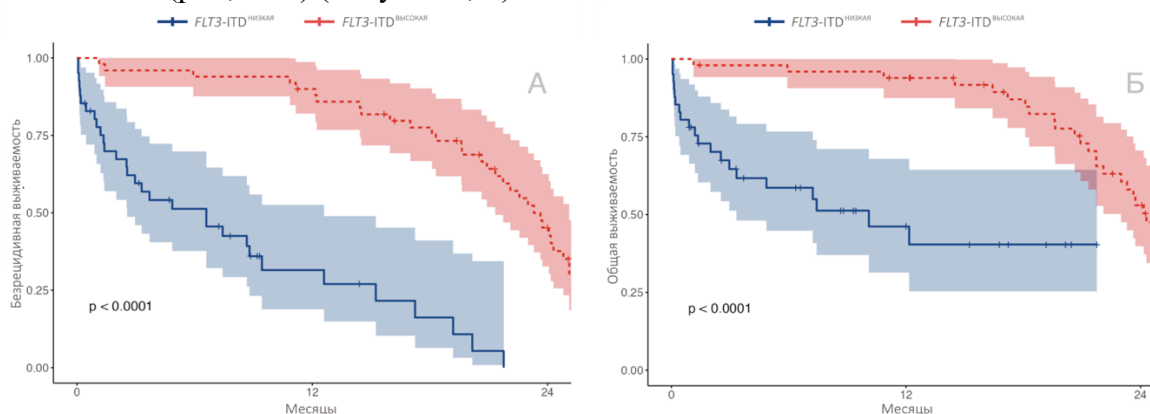


Рисунок 2 – Частота достижения полной ремиссии в зависимости от мутационного статуса генов *FLT3* и *NPM1*

С целью определения значимости влияния величины АН в гене *FLT3* на течение ОМЛ нами была проанализирована группа пациентов с *FLT3-ITD^{выс}* и *FLT3-ITD^{низ}* АН. При определении прогностической роли уровней АН мутаций в гене *FLT3* было установлено, что показатели БРВ значимо ниже в группе *FLT3-ITD^{выс}*, чем с *FLT3-ITD^{низ}* АН. Медиана длительности БРВ в группе *FLT3-ITD^{выс}* ($n=41$), составила 6,6 мес. (95% ДИ 2,5-12,6), а в группе *FLT3-ITD^{низ}* ($n=50$) – 23,3 мес. (95% ДИ 21,3-25,1) ($p<0,0001$) (Рисунок 3, А). Получены статистически значимые различия в длительности ОБ между данными группами. Медиана ОБ у пациентов *FLT3-ITD^{выс}* ($n=41$), была значительно ниже по сравнению с группой *FLT3-ITD^{низ}* ($n=50$): 10,1 мес. (95% ДИ 3,3 – НД) и 24,3 мес. (95% ДИ 23-26,8), соответственно ($p<0,0001$) (Рисунок 3, Б).



А – безрецидивная; Б – общая.

Рисунок 3 – Выживаемость пациентов ОМЛ в зависимости от величины аллельной нагрузки мутации в гене *FLT3-ITD*

Среди пациентов с ОМЛ отмечена высокая частота комбинированных мутаций генов *FLT3* и *NPM1*. В связи с этим, сопоставлена длительность БРВ и ОБ в различных группах пациентов. При разделении больных на группы в зависимости от сочетаний генных мутаций *FLT3* и *NPM1* обнаружено только достоверное различие в длительности ОБ ($p<0,0001$), но не по уровням БРВ ($p>0,05$). Медианные значения ОБ больных в группах *FLT3⁺/NPM1⁺* ($n=43$), *FLT3⁺/NPM1⁻* ($n=85$), *FLT3⁻/NPM1⁺* ($n=12$), *FLT3⁻/NPM1⁻* ($n=108$), составляли соответственно 13,4, 11,2, 49,1 и 46 мес. (Рисунок 4, А).

При анализе группы пациентов в зависимости от мутационного статуса, а также уровней АН *FLT3*-ITD, получены достоверно значимые различия только по длительности ОБ. Медианы ОБ больных в группах с высокой АН *FLT3*-ITD/*NPM1*⁺ (n=15), с высокой АН *FLT3*-ITD/*NPM1*⁻ (n=22), с низкой АН *FLT3*-ITD/*NPM1*⁺ (n=17), с низкой АН *FLT3*-ITD/*NPM1*⁻ (n=30) составили соответственно 7,4, 12,1, 26,8 и 23,7 мес. (p<0,0001) (Рисунок 4, Б).

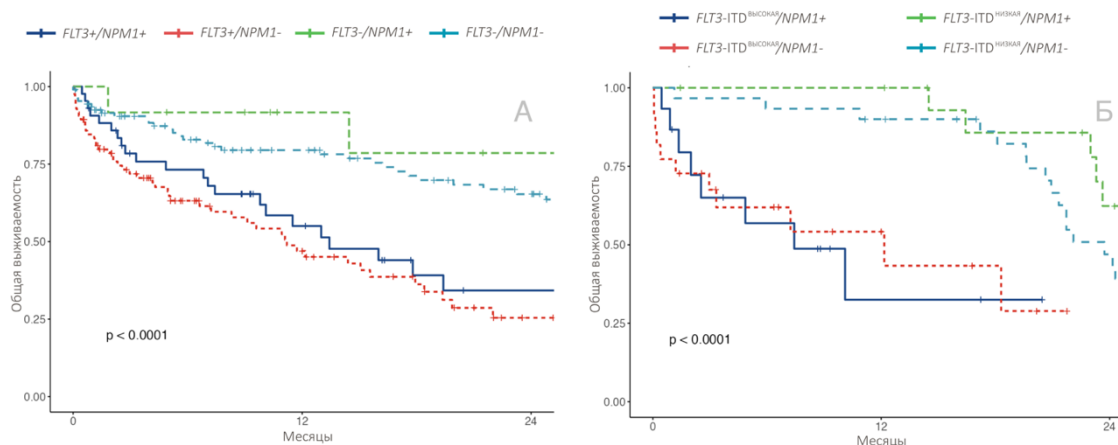
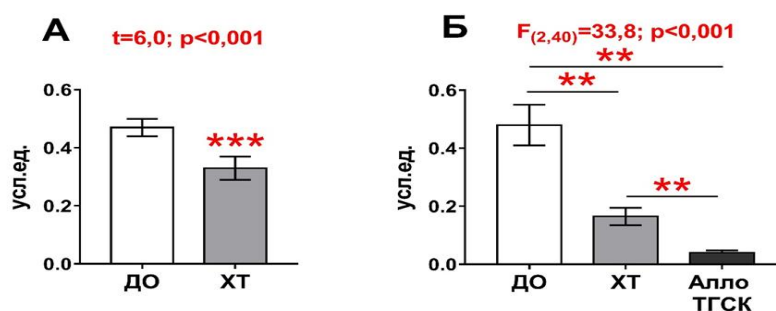


Рисунок 4 – Общая выживаемость пациентов с ОМЛ в зависимости от мутационного статуса генов *FLT3* и *NPM1* (А) и величины аллельной нагрузки *FLT3*-ITD (Б)

Динамика величины аллельной нагрузки мутации *FLT3*-ITD у больных острыми миелоидными лейкозами на фоне стандартных программ химиотерапии и современных методов лечения

В последующем мы анализировали динамику АН мутаций в гене *FLT3*-ITD на фоне проведения ХТ и алло-ТГСК. Применение ХТ снижало АН в 1,5 раза (Рисунок 5, А, t=6,0; p<0,001). Последовательное использование ХТ и алло-ТГСК показало еще большую эффективность (Рисунок 5, Б, ANOVA для повторных измерений – F(2,40)=33,8; p<0,001). При этом уровни АН снижались в 12 раз по сравнению с исходными значениями (Рисунок 5, Б, t=6,3; p<0,01) и в 4 раза по сравнению со значениями, полученными после ХТ (Рисунок 5, Б, t=5,0; p<0,01). Различия между группами достоверны с учетом поправки Бонферрони.



А – химиотерапия (ХТ, 88 случаев); Б – ХТ и последующая алло-ТГСК (n=21).

Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки. t – критерий Стьюдента для серий повторных определений, F – критерий Фишера, ANOVA для повторных определений.

** – p<0,01; *** p<0,001 – различия между выборками по t – критерию Стьюдента для повторных определений достоверны (на Рисунке Б – с учетом поправки Бонферрони).

Рисунок 5 – Изменение величины аллельной нагрузки мутаций *FLT3* до лечения (ДО) и после проведенной комплексной терапии

Для оценки динамики изменения АН *FLT3*-ITD был рассчитан процентный коэффициент, показывающий снижение АН по формуле, отражающей долю снижения АН в динамике по сравнению с ее уровнем в дебюте заболевания, принятом за 100%. Степень снижения величины АН *FLT3*-ITD достоверно коррелировала с показателями БРВ и ОБ (Рисунок 6) соответственно при r=0,45 (p<0,01) и r=0,46 (p<0,01).

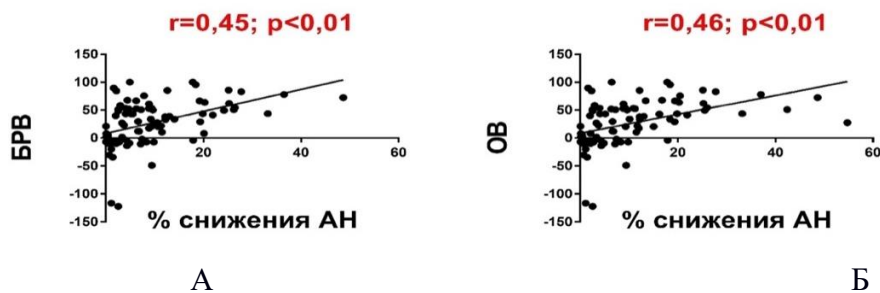
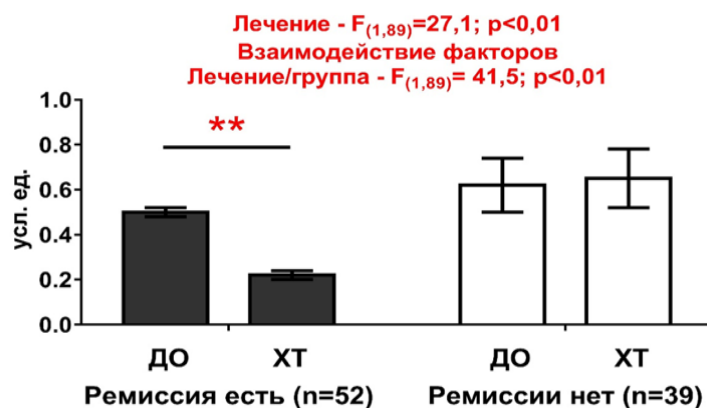


Рисунок 6 – Корреляция между безрецидивной (А) и общей выживаемостью (Б) и долей снижения аллельной нагрузки *FLT3*-ITD (%) на фоне проведенной терапии

Оценка прогностической ценности уровня аллельной нагрузки *FLT3*-ITD

Нами представлены результаты анализа АН *FLT3*-ITD после проведенной ХТ у пациентов в зависимости от достижения ПР (Рисунок 7).



ДО – аллельная нагрузка до лечения, ХТ – аллельная нагрузка после лечения; F – критерий Фишера. ** – $p < 0,01$, достоверные различия показателей до и после лечения по t – критерию Стьюдента для повторных определений с учетом поправки Бонферрони. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки.

Рисунок 7 – Изменения аллельной нагрузки *FLT3*-ITD в процессе лечения у пациентов с ремиссией (левая часть диаграммы) и без нее (правая часть)

Достоверное двукратное уменьшение АН после ХТ (Рисунок 7) выявлено только у пациентов с ПР (лечение – $F_{(1,89)}=27,1$; $p < 0,01$. Отмечено взаимодействие факторов лечения и наличия/отсутствия ПР – $F_{(1,89)}= 41,5,2$; $p < 0,01$). Сравнение уровней АН до и после лечения показывает достоверное снижение АН в группе с ПР ($t=7,0$; $p < 0,001$) при отсутствии изменений АН в группе, не достигшей ПР ($t=1,9$; $p > 0,05$).

Проведение алло-ТГСК в группе пациентов без мутаций в гене *FLT3* не оказывало влияния на длительность как БРВ, так и ОВ ($p > 0,05$). Эффективность проведения алло-ТГСК среди *FLT3*⁺ пациентов была достоверно значима только по динамике ОВ ($p < 0,0001$). Так, медиана ОВ в случаях проведения алло-ТГСК⁺ ($n=24$) не была достигнута (95% ДИ 22 – НД), по сравнению с медианным уровнем 9,1 мес. (95% ДИ 5,1-11,7) в группе пациентов без алло-ТГСК⁻ ($n=109$) (Рисунок 8, А).

Проанализирована эффективность проведения алло-ТГСК в зависимости от величины АН. Проведение алло-ТГСК не оказывало значимого влияния на длительность БРВ ($p > 0,05$), однако достоверно значимо способствовало увеличению длительности ОВ. Так, в группе с *FLT3*-ITD^{выс} после алло-ТГСК⁺ ($n=15$) медиана ОВ не была достигнута (95% ДИ НД – НД), а в группе без алло-ТГСК⁻ ($n=26$) она составила 2,5 мес. ($p < 0,0001$) (Рисунок 8, Б). Проведение алло-ТГСК также не влияло на длительность БРВ и ОВ в группе пациентов с низкой АН *FLT3*-ITD ($p > 0,05$).

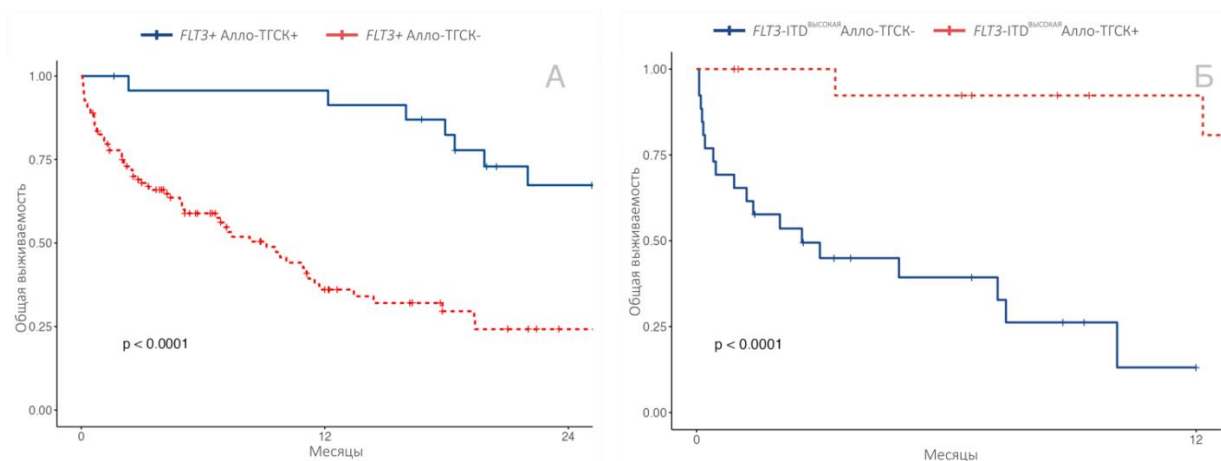


Рисунок 8 – Общая выживаемость пациентов с мутациями в гене *FLT3* (А) и величиной аллельной нагрузки (Б) в зависимости от проведения алло-ТГСК

Прогностическая значимость мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами, выявленных по результатам секвенирования нового поколения

В исследование включено 33 пациента с ОМЛ, проходивших лечение в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, которым было выполнено секвенирование в дебюте заболевания перед началом лечения. Медиана возраста составила 61 (26-79) год ($n=33$), соотношение М:Ж было 1 к 2,7.

Анализ клинических данных выявил ряд факторов, влияющих на ОВ. Показано, что пациенты с первичным ОМЛ имеют более благоприятный прогноз по сравнению с пациентами, у которых ОМЛ трансформировался из других миелоидных неоплазий (тОМЛ), отношение рисков (hazard ratio, HR) составило 9,05 (95% ДИ 2,43-33,62), $p=0,001$. Медиана ОВ у пациентов с тОМЛ составила 9,1 мес. против 47,5 мес. у пациентов с первичным ОМЛ, $p<0,0001$. В отношении длительности БРВ были получены аналогичны результаты, $HR=4,32$ (95% ДИ 1,62-11,53), $p=0,004$.

Возраст пациентов также оказался значимым прогностическим фактором, однако методом максимизации логарифмического сглаживающего сплайна нами был определен порог в 62 года, как наиболее значимый в анализе ОВ на исследуемых данных. Значение HR (при пороговом значении возраста 62 года) составило 5,05 (95% ДИ 1,58-16,14), $p=0,006$.

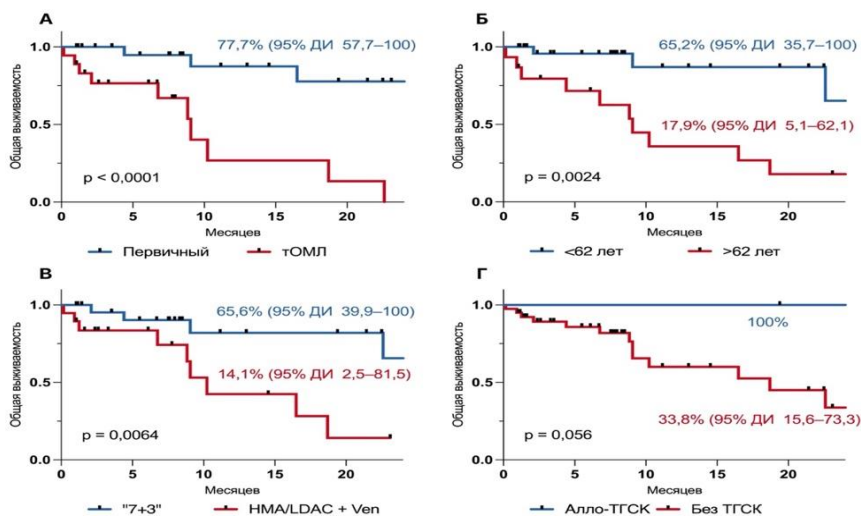
Сравнение групп лечения показало, что пациенты, получавшие стандартную индукционную терапию («7+3» с последующей консолидацией высокими или средними дозами цитарабина или FLAG-IDA) имели лучшие показатели ОВ, чем пациенты, которым была назначена низкоинтенсивная индукционная терапия: медиана ОВ составила 33,5 мес. против 10,2 мес. соответственно, $p=0,0064$ ($HR=0,22$ (95% ДИ 0,07-0,72), $p=0,013$). В отношении длительности БРВ различия отсутствовали ($p=0,14$). У пациентов, которым была выполнена алло-ТГСК, 2-летняя ОВ составила 100%, у больных, которым трансплантация не проводилась, ОВ была 33,8% (95% ДИ 15,6-73,3), $p=0,056$.

Наличие цитогенетических аномалий ($p=0,67$), включая КК ($p=0,17$), а также показатели гемограммы (уровень гемоглобина, количество лейкоцитов и тромбоцитов) не были статистически значимы ($p>0,3$). Результаты представлены на Рисунке 9.

В ходе анализа мутационного профиля пациентов с ОМЛ было выявлено 235 различных мутаций. Общая медиана VAF составила 44,56% (2,68-95,20). Наибольшая частота мутаций отмечалась в генах *ASXL1* (25%), *DNMT3A* (20%), *PTPN11* (20%), *KMT2C* (18%), *RUNX1* (18%), *RYR1* (18%), *SRSF2* (18%) и *TET2* (18%).

Распределение мутаций по варианту показало, что миссенс-мутации (missense mutation) были наиболее частыми 74,0% (174/235), за ними следовали мутации со сдвигом рамки считывания (frameshift mutation) 13,2% (31/235), мутации в сайтах сплайсинга (splice-site mutation) 5,1% (12/235), нонсенс-мутации (nonsense mutation) 4,7% (11/235), инфрейм-мутации

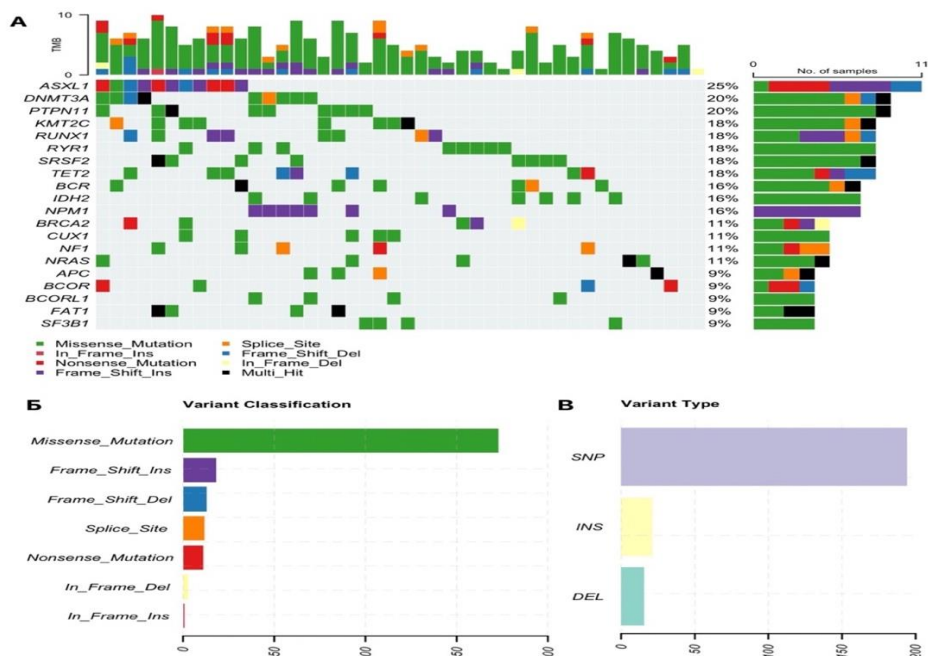
(in-frame mutation) 1,7% (4/235) и другие – 1,3% (3/235). По типу замещений преобладали однонуклеотидные замены (single-nucleotide polymorphism, SNP) – 84,3% (198/235), далее следовали вставки (insertion) – 8,9% (21/235) и делеции (deletion) – 6,8% (16/235) (Рисунок 10).



А – в зависимости от варианта ОМЛ (первичный или трансформированный); Б – выживаемость в группах (≥ 62 лет и > 62 лет); В – в зависимости от варианта индукционной терапии («7+3» или венетоклак в комбинации с гипометилирующими агентами или с низкими дозами цитарабина); Г – выживаемость у пациентов с алло-ТГСК и без ТГСК.

алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток;
тОМЛ – трансформированный острый миелоидный лейкоз; HMA/LDAC + Ven – венетоклак в комбинации с гипометилирующими агентами или с низкими дозами цитарабина

Рисунок 9 – Результаты анализа 2-летней общей выживаемости



А – онкоплот (частоты мутаций и распределение их по вариантам); Б – частота вариантов мутаций; В – частота типов нуклеотидных изменений. Multi_Hit – ≥ 2 мутаций в одном образце.

Рисунок 10 – Общая характеристика выявленных мутаций

Медианное значение VAF для наиболее мутировавших генов составило: *ASXL1* – 35,06% (13,02-52,90), *DNMT3A* – 31,28% (10,94-52,85), *PTPN11* – 17,98% (5,88-46,26), *KMT2C* – 7,02% (3,31-48,99), *RUNX1* – 44,71% (9,22-69,23).

Анализ сопутствующих и взаимоисключающих мутаций (Рисунок 11) выявил значимую связь между мутациями в генах *DNMT3A* и *NPM1* ($p=0,002$), а также между следующими парами: *FAT1* и *PTPN11* ($p=0,0226$), *FAT1* и *SRSF2* ($p=0,0154$), *KMT2C* и *CUX1* ($p=0,0349$), *BRCA2* и *RYR1* ($p=0,0349$), что свидетельствует о частом совместном их присутствии в одном геноме. Взаимоисключающие мутации были отмечены между *ASXL1* с *NPM1* и *IDH2*, что может отражать их участие в альтернативных путях патогенеза ОМЛ.

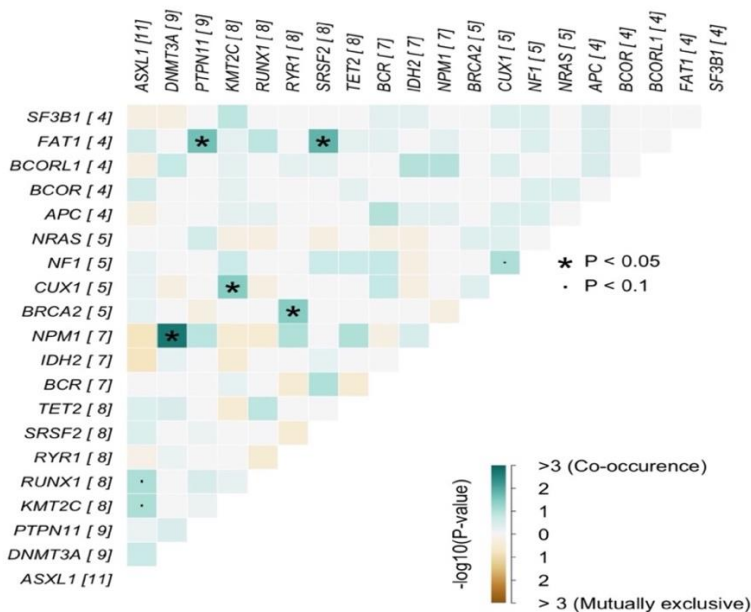


Рисунок 11 – График соматических взаимодействий с указанием сопутствующих и взаимоисключающих мутаций на основании результатов парного точного теста Фишера для каждой пары исследуемых генов. Значения взаимодействия представлены в виде отрицательных десятичных логарифмов от р-уровня

Для выявления генов-драйверов ОМЛ был проведен анализ позиционной кластеризации мутаций с использованием функции oncodrive, основанной на алгоритме oncodrive CLUST. В результате анализа было выявлено шесть генов-драйверов ОМЛ: *IDH2*, *NPM1*, *NRAS*, *SRSF2*, *DNMT3A* и *EZH2*, расположенных в порядке убывания z-значений (Рисунок 12).

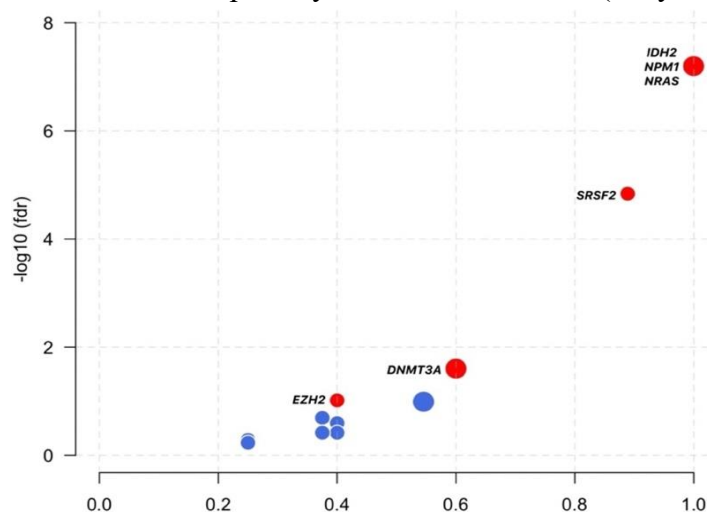
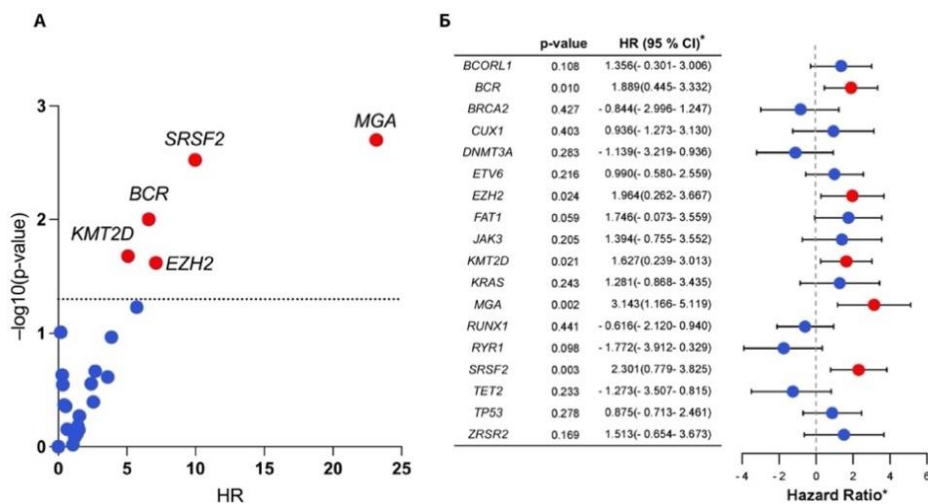


Рисунок 12 – Диаграмма рассеяния выявленных генов-драйверов ОМЛ. Размер точек пропорционален числу кластеров, обнаруженных в гене. Ось X показывает долю мутаций, наблюдаемых в кластере, от общего числа мутаций в гене. Ось Y представляет собой отрицательный десятичный логарифм от р-значений, которые скорректированы с учетом множественных сравнений с использованием коэффициента ложного обнаружения (false discovery rate, FDR)

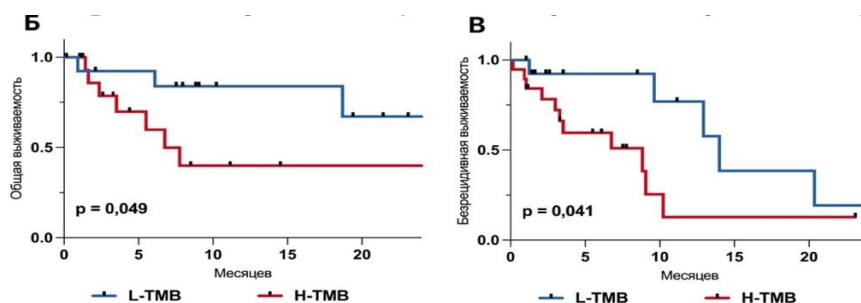
Для оценки клинической значимости идентифицированных мутаций в исследовании включались только те гены, мутации которых были определены у ≥ 2 пациентов. По результатам однопараметрического регрессионного анализа Кокса установлено, что на длительность ОБ статистически значимо влияют только мутации в генах: *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2*. Наиболее неблагоприятное влияние оказали мутации в гене *MGA*, $p=0,002$. Мутации в генах *SRSF2* ($p=0,003$) и *BCR* ($p=0,001$), а также в генах эпигенетической регуляции транскрипции – *KMT2D* ($p=0,021$) и *EZH2* ($p=0,021$) характеризуются неблагоприятным прогнозом (Рисунок 13).



А – точный график (dot plot). Ось X показывает значение отношения рисков (HR), ось Y – отрицательный десятичный логарифм от р-значения. Красным отмечены гены, мутации в которых ассоциированы с низкой общей выживаемостью; Б – лесной график (forest plot). Указаны только гены, для которых р-значение по результатам регрессионного анализа было $\leq 0,5$. * – ось X представляет собой значение отношения рисков (HR), вычисленное в логарифмической шкале $-\ln(p\text{-value})$. HR – относительный риск; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Рисунок 13 – Результаты однопараметрического регрессионного анализа Кокса

В рамках анализа была рассчитана опухолевая мутационная нагрузка (ОМН, tumour mutational burden – ТМВ) для каждого образца. Медианное значение составило 5 (2-9) мутаций на один образец костного мозга. С использованием метода максимизации логарифмического сглаживающего сплайна определен пороговый уровень ОМН, который составил 4 мутации. Пациенты с ОМН выше этого значения имели худшую ОБ ($p=0,049$). Медиана ОБ пациентов с высокой ОМН составила 9,1 мес., а пациентов с низкой ОМН – 33,5 мес. В анализе 2-летней ВБР: 8,8 мес. против 14,0 мес. соответственно, $p=0,041$ (Рисунок 14).



А – результаты анализа максимизации логарифмического сглаживающего сплайна; Б – общая выживаемость; В – безрецидивная выживаемость пациентов с ОМЛ в зависимости от величины опухолевой мутационной нагрузки. Н-Л-ТМВ – соответственно высокая и низкая опухолевая мутационная нагрузка.

Рисунок 14 – Прогностическая роль опухолевой мутационной нагрузки

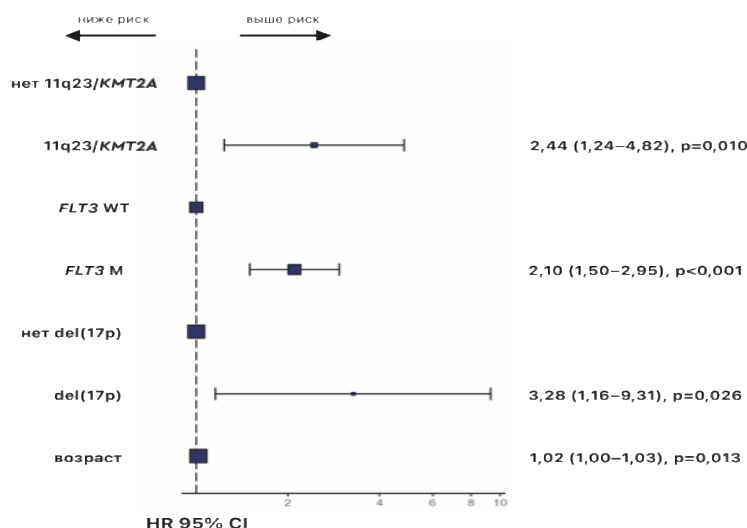
Многофакторный анализ независимых клинических и молекулярно-генетических факторов прогноза при остром миелоидном лейкозе

С учетом выраженной клинико-биологической гетерогенности ОМЛ и комплексной природы заболевания, был проведен многофакторный регрессионный анализ Кокса с целью определения независимых факторов, влияющих на ОВ, с одновременной корректировкой по ключевым клиническим, цитогенетическим и молекулярно-генетическим характеристикам.

В окончательную многофакторную модель были включены 240 пациентов. Анализ показал, что наличие перестроек региона 11q23 с вовлечением гена *KMT2A* являлось независимым неблагоприятным прогностическим фактором и ассоциировалось с более чем двукратным увеличением риска смерти (HR 2,44; 95% ДИ 1,24-4,82; $p=0,010$). Мутации в гене *FLT3* также сохраняли высокую статистическую значимость после поправки на другие ковариаты, увеличивая риск летального исхода в 2,1 раза (HR 2,10; 95% ДИ 1,50-2,95; $p<0,001$). Делеция 17-й хромосомы, несмотря на низкую частоту выявления, оставалась независимым фактором неблагоприятного прогноза и сопровождалась более чем трехкратным ростом риска смерти (HR 3,28; 95% ДИ 1,16-9,31; $p=0,026$).

Возраст пациентов также оказывал статистически значимое влияние на ОВ: увеличение возраста на каждый дополнительный год ассоциировалось с повышением риска смерти на 2% (HR 1,02; 95% ДИ 1,00-1,03; $p=0,013$). В то же время наличие КК не продемонстрировало независимого влияния на смертность в однофакторной модели (HR 1,40; 95% ДИ 0,82–2,32; $p=0,223$) (Рисунок 15).

С целью определения наиболее значимых биологических предикторов БРВ и ОВ были построены многофакторные регрессионные модели пропорциональных рисков Кокса для пациентов, кому был выполнен NGS анализ. Выявлено, что ряд факторов ассоциирован с достоверным увеличением риска смерти или рецидива. В частности, повышенная ОМН (>5 мутаций), мутации в генах *IDH2* и *KMT2D*, а также вторичный характер заболевания демонстрировали значимую тенденцию к неблагоприятному прогнозу. Мутация гена *ASXL1* показывала отсутствие эффекта в однофакторном анализе, однако в многофакторной модели является значимой ковариатой. По результатам однофакторного анализа мутация гена *IDH2* также не связана с неблагоприятным исходом ОМЛ, что может говорить о конфаундинг-эффекте.

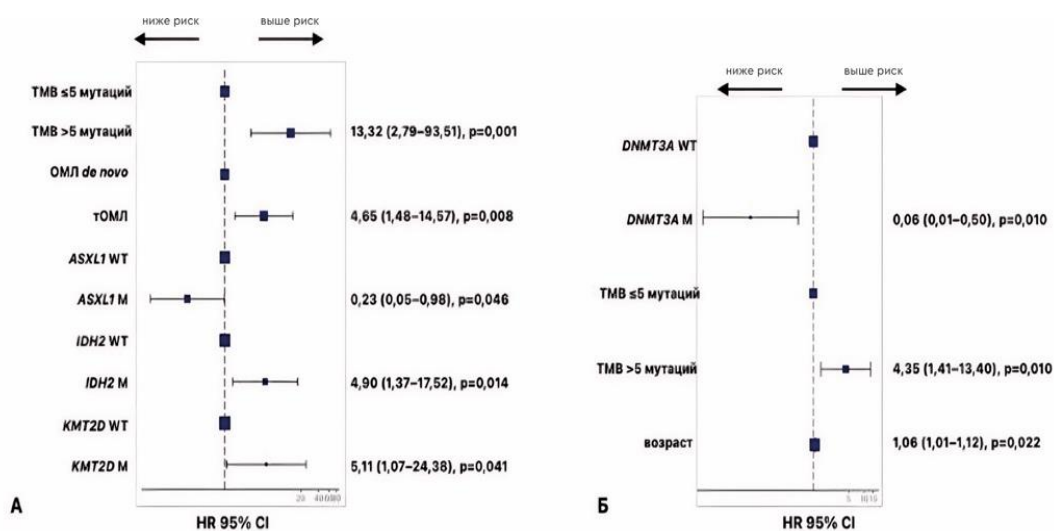


М – мутация; ОМН – опухолевая мутационная нагрузка; WT – вариант аллеля дикого типа.

Рисунок 15 – Forest plot многофакторной регрессионной модели Кокса для общей выживаемости у пациентов с острым миелоидным лейкозом после исключения больных с острым промиелоцитарным лейкозом и первичными МДС/МПН

Представлены отношения рисков (HR) с 95% доверительными интервалами

Высокая ОМН (≥ 5 мутаций на образец) демонстрировала неблагоприятное влияние на прогноз на уровне тенденции (HR=2,59, $p=0,079$). В многофакторной модели ОВ мутация *DNMT3A* приобрела независимое прогностическое значение и ассоциировалась с выраженным снижением риска смерти, что может отражать биологическую неоднородность данной мутации и ее контекст-зависимый эффект. В то же время высокая ОМН сохраняла независимую неблагоприятную прогностическую роль, увеличивая риск летального исхода более чем в четыре раза (HR=4,35, $p=0,010$). Возраст также оставался статистически значимым независимым фактором. Увеличение возраста на каждые 5 лет, повышает риск смерти от любой причины у пациентов с ОМЛ на 34% (Рисунок 16).



А – forest-plot многофакторной регрессионной модели Кокса для выживаемости без рецидива;

Б – forest-plot многофакторной регрессионной модели Кокса для общей выживаемости.

тОМЛ – трансформированный острый миелоидный лейкоз; М – мутация;

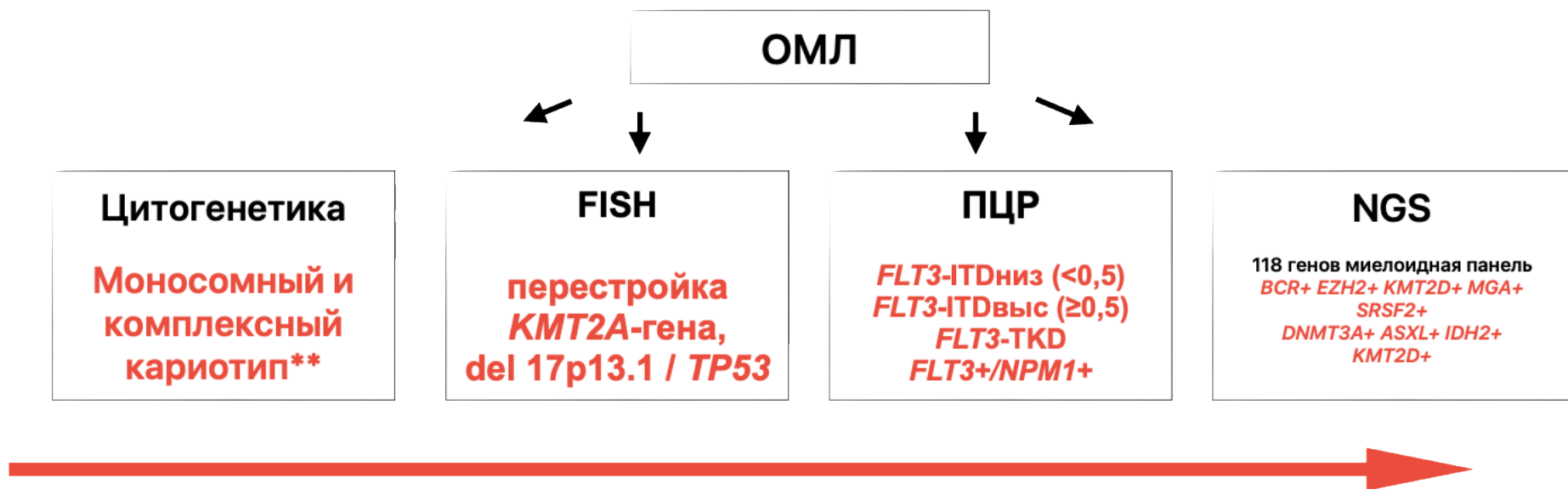
ОМН – опухолевая мутационная нагрузка; WT – вариант аллеля дикого типа.

Рисунок 16 – Влияние клинических и молекулярно-генетических факторов на показатели безрецидивной и общей выживаемости

Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острого миелоидного лейкоза

Современный подход к диагностике ОМЛ прежде всего строится на основании возрастных особенностей пациентов и молекулярно-генетической стратификации риска, определяющих прогноз и выбор терапии.

Составленный нами алгоритм отражает необходимость пошаговой последовательности применения методов цитогенетики, FISH, ПЦР и NGS. Результаты диагностики способствуют выявлению ключевых молекулярных маркеров, тем самым определяют дальнейшую лечебную тактику – выбор между стандартной и низкоинтенсивной терапией, а также показания к проведению алло-ТГСК. Следовательно, возможно выделить группы пациентов с различным прогностическим потенциалом, что является принципиально важным в выборе интенсивности терапии (Рисунок 17).



Неблагоприятный прогноз - выполнение Алло-ТГСК +/- Таргетная терапия
При отсутствие неблагоприятных генетических аномалий рассмотреть стандартную индукционную терапию
 ** согласно клиническим рекомендациям 2024 г

ПЦР – полимеразная цепная реакция; NGS – секвенирование нового поколения; алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; СИН – стандартная индукционная терапия (7+3, HiDAC, FLAG).

Рисунок 17 – Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острых миелоидных лейкозов

ВЫВОДЫ

1. Применение комплексного диагностического подхода способствует уточнению варианта острого миелоидного лейкоза, выявлению биологической гетерогенности опухолевого клона, формированию основы для последующей стратификации риска и выбора оптимальной терапевтической тактики.

2. Достижение полной ремиссии при лечении по стандартной программе «7+3» с низкой аллельной нагрузкой *FLT3-ITD* отмечалось чаще и составило 71,4% против 16,0% пациентов с высокой нагрузкой ($p=0,04$). Применение алло-ТГСК улучшало показатели общей выживаемости как в целом при *FLT3*-позитивных лейкозах ($p<0,0001$), так и у пациентов с высокой аллельной нагрузкой *FLT3-ITD* ($p<0,0001$). Выполнение алло-ТГСК сопровождалось выраженным снижением в отличие от пациентов, получивших только химиотерапию ($p<0,001$).

3. Мутации в генах *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2* оказывали неблагоприятное влияние на длительность общей выживаемости пациентов с острыми миелоидными лейкозами ($p>0,005$).

4. Пороговый уровень опухолевой мутационной нагрузки определен как 4 мутации. Высокая мутационная опухолевая нагрузка являлась неблагоприятным прогностическим фактором и оказывала негативное влияние на показатели общей ($p=0,049$) и безрецидивной выживаемости ($p=0,041$) пациентов.

5. Наиболее значимыми неблагоприятными прогностическими факторами, оказывающим влияние на общую выживаемость, являлись: возраст ($p=0,013$), *del* (17p) ($p=0,026$), перестройка 11q23/*KMT2A* ($p=0,010$), мутации в генах *FLT3* ($p<0,001$), *DNMT3A* ($p=0,010$), опухолевая мутационная нагрузка (>5 мутаций) ($p=0,010$); на безрецидивную выживаемость – мутации в генах *ASXL1* ($p=0,046$), *IDH2* ($p=0,014$), *KMT2D* ($p=0,041$), опухолевая мутационная нагрузка ($p=0,001$).

6. Алгоритм, позволяющий обнаружить маркеры неблагоприятного прогноза острого миелоидного лейкоза, должен включать перестройку *KMT2A* гена, *del* 17 хромосомы, мутации в генах *FLT3-ITD* с низкой и высокой аллельной нагрузкой, *FLT3-TKD*, *FLT3/NPM1*, *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA*, *SRSF2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *IDH2* и *KMT2D*. Наличие неблагоприятных аномалий является ключевым показанием для назначения таргетной терапии с последующим рассмотрением вопроса алло-ТГСК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Учитывая неблагоприятное течение острых миелоидных лейкозов с мутациями в гене *FLT3* и высокой аллельной нагрузкой *FLT3-ITD*, целесообразно определение данных показателей на этапе первичной диагностики у всех пациентов.

2. Проведение мониторинга величины аллельной нагрузкой мутации в гене *FLT3-ITD* у больных острыми миелоидными лейкозами на фоне проводимой химиотерапии способствует своевременной коррекции лечения. Сохраняющийся повышенный уровень аллельной нагрузки *FLT3-ITD* свидетельствует о неэффективности проводимого лечения и о неблагоприятном прогнозе течения заболевания.

3. С учетом возможности клональной эволюции заболевания, необходимо выполнение NGS исследования не только в дебюте, но и при резистентном или рецидивирующем течении острых миелоидных лейкозов, что позволит своевременно выявлять как маркеры неблагоприятного прогноза, так и возможные мишени дополнительного терапевтического таргетного воздействия для индивидуализации проводимой терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в процессе исследования результаты подтверждают ключевую роль генетических аномалий в патогенезе, клиническом течении и прогнозе острого миелоидного лейкоза. Выявленные взаимосвязи между мутационным профилем опухолевого клона, клинико-гематологическими характеристиками заболевания и показателями выживаемости

пациентов обосновывают целесообразность дальнейшего углубленного изучения молекулярно-генетических факторов с использованием современных технологий высокопроизводительного секвенирования. Актуальными темами для дальнейшего изучения являются:

1. Интеграция данных NGS-диагностики с клинико-гематологическими и цитогенетическими показателями для совершенствования риск-адаптированной стратификации пациентов.
2. Использование выявленных генетических маркеров для мониторинга эффективности терапии и оценки риска развития рецидива заболевания.
3. Оценка прогностической и предиктивной значимости отдельных генетических аномалий в условиях применения современных терапевтических режимов, включая таргетную терапию и аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мотыко, Е.В. Прогностическое значение генетических мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами: результаты совместного исследования гематологических клиник Санкт-Петербург (Россия) и клиники Шарите (Германия) / Е.В. Мотыко, О.В. Блау, Л.Б. Полушкина, Л.С. Мартыненко, М.П. Бакай, Н.Ю. Цыбакова, Ю.С. Рыженкова, Е.В. Клеина, Н.Б. Павленко, А.М. Раджабова [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 211-219.
2. Раджабова, А.М. Роль мутаций гена *FLT3* при острых миелоидных лейкозах: влияние на течение заболевания и результаты терапии / А.М. Раджабова, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич [и др.] // Гены и Клетки – 2019. – Т. 14, № 1. – С. 55-61.
3. Мотыко, Е.В. Прогностическое значение мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами / Е.В. Мотыко, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина [и др.] // Вестник Гематологии. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 53-54.
4. Мотыко, Е.В. Роль молекулярно-генетических aberrаций при прогнозировании течения острых миелобластных лейкозов / Е.В. Мотыко, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина [и др.] // Вестник Гематологии. – 2017. – Т. 13, № 2. – С. 60-61.
5. Раджабова, А.М. Влияние мутаций гена *FLT3* на клинико-лабораторные особенности и общую выживаемость у больных острыми миелоидными лейкозами в обычной клинической практике / А.М. Раджабова, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич [и др.] // Вестник Гематологии. – 2017. – Т. 13, № 3. – С. 62-63.
6. Раджабова, А.М. Клиническое и прогностическое значение мутаций гена *FLT3* у больных острыми миелоидными лейкозами в обычной клинической практике / А.М. Раджабова, С.В. Волошин, И.С. Мартынкевич [и др.] // Вестник Гематологии. – 2017. – Т. 13, № 2. – С. 70-71.
7. Мотыко, Е.В. Влияние молекулярно-генетических aberrаций на прогноз у больных острыми миелобластными лейкозами / Е.В. Мотыко, О.В. Блау, Л.Б. Полушкина [и др.] // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 65.
8. Мотыко, Е.В. Молекулярно-генетический профиль 620 пациентов с острыми миелоидными лейкозами, оценка влияния мутаций на прогноз / Е.В. Мотыко, О.В. Блау, Л.Б. Полушкина, Л.С. Мартыненко, М.П. Бакай, Ю.С. Руженкова, Е.В. Клеина, Н.Б. Павленко, А.М. Раджабова [и др.] // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 2. – С. 18-25.
9. Раджабова, А.М. *FLT3+* острые миелоидные лейкозы: мутационный статус и величина аллельной нагрузки / А.М. Раджабова, И.С. Мартынкевич, Е.В. Мотыко [и др.] // Гематология и Трансфузиология. – 2022. – Т. 67, № 2. – С. 285-286.
10. Мотыко, Е.В. Исследование молекулярно-генетических нарушений у больных СВФ-ОМЛ методом секвенирования нового поколения / Е.В. Мотыко, А.Н. Кириенко, Д.В. Кустова [и др.] // Вестник гематологии. – 2023. – Т. 19, № 2. – С. 91.

11. Мотыко, Е.В. Характеристика мутационного профиля пациентов с СВФ-ОМЛ: гетерогенность и влияние на прогноз течения заболевания / Е.В. Мотыко, А.Н. Кириенко, Д.В. Кустова [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2023. – Т. 19, № S1. – С. 53-54.
12. Раджабова, А.М. Прогностическое значение и мониторинг величины аллельной нагрузки *FLT3-ITD* при острых миелоидных лейкозах / А.М. Раджабова, Е.В. Мотыко, М.П. Бакай [и др.] // Вестник гематологии. – 2023. – Т. 19, № 2. – С. 102-111.
13. Раджабова, А.М. Мутационный статус и величина аллельной нагрузки *FLT3-ITD* при острых миелоидных лейкозах / А.М. Раджабова, Е.В. Мотыко, Л.Б. Полушкина [и др.] // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2023. – Т. 16, № S1. – С. 51-52.
14. Radzhabova, A. Clinical and prognostic value of FLT3 mutations in acute myeloid leukemia patients in routine clinical practice – single center experience / A. Radzhabova, S. Voloshin, I. Martynkevich [et al.] // Haematologica. – 2017. – Vol. 102, Suppl. 2. – Abstract PB1682.
15. Motyko, E. Prognostic relevance of FLT3, NPM1, DNMT3, IDH 1/2 gene mutations in acute myeloid leukemia patients / E. Motyko, I. Martynkevich, O. Blau [et al.] // HemaSphere. – 2018. – Vol. 2, Suppl. S1 – Abstract PS1003.
16. Radzhabova, A. The role of mutations of the gene FLT3 in acute myeloid leukemia: the effect on the course of the disease and the results of the therapy / A. Radzhabova, S. Voloshin, I. Martynkevich [et al.] // HemaSphere. – 2019. – Vol. 3, Suppl. S1 – Abstract PB1742.
17. Radzhabova, A. Specific features of the FLT3+ Acute Myeloid Leukemia Course / A. Radzhabova, I. Martynkevich, E. Motyko [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2022. – Vol. 22, Suppl. 2. – P. S228-S229.
18. Radzhabova, A. Mutation status and allele burden of FLT3-ITD in acute myeloid leukemia / A. Radzhabova, E. Motyko, L. Polushkina [et al.] // HemaSphere. – 2023. – Vol. 7, Suppl. S3. – Abstract PB1856.
19. Motyko, E. Molecular-genetic profiling of NPM1-mutated acute myeloid leukemia and its prognostic value / E. Motyko, A. Kirienko, D. Kustova [et al.] // Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2024. — Vol. 24, Suppl. 1. – P. S311. – ISSN 2152-2650.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Алло-ТГСК	– аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
АН	– аллельная нагрузка
БРВ	– безрецидивная выживаемость
КК	– комплексный кариотип
МДС	– миелодиспластический синдром
МДЦ	– малые дозы цитарабина
МОБ	– минимальная остаточная болезнь
МПН	– миелопролиферативное новообразование
ОВ	– общая выживаемость
ОМЛ	– острый миелоидный лейкоз
ОМН	– опухолевая мутационная нагрузка, ТМВ – tumour mutational burden
ПР	– полная клинико-гематологическая ремиссия
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РФ	– Российская Федерация
тОМЛ	– трансформированный острый миелоидный лейкоз
ХТ	– химиотерапия
<i>de novo</i>	– первичный острый миелоидный лейкоз
ELN	– European Leukemia Net, Европейская организация по изучению и лечению лейкозов
FISH	– fluorescent <i>in-situ</i> hybridization, флуоросцентная <i>in-situ</i> гибридизация

HR	– hazard ratio, отношение рисков
Mut	– мутация
NGS	– next-generation sequencing, секвенирование нового поколения
VAF	– variant allele frequency – частота встречаемости аллеля
WT	– вариант дикого типа