

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

РАДЖАБОВА АСИЯТ МАЛИКОВНА

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ В ПРОГНОЗЕ
ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

3.1.28 – Гематология и переливание крови

3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Сидоркевич Сергей Владимирович

доктор медицинских наук

Мартынкевич Ирина Степановна

доктор биологических наук

Санкт-Петербург – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ, ВЕРИФИКАЦИИ ДИАГНОЗА, ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВЫБОРЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА	15
1.1 Ключевые аспекты этиологии и патогенеза острого миелоидного лейкоза, клинические проявления заболевания.....	15
1.2 Характеристика и современная классификация острого миелоидного лейкоза.....	16
1.3 Современное представление о роли генетических мутаций в течении острого миелоидного лейкоза.....	21
1.4 Внедрение в диагностику возможностей применения секвенирования нового поколения	27
1.5 Современные подходы к выбору терапевтической тактики пациентов с острыми миелоидными лейкозами в зависимости от мутационного профиля заболевания	31
1.6 Место аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у больных острым миелоидным лейкозом в эру таргетной терапии.....	41
Глава 2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1 Характеристика исследуемой группы пациентов.....	46
2.2 Методы исследования.....	51
2.2.1 Клинические и инструментальные методы исследования	51
2.2.2 Цитогенетическое исследование	52
2.2.3 Метод качественного определения мутаций в гене <i>FLT3</i>	52

2.2.4 Метод количественного определения аллельной нагрузки <i>FLT3-ITD</i>	54
2.2.5 Секвенирование нового поколения.....	55
2.3 Статистическая обработка данных.....	59
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	61
3.1 Частота встречаемости мутаций в гене <i>FLT3</i> у больных острыми миелоидными лейкозами.....	61
3.1.1 Величина аллельной нагрузки мутантного <i>FLT3-ITD</i> гена у больных острыми миелоидными лейкозами.....	65
3.2 Клинические особенности течения острых миелоидных лейкозов в зависимости от наличия мутаций в гене <i>FLT3</i> и величины аллельной нагрузки, их влияние на безрецидивную и общую выживаемость пациентов.....	66
3.3 Динамика величины аллельной нагрузки мутации <i>FLT3-ITD</i> у больных острыми миелоидными лейкозами на фоне стандартных программ химиотерапии и современных методов лечения.....	79
3.4 Оценка прогностической ценности уровня аллельной нагрузки <i>FLT3-ITD</i>	81
3.5 Прогностическая значимость мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами, выявленных по результатам секвенирования нового поколения.....	84
3.6 Многофакторный анализ клинических и молекулярно-генетических факторов прогноза при остром миелоидном лейкозе.....	100
3.7 Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острых миелоидных лейкозов.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ВЫВОДЫ.....	129
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	131
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	133
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	135

ВВЕДЕНИЕ

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 стандартизированной. 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 [4; 15]. Терапия пациентов возрастной группы интенсивными курсами ХТ сопряжена с увеличением токсичности и риском смерти [2], следовательно, данной группе рекомендовано применение длительной терапии малоинтенсивными ротирующими курсами: гипометилирующие агенты (ГА), 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) [6; 7]. 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 [50], 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 не изученной 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, что подтверждается 5 пересмотром ВОЗ классификации ОМЛ (2022 г.) [199]. 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 (миелопролиферативное новообразование) [133; 199].

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 сочетанном влиянии 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 определяют 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 [50].

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 течения 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 проведенной работы отражают современное представление о молекулярных механизмах патогенеза ОМЛ и эволюции их генетического ландшафта. В ходе проведенного 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 сравнение 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 неблагоприятными 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.

Основные теоретические и практические положения диссертационной работы представлены в виде докладов на научных конференциях всероссийского и международного уровня: IV Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы высокотехнологичной помощи в терапии» (Санкт-Петербург, 2020); II Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021); III Московская гематологическая школа, II Московская гематологическая школа 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 Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2023); III Научно-практическая конференция молодых ученых «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийская научно-практическая конференция 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РОЛИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ, ВЕРИФИКАЦИИ ДИАГНОЗА, ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРОГНОСТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ТЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВЫБОРЕ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

1.1 Ключевые аспекты этиологии и патогенеза острого миелоидного лейкоза, клинические проявления заболевания

Острый миелоидный лейкоз представляет собой гетерогенную группу клональных опухолевых заболеваний кроветворной ткани, характеризующуюся неконтролируемой пролиферацией, нарушением дифференцировки и накоплением в костном мозге и периферической крови незрелых клональных гемопоэтических клеток (бластов) [131].

В среднем заболеваемость составляет 3-5 человек на 100 000 населения. Медиана возраста – 65 лет. Согласно зарубежным данным, самая высокая заболеваемость ОМЛ отмечена в США, Австралии и Западной Европе. По данным российской исследовательской группы по изучению ОМЛ, медиана возраста при диагностике ОМЛ составляет 53 года [4].

Этиология заболевания окончательно не установлена. Louise M. Kelly и D. Gary Gilliland разработали модель развития ОМЛ, согласно которой заболевание возникает в результате, как минимум, двух последовательных генетических событий [104; 109].

Первое событие – это мутации I класса, возникают в генах *FLT3*, *KIT*, *N-RAS*, *K-RAS* и *PTPN11*, приводя к неконтролируемой пролиферации. Возникающая при этом нестабильность генома приводит к появлению вторичных событий – так называемых мутаций II класса, например, генов *NPM1* и *CEBPA*,

влияющих на уровни дифференцировки клеток. Считается, что именно сочетание мутаций этих двух классов приводит к возникновению ОМЛ [31; 173].

Важно отметить также, что лейкозогенез ОМЛ не ограничивается только последовательным возникновением двух генетических событий, он значительно сложнее и включает, в частности, мутации генов, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию (участвующие в метилировании ДНК – *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*). Данные мутации относятся к мутациям III класса, которые тоже играют роль в регуляции лейкозогенеза [59; 136]. Именно этим объясняются сложности в достижении длительного устойчивого ответа, сопряженного с полным выздоровлением.

В основе патогенеза ОМЛ лежат повреждения стволовой клетки, в результате чего клон клеток теряет способность к созреванию. Возникает клональная пролиферация бластных клеток, которые не способны к дифференцировке в более зрелые клетки крови.

Клинические проявления ОМЛ неспецифичны и определяются опухолевой интоксикацией, специфической инфильтрацией различных органов, инфекционными и геморрагическими осложнениями, а также анемией. Именно объем опухолевой инфильтрации костного мозга, как правило, определяет выраженность клинической симптоматики при ОМЛ [5; 54; 185].

1.2 Характеристика и современная классификация острого миелоидного лейкоза

В связи с новыми достижениями в понимании генетических механизмов онкогенеза при ОМЛ и выявлением значимых прогностических молекулярных маркеров была представлена классификация ВОЗ миелоидных новообразований ОМЛ (2016 г.) [198].

Одним из важнейших разделов данной классификации, который представляет наибольший интерес, являются рекуррентные (повторяющиеся)

генетические аномалии. Так, в новую версию были внесены следующие изменения: переименованы гены, в частности, *MLL* на *KMT2A*; пересмотрен молекулярный маркер *inv(3)(q21.3q26.2)* или *t(3;3)(q21.3;q26.2)*, с указанием на реаранжировку в онкогенном факторе *GATA2* и *MECOM*, а не в гене *RPNI-EVII* [16].

Помимо этого, были выделены группы острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) с *PML-RARA* и ОМЛ с *BCR-ABL1*, при которых возможно успешное применение таргетной терапии [168; 181]. Проведена углубленная разработка группы семейных миелоидных новообразований, которая отражает взаимосвязь семейных синдромов в патогенезе ОМЛ.

В основу классификации ОМЛ легли результаты молекулярно-генетических исследований. Первоначальная цель классификации генетических аномалий заключалась в оценке их корреляции с клиническими характеристиками и исходом заболеваний, а не в прогностической стратификации [160; 200]. Исследовательская группа ELN решила усовершенствовать классификацию, выделив 3 группы пациентов по категориям прогностических рисков: благоприятный, промежуточный, неблагоприятный (Таблица 1).

Таблица 1 – Цитогенетическая и молекулярно-генетическая стратификация рисков ELN ОМЛ 2017 [200]

Прогноз	Генетические аномалии
Благоприятный	<i>t(8;21)(q22;q22.1)</i> ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>inv(16)(p13.1q22)</i> или <i>t(16;16)(p13.1;q22)</i> ; <i>CBFB-MYH11</i> Мутация в гене <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> ^{низ} Биаллельная мутация в гене <i>CEBPA</i>
Промежуточный	Мутация в гене <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> ^{выс} Дикий тип <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> ^{низ} <i>t(9;11)(p21.3;q23.3)</i> ; <i>MLLT3-KMT2A</i> Цитогенетические аномалии, не относящиеся к благоприятной и неблагоприятной группам риска

Продолжение таблицы 1

Прогноз	Генетические аномалии
Неблагоприятный	<p>t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3); реанжировка гена <i>KMT2A</i></p> <p>t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i></p> <p>inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM(EV11)</i></p> <p>-5 или del(5q); -7; -17/abn(17p)</p> <p>Комплексный кариотип, моносомный кариотип</p> <p>Дикий тип <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD^{выс}</i></p> <p>Мутация в гене <i>RUNX1</i></p> <p>Мутация в гене <i>ASXL1</i></p>

Согласно классификации ELN 2017, пациенты с высокой АН мутации в гене *FLT3-ITD^{выс}* имеют значительно меньшую длительность ОБ, в отличие от пациентов с *FLT3-ITD^{низ}*, поэтому пациентам с *FLT3-ITD^{выс}* рекомендована алло-ТГСК в клинко-гематологической ремиссии (ПР) заболевания, которая значительно улучшает показатели БРВ и ОБ [1; 99; 200].

Классификация генетических аномалий ELN 2017 в дальнейшем была пересмотрена и на основании полученных данных была сформирована новая классификация ELN 2022 (Таблица 2). Наиболее значимые аспекты, которые были внесены в новую классификацию, следующие:

1. Величина АН *FLT3-ITD* больше не учитывается в классификации рисков. Следовательно, все ОМЛ с мутациями в гене *FLT3-ITD* теперь относят к группе промежуточного риска, независимо от соотношения аллелей или одновременного присутствия мутации в гене *NPM1*.

2. ОМЛ с наличием различных мутаций, связанных с миелодисплазией, отнесены в группу неблагоприятного риска. Помимо ранее выделенных мутаций в генах *ASXL1* и/или генов *RUNX1*, эта категория теперь включает такие мутации как: *BCOR, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2* и *TP53*.

3. Пациенты с неблагоприятными хромосомными aberrациями несмотря на наличие мутации в гене *NPM1* относятся в группу неблагоприятного прогноза.

4. Согласно последним исследованиям, мутации в гене *CEBPA*, относятся к группе благоприятного прогноза, независимо от возникновения биаллельных или моноаллельных мутаций.

5. Выделены хромосомные aberrации $t(8;16)(p11;p13)$, связанные с перестройкой генов *KAT6A::CREBBP*, которые определены в группу неблагоприятного прогноза.

6. Гипердиплоидные кариотипы с множественными трисомиями (или полисомиями) больше не считаются комплексным кариотипом (КК) и не относятся в группу неблагоприятного прогноза.

Таблица 2 – Цитогенетическая и молекулярно-генетическая стратификация рисков ELN OML 2022 [50]

Прогноз	Генетические аномалии
Благоприятный	$t(8;21)(q22;q22.1)$; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; <i>CBFB-MYH11</i> Мутация в гене <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> Биаллельная мутация в гене <i>CEBPA</i> Мутация в гене <i>bZIP CEBPa</i>
Промежуточный	Мутация в гене <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> Дикий тип <i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> $t(9;11)(p21.3;q23.3)$; <i>MLLT3-KMT2A</i> Цитогенетические аномалии, не относящиеся к благоприятной и неблагоприятной группам риска
Неблагоприятный	$t(6;9)(p23;q34.1)$; <i>DEK-NUP214</i> $t(v;11q23.3)$; реаранжировка гена <i>KMT2A</i> $t(9;22)(q34.1;q11.2)$; <i>BCR-ABL1</i> $t(8;16)(p11;p13)/KAT6A::CREBBP$ $inv(3)(q21.3q26.2)$ или $t(3;3)(q21.3;q26.2)$; <i>GATA2</i> , <i>MECOM(EV11)</i> -5 или $del(5q)$; -7; -17/ <i>abn(17p)</i> Комплексный кариотип, моносомный кариотип Мутации в генах <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i> , <i>TP53</i>

Исторически величина АН мутации в гене *FLT3-ITD* рассматривалась как важный прогностический маркер при ОМЛ, который ассоциирован с высоким риском рецидива заболевания и низкими показателями ОВ. В последние годы произошла переоценка клинической значимости порога величины АН. Обновлённые рекомендации ELN 2022 были пересмотрены и в настоящее время показатель величины АН не применяют как независимый критерий при распределении пациентов на группы риска. Основные причины этого решения – методологическая неустойчивость, возможность применения ингибиторов-FLT3 и проведение алло-ТГСК, тем самым воздействуя на течение заболевания и его прогноз.

Современная литература не одобряет использование порога величины АН мутантного гена *FLT3-ITD*, как универсального прогностического критерия и выделяет клиническую ценность *FLT3-ITD* независимо от величины в дебюте заболевания и на разных этапах терапии, определяя выбор таргетной терапии и показания к проведению алло-ТГСК [161].

В результате большинство исследователей пришли к выводу, что величина АН может иметь биологический смысл, но его клиническая интерпретация требует контекста, а именно – наличие сопутствующих мутаций, доступность таргетной терапии, а также своевременное проведение алло-ТГСК.

Несмотря на то, что в многочисленных исследованиях изучался потенциал мутаций в таких генах, как *IDH1/IDH2* или *DNMT3A*, текущие данные еще не гарантируют их отнесение к отдельной прогностической группе ELN. Кроме того, применение таргетных ингибиторов может повлиять на исход заболевания с мутациями в гене *IDH1/IDH2*. Наконец, следует подчеркнуть, что классификация рисков ELN ОМЛ 2022 была разработана на основе данных пациентов, получающих только интенсивную программу лечения, и в будущем может потребовать внесение поправок для групп пациентов, получивших низкоинтенсивную терапию.

1.3 Современное представление о роли генетических мутаций в течении острого миелоидного лейкоза

Острый миелоидный лейкоз – злокачественное заболевание кроветворной системы, характеризующееся повышенной пролиферацией и нарушением дифференцировки гемопоэтических предшественников. Развитие ОМЛ ассоциировано с множеством цитогенетических и молекулярных нарушений, тесно связанных с клинической и биологической гетерогенностью заболевания.

Хромосомные и молекулярно-генетические aberrации играют ключевую роль в определении диагностических и прогностических особенностей при ОМЛ, имеют неопределимое значение для стратификации риска и индивидуализации терапевтических подходов. Динамика молекулярно-генетических аномалий отражает клональную эволюцию самого заболевания и обусловлена постоянным изменением молекулярно-генетического ландшафта – потерей и приобретением новых соматических мутаций в ходе изменения статуса заболевания. Согласно классификации ELN 2022, пациентов следует разделить на благоприятную, промежуточную и неблагоприятную группы в зависимости от характеристик хромосомных и молекулярно-генетических аномалий.

Цитогенетические и молекулярно-генетические аномалии выявляются у большинства больных ОМЛ и сочетаются с определенными клиническими особенностями. Так, хромосомные перестройки обнаруживаются примерно у 50-60% больных при заболевании *de novo* (первичный) и у 80-95% больных вторичными ОМЛ.

До 45% пациентов с ОМЛ не имеют хромосомных aberrаций, их классифицируют как больных с нормальным кариотипом (НК). Они относятся к промежуточной группе риска. Группа пациентов с НК является весьма гетерогенной по характеру ответа на терапию и течению заболевания. Именно поэтому принципиальное значение для этих больных приобретает оценка частоты выявляемости и прогностической значимости молекулярно-генетических

аномалий, особенно тех, которые принимают непосредственное участие в лейкозогенезе, которые, могут рассматриваться как дополнительная «мишень» для терапевтического воздействия [33; 39; 84].

Основную часть пациентов с неблагоприятным прогнозом составляют пациенты с КК. Это, как правило, наличие трех или более хромосомных aberrаций структурного или численного характера. В последнее время более подробный анализ данной группы, привел к выделению подгруппы с наиболее неблагоприятным исходом – это пациенты с моносомным кариотипом (МК) [128]. МК определяют по наличию двух или более моносомий, или одиночной моносомии с дополнительной структурной перестройкой. МК встречается относительно часто при ОМЛ (около 10% всех случаев, а среди пожилых пациентов – до 20%). При этом 4-летняя выживаемость в данной подгруппе составляет только 3% по сравнению с 13% без МК [29; 154].

Среди пациентов с НК – это более 85%, могут определяться различные специфические мутации отдельных генов [87]. Наиболее часто при ОМЛ встречаются мутации в гене *FLT3*, имеющие прогностическое значение [25; 115; 178]. Ген *FLT3* (fms-like tyrosine kinase 3) локализован на 13 хромосоме (локус 13q12) и кодирует белок, относящийся к семейству рецепторов тирозинкиназ. Рецепторный белок FLT3 активируется на клеточной мембране посредством связывания его с лигандом. Лиганд FLT3 относится к семейству цитокинов. Это трансмембранный белок, который вырабатывается клетками костномозгового микроокружения и некоторыми гемопоэтическими клетками и способен переходить в растворимую форму во внеклеточном пространстве и взаимодействовать с рецептором. Переход рецептора в активное состояние сопровождается фосфорилированием тирозиновых остатков тирозинкиназного домена ТК2, что приводит к запуску целого каскада реакций по различным сигнальным путям, включая STAT5, RAS/MAP и PI3K/AKT. Сигнальные пути, которые стимулируются *FLT3*, контролируют процессы клеточного роста и пролиферацию ранних гемопоэтических клеток-предшественников [54; 65; 81; 210].

Молекулу рецептора FLT3 условно можно разделить на две функциональные единицы: рецептор и тирозиновую киназу, связанные друг с другом трансмембранным доменом. Рецепторная часть расположена на клеточной мембране, она имеет характерную структуру – состоит из пяти иммуноглобулиноподобных доменов, которые могут связываться с лигандом. Внутриклеточная часть состоит из субмембранного домена (JM-юкстамембранный) и двух каталитических (киназных) доменов (TK1 и TK2). Структура молекулы рецептора FLT3 представлена на Рисунке 1.

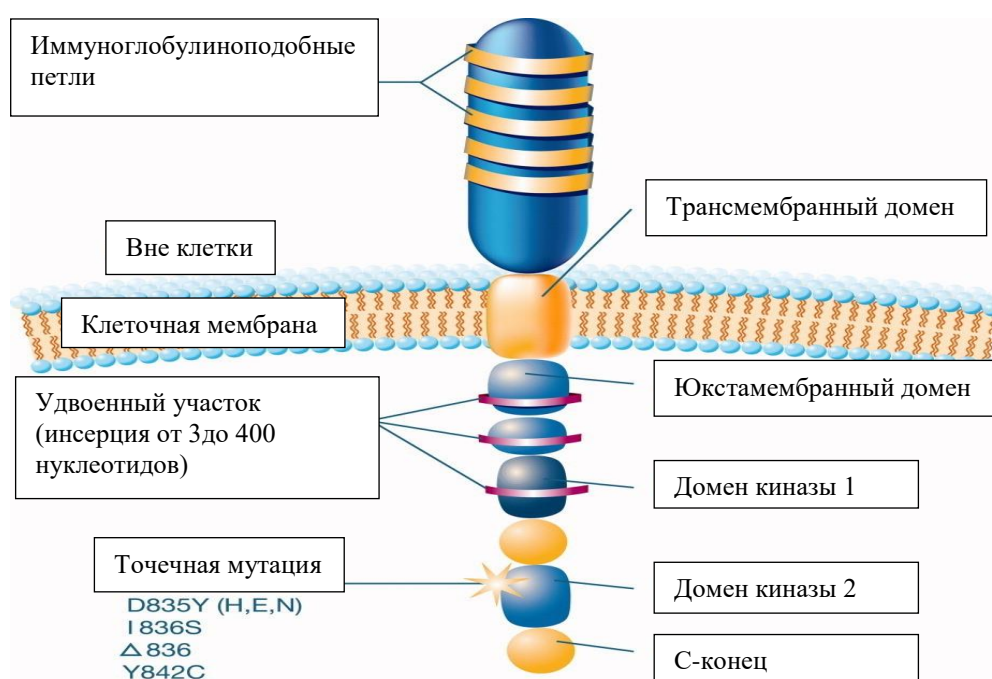


Рисунок 1 – Структура молекулы рецептора FLT3

Мутации в гене *FLT3* приводят к неконтролируемой активации рецептора, и в результате он проводит сигнал, не связываясь с лигандом. Запускаемый каскад реакций становится более длительным, чем в норме, что вызывает неконтролируемую стимуляцию экспрессии генов, направленных на пролиферацию клеток гемопоэза [179; 194].

При ОМЛ известно два основных типа мутаций: внутреннее тандемное удвоение нуклеотидов (internal tandem duplication, ITD) иногда со вставками

добавочных нуклеотидов в экзонах 14-15, а также точечная мутация в домене (TKD1). По данным R.F. Schlenk, P.D. Kottaridis et al. установлено, что больные ОМЛ с мутацией *FLT3*-ITD имеют неблагоприятный прогноз заболевания с высокой частотой рецидивов и короткой средней продолжительностью жизни [23; 24; 36; 157; 208].

Другой менее частый вариант мутации *FLT3* – точечная мутация в домене TKD1, которая встречается примерно у 10% больных ОМЛ, как у детей, так и среди взрослых [18]. Прогностическое значение мутации *FLT3*-TKD остается неясным. Противоречивые данные, вероятно, объясняются редкостью этих мутаций [71; 75; 119].

Неоднократно было продемонстрировано, что мутация в гене *FLT3*, в целом, определяет плохой прогноз и нивелирует благоприятный прогноз, ассоциированный с другими сопутствующими мутациями [34; 106; 155; 192]. Результаты секвенирования свидетельствуют, что мутация в гене *FLT3* довольно часто сочетается с другими генетическими абберациями, особенно с такими, как: *DNMT3A* (13,3%), *NPM1* (6,8%), *WT1* (5%), *RUNX1* (3,5%), *MLL* (2,5%), *CEBPA* (1,5%) и *CBF* (1,5%) [114; 155].

Ранее было известно, что высокая частота рецидивов и меньшая ОВ ассоциированы с мутацией в гене *FLT3*-ITD и в значительной мере зависят от АН мутантного гена. До настоящего времени исследования демонстрировали, что пациенты с мутациями в генах *NPM1* и *FLT3*-ITD^{низ} имели благоприятный прогноз, как и пациенты с мутацией *NPM1*, но без *FLT3*-ITD [29; 128; 154; 202]. В то же время пациенты с ОМЛ с диким типом *NPM1* и с мутацией в гене *FLT3*-ITD^{выс} имели худший прогноз и были отнесены в группу высокого риска [202].

Согласно новой пересмотренной классификации ELN 2022, которая претерпела изменения относительно АН мутации в гене *FLT3*-ITD, ее величина уже не принимается во внимание. Таким образом, наличие мутации в гене *FLT3* относится в промежуточную группу риска независимо от наличия или отсутствия мутации в гене *NPM1* [50].

Другие виды мутации, которые актуальны на сегодняшний день, имеют высокую частоту встречаемости и определяют характер течения ОМЛ – *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *KIT*, *TP53*, *RUNX1* и *ASXL1*.

Ген *NPM1* находится на длинном плече хромосомы 5 (5q35) и кодирует фосфопротеид, который формирует связь между ядром и цитоплазмой. *NPM1* имеет функции гена – стимулятора роста, гена – опухолевой супрессии. Мутации *NPM1* определяются примерно в 30% по разным источникам и часто коррелируют с НК. Изолированная мутация в гене *NPM1*, как правило, связана с относительно благоприятным исходом – высокими показателями БРВ, ОВ, и ПР, а также рассматривается в группе благоприятного прогноза [155; 177].

CEBPA кодирует ССААТ/белок, связывающий энхансер альфа, который является ключевым фактором транскрипции для гранулоцитарной дифференцировки. В результате мутации в гене нарушается способность связывания с ДНК. Частота выявления в 7-11% случаев ОМЛ и в 13-15% среди пациентов с НК. Известно три варианта мутаций: чаще всего у пациентов выявляется одиночная мутация в одном аллеле, когда сохраняется экспрессия гена дикого типа. Вторым вариантом является двойная мутация, когда белок дикого типа отсутствует. Гомозиготные мутации *C/EBPα* – это третий вариант аберрации, когда белок дикого типа также отсутствует. Мутации *CEBPA* ассоциируются с благоприятным прогнозом заболевания [151; 155; 158].

Гены *IDH1* и *IDH2* кодируют цитоплазматическую изоцитратдегидрогеназу-1 и митохондриальную изоцитратдегидрогеназу-2, метаболические ферменты, которые катализируют превращение альфа-кетоглутарата в онкометаболит, который может блокировать нормальную миелоидную дифференцировку. Мутация *IDH1* выявляется в 6-9% ОМЛ и в 8-16% случаев с НК. Чаще встречаются при ОМЛ с мутациями *NPM1* или *DNMT3A*. Мутация *IDH2* определяется в 8-12% случаев ОМЛ и в 19% с НК. Влияние мутации *IDH1* и *IDH2* на течение заболевания было противоречивым в различных исследованиях. В некоторых исследованиях сообщается, что мутация *IDH2* связана с лучшим прогнозом в отличие от мутации *IDH1* [151; 155; 158].

Ген *DNMT3A* кодирует метилтрансферазу – фермент, участвующий в метилировании ДНК. Мутация *DNMT3A* встречается в 20% случаев ОМЛ и в 30% с НК. Часто наблюдается в сочетании с мутациями *NPM1*, *FLT3*, *IDH1/2* и характеризуется неблагоприятным прогнозом заболевания [7; 19; 101; 122; 152; 159].

Ген *KIT* находится на длинном плече хромосомы 4. Рецептор локализован в клеточной мембране и в обычных условиях активируется связыванием с лигандом. Активация гена *KIT*, независимая от связывания лиганда, объясняется его мутацией. Детектируется у 6% и у 20% с *CBF* (core binding factor, основной связывающий фактор) (t[8;21] или inv[16]). Мутация в гене *KIT* не определяет прогностическую категорию ОМЛ, поскольку на саму мутацию возможно воздействовать дазатинибом и другими ингибиторами тирозинкиназ [7; 155].

TP53 кодирует опухолевый супрессор P53, который играет ключевую роль в регуляции деления и пролиферации клеток. Мутация *TP53* связана с неблагоприятным исходом и определяется в 12% случаев, чаще встречается у пациентов старше 60 лет и при КК [203; 215].

RUNX1 кодирует RUNX1, который является компонентом гетеродимерного комплекса транскрипционных факторов CBF. Мутация *RUNX1* обнаруживаются в 10% случаев ОМЛ. Она связана с возрастом ≥ 60 лет, мужским полом, а также с мутациями эпигенетических модификаторов (*ASXL1*, *IDH2*, *KMT2A*, *EZH2*) и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом [180; 181].

Мутации *ASXL1* присутствуют у 6-30% пациентов ОМЛ с НК и связаны с неблагоприятным прогнозом течения заболевания.

На сегодняшний день возможности молекулярно-генетических методов исследования позволяют выявлять одновременно широкий спектр мутаций различных генов специфичных для ОМЛ. Именно комплексный анализ генетических аномалий способствует определению прогностических особенностей течения заболевания, а также обеспечивает персонализированный подход лечения для каждого пациента.

1.4 Внедрение в диагностику возможностей применения секвенирования нового поколения

Диагноз ОМЛ остается одним из жизнеугрожающих состояний пациентов, которое может затронуть любую возрастную группу. Прогноз пациентов остается неблагоприятным, несмотря на новые методы лечения и персонализированный подход. Основой лечения является ХТ, терапия таргетными препаратами и алло-ТГСК.

В период до внедрения методики NGS в клиническую практику обнаружение наиболее частых реципрокных перестроек/транслокаций было возможным только с помощью метода ПЦР. Однако за последнее десятилетие произошла научная революция знаний о мутационном ландшафте ОМЛ, в основном благодаря достижениям молекулярно-генетических технологий – внедрение в практику методов секвенирования. Таким образом, на сегодняшний день, секвенирование нового поколения позволяет определять последовательность нуклеотидов в геномной ДНК или РНК (транскриптом) путем амплификации множества коротких участков генов за относительно короткий промежуток времени [148].

Благодаря лучшему пониманию патобиологии ОМЛ, достижениям в области геномного профилирования, меняются и подходы к современной терапии ОМЛ – внедрение принципа деинтенсификации индукционной терапии посредством использования новых таргетных препаратов в первой линии терапии, которые могут использоваться в условиях первой линии терапии, при рецидивирующем/резистентном (Р/Р) течение ОМЛ, а также в качестве поддерживающей терапии и приводить к лучшим результатам лечения.

К настоящему времени одобрены новые методы лечения в зависимости от иммунофенотипа заболевания – анти-CD33 гемтузумаб озогамицин (ГО), который может быть применим как для ОМЛ de novo, так и при рецидивирующем течении CD33-позитивного ОМЛ. Мидостаурин и гилтеритиниб утверждены для лечения FLT3-позитивных ОМЛ de novo и при Р/Р вариантах, а также анти-BCL-2

венетоклакс для лечения пожилых пациентов. Данные терапевтические подходы отражают новую реальность, в которой хромосомные aberrации (сбалансированные транслокации, инверсии, делеции, моносомии и трисомии) и молекулярно-генетические аномалии являются определяющими в выборе тактики лечения пациентов *de novo* и Р/Р ОМЛ.

В последние годы детектируются все большее разнообразие молекулярно-генетических аномалий, которые лежат в основе патогенеза ОМЛ. Особенно важен мутационный статус для оценки прогноза у пациентов с НК. С клинической точки зрения выделяют несколько важных аспектов – большинство генных мутаций являются прогностическими маркерами, для которых разрабатываются новые методы лечения таргетными препаратами.

С помощью NGS имеется возможность детекции различного типа мутаций, которые попадают в широко определенные группы комплементации и участвуют в лейкозогенезе.

Первая группа (класс I) включает мутации, которые активируют пути сигнальной трансдукции, приводящие к усилению пролиферации. Это, как правило, мутации, создающие активацию рецепторной тирозинкиназы *fms*, связанной с тирозинкиназой 3 (FLT3) или сигнальный путь RAS. В нормальном кроветворении эти пути строго контролируются. Мутации этого класса в основном приводят к конститутивной активации, тем самым делая клетку нечувствительной к контролю роста [55; 206].

Вторая группа (класс II) включает мутации, которые влияют на транскрипционные факторы или компоненты комплекса коактивации транскрипции, что приводит к нарушению дифференцировки. Яркими представителями являются повторяющиеся слияния генов, возникающие в результате $t(8;21)$, $inv(16)/t(16;16)$, $t(15;17)$, а также белок, связывающий энхансер ССААТ альфа (СЕВРА), MLL и нуклеофосмин (NPM).

Полагают также, что существует и третья группа комплементации, которая включает мутации, влияющие на эпигенетические пути – это мутации в генах *TET2*, *IDH1*, *IDH2* и *DNMT3A*.

Геномный ландшафт в диагностике ОМЛ играет значимую роль в патогенезе ОМЛ и подразделяются на несколько категорий в соответствии с их биологическими функциями. К ним относятся гены миелоидных транскрипционных факторов; гены-супрессоры опухолей, такие как, *TP53*, *WT1* и *PHF6*; сигнальные гены – *FLT3*, *KIT*, *PTPN11* и *RAS*; гены, связанные с метилированием ДНК – *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* и *IDH2*; модификаторы хроматина – *ASXL1*, *EZH2* и *KMT2A*; гены когезинового комплекса – *STAG1*, *STAG2*, *RAD21*, *SMC1A* и *SMC3*; и факторы сплайсинга – *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1* и *ZRSR2* [30; 79; 90; 132].

Важное прогностическое значение имеют такие генетические аномалии как, *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *TET2* и *ETV6*. Ранее уже было отмечено, что мутации в генах *FLT3*, *NPM1*, *DNMT3A*, *ASXL1* представляют собой наиболее часто встречаемые мутации среди пациентов с ОМЛ. В случае развития рецидива заболевания необходимо выполнение повторного обследования с использованием NGS панели, с целью выявления мутаций в генах *FLT3*-ITD/TKD и *IDH1*, *IDH2*, которые часто возникают в результате клональной эволюции заболевания, а также для своевременного назначения таргетной терапии [17].

Эпигенетические мутации в генах *ASXL1*, *TET2* и *DNMT3A* характеризуются неблагоприятным прогнозом заболевания. До сих пор не существует препаратов, направленного на них действия, но ряд исследований сообщает, что индукционная ХТ высокими дозами антрациклинов, в частности, даунорубицин улучшает показатели выживаемости у пациентов. Данной группе пациентов показано проведение алло-ТГСК в первой ПР заболевания [21; 91; 156].

Наиболее часто выявляемыми перестройками при ОМЛ являются $t(15;17)(q22;q12)$ – *PML-RARA*; $inv(16)(p13;q22)$ или $t(16;16)(p13;q22)$ – слияние *CBFB-MYH11*; $t(8;21)(q22;q22)$ – *RUNX1-RUNX1T1* и $t(9;11)(p22;q23)$. Частота их определения при ОМЛ: *RUNX1-RUNX1T1* (15,2%); *PML-RARA* (7,8%), *ZNF292-PNRC1* (4,1%), *NUP98-NSD1* (3,5%), *CBFB-MYH11* (3,0%), *KMT2A-MLLT4* (3,0%), *KMT2A-MLLT3* (2,6%), *KMT2A-MLLT10* (2,0%) и *DEK-NUP214* (1,3%) [78]. С внедрением методики NGS в клиническую практику, проводится множество

исследований с целью изучения прогностического потенциала различных мутаций, который в будущем способен оптимизировать подходы к лечению пациентов различных возрастных групп.

В 2016 г. Duployez et al. выполнили секвенирование с использованием панели из 40 генов у 215 пациентов с СBF ОМЛ (с $t(8;21)$ или $inv(16)$). Они обнаружили дополнительные мутации у >90% пациентов с СBF, у которых чаще всего мутировали гены, участвующие в передаче сигналов тирозинкиназы (*KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*). Было выявлено, что мутации в эпигенетических регуляторах (*ASXL1*, *EZH2*) чаще встречались у пациентов с $t(8;21)$, и в то же время они практически отсутствовали у пациентов с $inv(16)$. Мутации в генах *ASXL1* и *EZH2* коррелировали с неблагоприятным прогнозом, особенно в сочетании мутаций тирозинкиназных путей (*KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*). Данное исследование демонстрирует уникальный патогенез $t(8;21)$ и $inv(16)$, а также дополнительную прогностическую информацию, которую можно получить с помощью высокопроизводительного секвенирования [42].

Уже в 2021 г. Xiao Chen et al. ретроспективно изучили 204 пациента с ОМЛ de novo (исключен М3 вариант), которым был проведен NGS анализ. Высокую частоту встречаемости имели мутации в генах *NPM1*, *ASXL1*, *TET2*, *IDH2*, *CEBPA*, *FLT3-ITD* и *DNMT3A*, которая составила более 10%. Выявлен ряд мутаций, которые определялись одновременно *NPM1* с *IDH2*, *NPM1* с *TET2*, *TET2* с *ASXL1*, *IDH2* с *FLT3-ITD* и *DNMT3A* и наконец мутации *DNMT3A* и *FLT3-ITD* часто определялись с мутацией *NPM1*. В группе пациентов с НК, которая, как правило, относится к группе промежуточного прогноза, детектировались 8 мутированных генов: *NPM1*, *TET2*, *IDH2*, *CEBPA*, *ASXL1*, *FLT3-ITD*, *DNMT3A* и *IDH1*, что указывает на большую молекулярную гетерогенность среди данной группы пациентов. Мутации в генах *RUNX1*, *TP53*, *ASXL1*, *KIT*, *IDH2*, *TP53* и *NRAS* оказывали неблагоприятное влияние на длительность ОБ. Кроме того, мутация в гене *RUNX1* достоверно коррелировала с худшими показателями БРВ [133].

Секвенирование нового поколения – это ключевой метод диагностики, позволяющий неизменно расширять понимание патогенеза ОМЛ и клональной

эволюции заболевания. Мутации, обнаруженные с помощью молекулярного анализа в дебюте или на момент рецидива заболевания, имеют большое значение в прогностической стратификации и определении терапевтической тактики. На основании полученных результатов NGS, которые в ближайшем будущем будут применяться в повседневной клинической практике для принятия своевременных и сложных решений, возможен оптимальный подбор терапии для каждого последующего пациента с ОМЛ.

Таким образом, диагностика методом NGS должна обязательно принимать во внимание несколько важных аспектов:

- этапы проведения анализа NGS – в дебюте заболевания и перед каждой сменой линии ХТ;
- целевые гены, имеющие прогностический интерес, которые следует включить в панель диагностики и мониторинга заболевания;
- интерпретация результатов с учетом сочетанного влияния и функционального характера мутаций генов и их АН.

1.5 Современные подходы к выбору терапевтической тактики пациентов с острыми миелоидными лейкозами в зависимости от мутационного профиля заболевания

Современная терапия пациентов с ОМЛ достаточно строго стандартизирована. В целом, тактика ведения пациентов зависит от возраста и возможности перенести интенсивную терапию, в связи с этим, выделяют 2 основные группы: кандидаты и не кандидаты на агрессивную терапию.

В среднем 5-летняя ОВ больных пациентов моложе 60 лет по данным крупных исследовательских групп составляет 35-50%, в зависимости от молекулярно-генетических особенностей течения ОМЛ [4]. Традиционной схемой ХТ на сегодняшний день для данной группы пациентов остается программа ХТ

«7+3»: цитарабин в дозах 100-200 мг/м² в течение 7 последовательных дней в сочетании с антрациклинами с последующим проведением консолидирующей и поддерживающей терапии при необходимости [15].

Долгосрочная выживаемость в группе пациентов старше 60 лет обычно не превышает 5-7%, а 5-летняя ОВ пожилых пациентов – до 10-12% [4]. Важно подчеркнуть, что ОМЛ – болезнь пожилых людей, и выживаемость ОМЛ ухудшается с возрастом. Лечение пациентов старшей возрастной группы для врача-клинициста является сложной задачей, учитывая наличие сопутствующей патологии и высокий риск возникновения осложнений в процессе лечения. Пациентам с сохранным соматическим статусом (ECOG ≤ 2) целесообразно назначение индукционного курса ХТ по программе «7+3». Пациентам же с высоким индексом коморбидности (ECOG ≥ 2) рекомендована терапия низкой интенсивности – МДЦ либо ГА (азациитидин, децитабин) в комбинации с ингибитором BCL2 – венетоклаксом [50; 54; 200].

По мере совершенствования молекулярно-генетических методов удается лучше стратифицировать больных ОМЛ на прогностические группы риска и определиться с дальнейшей тактикой ведения пациентов. Следуя классификации ELN 2022, в зависимости от варианта выявляемых мутаций и хромосомных aberrаций, больные разделены на 3 группы риска: благоприятная, промежуточная и неблагоприятная [50].

Распределение больных на группы риска служит основанием для выбора терапевтической тактики и необходимостью планирования и выполнения алло-ТГСК [1]. Необходимо учитывать, что возраст старше 60 лет, соматический статус, высокий уровень лейкоцитов, наличие экстрамедуллярного поражения, предшествующий МДС оказывают негативное влияние на длительность БРВ и ОВ [50; 120; 135; 155; 175; 200]. Однако наиболее важным прогностическим фактором является цитогенетическая и молекулярно-генетическая характеристика патологического опухолевого клона [128]. Прогностическая группа представляет собой совокупность большого числа показателей, которые отражают статус болезни, в частности, хромосомные aberrации, а также наличие или отсутствие

тех или иных мутаций. Следовательно, пациентам моложе 60 лет с благоприятным и промежуточным риском, а также пациентам старше 60 лет, если они являются кандидатами для проведения интенсивной терапии в индукционном периоде, рекомендовано добавление ГО к стандартной ХТ «7+3» [56; 93]. Назначение ГО показано, прежде всего, больным из группы низкого и промежуточного риска, но у которых есть дополнительные маркеры, наличие которых, несмотря на благоприятный ELN вариант, может характеризоваться высокой частотой резистентности заболевания или развитием раннего рецидива.

Гемтузумаб озогамин – гуманизированное моноклональное анти-CD33-антитело, связанное с цитостатиком (calicheamicin). В многочисленных исследованиях было установлено достоверное улучшение длительности ОБ при включении данного препарата в схему терапии. Препарат назначается внутривенно в дозе 3 мг/м² в 1, 4 и 7-й день индукционного курса и в 1-й день каждого из двух консолидирующих курсов ХТ.

В работе, посвященной III фазе клинических испытаний, больные ОМЛ получали ГО [56]. Исследование проводилось в 26 гематологических центрах Франции. В исследование включены пациенты в возрасте 50-70 лет с ОМЛ *de novo*: 1-я группа (n=139) – контрольная, которой проведена терапия по стандартной схеме ХТ, и 2-я группа (n=139), получавшая стандартную ХТ и ГО. По результатам исследования значимо лучшая 2-летняя бессобытийная выживаемость (БСВ) (p=0,0368) и 2-летняя ОБ (p=0,0003) наблюдались в группе, получавшей ГО по сравнению с контрольной группой [56; 150].

Согласно суммарным данным, для групп промежуточного и неблагоприятного риска установлено, что проведение алло-ТГСК в первой ПР имеет существенное преимущество [1], однако ее выполнение у больных с благоприятным прогнозом не ведет к улучшению клинических исходов.

Особый интерес представляет группа пациентов с мутациями гена *FLT3*, которая, согласно молекулярно-генетической классификации, ранее рассматривалась как промежуточная и неблагоприятная группы в зависимости от уровней АН и наличия дополнительных мутаций. На сегодняшний день наличие

мутаций в гене *FLT3* принято относить в группу промежуточного риска. Пациентам с наличием мутаций в гене *FLT3* необходимо выполнение алло-ТГСК в первой ПР (при удовлетворительном соматическом состоянии) [1; 34]. Наличие данной мутации ассоциировано с меньшей продолжительностью жизни и высокой частотой рецидивов [6; 28; 32; 41; 68; 70; 204].

Пациентам с мутациями гена *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD* целесообразно, в дополнение к стандартной ХТ, назначать специфический ингибитор тирозинкиназ – мидостаурин (50 мг 2 раза в день, внутрь на 8-21 дни терапии) [44; 105; 119]. Мидостаурин обладает способностью подавлять функцию нескольких киназ, включая *FLT3*. В крупном клиническом исследовании III фазы RATIFY проанализирована достаточно большая выборка пациентов в возрасте от 18 до 59 лет, у которых был диагностирован ОМЛ *de novo* с мутациями в гене *FLT3*. Пациенты получали стандартную индукционную ХТ «7+3» и высокие дозы цитарабина в качестве консолидации с добавлением мидостаурина или плацебо. Мидостаурин получали 360 пациентов, плацебо назначали в 357 случаях. По результатам исследования, 4-х летняя ОВ была значительно выше в группе, получавших мидостаурин, чем в группе плацебо – 51,4% и 44,3%, соответственно ($p=0,009$), как и БСВ ($p=0,002$) [119]. Наиболее частыми нежелательными явлениями 3-4 степени (мидостаурин по сравнению с плацебо) являлись фебрильная нейтропения (81% и 82%), инфекции (40% и 38%) и диарея (15% и 16%).

Для Р/Р вариантов ОМЛ зарегистрирован гилтеритиниб – ингибитор *FLT3* и *AXL*-тирозинкиназ, который является пероральным препаратом и назначается ежедневно в дозе 120 мг. В крупном многоцентровом рандомизированном исследовании ADMIRAL были проанализированы данные о 371 случае Р/Р *FLT3*⁺ ОМЛ. Из них 247 пациентов получали гилтеритиниб в монорежиме, и 124 пациента – полихимиотерапию. Медиана длительности ОВ в группе, получавших гилтеритиниб составила 9,3 мес., в группе пациентов с полихимиотерапией – 5,6 мес., ПР с полным или частичным восстановлением гемопоэза достигнута соответственно в 34% и 15,3% случаев [82].

В настоящее время продолжается изучение большинства исследований, которые направлены на изучение эффективности и безопасного применения ингибиторов FLT3. В качестве первой линии терапии ингибитор I поколения – сорафениб (исследование SORAML) демонстрирует обнадеживающие результаты в отношении длительности ОБ. Сорафениб (SORMAIN фаза II) и мидостаурин (RADIUS фаза II) исследуется для проведения поддерживающей терапии после выполнения Алло-ТГСК. Изучается эффективность применения ингибитора FLT3 II поколения – квизартиниба в монорежиме в исследовании QuANTUM-R (фаза III) для P/P вариантов ОМЛ [119; 169; 170; 187].

Благодаря лучшему пониманию механизмов патогенеза заболевания и изучению молекулярно-генетических особенностей ОМЛ, появились новые возможности индивидуализации и оптимизации специфической ХТ. Внедрение таргетной терапии, мишенями которой являются продукты мутантных генов, привело к разработке новых терапевтических средств для данной группы пациентов [14; 39; 41; 46; 57; 69; 138; 141; 142; 143; 193].

Несмотря на совершенствование сопровождающей терапии при ОМЛ, показатели 5-летней выживаемости среди пожилых пациентов остаются низкими – 25% [186]. Интенсификация специфической ХТ не представляется возможной, в связи с высокой токсичностью и плохой переносимостью препаратов [185]. Относительно недавно был одобрен венетоклакс – (АВТ-199), ВНЗ-миметик и селективный ингибитор BCL-2, который способствует предотвращению апоптозу. Препарат предназначен для лечения возрастных пациентов, которые не являются кандидатами для интенсивной индукционной ХТ. Предложены иные схемы терапии в сочетании с ГА или МДЦ. Принцип действия венетоклакса основан на селективном ингибировании антиапоптозного белка BCL-2, который, в свою очередь, способствует выживанию опухолевых клеток [110; 200]. В качестве серьезного побочного эффекта на фоне приема этого препарата у пациентов может развиваться синдром лизиса опухоли. Поэтому эскалация дозы венетоклакса целесообразна в дебюте заболевания. Начальная рекомендованная доза для пациентов с ОМЛ составляет 100 мг в день 1; 200 мг в день 2; 400 мг

в день 3 и 4 и так далее (для пациентов, получающих азацитидин или децитабин), или 600 мг (для пациентов получавших МДЦ).

Представлены перспективные результаты многочисленных клинических исследований по изучению эффективности применения венетоклакса у пожилых пациентов с ОМЛ [60; 140; 144; 182; 183]. В многоцентровом плацебо-контролируемом исследовании VIALE-A III фазы была изучена эффективность и безопасность применения венетоклакса в комбинации с азацитидином, в сравнении с назначением плацебо и азацитидина. Медиана ОВ в группе венетоклакс/азацитидин составила 14,7 мес. по сравнению с 9,6 мес. в группе плацебо/азацитидин ($p < 0,001$). Частота ПР была достоверно выше в группе, получавших венетоклакс/азацитидин, в сравнении с пациентами, получавшими плацебо/азацитидин (36,7% против 17,9%, $p < 0,001$) [142].

Мутации *IDH1* и *IDH2* приводят к нарушению эпигенетической регуляции дифференцировки соматических клеток. Они преимущественно встречается среди пациентов с НК. Прогностическое значение мутаций *IDH1/IDH2* не совсем ясно. В некоторых сообщениях предполагается, что мутации *IDH2* связаны с лучшими исходами, в то время как мутации *IDH1* приводят к худшим результатам [94].

Ивосидениб – пероральный препарат, таргетный ингибитор мутированного фермента IDH1. Ивосидениб зарегистрирован в США в качестве монотерапии для лечения взрослых пациентов с P/P формой ОМЛ с мутацией *IDH1*, а также для лечения взрослых пациентов с ОМЛ *de novo* с мутацией *IDH1* в возрасте 75 лет.

Энасидениб – пероральный препарат, таргетный ингибитор мутированного фермента IDH2. Препарат одобрен FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США) для лечения взрослых пациентов с P/P вариантов ОМЛ с мутацией в гене *IDH2*.

В международном многоцентровом клиническом исследовании III фазы AGILE комбинация азацитидин/ивосиденибом (А/И) совсем недавно стала альтернативным вариантом низкоинтенсивного лечения [130]. В исследование включены пациенты с ОМЛ с мутацией *IDH1*, не подходящие для интенсивной

ХТ, получавшие азацитидин/ивосидениб и азацитидин/плацебо [108]. Медиана БСВ составила 12,4 мес. и была значительно выше в группе А/И по сравнению с группой А/П – 37% и 12% соответственно. Медиана ОВ составила 24 мес. для А/И и 7,9 мес. для А/П. Частота ПР была высокой – 53% в группе А/И по сравнению с 18% в группе А/П, также как и длительность ремиссии 22,1 мес. в группе А/И и 9,2 мес. – А/П [124]. Несмотря на высокую частоту побочного эффекта в виде синдрома дифференцировки на фоне приема ивосидениба – 20%, частота цитопений по сравнению с азацитидин/венетоклакс наблюдалась значительно меньше.

Комбинация азацитидин/энаседениб (А/Э) также изучалась у пациентов с Р/Р формой ОМЛ с мутациями *IDH2* для возрастных групп пациентов. Во II фазе исследования пациенты были рандомизированы на 2 группы: А/Э и азацитидин в монорежиме. Средний возраст пациентов составлял 75 лет, при этом частота ПР составляла 63% в группе А/Э по сравнению с 30% в группе азацитидин. В ходе 2-летнего анализа медиана БСВ при использовании А/Э составила 15,7 мес. по сравнению с 11,9 мес. в группе азацитидина, а ОВ составила 22 мес. в группе А/Э по сравнению с 18,6 мес. в группе азацитидин [61; 64].

На сегодняшний день уже зарегистрирован препарат для лечения пациентов с вторичным или возникшим *de novo* ОМЛ с миелодисплазией – СРХ-351 (Виксеос). Этот препарат представляет собой комбинацию цитарабина и даунорубицина в молекулярном соотношении 5:1 внутри липидной оболочки, который был разработан с целью синергетического действия цитостатического действия. В клиническом исследовании III фазы было продемонстрировано значимое увеличение частоты ПР (37,3% против 25,6% при назначении программы ХТ «7+3» ($p=0,04$) и увеличение медианы ОВ (соответственно, 9,56 и 5,95 мес., $p=0,005$).

Известно, что наличие мутации *TP53* при ОМЛ определяет неблагоприятный прогноз и в среднем выявляется в 9,7%. К сожалению, на сегодняшний день не доказали своей эффективности и безопасного

применения препараты, обладающие терапевтическим воздействием на мутацию TP53. Многие из них находятся в разработке.

Магрוליмаб (анти CD-47) – моноклональное антитело, ингибитор мутации TP53, который не обладает самостоятельной терапевтической активностью в монорежиме и был применен в комбинации с венетоклаксом и азацитидином. Однако в III фазе исследования ENHANCE изучена бесперспективность и высокий риск смертности, преимущественно от инфекционных осложнений и дыхательной недостаточности.

Эпренетапопт – представляет собой низкомолекулярный ингибитор TP53. Однако у пациентов с ОМЛ ПР составила лишь в 17%. Медиана ОВ составила 13,9 мес.

Ингибиторы менина представляют собой новые таргетные препараты, которые в настоящее время находятся в клинической разработке, применяемые для лечения Р/Р форм ОМЛ с реаранжировкой гена лизинметилтрансферазы 2A (*KMT2Ar*) или мутацией гена нуклеофосмина 1 (*NPM1*).

Менин – это ядерный белок, который регулирует экспрессию генов посредством взаимодействия с различными факторами транскрипции и регуляторами хроматина. Менин связывается с *KMT2A*, который вместе с белками-партнерами, образуя комплекс *KMT2A* и регулирует экспрессию генов. При *NPM1* взаимодействие *KMT2A* и менина приводит к НОХ- и MEIS1-опосредованной лейкозогенной транскрипции. *NPM1* имеют сверхэкспрессию НОХА9 и его кофактора MEIS1, что приводит к лейкозогенезу через белок, связывающий *CEBPa* и *KMT2A*. *KMT2A* действует как регулятор транскрипции, который связывается с менином и затем регулирует НОХА9. Следовательно, взаимодействие менин-*KMT2A* может быть терапевтической опцией и при мутации в гене *NPM1* [118; 196; 211].

Ингибиторы менина имеют другой механизм действия в отличие от таргетных методов лечения. Вместо того, чтобы блокировать активность дисфункциональных белков, он в первую очередь блокирует экспрессию генов, на которые влияют мутации в генах *KMT2A* или *NPM1*. Когда комплекс менин-

KMT2A не может связываться с хроматином, клетки, которые существовали как поврежденные стволовые клетки, либо превращаются обратно в нормальные клетки, либо умирают [11; 118; 212].

Таким образом, ингибиторы менина оказывают терапевтический эффект, предотвращая связывание белка менина и комплекса *KMT2A*, способствуя дифференцировке лейкемических незрелых клеток [213].

Ревумениб и зофтомениб являются ингибиторами менина, нарушающими одно и то же взаимодействие менин-*KMT2A*. Нарушение данного комплекса приводит к ингибированию транскрипции и апоптоза опухолевых клеток, не затрагивая нормальный гемопоэз [213].

Первоначальное исследование фазы I/II ревумениба в клиническом исследовании AUGMENT-101 проводилось для P/P форм ОМЛ с *NPM1* или *KMT2Ar*. Основной целью I фазы было определение максимально переносимой и рекомендуемой дозы. Целью фазы II была оценка безопасности и эффективности исследуемого препарата. Общая частота ответа включая ПР с неполным и полным гематологическим восстановлением составила 53%. Общая частота ответа составила 59% и 36% у пациентов с P/P *KMT2Ar* и *NPM1* соответственно. Среднее время достижения ПР составило 1,9 мес. (0,9-4,9 месяца) [176].

Исследование фазы I/II зофтомениба (КОМЕТ-001) также проводится в отношении P/P форм ОМЛ с *KMT2Ar* и *NPM1*, в котором у пациентов оценивается переносимость и эффективность [149].

Синдром дифференцировки является серьезным нежелательным явлением, который наблюдается в случае применения ингибиторов менина. Как правило, данное явление вызвано изменениями цитокинов, связанными с гематопоетической дифференцировкой, и может включать лихорадку, артралгии, лейкоцитоз, плевральный или перикардиальный выпот, а также дыхательную или почечную недостаточность в некоторых тяжелых случаях. Синдром дифференцировки возникал в среднем через 18 дней (5-41 день) от начала терапии ингибиторами менина [52; 189]. Это наблюдалось у 16% пациентов, получавших терапию ревуменибом [149; 205].

Учитывая высокую эффективность применения ингибиторов менина в монорежиме, проводится ряд исследований по изучению эффективности применения их в сочетании с другими химиопрепаратами. Исследователи полагают, что именно комбинированное применение препаратов обладает синергическим действием на гибель опухолевых клеток.

Так, в настоящее время проводится исследование КОМЕТ-007, в котором ожидается оценка безопасности и эффективности зофтомениба в комбинации с азацитидином и венетоклаксом или в сочетании с режимом «7+3» для пациентов с ОМЛ *de novo* или Р/Р *NPM1* и *KMT2Ar* менин-зависимым ОМЛ [12].

Исследование КОМЕТ-008 предоставляет возможностью повышения дозы и определения безопасности, переносимости и предварительной эффективности зофтомениба в сочетании со стандартными схемами лечения для лечения пациентов с *NPM1* либо с *KMT2Ar* Р/Р ОМЛ [13]. Продолжается набор пациентов в исследование AUGMENT-102, в котором оценивается эффективность применения ревумениба в комбинации с азацитидином и венетоклаксом, а также флударабином и цитарабином.

Ранние полученные данные о новых терапевтических подходах с использованием ингибиторов менина при Р/Р ОМЛ выявили весьма обнадеживающие результаты. Умеренная токсичность предполагает использование их в комбинации как низкоинтенсивными программами лечения, так и со стандартными интенсивными программами химиотерапии.

Учитывая генетическую гетерогенность заболевания, необходимо продолжать исследование прогностических групп пациентов для понимания клинических особенностей заболевания и прогнозирования его исходов. В связи с активным внедрением молекулярно-генетических методов диагностики в повседневную клиническую практику первоочередным выходит разработка новых препаратов направленного действия на конкретные молекулярные мишени. Это позволяет индивидуализировать терапию, а также улучшить качество жизни пациентов. Современная таргетная терапия пациентов с ОМЛ представлена на Рисунке 2.

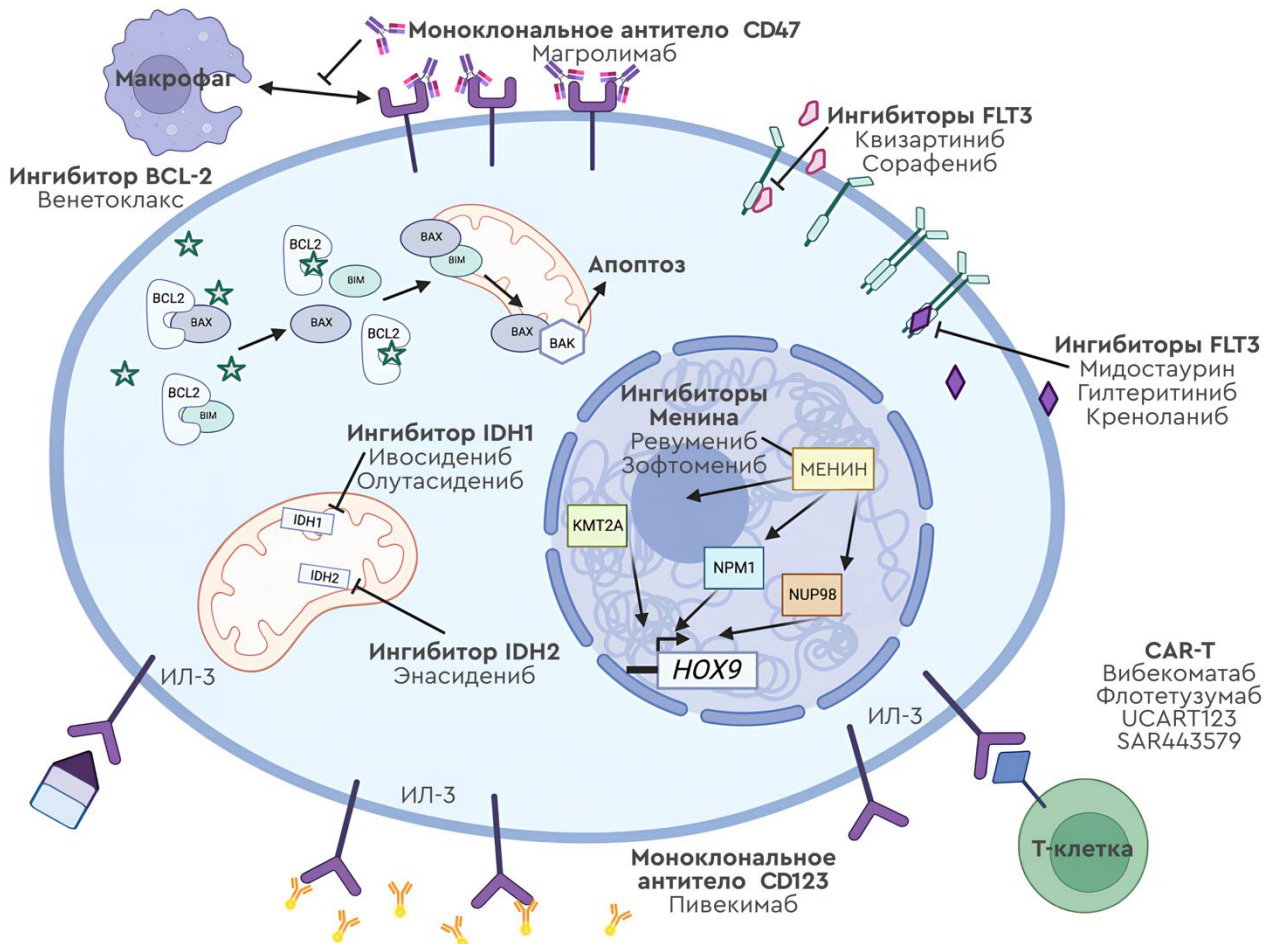


Рисунок 2 – Таргетная терапия пациентов с острым миелоидным лейкозом

1.6 Место аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у больных острым миелоидным лейкозом в эру таргетной терапии

Потенциально эффективным методом терапии при острых миелоидных лейкозах остается выполнение алло-ТГСК. Терапевтический эффект, который заключается не только воздействием на опухолевые клетки цитостатических препаратов, но и иммунологической реакцией трансплантат против лейкоза. Проведение алло-ТГСК зачастую имеет множество ограничений: возраст пациента, высокий индекс коморбидности, обусловленный сопутствующими заболеваниями, а также наличие или отсутствие HLA (Human Leukocyte Antigens) – совместимого донора. Решающим показанием в проведении алло-ТГСК

являются цитогенетические и генетические факторы прогноза [96]. Данная опция лечения обладает наиболее высокой эффективностью при выполнении в период 1-й (реже 2-й) ПР [174].

Группа российских экспертов полагает, что алло-ТГСК показана всем пациентам моложе 60 лет (с учетом индекса коморбидности) в 1-й ПР, которым не выполнялось молекулярно-генетические исследования.

Группа исследователей ELN представила обновленные рекомендации по диагностике и классификации рисков ОМЛ на основе генетических факторов риска. Согласно множеству проведенных исследований, они полагают, что проведение алло-ТГСК необходимо для пациентов с промежуточной и неблагоприятной группой риска. Для пациентов с благоприятной группой риска алло-ТГСК не показана, за исключением наличия позитивного МОБ-статуса. Также целесообразно проведение алло-ТГСК у пациентов с рецидивирующим течением заболевания [50].

Длительность 3-х летней БРВ и ОВ после проведения алло-ТГСК между благоприятной, промежуточной и неблагоприятной группами значительно различалась ($p < 0,001$) и составила: в группе БРВ 58, 47 и 30% соответственно; и в группе ОВ 65, 61 и 48% соответственно. Лучшие результаты наблюдались у пациентов, трансплантированных в первой ремиссии заболевания, а также среди пациентов моложе 60 лет.

Интересные данные были получены в зависимости от мутационного статуса пациентов. В группе благоприятного риска ELN 2022 пациенты с CBF, как правило, имели более длительную БРВ, чем пациенты с мутациями *CEBPA bZIP* или *NPM1*, но не отличались длительностью ОВ. Кроме того, в группе промежуточного риска не было выявлено существенных различий между пациентами с ОМЛ с высокой или низкой АН *FLT3-ITD*, *t(9;11)* или другими хромосомными аномалиями. Напротив, у пациентов в группе неблагоприятного риска результаты существенно различались в зависимости от наличия КК (3-х летняя БРВ 17% и ОВ 30%), других неблагоприятных хромосомных aberrаций (3-х

летняя БРВ 32% и ОВ 54%), а также мутаций неблагоприятного риска, а именно *ASXL1*, *RUNX1* или *TP53* (3-х летняя БРВ 42% и ОВ 58%).

Пациенты с ОМЛ и мутациями в гене *FLT3* традиционно рассматриваются как группа с крайне неблагоприятным прогнозом. Как уже ранее было указано, различают два типа мутаций: внутренняя тандемная дупликация (*FLT3-ITD*) и точечная мутация в тирозинкиназном домене (*FLT3-TKD*). Мутация *FLT3-ITD*⁺ в отличие от *FLT3-TKD*⁺ ассоциирована с кратковременными ремиссиями, резистентным течением и рецидивами заболевания [60]. Учитывая клиническое значение данной мутации, которая ассоциирована с меньшей продолжительностью жизни, такая группа больных заслуживает особого внимания и требует индивидуального подхода.

Стандартная ХТ не всегда эффективна в плане длительности и глубины ответа. Интенсификация специфической ХТ порой ограничивается серьезными осложнениями. Оптимальной опцией данной группы пациентов можно рассматривать включение таргетных препаратов – ингибиторов тирозинкиназ, как в монорежиме, так и в комбинациях с ХТ, которые являются эффективными и менее токсичными, в особенности для группы возрастных пациентов [141; 142; 162; 186]. В плане повышения эффективности лечения следует рассматривать такую опцию, как проведение алло-ТГСК в качестве консолидации первой ремиссии, если отсутствуют противопоказания [1; 60; 173]. Однако алло-ТГСК не удастся выполнять всем пациентам, в частности, в связи с отсутствием НЛА-идентичного донора, либо высоким риском развития реакции «трансплантат против хозяина», а также сопутствующими заболеваниями у пациентов.

Мутации в гене *FLT3* оказывают неблагоприятное влияние на клинические исходы даже после проведения алло-ТГСК у пациентов ОМЛ в первой ПР. При этом после проведения алло-ТГСК сохраняется высокая вероятность развития рецидивов заболевания и сокращение сроков длительности ОВ.

Центр международных исследований крови и ТГСК – CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) провел крупное исследование с целью изучения эффективности проведения ТГСК у больных ОМЛ с мутациями

в гене *FLT3*. Всего в анализ было включено 511 пациентов из 48 центров, наблюдавшихся в период с 2008-2011 гг. Медиана наблюдения составила 37 месяцев (12-65 мес.). Мутация в гене *FLT3* была выявлена у 158 из 511 пациентов (31% случаев). Полученные результаты продемонстрировали, что пациенты с мутациями в гене *FLT3* имеют более высокий риск рецидива и меньшие сроки выживаемости, была отмечена принципиальная разница в длительности БРВ и ОВ по сравнению с группой пациентов, которым была проведена алло-ТГСК [53].

В рандомизированном исследовании ОМЛ 2003 (Randomized Study Alliance Leukemia AML 2003) было проанализировано влияние алло-ТГСК у больных с мутациями гена *FLT3-ITD*, была выявлена у 209 пациентов, стратифицированных на группы риска в зависимости от величины АН: *FLT3-ITD*^{низ} (n=147) и *FLT3-ITD*^{выс} (n=47). Пациенты с *FLT3-ITD*^{выс} имели худшие показатели ОВ (p<0,001) и БРВ (p=0,001) по сравнению с *FLT3-ITD*^{низ}. Алло-ТГСК была проведена 61 пациенту. По результатам исследования длительность ОВ (p=0,004) и БРВ (p=0,02) была значимо лучше у пациентов с *FLT3-ITD*^{выс}, получивших алло-ТГСК в качестве консолидирующего лечения по сравнению с пациентами, которым алло-ТГСК не проводилась [86].

Противоречивые данные были получены в исследовании Schlenk et al., где были проанализированы результаты лечения 323 пациентов. Лучшие показатели выживаемости были отмечены после проведения алло-ТГСК в группе пациентов *FLT3-ITD*^{выс} [9]. Pratorcorona et al. в своей работе отметили преимущество выполнения алло-ТГСК только среди пациентов *FLT3-ITD*^{выс} (независимо от мутации в гене *NPM1*) [67; 131]. Vornhauser et al. и G. Laboure et al. также в своих исследованиях сообщили об успешном применении алло-ТГСК у больных с мутацией в гене *FLT3-ITD* [100; 147].

В связи с лучшей и более детализированной диагностикой ОМЛ, которая позволяет правильно стратифицировать пациентов на группы риска, а также своевременно проводить алло-ТГСК, результаты лечения пациентов с ОМЛ значительно улучшились. Внедрение таргетной терапии в рутинную клиническую

практику положительно повлияло на результаты лечения пациентов с ОМЛ. Однако, несмотря на попытки улучшения подходов к лечению пациентов, рецидив заболевания при ОМЛ по-прежнему остается актуальной и обсуждаемой проблемой. Проводится множество клинических исследований, направленных на изучение новых таргетных препаратов, с целью создания унифицированного и безопасного алгоритма действий.

Глава 2

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ
И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 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.

В исследование вошли пациенты с впервые диагностированным ОМЛ, а также с трансформацией из МДС в ОМЛ, которые проходили лечение с 2007 по 2024 гг. 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.

Распределение больных по возрастной категории в дебюте заболевания: пациенты моложе 60 лет составили 190 (61%); старше 60 лет – 121 (39%) пациентов.

В соответствии с ФАБ классификацией ОМЛ распределение пациентов на момент диагностики по морфологическим вариантам было следующим: М0 – 12 (3,9%) пациентов; М1 – 38 (12,2%); М2 – 72 (23,1%); М3 – 27 (8,8%); М4 – 75 (24,1%); М5 – 34 (11%); М6 – 2 (0,6%); неуточненный вариант (НВ) – 21 (6,8%), ОМЛ из МДС – 22 (7%), ОМЛ из МПН – 8 (2,5%).

Распределение больных в зависимости от цитогенетической группы: группа с благоприятным прогнозом – 24/311 (7,6%); промежуточная – 233/311 (75%); с неблагоприятным прогнозом – 46/311 (14,8%); у 8/311 пациентов (2,5%) митозы не были получены. Большинство пациентов было отнесено к промежуточной прогностической группе, в основном, с НК. Комплексный кариотип определен у 31/311 (10%) пациента.

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%).

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%).

ПЦР исследование проводилось 311 пациентам ОМЛ. Специфические мутации генов и химерные гены обнаруживались: *FLT3-ITD* – у 121 больного (38,9%); из них *FLT3-ITD*^{низ} – у 50 (16%), *FLT3-ITD*^{выс} – 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%).

Для дальнейшего анализа частота встречаемости мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* установлена в группе пациентов (N=199) с ОМЛ *de novo* или у которых наличие данных мутаций было определено до начала лечения. Кроме того, у 91/280 пациента определена величина АН мутации в гене *FLT3-ITD*, которая стратифицировала пациентов на подгруппы в зависимости от величины АН (низкая $<0,5$ и высокая $\geq 0,5$).

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 (даунорубицина в дозе 60-90 мг/м², идарубицина в дозе 12 мг/м² или митоксантрона 10 мг/м²) [15].

Указанную схему ХТ «7+3» получили 215 (69,1%) пациентов. Больные старшей возрастной пациенты получали ХТ низкой интенсивности (n=53; 41,4%).

К нестандартным индукционным режимам были отнесены курсы ХТ с дозами цитостатиков меньше стандартно рекомендованных [48]:

- редуцированные дозы цитостатиков и антрациклинов: «5+2», «5+3»;
- малые дозы цитарабина (МДЦ);
- децитабин;
- азациитидин;
- гилтеритиниб;
- гидроксикарбамид и другие.

Пациенты, у которых был диагностирован ОПЛ (n=9), получали в фазе индукции лечение по схеме «7+3» +АТРА, либо индукционная терапия проводилась по протоколу AIDA (n=6).

При высоком уровне лейкоцитов (более $100 \times 10^9/\text{л}$) дополнительно назначали процедуры лейкоцитафереза (n=7). ХТ не проводилась 11 пациентам, они получали только симптоматическую терапию. Один пациент отказался от проведения ХТ.

Пациентам, достигшим ПР, проводили консолидирующий этап терапии. На данном этапе применялись стандартные режимы ХТ «7+3», высокодозные консолидирующие режимы – цитарабин от 1 до 3 г/м², либо низкоинтенсивные режимы.

Общая характеристика исследуемой группы пациентов до начала терапии представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Общая характеристика пациентов

Параметр	n (%)
Возраст	
Медиана, лет	55
Моложе 60 лет	190 (61%)
Старше 60 лет	121 (39%)

Продолжение таблицы 3

Параметр	n (%)
Пол	
Мужчины	133 (43%)
Женщины	178 (57%)
ФАБ классификация	
M0	12 (3,9%)
M1	38 (12,2%)
M2	72 (23,1%)
M3	27 (8,8%)
M4	75 (24,1%)
M5	34 (11%)
M6	2 (0,6%)
Неуточненный вариант	21 (6,8%)
ОМЛ из МДС	22 (7%)
ОМЛ из МПН	8 (2,5%)
Цитогенетическая группа риска	
Благоприятная	24 (7,6%)
Промежуточная	233 (75%)
Неблагоприятная	46 (14,8%)
Комплексный кариотип	31 (10%)
Нет митозов	8 (2,5%)
FISH исследование	
t(15;17)(q22;q11-q21)/ <i>PML-RARA</i>	7 (2,2%)
inv(16)(p13.1q22); t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i>	5 (1,6%)
перестройка <i>KMT2A</i> -гена	3 (0,9%)
t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1:: RUNX1T1</i>	2 (0,6%)
моносомия -7	2 (0,6%)
трисомия +8	2 (0,6%)
del 17p13.1/ <i>TP53</i>	1 (0,3%)
ПЦР исследование	
<i>FLT3-ITD</i>	121 (38,9%)
<i>FLT3-ITD</i> ^{низ} (<0,5)	50 (16%)

Продолжение таблицы 3

Параметр	n (%)
<i>FLT3-ITD</i> ^{BLIC} ($\geq 0,5$)	41 (13,1%)
<i>FLT3-TKD</i>	29 (9,3%)
<i>NPM1</i>	62 (19,9%)
<i>CBFB-MYH11</i> /inv 16; t(16;16)	8 (2,5%)
<i>PML-RARA</i> /t(15;17)	15 (4,8%)
<i>RUNX1: RUNX1T1</i> /t(8;21)	9 (2,9%)
<i>C-KIT</i> (D816V)	1 (0,3%)
NGS исследование	33 (10%)
ELN 2022 риски	
Благоприятный	10 (32,2%)
Промежуточный	3 (9,7%)
Неблагоприятный	20 (58,1%)
Алло-ТГСК	45 (14,4%)

Данные клинического исследования периферической крови на момент установления диагноза представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Данные клинического исследования периферической крови на момент установления диагноза

Показатели клинического анализа крови и миелограммы	Медиана (интервал)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	26,0 (0,6-400,0)
Гемоглобин, г/л	87 (10-145)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	60 (1-688)
Бластные формы в костном мозге, %	62 (20-100)

Учитывая возраст, характер и течение заболевания, проводилась алло-ТГСК. Аллогенная ТГСК выполнялась при наличии HLA-совместимого (родственного или неродственного) донора или от гаплоидентичного донора (Таблица 5). Частота достижения ПР при ХТ у пациентов в зависимости от возрастной категории представлена в Таблице 6.

Таблица 5 – Характеристика проводимой трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

Алло-ТГСК в зависимости от мутационного статуса		
<i>FLT3</i> ⁻	<i>FLT3</i> -ITD ⁺	<i>FLT3</i> -TKD ⁺
n=19	n=23	n=2

Таблица 6 – Частота достижения полной ремиссии при химиотерапии у пациентов моложе и старше 60 лет

Возрастная категория	Мутационный статус гена <i>FLT3</i>		
	<i>FLT3</i> ⁻	<i>FLT3</i> -ITD ⁺	<i>FLT3</i> -TKD ⁺
Моложе 60 лет	89/190	47/190	9/190
Старше 60 лет	61/121	16/121	4/121

2.2 Методы исследования

2.2.1 Клинические и инструментальные методы исследования

Обязательными исследованиями при установлении диагноза ОМЛ были:

- сбор жалоб, анамнеза, оценка объективного статуса больного;
- клинический анализ крови с подсчетом лейкоцитарной формулы и определением уровня тромбоцитов;
- цитохимическое исследование периферической крови/костного мозга;
- цитофлуориметрическое исследование периферической крови/костного мозга бластных клеток;
- цитогенетическое исследование клеток костного мозга/периферической крови;
- FISH-исследование клеток костного мозга;
- молекулярно-генетическое исследование периферической крови на наличие мутаций в гене *FLT3*, *NPM1*, *inv 16*; *t(16;16)/CBFb-MYH11*, *t(15;17)/PML-RARA*; *t(8;21)/RUNX1::RUNX1T1*;

- количественная ПЦР для исследования уровня АН мутантного гена *FLT3-ITD*;
- NGS исследование костного мозга.

2.2.2 Цитогенетическое исследование

Кариотипирование костного мозга проводилось по стандартной методике. После оценки клеточности полученного пунктата костного мозга проводилось культивирование в течение 24 часов при температуре 37 °С с использованием стандартных реактивов (среда RPMI, эмбриональная телячья сыворотка, глутамин), с добавлением колцемида. После фиксации клеточную суспензию раскапывали на подготовленные стекла и проводили G-окраску полученных препаратов. В каждом исследовании было проанализировано не менее 20 метафазных пластинок.

2.2.3 Метод качественного определения мутаций гена *FLT3*

Выделение геномной ДНК из периферической крови или костного мозга проводили с помощью метода хлороформной экстракции. Для гемолиза эритроцитов добавляли к 3 мл крови (1 мл костного мозга) 12 мл NH₄Cl (pH 6.97, 0,83%) и инкубировали 20 минут при 4 °С. Осаждали лейкоциты, отбирали 10-20 мкл и ресуспендировали в 400 мкл лизирующего буфера, инкубировали 10 минут при 65 °С. Добавляли 600 мкл хлороформа, после центрифугирования переносили фазу, содержащую ДНК, в преципитирующий буфер, осаждали и растворяли в 1,2 М NaCl. Осаждали ДНК в 96% С₂Н₅ОН при -20 °С и отмывали в 70% растворе С₂Н₅ОН, высушивали и растворяли в 100 мкл Н₂О. Выделение РНК проводили с помощью наборов Ампли Сенс Лейкоз Квант (Интерлабсервис, Россия).

Праймеры для проведения ПЦР были подобраны с помощью программы Vector NTI (Таблица 7).

Таблица 7 – Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых для амплификации фрагментов генов *FLT3*

Название праймера	Последовательность 5' → 3'
<i>FLT3</i> -ITD_F	GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC
<i>FLT3</i> -ITD_R	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC
<i>FLT3</i> -TKD_F	TGTGTTACACAGAGACCTGG
<i>FLT3</i> -TKD_R	ATTGCCCTGACAACATA

Анализ мутаций проводили методом ПЦР с последующим анализом продуктов амплификации после инкубации с ферментами-рестриктазами и электрофореза в геле полиакриламида либо секвенирования полученных ампликонов. Размер продукта амплификации нормального аллеля гена *FLT3* (экзон 14-15) составляет 329 п.н. Длина ампликона мутантного аллеля увеличена на размер участка инсерции, который может составить от 3 до 400 п.н. (Рисунок 3).

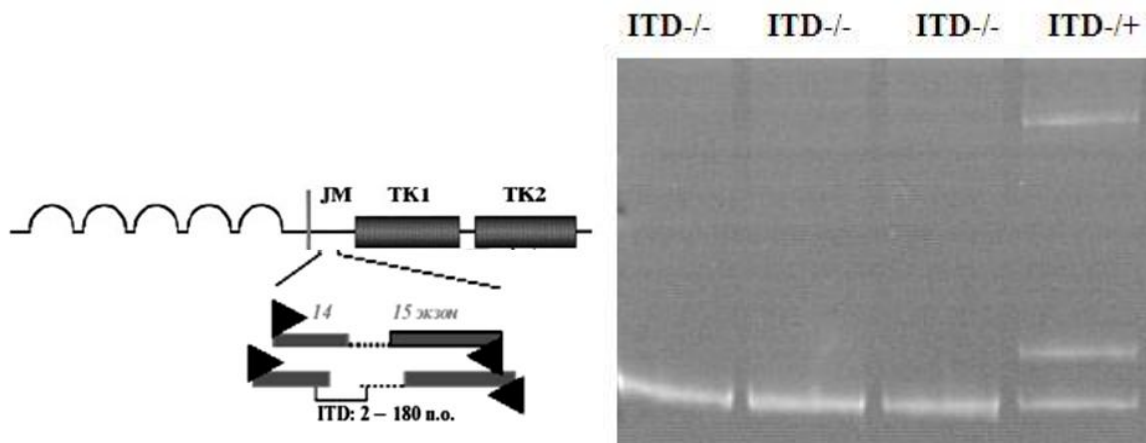


Рисунок 3 – Электрофореграмма, иллюстрирующая анализ мутации *FLT3*-ITD. Показан вид ампликонов при «диком» типе гена и наличие рестриктазного фрагмента при мутации в гене *FLT3*-ITD

Определение точечной мутации *FLT3* в экзоне 20 (замена аспарагина в 835 положении) проводили также методом ПЦР, но с последующим анализом длины рестрикционных фрагментов. При наличии нормального аллеля происходит расщепление продукта ПЦР специфичным ферментом (рестриктазой) на 2 фрагмента, что видно на электрофореграмме (Рисунок 4). В том случае, если в клетках пациента присутствует аллель с данной мутацией *FLT3*, этот сайт рестрикции отсутствует, и длина фрагмента остается неизменной, что позволяет идентифицировать данную мутацию у пациента (Рисунок 4).

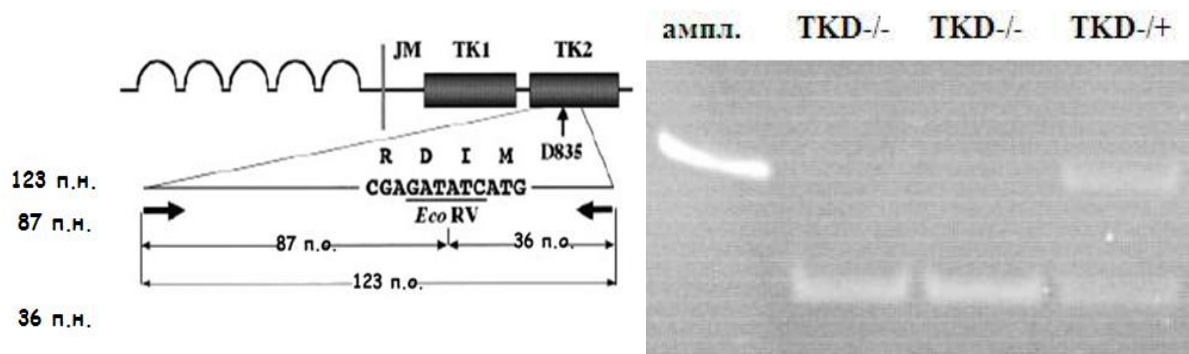


Рисунок 4 – Электрофореграмма, иллюстрирующая анализ мутации *FLT3*-TKD

Отмечен вид ампликонов при «диком» типе гена и дополнительный рестриктазный фрагмент при гетерозиготной мутации в гене *FLT3*-TKD

2.2.4 Метод количественного определения аллельной нагрузки *FLT3*-ITD

При определении мутации *FLT3*-ITD качественным методом в дальнейшем выполнялось 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 (Рисунок 5). Количественная оценка пиков проводилась с помощью прибора Mega BACE 1000.

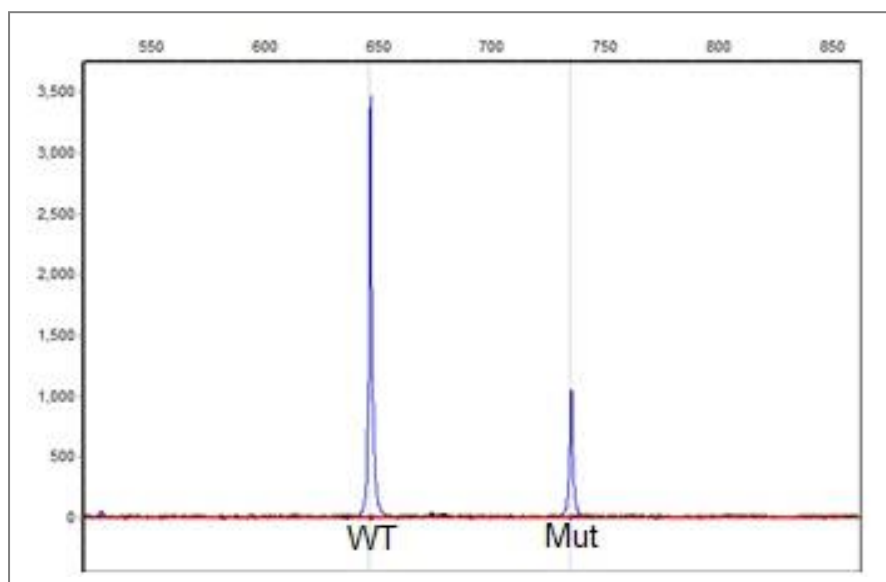


Рисунок 5 – Результаты фрагментного анализа мутации в гене *FLT3-ITD*

Таким образом, фрагментный анализ включал в себя:

- мечение полинуклеотидных фрагментов флуоресцентными красителями;
- амплификацию меченых фрагментов методом ПЦР;
- разделение фрагментов в секвенаторе Mega BACE 1000 методом капиллярного электрофореза;
- анализ полученных результатов.

2.2.5 Секвенирование нового поколения

NGS проводилось на платформе NextSeq (Illumina, США) с использованием технологии синтеза. ДНК выделяли из периферических мононуклеаров крови, полученных методом градиентного центрифугирования, с использованием Ficoll-Raque. Пробоподготовка включала гибридизационное селективное обогащение фрагментов ДНК, относящихся к кодирующим областям 118 генов, ассоциированных с гемобластозами (Таблица 8). Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop и флуориметра Qubit.

Таблица 8 – Таргетная NGS-панель, используемая в исследовании

Ген	Экзоны	Ген	Экзоны
<i>ABL1</i>	4–6	<i>KDR</i>	все
<i>AKT3</i>	все	<i>KIT</i>	2, 8-11, 13, 17
<i>ALK</i>	все	<i>KLF2</i>	все
<i>APC</i>	все	<i>KMT2A</i>	все
<i>ARID1A</i>	все	<i>KMT2C</i>	2-11
<i>ATM</i>	все	<i>KMT2D</i>	все
<i>ATRX</i>	все	<i>KRAS</i>	все
<i>ASXL1</i>	8-10, 17-31	<i>MAP2K1</i>	все
<i>B2M</i>	все	<i>MEF2B</i>	все
<i>BCL2</i>	все	<i>MGA</i>	все
<i>BCOR</i>	все	<i>MPL</i>	все
<i>BCORL1</i>	все	<i>MSN</i>	10
<i>BCR</i>	все	<i>MYC</i>	все
<i>BIRC3</i>	все	<i>MYD88</i>	все
<i>BRCA1</i>	все	<i>NF1</i>	3-5
<i>BRCA2</i>	все	<i>NOTCH1</i>	все
<i>BRAF</i>	все	<i>NOTCH2</i>	все
<i>BTK</i>	все	<i>NPM1</i>	все
<i>CALR</i>	9	<i>NRAS</i>	12
<i>CARD11</i>	все	<i>PDGFRA</i>	все
<i>CBL</i>	8, 9	<i>PHF6</i>	12, 14, 18
<i>CCND1</i>	все	<i>PIK3CB</i>	все
<i>CD79B</i>	все	<i>PIM1</i>	все
<i>CD58</i>	все	<i>PKHD1</i>	все
<i>CDKN2A</i>	все	<i>PLCG2</i>	все
<i>CDX2</i>	все	<i>POT1</i>	все
<i>CEBPA</i>	все	<i>PRDM1</i>	все
<i>CIITA</i>	все	<i>PTCH1</i>	все
<i>CREBBP</i>	все	<i>PTEN</i>	5, 7
<i>CSF3R</i>	14-17	<i>PTPN11</i>	3, 13
<i>CUX1</i>	все	<i>PTPRD</i>	все

Продолжение таблицы 8

Ген	Экзоны	Ген	Экзоны
<i>DDX3X</i>	все	<i>RAD21</i>	все
<i>DEK</i>	все	<i>RB1</i>	все
<i>DIS3</i>	все	<i>RHOA</i>	все
<i>DNMT3A</i>	все	<i>RPS15</i>	все
<i>EP300</i>	все	<i>RUNX1</i>	все
<i>ETV6</i>	все	<i>RYR1</i>	все
<i>EZH2</i>	все	<i>SAMHD1</i>	все
<i>FAM46C</i>	все	<i>SETBP1</i>	4 (850-910 кодоны)
<i>FAT1</i>	все	<i>SF3B1</i>	все
<i>FLT3</i>	все	<i>SH2B3</i>	2
<i>GATA1</i>	14, 15, 20	<i>SMARCA4</i>	все
<i>GATA2</i>	2	<i>SMC1A</i>	2, 11, 16, 17
<i>GJB2</i>	2–6	<i>SMC3</i>	10, 13, 19, 23, 25, 28
<i>GNAI3</i>	все	<i>SOCS1</i>	все
<i>GNAS</i>	все	<i>SRSF2</i>	1
<i>FBXW7</i>	8, 9	<i>STAG2</i>	все
<i>HIST1H1A</i>	все	<i>STAT3</i>	все
<i>HRAS</i>	2, 3	<i>STAT6</i>	все
<i>ID3</i>	все	<i>SUZ12</i>	все
<i>IDH1</i>	4	<i>SYK</i>	все
<i>IDH2</i>	4	<i>TET2</i>	все
<i>IRF4</i>	все	<i>TNFAIP3</i>	все
<i>IKZF1</i>	все	<i>TP53</i>	все
<i>IKZF3</i>	все	<i>U2AF1</i>	2, 6
<i>ITPKB</i>	все	<i>WHSC1</i>	все
<i>JAK2</i>	12, 14	<i>WT1</i>	все
<i>JAK3</i>	все	<i>XPO1</i>	все
<i>KDM6A</i>	все	<i>ZRSR2</i>	все

Библиотеки готовились на основе фрагментированной ДНК с последующим лигированием адаптеров и амплификацией целевых участков. Объем библиотеки нормализовали до концентрации 4 нг/мкл. Для гибридизации таргетных зондов использовали температурный профиль с аннеалингом при 65 °С. Секвенирование выполнялось в парном режиме чтения (paired-end) с длиной прочтения 150 пар оснований. Целевая глубина прочтения составляла 1000×, что обеспечивало высокую чувствительность для обнаружения редких вариантов. Контроль качества сырого материала проводился с помощью программного обеспечения FastQC. Сырой поток данных обрабатывался с использованием стандартного пайплайна, включающего этапы обрезки адаптеров и выравнивания последовательностей на референсный геном человека (версия hg37) с помощью алгоритма BWA-MEM, постпроцессинг выравнивания, детекцию вариантов и их фильтрацию по качеству.

При анализе данных использовали 3% порог частоты встречаемости аллеля (variant allele frequency, VAF). Выявленные варианты подвергались функциональной аннотации и оценке клинической значимости с использованием баз данных COSMIC, ClinVar и gnomAD (использовали порог частоты 0,01%), а также *in silico* инструментов, таких как Cscape, Cancer Genome Interpreter и SNPs&Go. Предположительно соматические варианты классифицировались в соответствии с рекомендациями AMP (Association for Molecular Pathology), а герминальные – в соответствии с рекомендациями ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) [190].

Все выявленные варианты распределялись на пять категорий клинической значимости: патогенные (pathogenic), вероятно патогенные (likely pathogenic), неопределенного значения (uncertain significance), вероятно доброкачественные (likely benign) и доброкачественные (benign) [9]. Обработка и визуализация данных проводились с использованием специализированного пакета для анализа мутационного профиля – maftools (версия 2.22.0) в R Studio [116].

2.3 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).

Нормальность распределения выборочных данных проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. В случае, если распределение было нормальным, для сравнения двух групп использовали t-критерий Стьюдента, для сравнения нескольких групп – однофакторный дисперсионный анализ (апостериорные попарные сравнения групп – t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони). Для анализа особенностей изменений АН у выживших и умерших пациентов в зависимости от вида использованной терапии, был применен двухфакторный дисперсионный анализ.

Для показателей, не имевших нормальное распределение, были использованы методы непараметрической статистики: U-критерий Манна-Уитни для сравнения двух групп и H-критерий Краскела-Уоллиса для сравнения нескольких групп. Для апостериорных попарных сравнений в последнем случае был использован U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Для анализа распределения частот был использован анализ χ^2 Пирсона, в случае, когда теоретические частоты не превышали 5, выполняли точный тест Фишера.

Анализ кривых выживаемости пациентов проведен с помощью метода Каплана-Мейера с использованием лог-рангового теста. Для определения взаимосвязи между двумя случайными величинами использован корреляционный анализ. Зависимость времени дожития от независимых переменных оценивали с помощью однофакторного и многофакторного регрессионного анализа Кокса.

Пороговое значение показателей определяли с помощью методик построения графиков по шкалам специфичности/чувствительности и дальнейшего ROC-анализа.

Результаты на графиках представлены в виде частот, медианы и интерквартильного интервала (для данных, не имеющих нормального распределения), либо в виде средних значений и стандартной ошибки (для нормально распределенных данных).

Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 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%).

В последующем ретроспективно и проспективно проанализированы все 280 пациентов, включенных в исследование. Не было получено достоверной разницы в частоте выявления мутаций в гене *FLT3* в зависимости от пола и возрастной категории пациентов – старше и моложе 60 лет ($p > 0,05$).

Мутации в гене *FLT3* выявлялись при всех морфологических вариантах ОМЛ, за исключением М6. Согласно полученным данным, частота выявления мутаций в гене *FLT3* между данными группами различалась достоверно ($\chi^2 = 15,291$; $p < 0,032$). Мутации в гене *FLT3* наиболее часто определялись у больных с вариантом М5 – 21 (61,8%) из 34 пациентов. Однако статистическая достоверность была получена только при сравнении с вариантом М2 ($p = 0,037$).

Результаты распределения групп больных в соответствии с ФАБ-классификацией представлены на Рисунке 6.

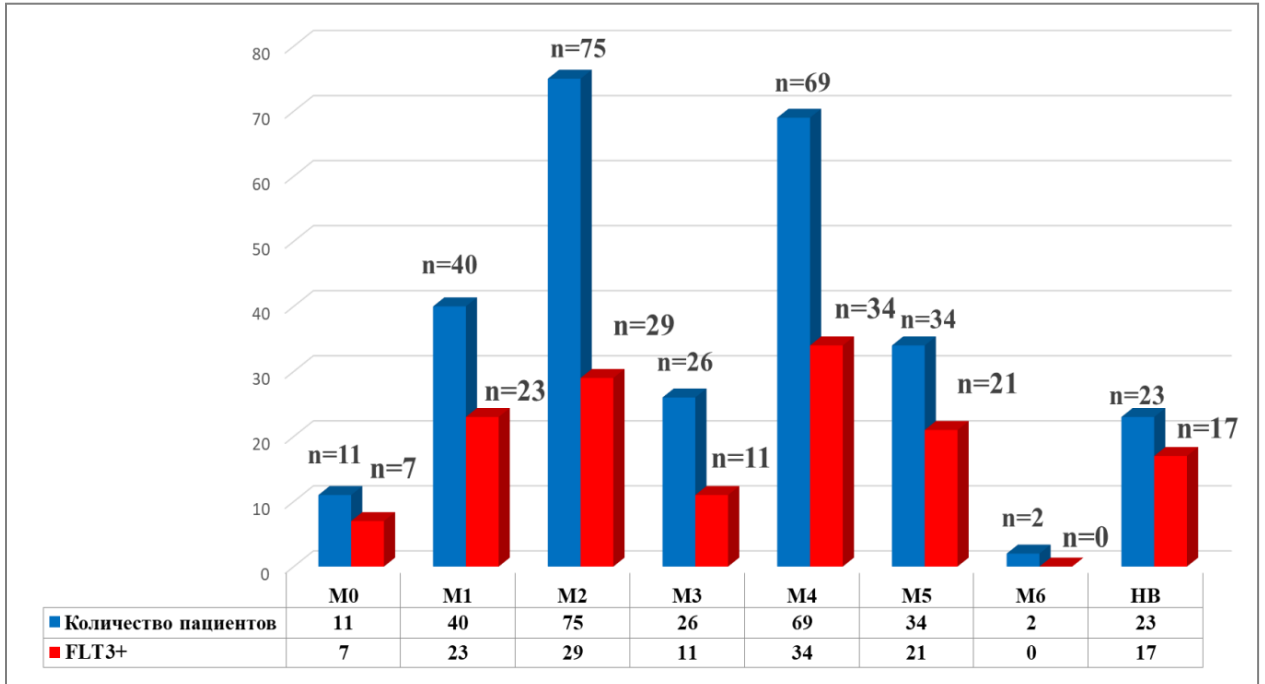


Рисунок 6 – Частота мутаций в гене *FLT3* при различных ФАБ-вариантах

Согласно молекулярно-генетической классификации ELN 2022, пациенты были распределены на цитогенетические группы риска (Рисунок 7). У 10 пациентов (3,6%) митозы получены не были. У 23 из 270 пациентов (8,5%) определялся КК. В ходе проведённого анализа цитогенетических групп риска не было выявлено статистически значимых различий медианы БРВ и ОВ между группами благоприятного, промежуточного и неблагоприятного прогноза ($p > 0,05$).

Выявление мутаций в гене *FLT3* (без учета типа мутаций) не было ассоциировано с определенной цитогенетической группой ($\chi^2 = 0,755$; $p > 0,05$). Однако мы обнаружили статистически значимые различия в частоте мутаций гена *FLT3* между цитогенетическими группами риска в зависимости от ее типа. Наличие мутации *FLT3*-ITD было связано с уменьшением вероятности выявления неблагоприятной группы, тем самым увеличивало вероятность промежуточной цитогенетической группы ($\chi^2 = 6,50$, $p = 0,039$). В то же время мутация *FLT3*-TKD не была связана с определенной цитогенетической группой ($\chi^2 = 0,161$; $p > 0,05$).

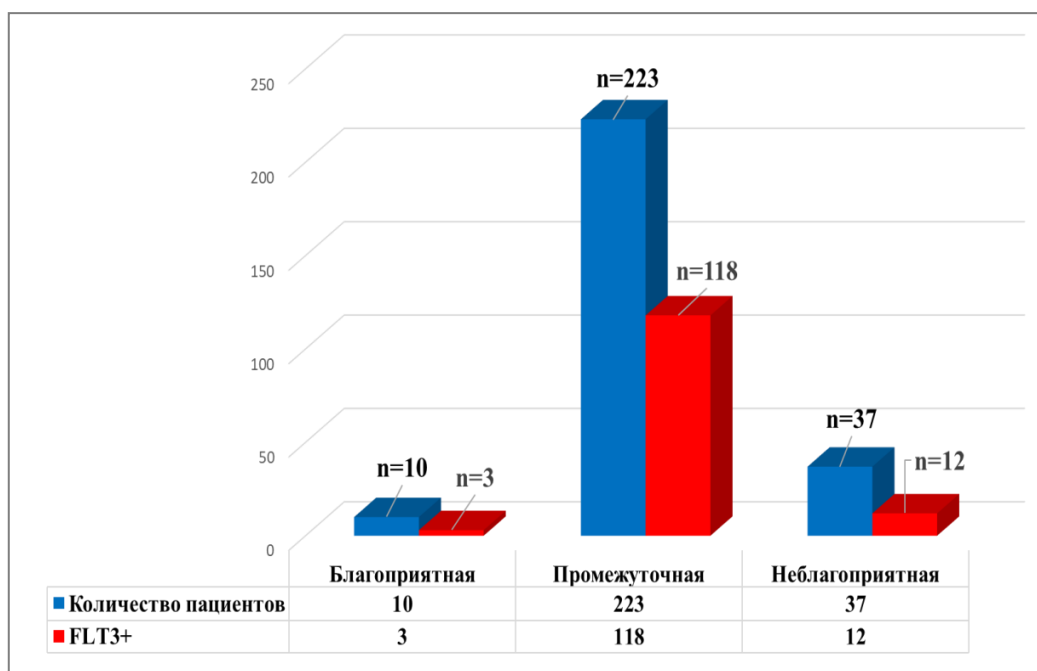


Рисунок 7 – Частота выявления мутаций в гене *FLT3* в зависимости от цитогенетической группы риска

Тем не менее, детальный анализ выживаемости всех пациентов, отнесенных к промежуточной группе риска, имеющих мутацию *FLT3*-ITD, позволяет говорить о том, что наличие этой мутации неблагоприятно влияет на течение ОМЛ (Рисунок 8): смертность в данной группе была выше в 2 раза по сравнению с пациентами, не имеющими мутаций в гене *FLT3* и достигала 54,64% по сравнению с 27,78% в группе пациентов без мутации ($\chi^2=14,21$ $p<0,001$).

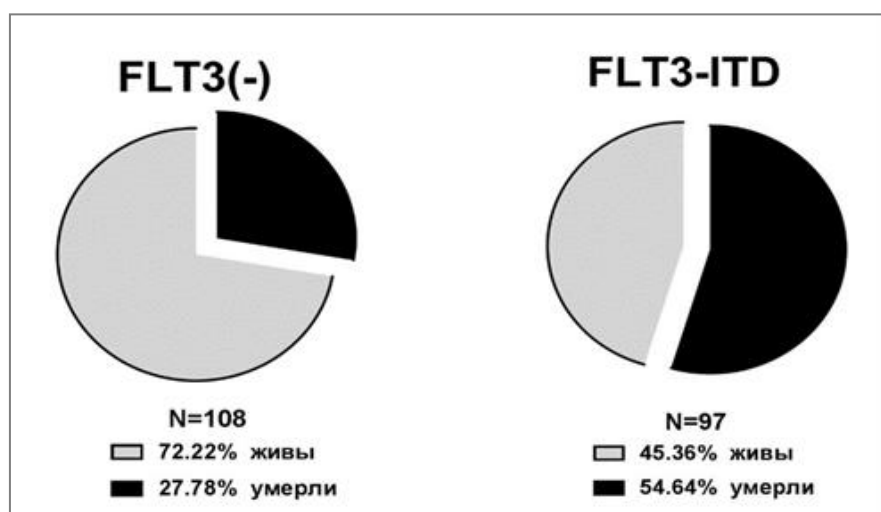


Рисунок 8 – Выживаемость пациентов промежуточной группы в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3*

Мутации в гене *NPM1* определялись во всех 3 группах пациентов с различным мутационным статусом (*FLT3*-; *FLT3-ITD*⁺; *FLT3-TKD*⁺). При анализе распределения мутаций гена *NPM1* было обнаружено, что они достоверно чаще выявлялись в группе пациентов с *FLT3-ITD*⁺ – 37 (32,4%) из 114 пациентов, по сравнению с *FLT3*- и *TKD*⁺ ($\chi^2=23,061$; $p=0,0001$). Результаты распределения групп больных в зависимости от мутационного статуса представлены в виде Рисунка 9 и Таблицы 9.

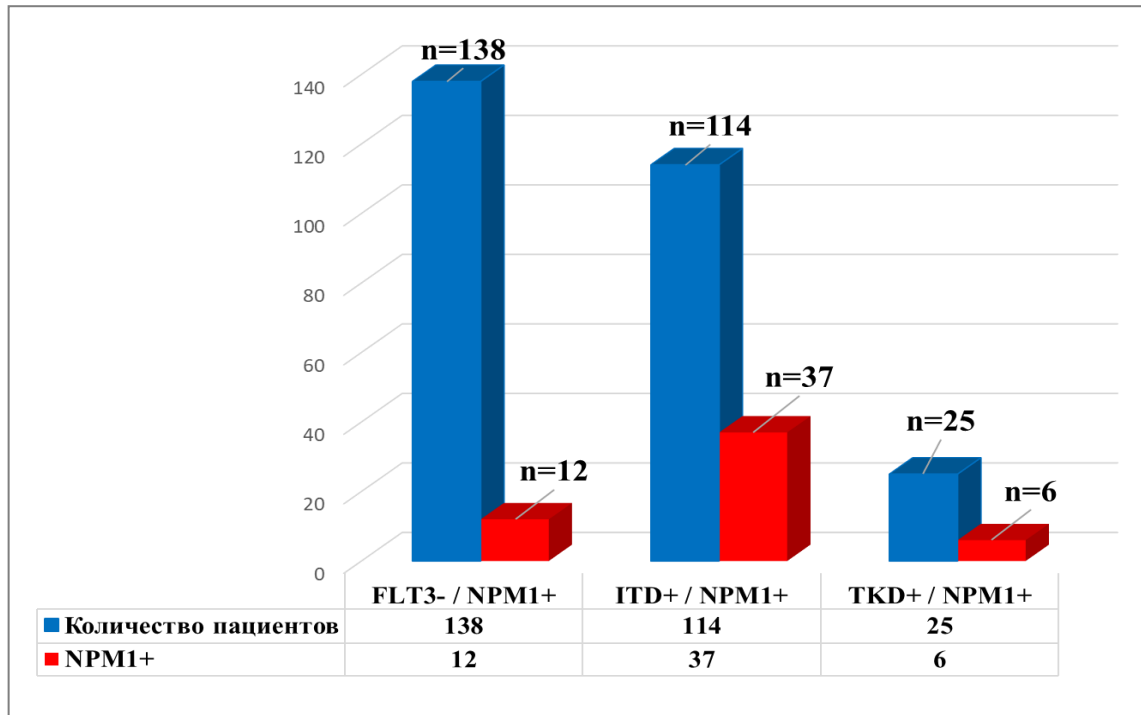


Рисунок 9 – Частота выявления мутации в гене *NPM1* в зависимости от мутационного статуса

Таблица 9 – Частота выявления мутации в гене *NPM1*

Мутационный статус	<i>FLT3</i> -/ <i>NPM1</i> +	<i>ITD</i> +/ <i>NPM1</i> +	<i>TKD</i> +/ <i>NPM1</i> +
Количество пациентов	n=138	n=114	n=25
<i>NPM1</i> +	n=12 (8,7%)	n=37 (32,4%)	n=6 (24%)

3.1.1 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 $<0,5$ [200].

Таким образом, были 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 ($\geq 0,5$).

Доля пациентов с высокими и низкими уровнями АН *FLT3*-ITD достоверно не различалась в зависимости от возрастной категории пациентов (моложе и старше 60 лет) ($\chi^2=0,488$; $p=0,485$), а также достижения ПР ($\chi^2=0,188$; $p=0,664$). Высокие уровни АН *FLT3*-ITD наблюдались более часто у пациентов, которым выполнялась алло-ТГСК, тогда как у пациентов, не получивших ТГСК, АН *FLT3*-ITD была более низкой ($\chi^2=5,217$; $p=0,022$) (Таблица 10).

Таблица 10 – Частота встречаемости различной величины аллельной нагрузки *FLT3* в зависимости от демографических и клинических характеристик

Возрастные и клинические параметры	Частота выявления различных уровней АН (число случаев, %)		p
	<i>FLT3</i> -ITD ^{низкая}	<i>FLT3</i> -ITD ^{высокая}	
Уровни АН			
Моложе 60 лет	n=34 (37,4%)	25 (27,5%)	0,485
Старше 60 лет	16 (17,6%)	16 (17,6%)	

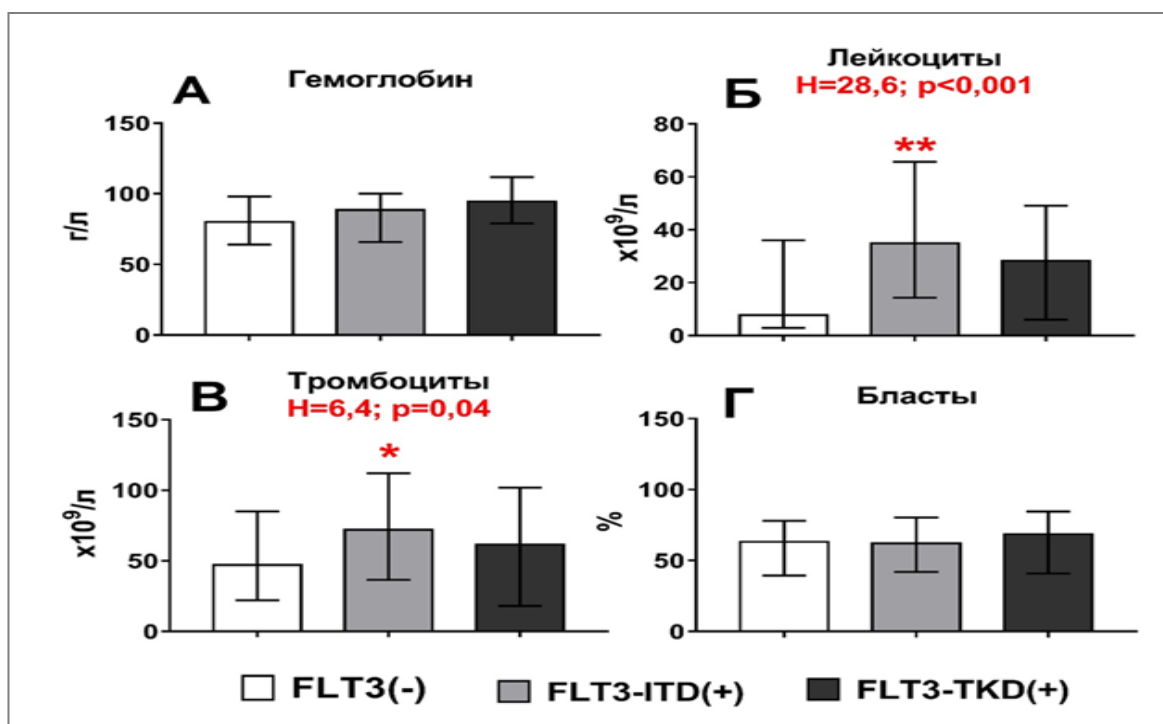
Продолжение таблицы 10

Возрастные и клинические параметры	Частота выявления различных уровней АН (число случаев, %)		p
	Уровни АН	<i>FLT3</i> -ITD ^{низкая}	
ПР ⁺	27 (52,9%)	24 (47,1%)	0,664
ПР ⁻	23 (57,5%)	17 (42,5%)	
Алло-ТГСК ⁺	6 (30,0%)	14 (70,0%)	0,022
Алло-ТГСК ⁻	44 (62,0%)	27 (38,0%)	

3.2 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 между группами пациентов *FLT3*⁺ и *FLT3*⁻ было отмечено следующее: наличие мутаций в гене *FLT3* ассоциировано с повышенным уровнем лейкоцитов (по критерию Крускала-Уоллиса, $H=23.9$; $p<0,001$) по сравнению с *FLT3*-негативной группой (Рисунок 10).

При этом наличие *FLT3*-ITD оказывало более выраженное влияние, по сравнению с *FLT3*-TKD. Так, для мутации *FLT3*-ITD значение U по критерию Манна-Уитни составило 3061, по сравнению с группой, где эта мутация отсутствовала ($p<0,001$); по мутации ТКД величина $U=888,5$ ($p=0,03$); что, с учетом поправки Бонферрони, недостоверно отличается от *FLT3*-негативной группы. Наличие *FLT3*-TKD в отличие от *FLT3*-ITD сопровождалось более выраженной тромбоцитопенией ($H=6,2$; $p=0,01$; $U=3605$; $p=0,024$).

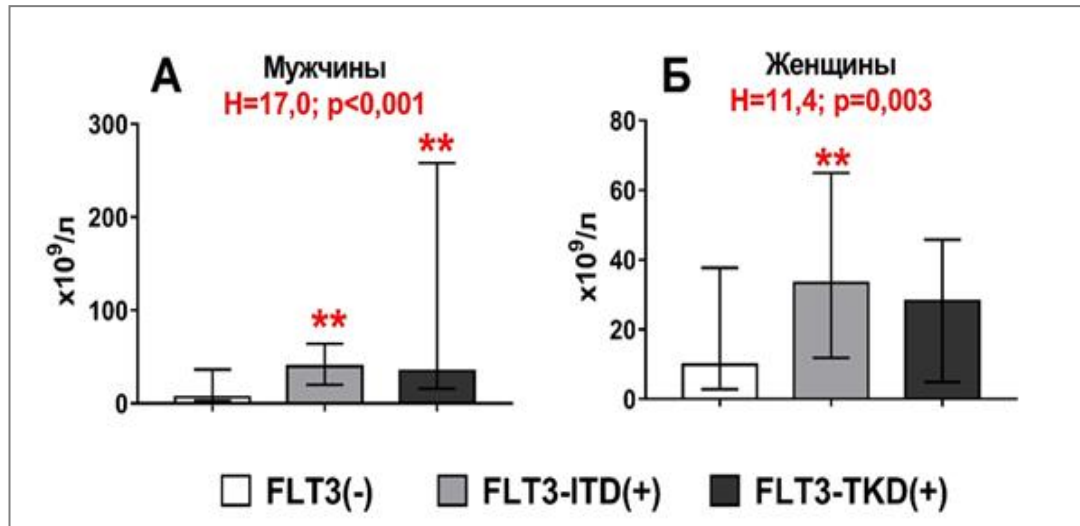


А – уровень гемоглобина; Б – количество лейкоцитов; В – количество тромбоцитов; Г – процент бластных форм в костном мозге). Н – значения критерия Крускала-Уоллиса; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; достоверные отличия (*FLT3*(-) по U (критерию Манна-Уитни) с поправкой Бонферрони).

Рисунок 10 – Показатели гемограммы и миелограммы у пациентов без мутаций *FLT3*⁻; с мутациями *FLT3*-ITD⁺ и *FLT3*-TKD⁺

У больных мужского пола отмечен повышенный лейкоцитоз при наличии мутаций *FLT3* обоих типов (ITD; TKD) ($H=17,0$; $p < 0,001$). Отличия от *FLT3*⁻ группы наблюдались как у пациентов с мутацией *FLT3*-ITD⁺ ($U=391,5$; $p < 0,001$), так и с мутацией *FLT3*-TKD⁺ ($U=83,5$; $p=0,007$). Однако у женщин лейкоцитоз отмечался только при мутации *FLT3*-ITD⁺ ($U=1115$; $p=0,001$), но не *FLT3*-TKD⁺ ($U=369$; $p=0,5$). Полученные результаты представлены на Рисунке 11.

Пациенты, имевшие высокую АН в гене *FLT3*, по сравнению с пациентами с низкой АН, отличались более высокими уровнями лейкоцитов (Рисунок 12, А) и бластных клеток костного мозга (Рисунок 12, В) (соответственно, $U=473$; $p < 0,001$ и $U=551,5$; $p=0,04$).

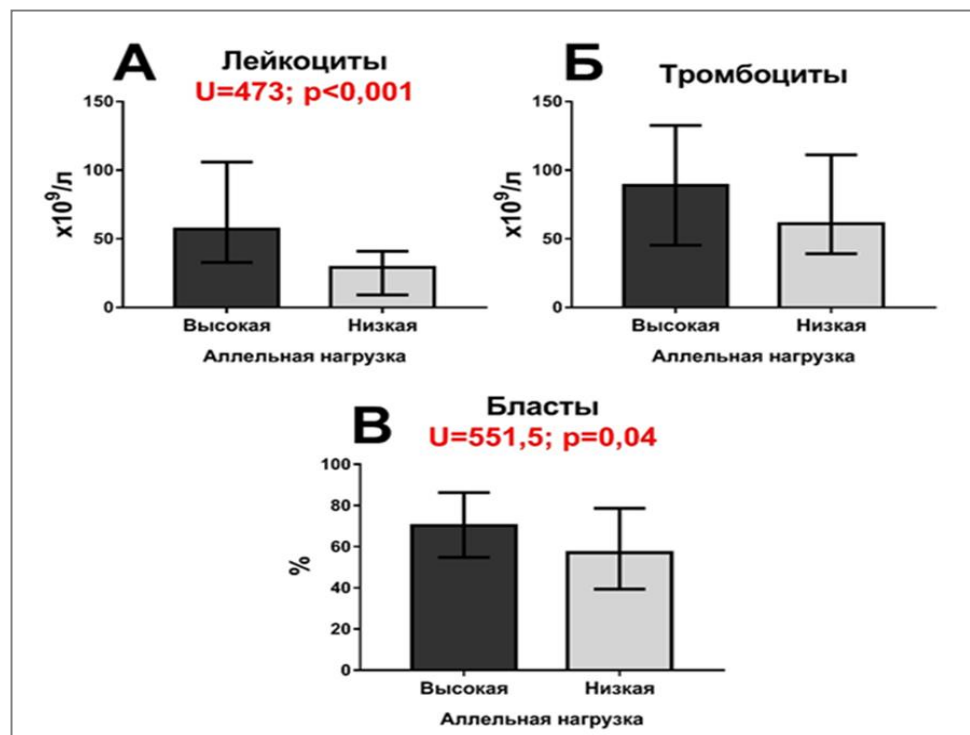


А – мужчины; Б – женщины.

H – значения критерия Крускала-Уоллиса; ** – различия с группой пациентов без мутаций *FLT3* достоверны по критерию U (Манна-Уитни) с поправкой Бонферрони ($p < 0,01$).

Рисунок 11 – Уровень лейкоцитов в крови у больных.

Показаны средние значения лейкоцитоза у пациентов без мутаций *FLT3*, а также с мутациями *FLT3-ITD*⁺ и *FLT3-TKD*⁺



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

Рисунок 12 – Показатели крови у лиц с высокой (n=41) и низкой (n=50) величиной аллельной нагрузки мутаций в гене *FLT3*

При сравнении всех возрастных групп (Рисунок 13, А) ПР чаще достигали пациенты с отсутствием мутаций в гене *FLT3*: 77,2% по сравнению с 56,6% в группе *FLT3*-ITD и 50% в группе *FLT3*-TKD ($\chi^2=13,4$; $p=0,001$).

С учетом различий в применяемой терапии был также проведен отдельный анализ частоты ремиссий для пациентов моложе и старше 60 лет. В группе пациентов моложе 60 лет (Рисунок 13, Б), ПР отмечалась у 86,6% пациентов без мутаций, 61,4% с мутациями *FLT3*-ITD и 64,3% с мутациями *FLT3*-TKD ($\chi^2=14,0$; $p=0,001$). Полученные различия были достоверны между всеми 3 группами.

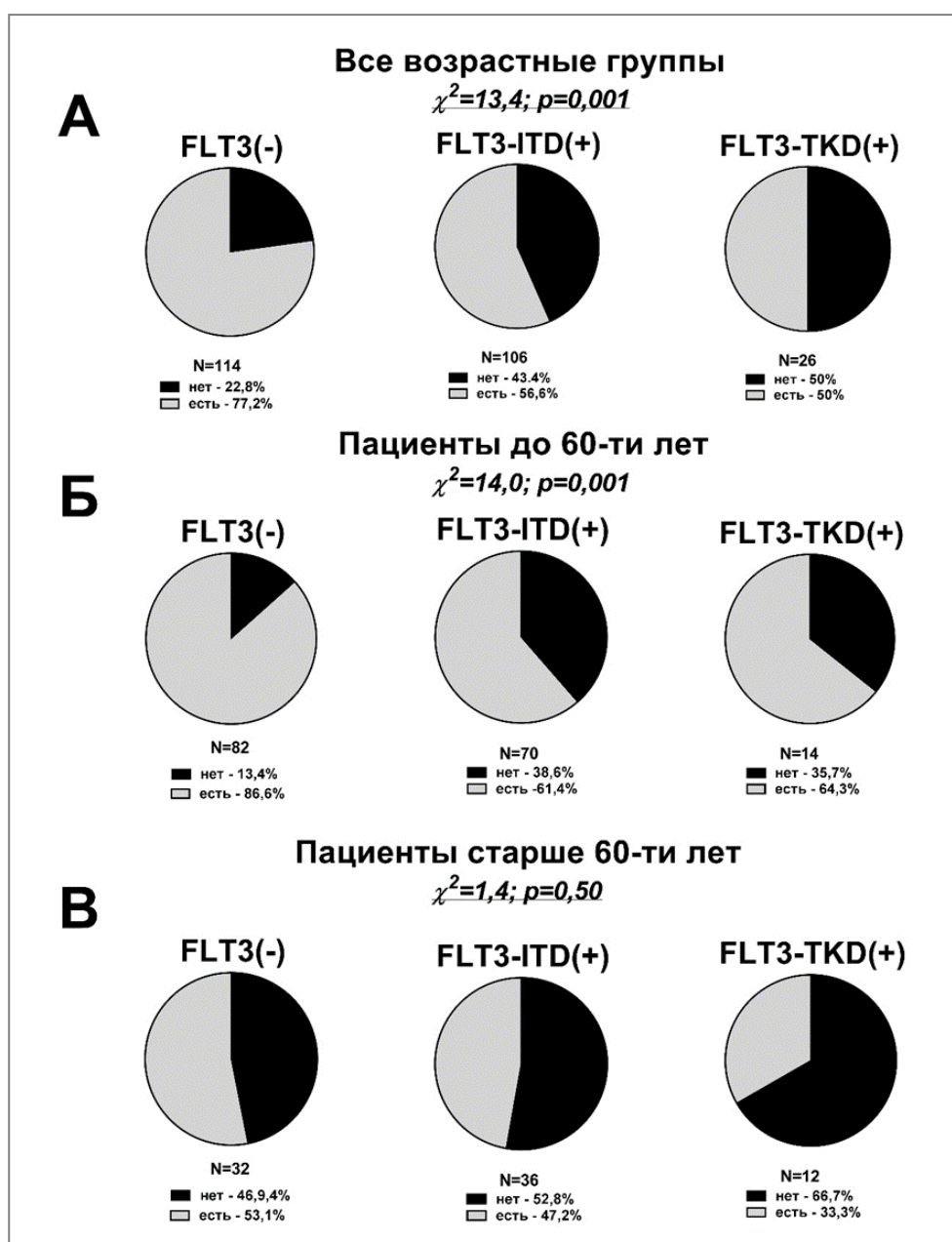


Рисунок 13 – Частота достижения ремиссии в общей группе пациентов ОМЛ, а также в группах моложе и старше 60 лет

Аналогичная тенденция наблюдалась в группе пациентов старше 60 лет (Рисунок 13, В): ПР достигли 53,1% больных без мутаций *FLT3*; при мутации ITD – 47,2%; при наличии ТКД – 33,3%. Однако в данной возрастной группе различия не были статистически значимыми ($\chi^2=1,4$; $p=0,50$).

Таким образом, 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 14). 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% ($\chi^2=11,2$; $p=0,04$).

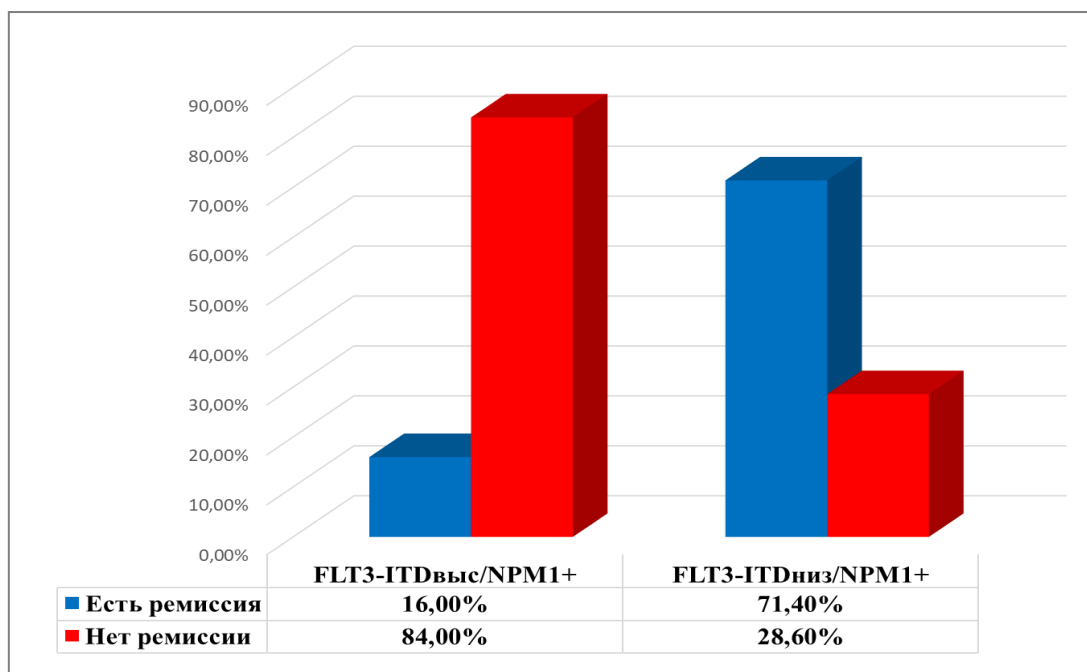
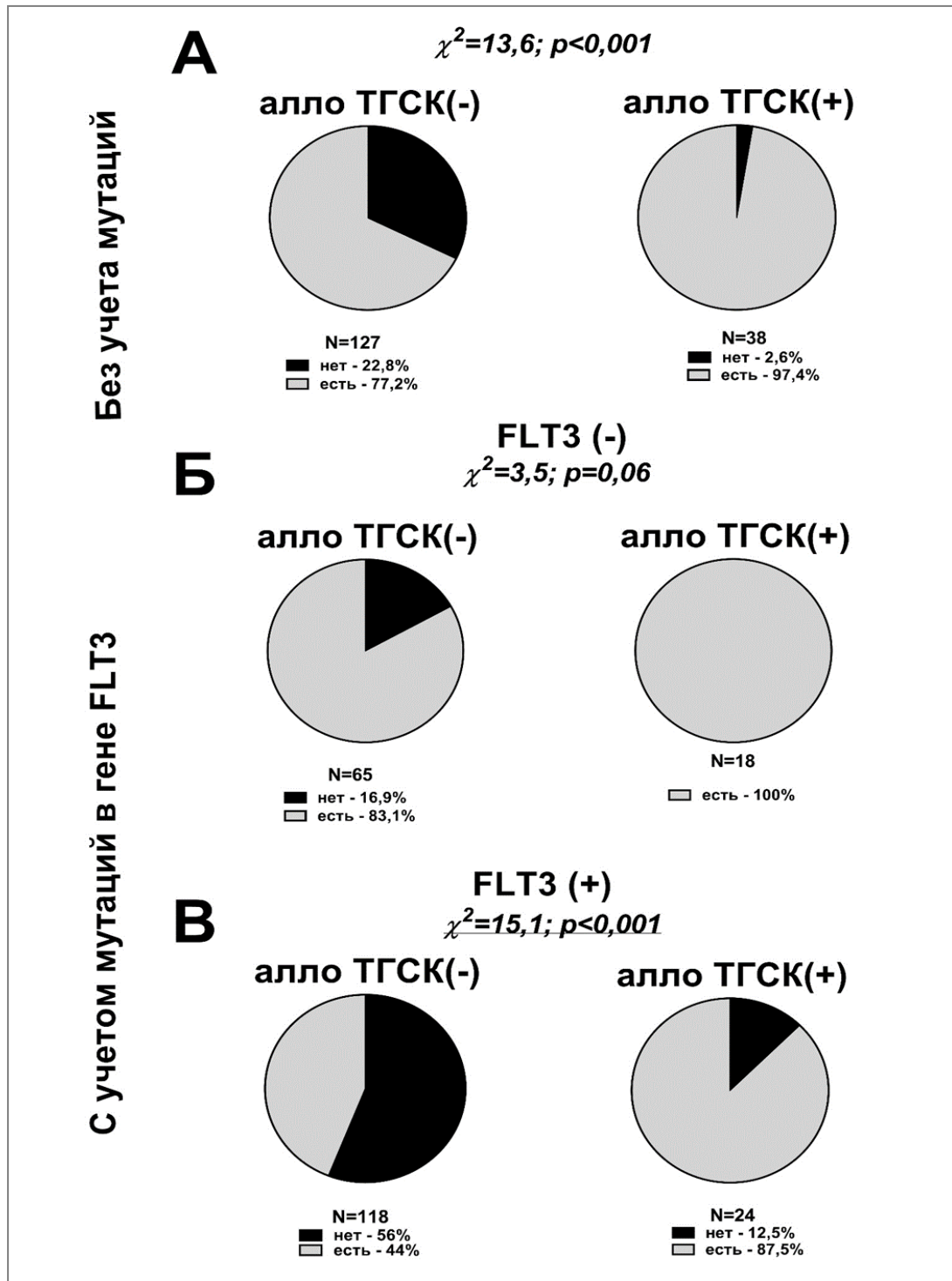


Рисунок 14 – Частота достижения полной ремиссии в зависимости от мутационного статуса генов *FLT3* и *NPM1*

Проведение алло-ТГСК выполнялось с целью возможного радикального излечения пациентов. Учитывая индивидуальные подходы к терапии ОМЛ, принятые для различных возрастных групп, данный вид терапии был использован, в основном, при лечении пациентов моложе 60 лет. Анализ эффективности

применения алло-ТГСК (по частоте достижения ремиссии), проведенный как в общей группе, так и дифференцированно, с учетом наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3*, показал следующие результаты, представленные на Рисунке 15.



А – для общей группы пациентов без учета мутации в гене *FLT3*; Б – у пациентов без мутаций в гене *FLT3*; В – при наличии мутации в гене *FLT3*.

Рисунок 15 – Частота достижения ПР у пациентов моложе 60 лет в зависимости от проведения алло-ТГСК

1. Среди общей группы больных ОМЛ, независимо от наличия мутаций, пациенты, которым после достижения ПР была проведена алло-ТГСК, чаще отмечалось достижение ПР (97,4% по сравнению с 77,2% у тех, кому она не выполнялась ($\chi^2=13,6$; $p<0,001$), как видно из Рисунка 15, А.

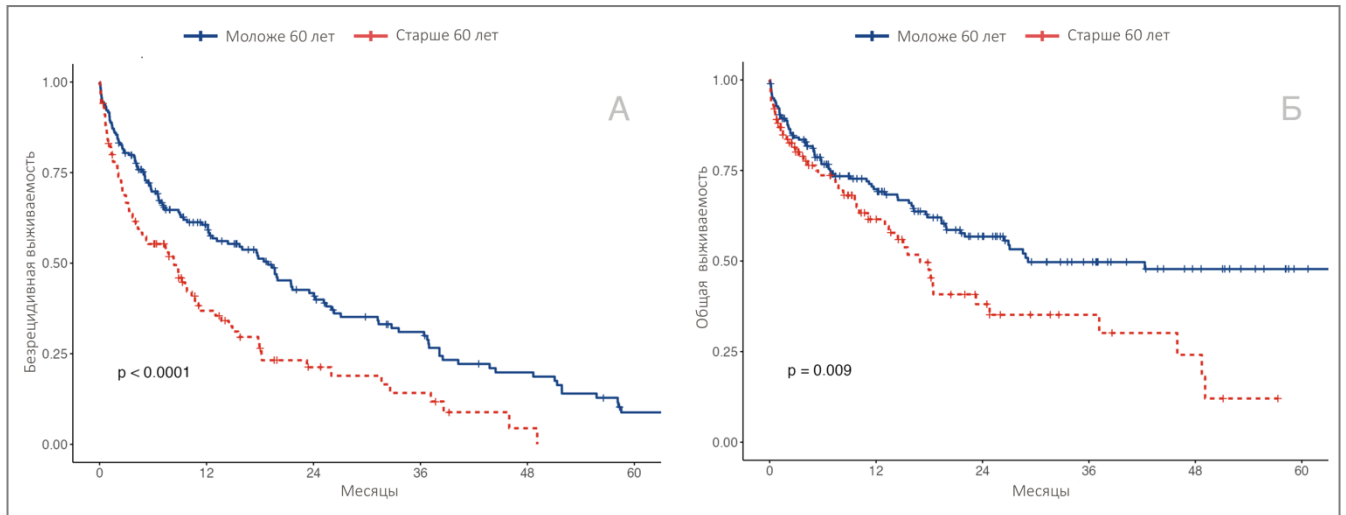
2. В группе пациентов с *FLT3*-негативным статусом, которые получали алло-ТГСК после достижения ПР, отмечено достижением ПР у 100% пациентов по сравнению с 83,1% в группе пациентов, которым алло-ТГСК не проводилась ($\chi^2=3,5$; $p=0,06$), (Рисунок 15, Б).

3. У *FLT3*⁺ пациентов, получивших алло-ТГСК, достижение ПР отмечено чаще, чем у тех, кто ее не получал, соответственно, 87,5% и 44,0% ($\chi^2=10,4$; $p<0,01$) (Рисунок 15, В).

Таким образом, алло-ТГСК позволяет существенно улучшить результаты терапии ОМЛ, в том числе у пациентов с мутациями гена *FLT3*, которые в меньшей степени отвечают на стандартную ХТ.

Для изучения прогностического значения возраста больных проведен анализ БРВ и ОВ пациентов с ОМЛ. Различие медиан БРВ пациентов с ОМЛ, проанализированных и распределенных по группам моложе ($n=179$) и старше 60 лет ($n=101$), было статистически значимым: 18,9 мес. (95% ДИ 12,6-24), и 8,3 мес. (95% ДИ 4,4-11,1), соответственно ($p<0,0001$) (Рисунок 16, А). При анализе длительности ОВ пациентов ОМЛ также было получено достоверное различие: в группе пациентов моложе 60 лет ($n=179$) медиана ОВ составила 29,1 мес. (95% ДИ 22 – медиана не достигнута (НД)), а в группе пациентов старше 60 лет ($n=101$) – 17,0 мес. (95% ДИ 13,0-37,2) ($p=0,009$) (Рисунок 16, Б).

Анализируя данные всей когорты пациентов ОМЛ, из которых сформированы три группы риска по результатам цитогенетического исследования, мы не получили статистической значимой разницы в медиане БРВ ($n=162$) и ОВ ($n=280$) между группами с благоприятным, промежуточным и неблагоприятным прогнозом ($p>0,05$).



А – безрецидивная; Б – общая.

Рисунок 16 – Выживаемость пациентов ОМЛ в разных возрастных группах

Медиана БРВ пациентов в промежуточной цитогенетической группе в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3* была статистически не значима ($p > 0,05$), как и длительность БРВ и ОВ среди пациентов с неблагоприятным прогнозом по цитогенетическим маркерам ($p > 0,05$). Однако были отмечены достоверные различия по медиане ОВ в промежуточной группе: она составила 13,4 мес. в группе *FLT3*⁺ (n=130), (95% ДИ 10,1-19,4), и не была достигнута в группе без мутаций в гене *FLT3*⁻ (n=90), (95% ДИ 42,3 – НД), ($p < 0,0001$) (Рисунок 17).

Учитывая достаточно высокую частоту встречаемости мутаций в гене *FLT3*, в нашем исследовании мы представили данные о влиянии мутаций на показатели БРВ и ОВ. Не было выявлено значимых различий между группами по типам мутации *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD и *FLT3*⁻ при изучении их влияния на показатели БРВ ($p > 0,05$). Вместе с тем, получены статистически значимые различия между данными группами по показателям ОВ. Так, медиана ОВ составила: 12,2 мес. в группе *FLT3*-ITD (n=114), (95% ДИ 9,8-19,4), 16 мес. в группе *FLT3*-TKD (n=28), (95% ДИ 9,1 – НД) и 46 мес. в группе *FLT3*⁻ (n=138), (95% ДИ 28,8 – НД) ($p < 0,0001$) (Рисунок 18).

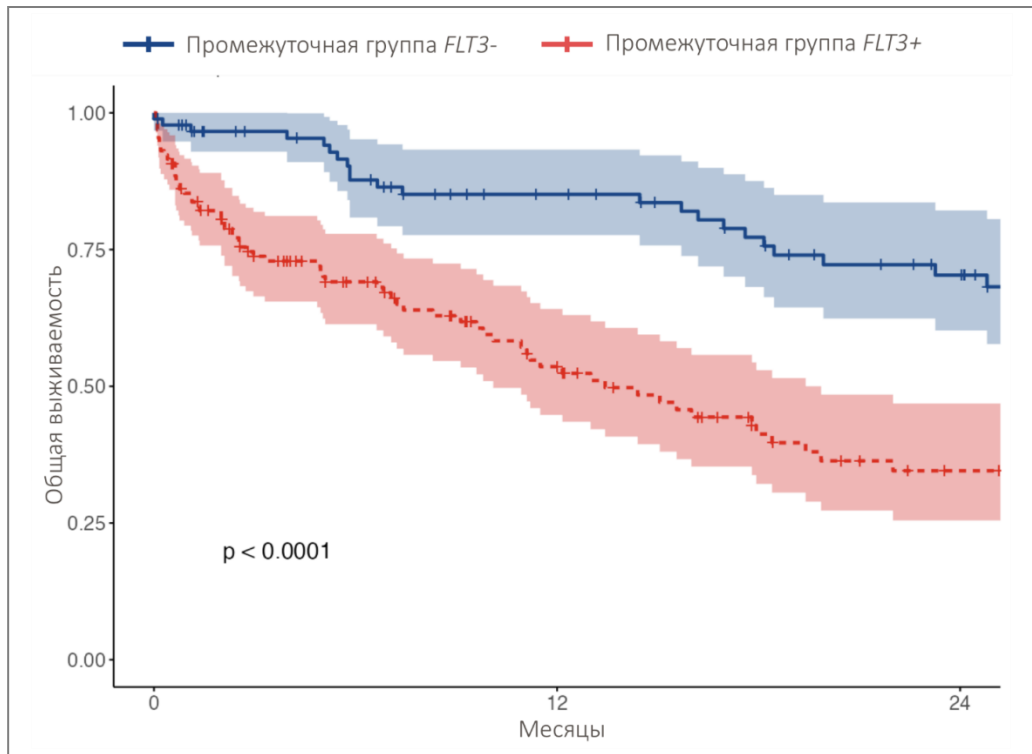


Рисунок 17 – Общая выживаемость пациентов ОМЛ в группе промежуточного риска в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3*

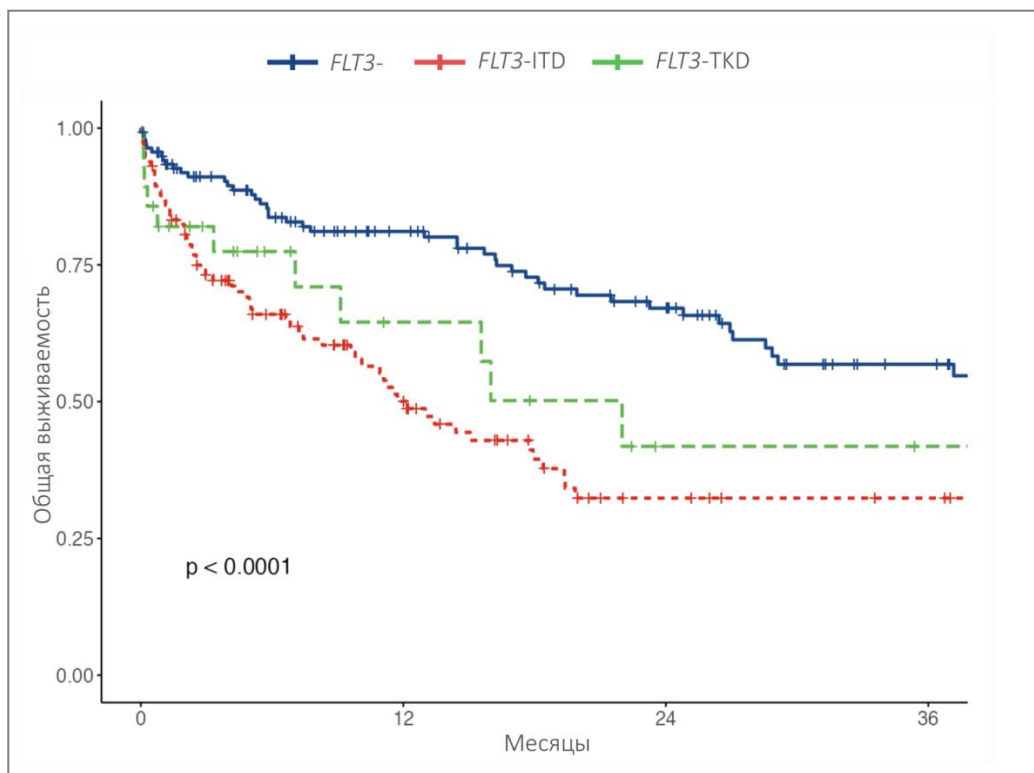
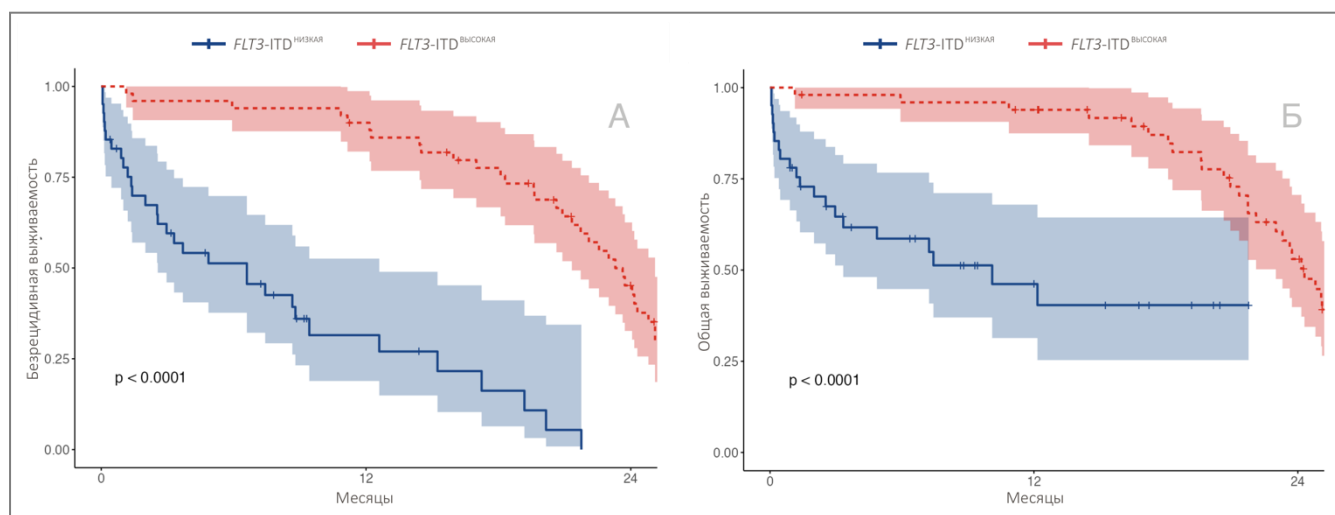


Рисунок 18 – Общая выживаемость пациентов ОМЛ в зависимости от типа мутаций в гене *FLT3*

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 19, А). Получены статистически значимые различия в длительности ОВ между данными группами. Медиана ОВ 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 19, Б).



А – безрецидивная; Б – общая.

Рисунок 19 – Выживаемость пациентов ОМЛ в зависимости от величины аллельной нагрузки мутации в гене *FLT3*-ITD

Установлены достоверные различия между показателями ОВ в группах пациентов с высокой и низкой АН *FLT3*-ITD, а также наличием *FLT3*-TKD. Медиана ОВ составила 10,1 мес. в группе с высокой АН *FLT3*-ITD (n=41), (95% ДИ 3,3 – НД), 24,3 мес. – среди пациентов с низкой АН *FLT3*-ITD (n=50), (95% ДИ 23-26,8) и 16 мес. в группе *FLT3*-TKD (n=26), (95% ДИ 9,1 – НД) (p=0,00017) (Рисунок 20). Показатели БРВ достоверно были не значимы (p>0,05).

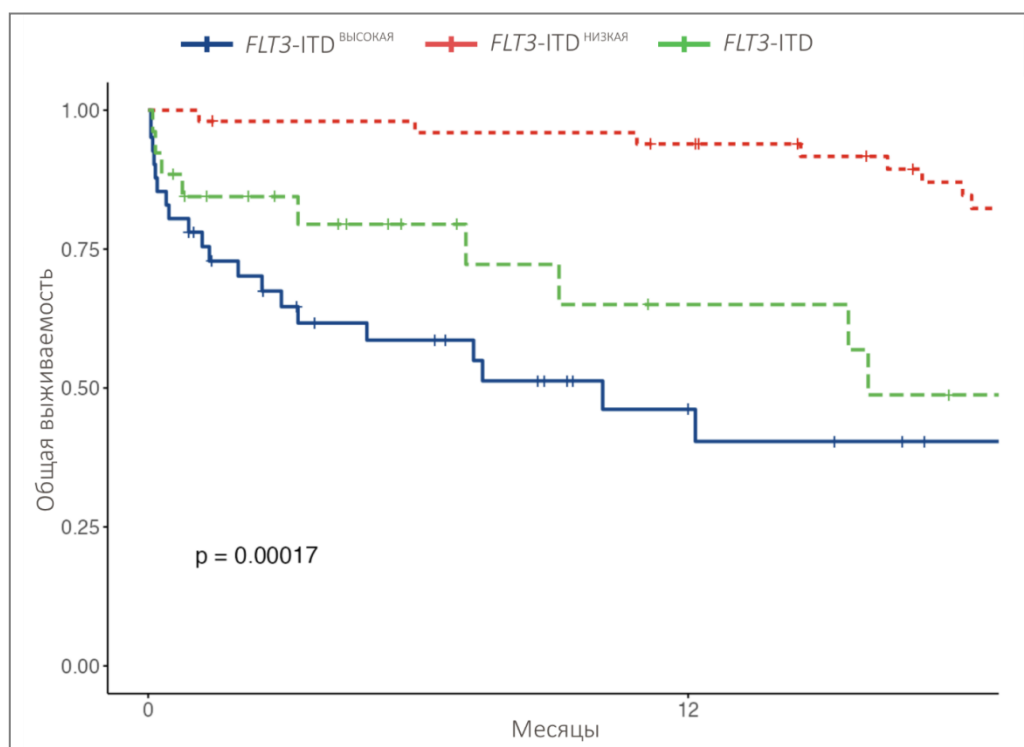


Рисунок 20 – Общая выживаемости пациентов ОМЛ
в зависимости от мутационного статуса *FLT3*

Среди пациентов с ОМЛ отмечена высокая частота комбинированных мутаций генов *FLT3* и *NPM1*. В связи с этим, сопоставлена длительность БРВ и ОВ в различных группах пациентов. При разделении больных на группы в зависимости от сочетаний генных мутаций *FLT3* и *NPM1* обнаружено только достоверное различие в длительности ОВ ($p < 0,0001$), но не по уровням БРВ ($p > 0,05$). Медианные значения ОВ 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 21, А).

При анализе группы пациентов в зависимости от мутационного статуса, а также уровней АН *FLT3*-ITD, получены достоверно значимые различия только по длительности ОВ. Медианы ОВ 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 *FLT*-ITD/*NPM1* – ($n=30$) составили соответственно 7,4, 12,1, 26,8 и 23,7 мес. ($p < 0,0001$) (Рисунок 21, Б).

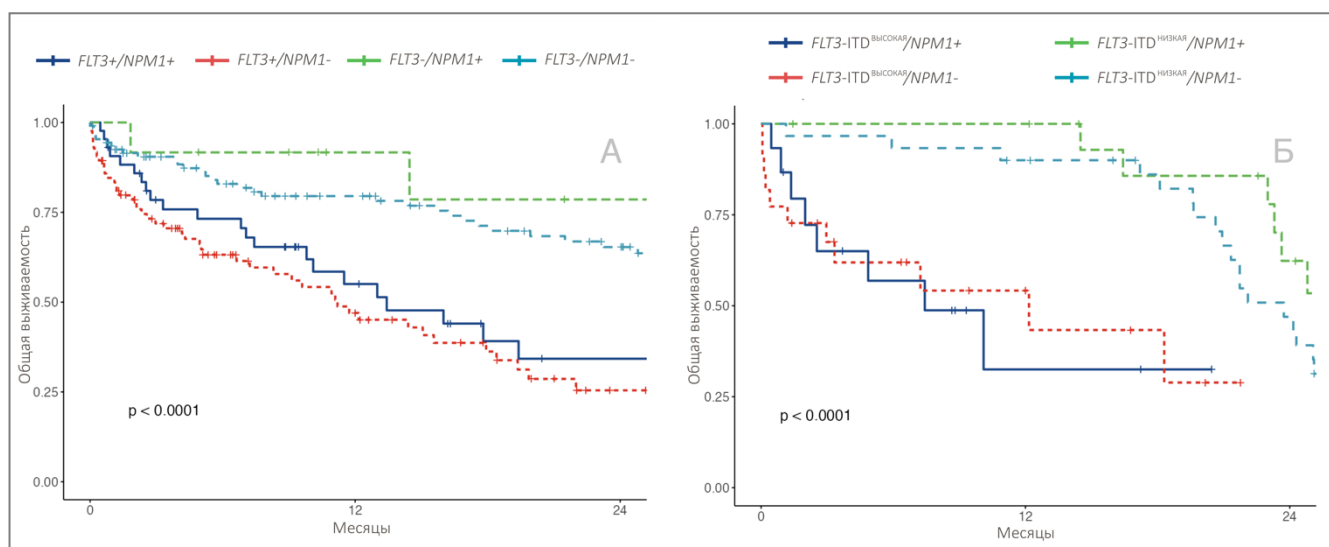
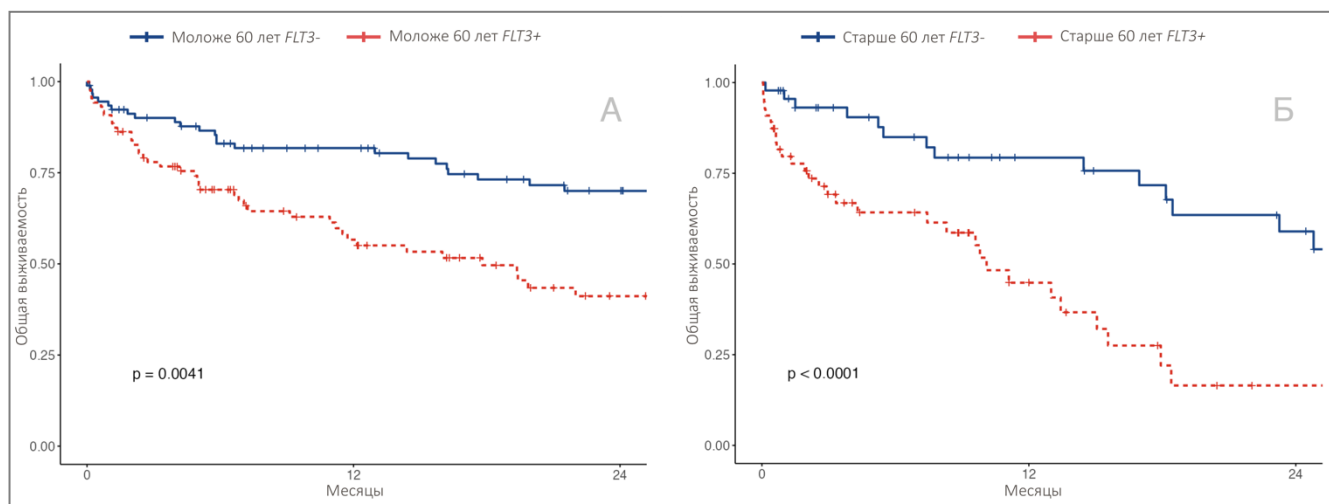


Рисунок 21 – Общая выживаемость пациентов с ОМЛ в зависимости от мутационного статуса генов *FLT3* и *NPM1* (А) и величины аллельной нагрузки *FLT3-ITD* (Б)

Проанализирована длительность ОВ среди пациентов моложе 60 лет в зависимости от наличия ($n=87$) или отсутствия ($n=92$) мутаций в гене *FLT3*. Были выявлены статистически значимые различия: медиана в группе $FLT3^+$ составила 17,8 мес. (95% ДИ 11,2 – НД), а в группе $FLT3^-$ медиана не была достигнута (95% ДИ 28,9 – НД) ($p=0,0041$) (Рисунок 22, А).

Разница в медиане ОВ среди пациентов старше 60 лет в зависимости от наличия ($n=55$) или отсутствия ($n=46$) мутаций в гене *FLT3* также была достоверно значимой, составляя соответственно 10,1 мес. (95% ДИ 7,4-17,9) и 37,2 мес. (95% ДИ 18,4 – НД) ($p<0,0001$) (Рисунок 22, Б). Не было получено различий по медианным значениям БРВ среди пациентов моложе и старше 60 лет с различным мутационным статусом *FLT3* ($p>0,05$).



А – моложе 60 лет; Б – старше 60 лет.

Рисунок 22 – Общая выживаемости пациентов с ОМЛ
в зависимости от наличия мутаций в гене *FLT3*

Полученные статистические различия длительности БРВ и ОВ в вышеперечисленных группах приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Показатели длительности выживаемости в различных группах

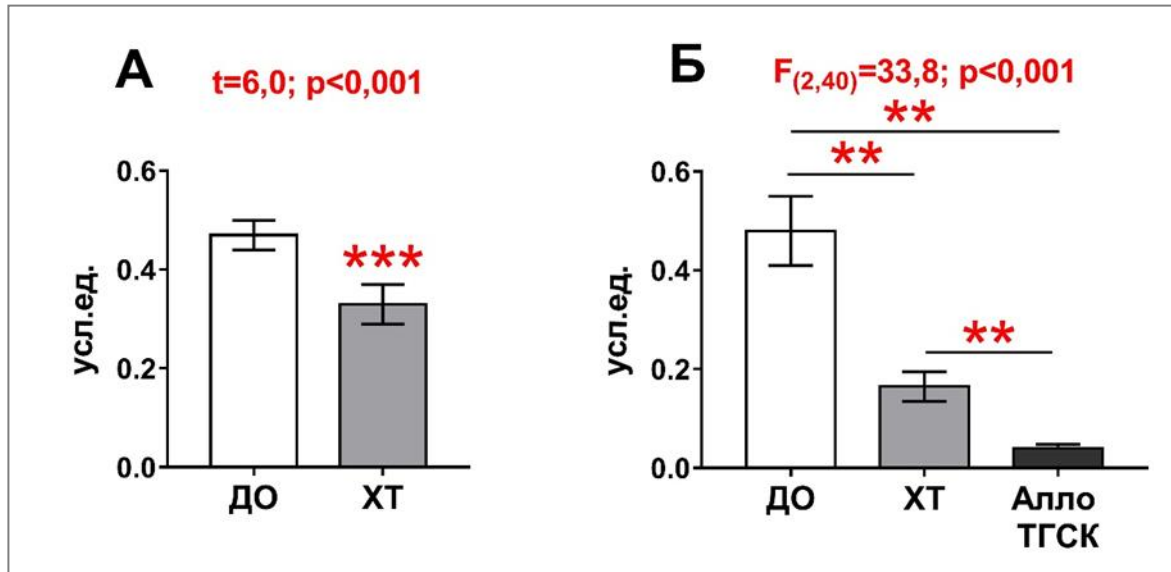
Анализируемые группы	Безрецидивная выживаемость	Общая выживаемость
Пациенты моложе и старше 60 лет	p<0,0001	p=0,009
Пациенты моложе 60 лет в зависимости от наличия мутаций в гене <i>FLT3</i>	p>0,05	p=0,0041
Пациенты старше 60 лет в зависимости от наличия мутаций в гене <i>FLT3</i>	p>0,05	p<0,0001
Группа неблагоприятного цитогенетического риска в зависимости от наличия мутаций в гене <i>FLT3</i>	p>0,05	p>0,05
Группа промежуточного цитогенетического риска в зависимости от наличия мутаций в гене <i>FLT3</i>	p>0,05	p<0,0001
Группы пациентов в зависимости от типа мутаций в гене (<i>FLT3</i> -; <i>FLT3</i> -ITD; <i>FLT3</i> -TKD)	p>0,05	p<0,0001
Группы пациентов в зависимости от величины аллельной нагрузки <i>FLT3</i> -ITD (высокая и низкая)	p<0,0001	p<0,0001

Продолжение таблицы 11

Анализируемые группы	Безрецидивная выживаемость	Общая выживаемость
Группы пациентов в зависимости от мутационного статуса (<i>FLT3</i> -TKD, <i>FLT3</i> -ITD высокая и низкая)	$p > 0,05$	$p = 0,00017$
Группы пациентов в зависимости от мутационного статуса: <i>FLT3</i> +/ <i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> +/ <i>NPM1</i> - <i>FLT3</i> -/ <i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> -/ <i>NPM1</i> -	$p > 0,05$	$p < 0,0001$
Группы пациентов в зависимости от мутационного статуса: <i>FLT3</i> -ITD _{выс} / <i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> -ITD _{выс} / <i>NPM1</i> - <i>FLT3</i> -ITD _{низ} / <i>NPM1</i> + <i>FLT3</i> -ITD _{низ} / <i>NPM1</i> -	$p > 0,05$	$p < 0,0001$

3.3 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 23, А, $t=6,0$; $p < 0,001$). Последовательное использование ХТ и алло-ТГСК показало еще большую эффективность (Рисунок 23, 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 23, Б, $t=6,3$; $p < 0,01$) и в 4 раза по сравнению со значениями, полученными после ХТ (Рисунок 23, 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 23 – 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 ОВ (Рисунок 24) соответственно при $r=0,45$ ($p<0,01$) и $r=0,46$ ($p<0,01$).

Полученные в настоящем исследовании данные подтверждают, что пациенты с *FLT3*-ITD^{выс} имели более выраженный лейкоцитоз, высокий уровень blasts костного мозга и достоверно меньшие значения БРВ и ОВ по сравнению с *FLT3*-ITD^{низ}, ключевым прогностическим фактором явился сам факт наличия мутации в гене *FLT3*, а не её исходная величина при первичной диагностике.

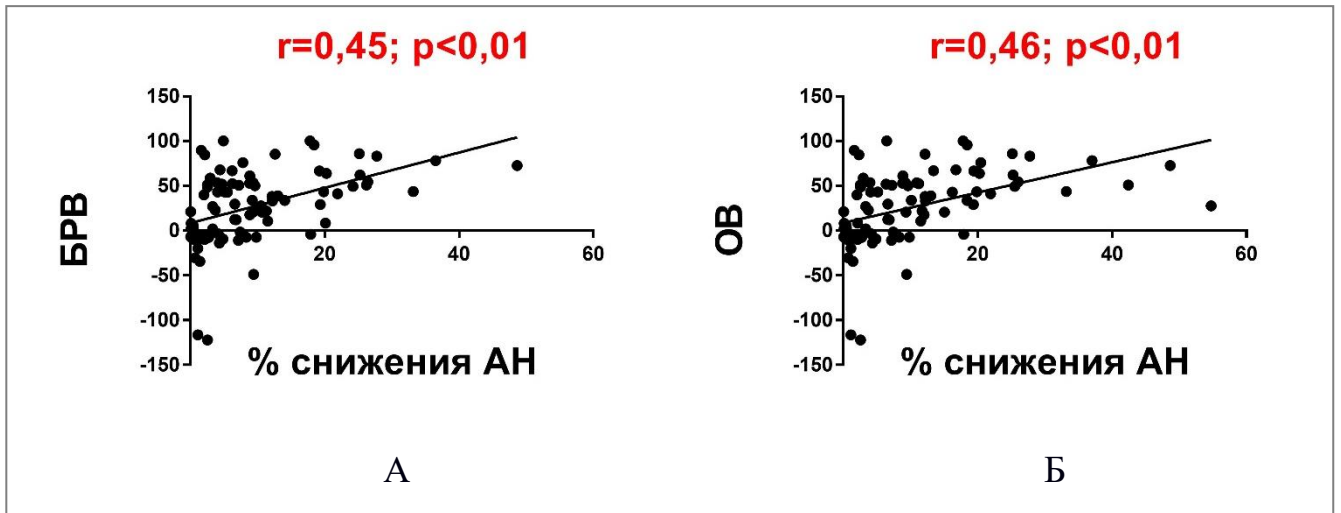
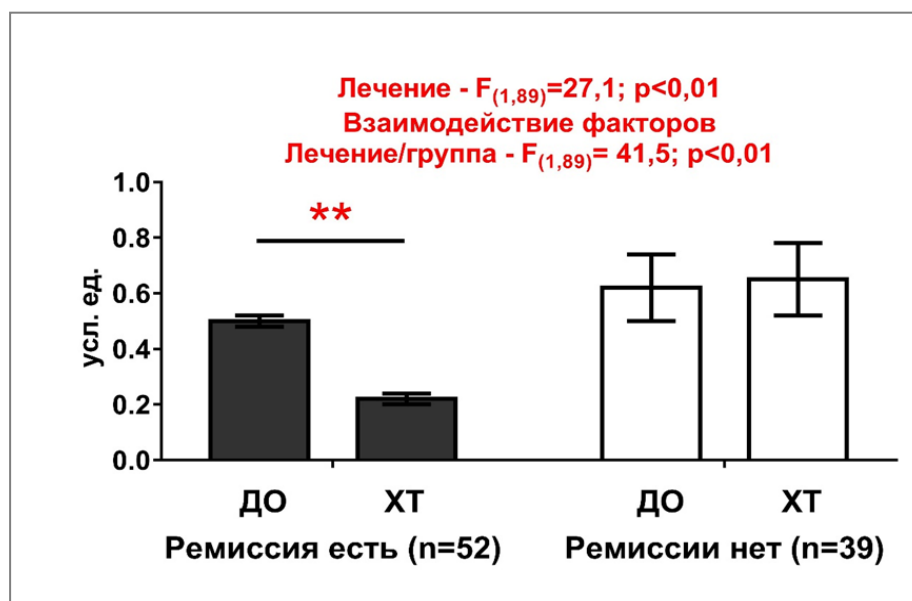


Рисунок 24 – Корреляция между безрецидивной (А) и общей выживаемостью (Б) и долей снижения аллельной нагрузки *FLT3*-ITD (%) на фоне проведенной терапии

Детектируемость и тенденция изменения уровня *FLT3*-ITD на фоне проведенной индукционной терапии и алло-ТГСК в конечном итоге являются более важными предикторами длительности показателей выживаемости, чем единичное значение величины АН в дебюте заболевания и поддерживают клиническую обоснованность включения алло-ТГСК независимо от исходного уровня АН в алгоритм лечения *FLT3*-позитивных пациентов.

3.4 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. Достоверное двукратное уменьшение АН после ХТ (Рисунок 25) 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 ($t=1,9$; $p>0,05$).



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

Для выявления прогностически значимого порогового уровня АН мутации *FLT3*-ITD был выполнен ROC-анализ. Изучение общих связей между значениями порогового уровня АН и длительностью БРВ и ОВ в дебюте заболевания не дало достоверно значимых результатов ($p > 0,05$). Однако ROC-анализ полученных данных показал, что наибольшее прогностическое значение для оценки длительности БРВ имел пороговый уровень АН *FLT3*-ITD, равный 0,65 (количественное соотношение аллеля ITD к аллелю дикого типа).

Применение этого порогового значения дает достоверный результат при $p = 0,001$, (ДИ 95% 0,628-0,831), чувствительности 62,5%, специфичности 85,3% и площади под кривой (AUC)=0,730. Вместе с тем, прогностическое значение для оценки длительности ОВ имел уровень АН *FLT3*-ITD, равный 0,69, с достоверностью $p = 0,001$, при доверительном интервале [95% (ДИ) =0,579-0,815], чувствительности 82,6%, специфичности 76,3%, площади под кривой (AUC) =0,697.

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 26, 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 способствовала увеличению длительности ОВ. Так, в группе с *FLT3*-ITD^{высок} 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 26, Б). Проведение алло-ТГСК также не влияла на длительность БРВ и ОВ в группе пациентов с низкой АН *FLT3*-ITD ($p > 0,05$).

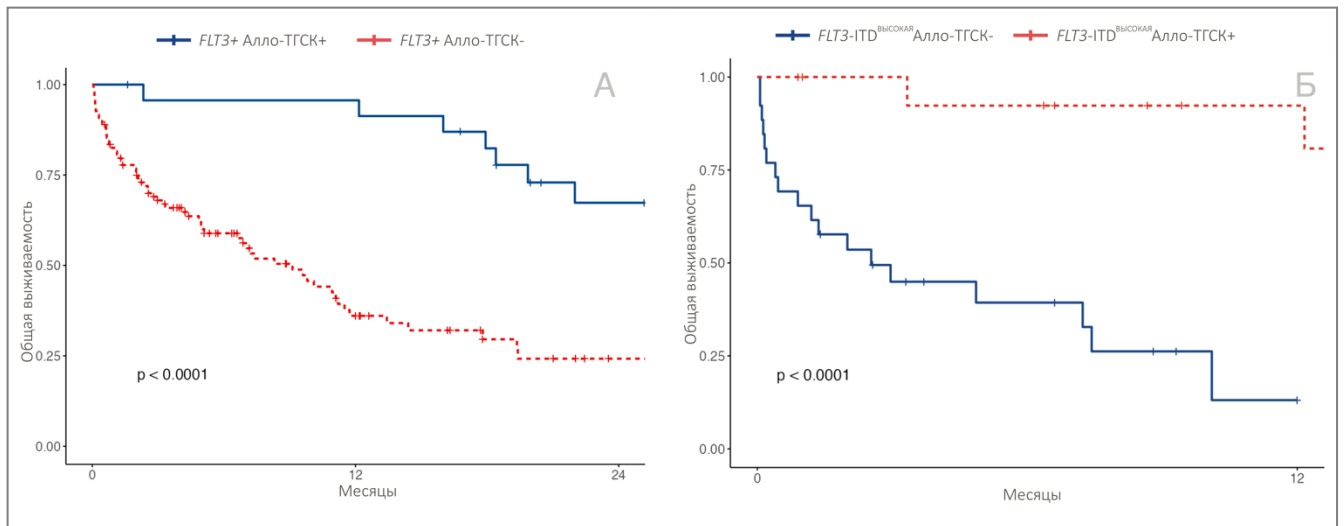


Рисунок 26 – Общая выживаемость пациентов с мутациями в гене *FLT3* (А) и величиной аллельной нагрузки (Б) в зависимости от проведения алло-ТГСК

Применение алло-ТГСК среди всех пациентов, независимо от мутационного статуса *FLT3*, не было связано с повышением БРВ ($p > 0,05$). Однако это лечение оказывало благоприятное влияние на длительность ОВ: медиана по этому параметру

не была достигнута в группе алло-ТГСК⁺ (n=42), (95% ДИ 26,9 – НД), а в группе алло-ТГСК⁻ (n=207) составила 18,5 мес. (95% ДИ 11,7-42,3) (p=0,0019) (Рисунок 27).

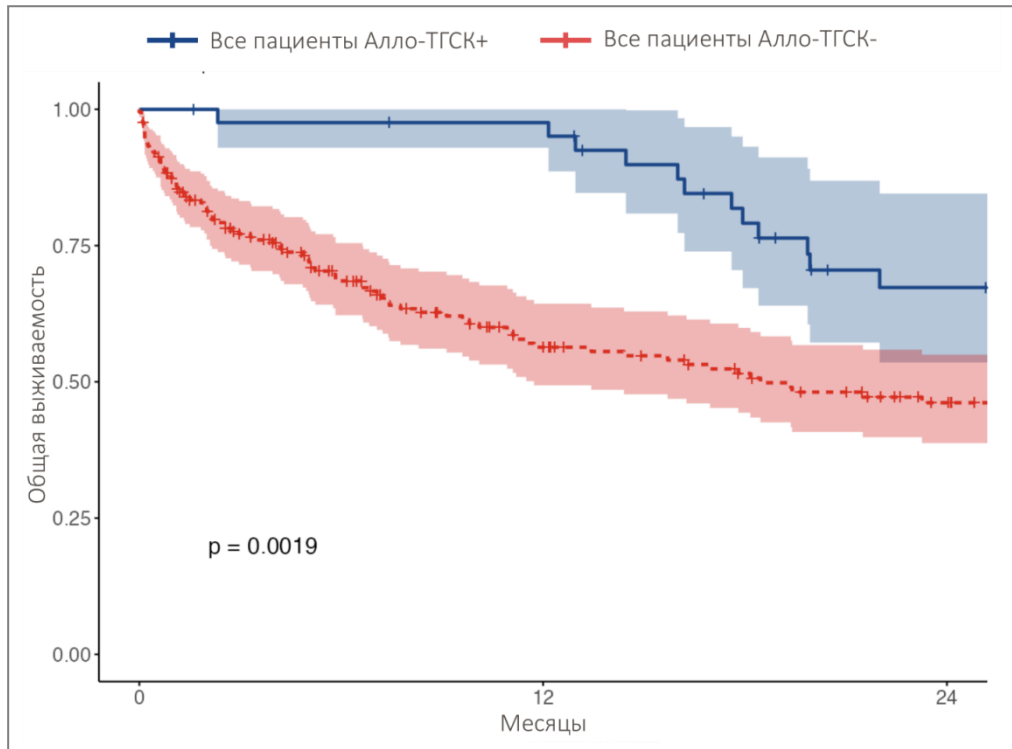


Рисунок 27 – Общая выживаемость в общей когорте пациентов ОМЛ в зависимости от проведения алло-ТГСК

3.5 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. У 7 пациентов в рецидиве и 4 больным секвенирование проводили в период ремиссии заболевания. Медиана возраста составила 61 (26-79) год (n=33), соотношение М:Ж было 1 к 2,7. У 52% (17/33) пациентов диагноз ОМЛ был верифицирован первично, у 48% (16/33) в результате трансформации из МДС – у 50% (8/16), из МПН – у 31% (5/16) и из хронического миеломоноцитарного лейкоза – у 19% (3/16).

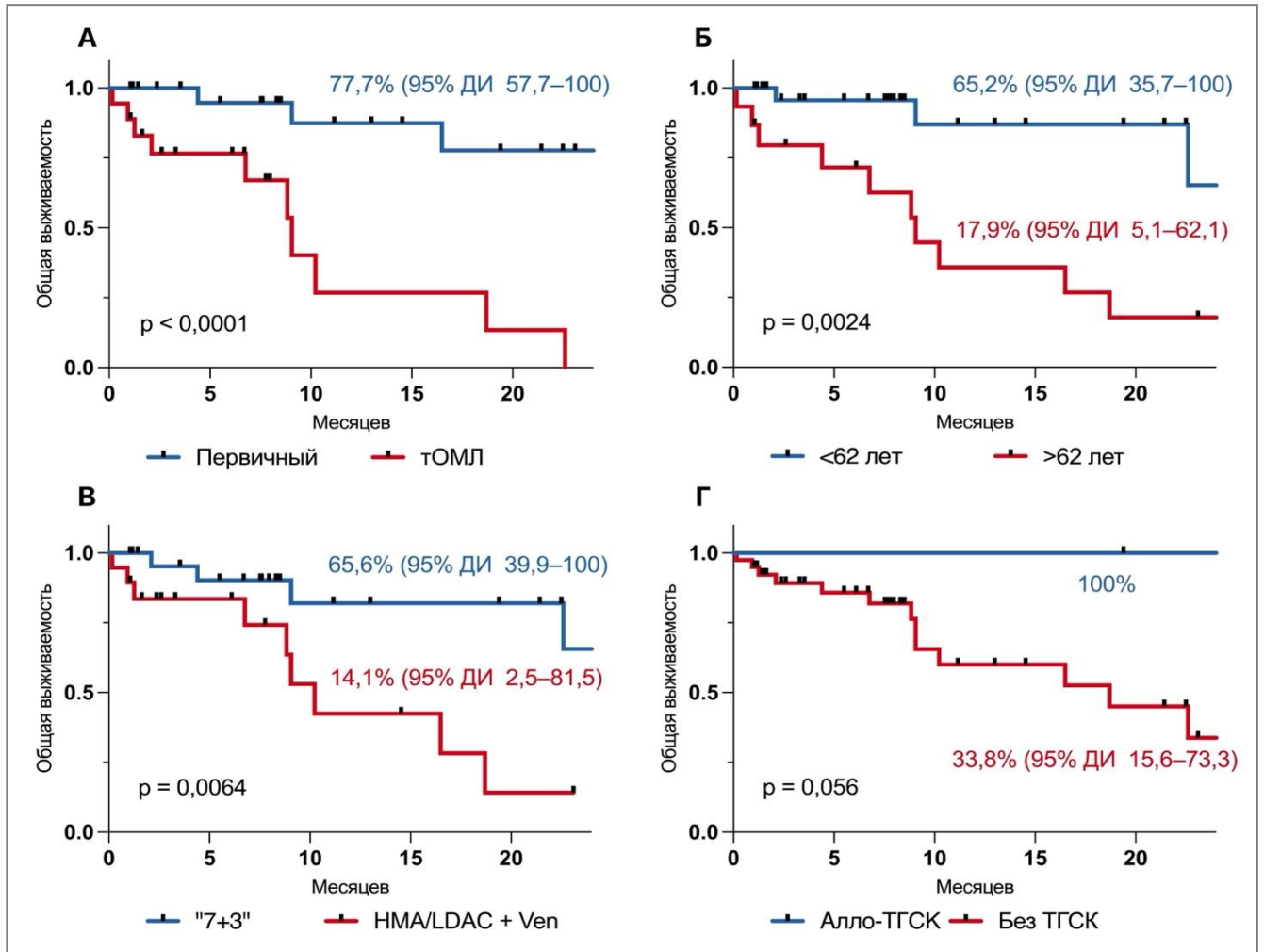
Анализ клинических данных выявил ряд факторов, влияющих на ОВ. Показано, что пациенты с первичным ОМЛ имеют более благоприятный прогноз по сравнению с пациентами, у которых ОМЛ трансформировался из других миелоидных неоплазий (тОМЛ), отношение рисков (hazard ratio, HR) составило 9,05 (95% ДИ 2,43-33,62), $p=0,001$. 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 продемонстрировало, 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 (венетоклакс в комбинации с гипометилирующими агентами или с низкими дозами цитарабина): 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 было 33,8% (95% ДИ 15,6-73,3), $p=0,056$.

Несмотря на это, другие клинические и биологические характеристики не показали значимого влияния на показатели ОВ. 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 ($p>0,3$). Аналогично, наличие мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* не оказало эффекта на ОВ ($p=0,68$ и $p=0,18$ соответственно).

Таким образом, важными прогностическими факторами, влияющими на выживаемость пациентов с ОМЛ, являются тип заболевания (*de novo* или трансформированный), возраст, вариант проводимой терапии и алло-ТГСК (Рисунок 28). Эти данные подтверждают важность комплексной оценки клинико-генетических характеристик при выборе тактики лечения и прогнозировании выживаемости у пациентов с ОМЛ.



А – в зависимости от варианта ОМЛ (первичный или трансформированный); Б – выживаемость в разных возрастных 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;

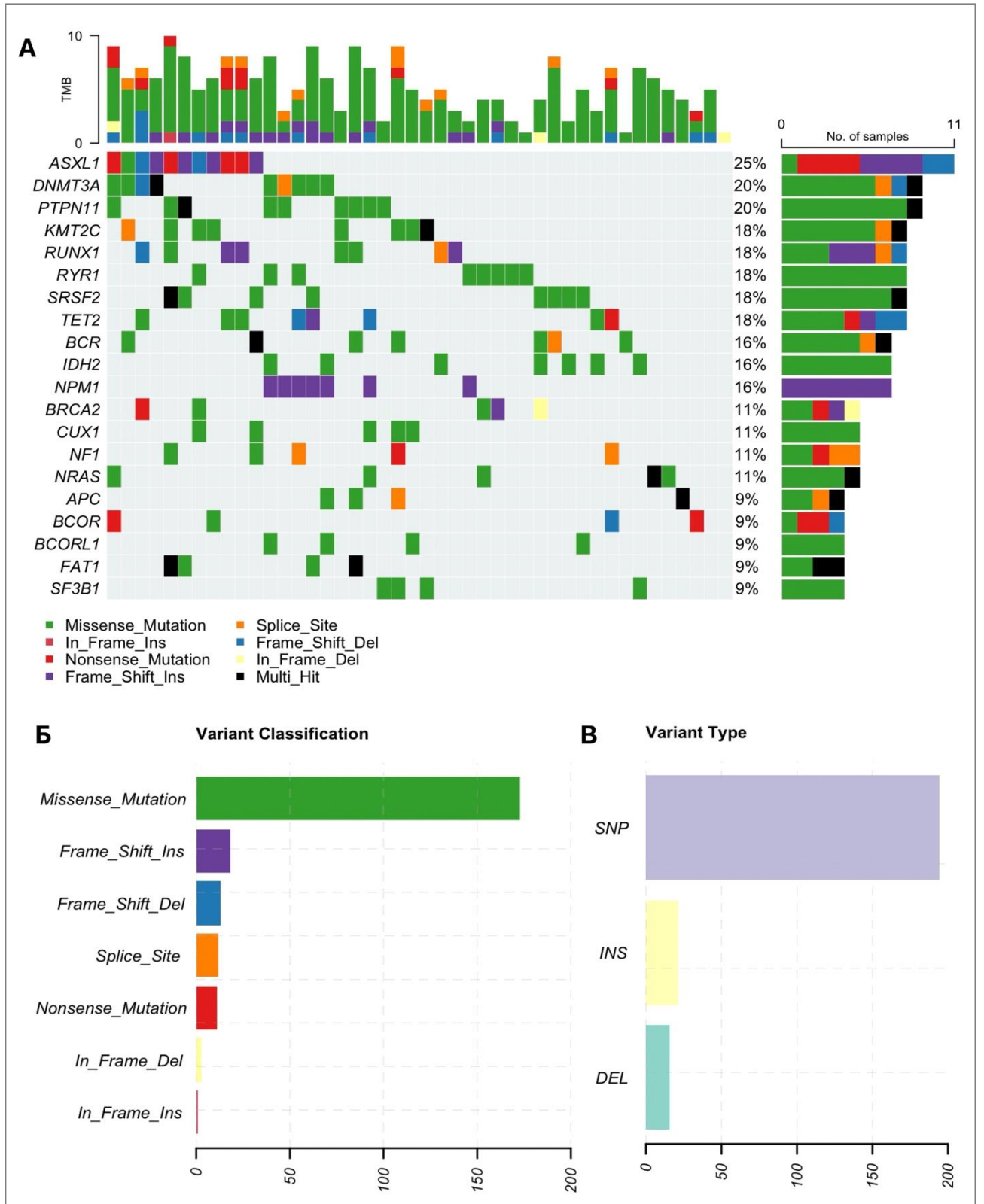
тОМЛ – трансформированный острый миелоидный лейкоз; HMA/LDAC + Ven – венетоклак в комбинации с гипометилирующими агентами или с низкими дозами цитарабина

Рисунок 28 – Результаты анализа 2-летней общей выживаемости

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%).

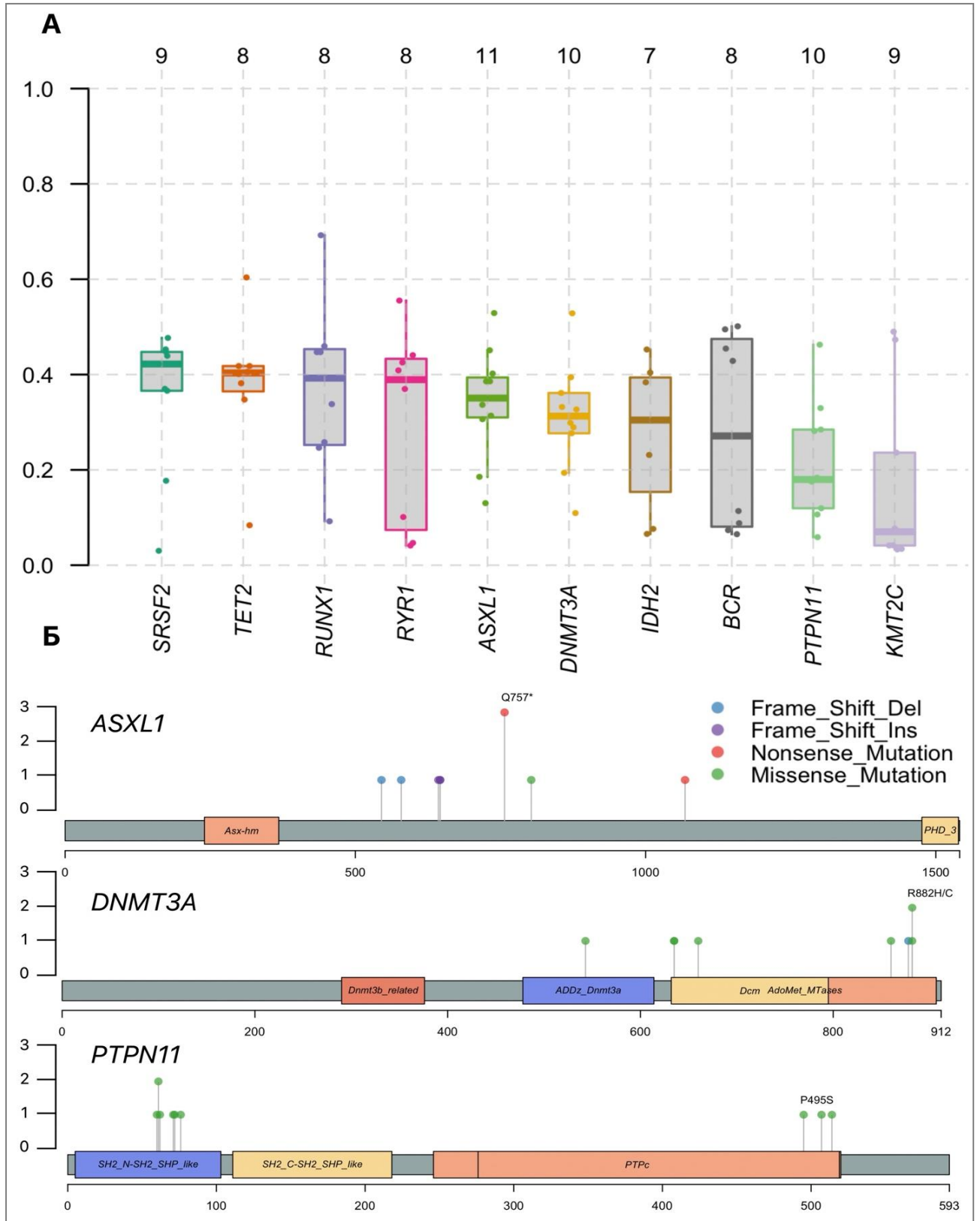
Распределение мутаций по варианту показало, что миссенс-мутации (missense mutation) были наиболее частыми 74,0% (174/235), за ними следовали мутации со сдвигом рамки считывания (frameshift mutation) 13,2% (31/235), мутации в сайтах сплайсинга (splice-site mutation) 5,1% (12/235), нонсенс-мутации (nonsense 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 29).

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) (Рисунок 30). В гене *ASXL1* преобладали мутации со сдвигом рамки считывания (55%) и нонсенс-мутации (36%). Для генов *DNMT3A*, *PTPN11* и *KMT2C* основными вариантами были миссенс-мутации: 80%, 100% и 78% соответственно. В гене *RUNX1* отмечается высокая частота мутаций со сдвигом рамки считывания (44%), а в гене *NPM1* данный вариант составляет 100% всех обнаруженных мутаций.



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 29 – Общая характеристика выявленных мутаций



А – клональный статус наиболее мутировавших генов (горизонтальная линия – медиана VAF, границы ящика – первый и третий квартили распределения VAF, усы – выбросы VAF значений); Б – варианты аминокислотных замен в структуре продукта исследуемого гена:

ASXL1, *DNMT3A* и *PTPN11* соответственно.

Рисунок 30 – Характеристика мутационного ландшафта

Анализ сопутствующих и взаимоисключающих мутаций (Рисунок 31) 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.

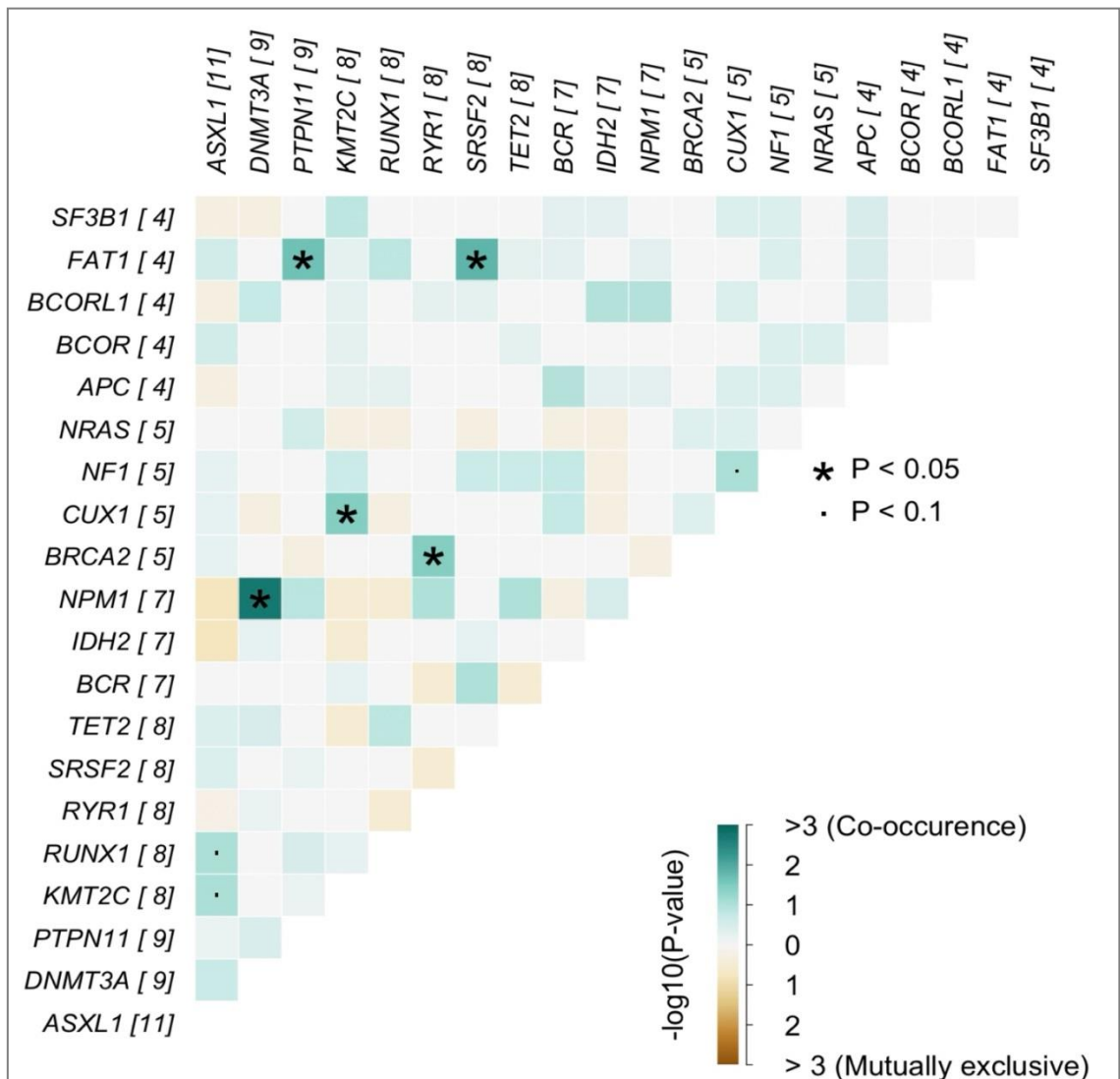


Рисунок 31 – График соматических взаимодействий с указанием сопутствующих и взаимоисключающих мутаций на основании результатов парного точного теста Фишера для каждой пары исследуемых генов.

Значения взаимодействия представлены в виде отрицательных десятичных логарифмов от p-уровня

Для выявления генов-драйверов ОМЛ был проведен анализ позиционной кластеризации мутаций с использованием функции oncodrive, основанной на алгоритме oncodrive CLUST [195]. Этот метод позволяет идентифицировать гены, в которых мутации имеют тенденцию к кластеризации в определенных функционально значимых областях, что является характеристикой драйверных генов. В результате анализа было выявлено шесть генов-драйверов ОМЛ: *IDH2*, *NPM1*, *NRAS*, *SRSF2*, *DNMT3A* и *EZH2*, расположенных в порядке убывания z-значений. Наибольшее z-значение было отмечено для генов *IDH2* ($z=5,5462$, $fdr=6,33 \times 10^{-8}$), где наблюдалась выраженная кластеризация мутаций в кодоне R140, известном своим влиянием на метаболизм клеток и ключевую роль в лейкозогенезе. Ген *NPM1* в кодоне W288 ($z=5,5462$, $fdr=6,33 \times 10^{-8}$) продемонстрировал абсолютную концентрацию мутаций в экзоне 12, что связано с нарушением ядерно-цитоплазматического транспорта. Мутации в гене *NRAS* ($z=5,5462$, $fdr=1,45 \times 10^{-8}$) были сконцентрированы в областях (кодон G13, экзон 2), отвечающих за активацию сигнального пути RAS-МАРК. Ген *SRSF2* ($z=4,4411$, $fdr=6,33 \times 10^{-5}$), ассоциированный с нарушением сплайсинга РНК, демонстрировал значительную кластеризацию в кодоне Р95. Ген *DNMT3A* ($z=2,3410$, $fdr=2,50 \times 10^{-2}$), участвующий в метилировании ДНК, показал кластеризацию мутаций в области R882, что согласуется с его ролью в регуляции эпигенетических механизмов. Наконец, в гене *EZH2* ($z=1,70$, $fdr=9,66 \times 10^{-2}$), связанном с модификацией хроматина, мутации преимущественно локализовались в его каталитической области (Рисунок 32).

Эти данные подтверждают ключевую роль указанных генов в патогенезе ОМЛ и подчеркивают необходимость их учета при выборе таргетной терапии.

Дополнительно была проведена оценка динамики клонов у двух пациентов (AML03 и AML31) в дебюте заболевания и в первом рецидиве. У пациента AML03 в дебюте заболевания доминировали клоны с мутациями в генах *KMT2D* p.D4072Lfs*34 (VAF 26,69%) и *ETV6* p.A377V (VAF 29,88%). На фоне проводимой терапии венетоклакс в комбинации с азацитидином и венетоклакс с кладрибином и МДЦ отмечалась их полная элиминация. В рецидиве заболевания у данного пациента отмечалось более высокое клональное разнообразие

с появлением новых клонов, несущих вероятно патогенные мутации в генах *ASXL1* p.I579* (VAF 18,54%) и *EZH2* p.M c.3G>C (VAF 6,90%), а также несколько клонов с мутациями неясной клинической значимости: *RYR1* p.E2157K (VAF 42,54%), *BRCA2* p.T1346S (VAF 3,88%), *KMT2C* p.L1538S (VAF 3,31%) и *CUX1* p.T1391A (VAF 3,16%).

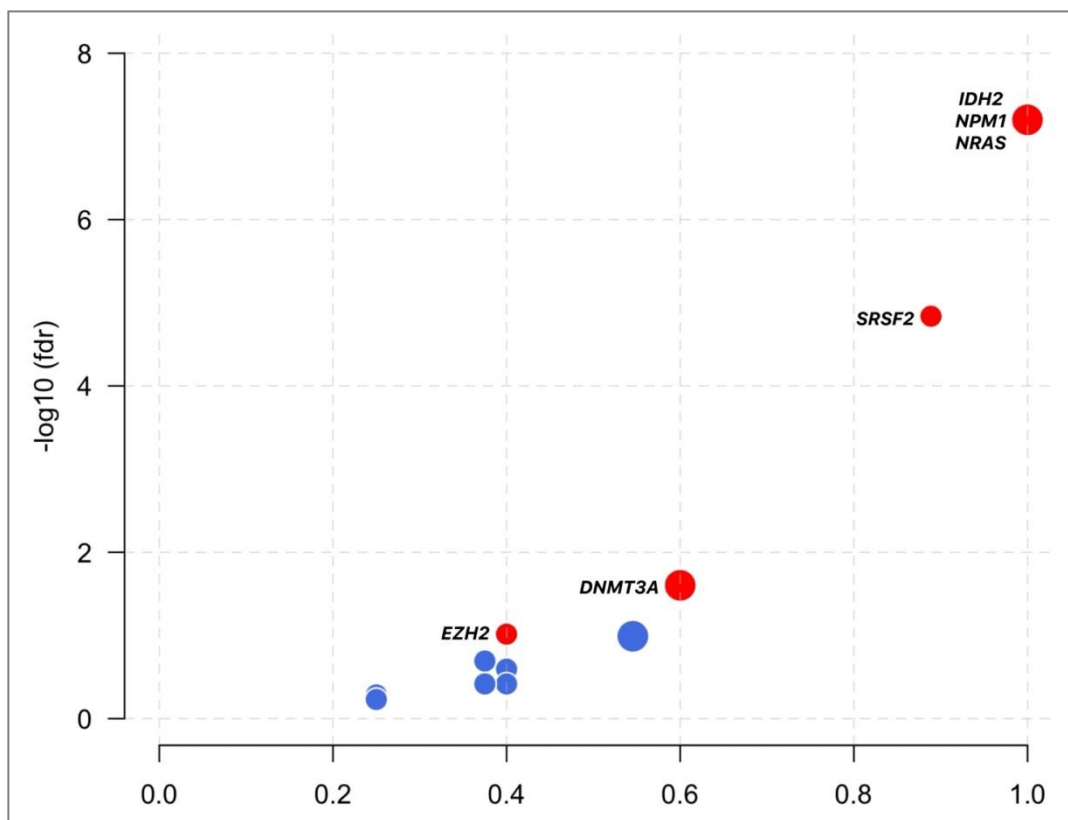
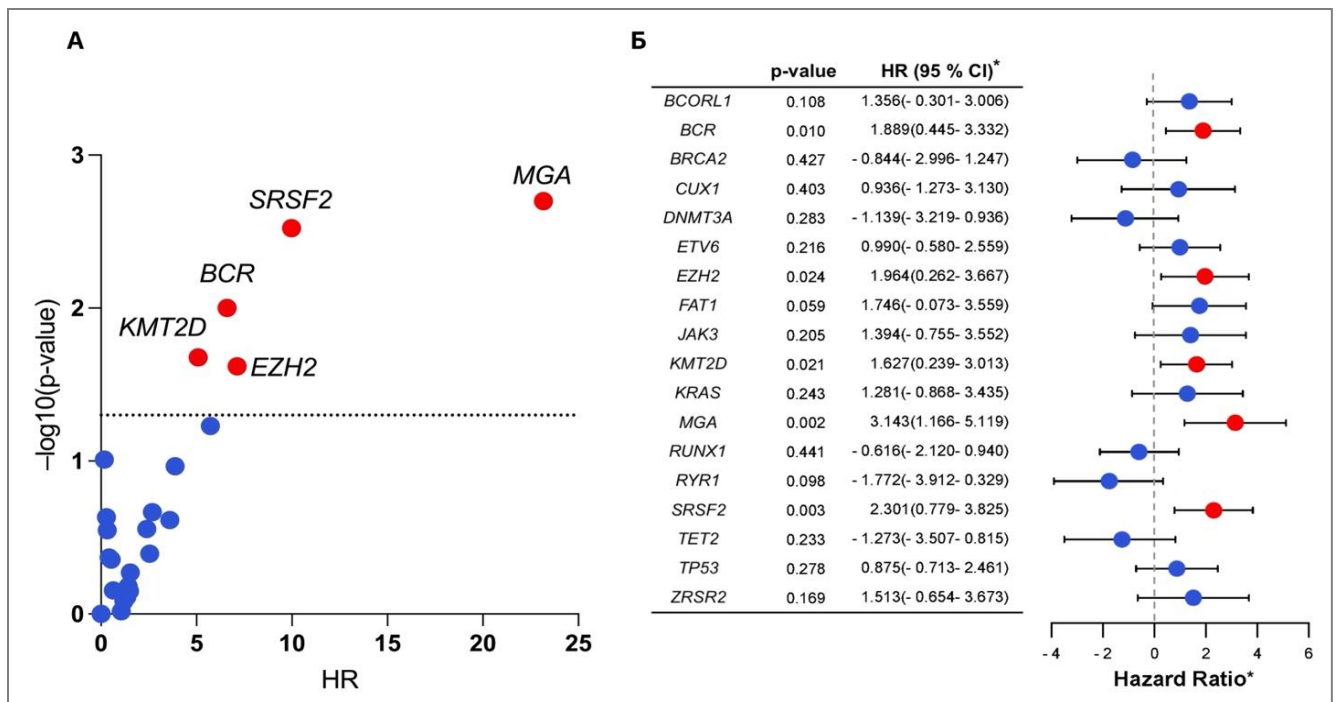


Рисунок 32 – Диаграмма рассеяния выявленных генов-драйверов ОМЛ
 Размер точек пропорционален числу кластеров, обнаруженных в гене. Ось X показывает долю мутаций, наблюдаемых в кластере, от общего числа мутаций в гене. Ось Y представляет собой отрицательный десятичный логарифм от р-значений, которые скорректированы с учетом множественных сравнений с использованием коэффициента ложного обнаружения (false discovery rate, FDR)

Анализ клональной динамики продемонстрировал влияние комбинированной иммунохимиотерапии на состав клонов: их полное подавление с последующим развитием рецидива, имеющего поликлональный характер. Это подчеркивает важность мониторинга клонального состава для оценки эффективности терапии и прогнозирования рецидива заболевания.

Для оценки клинической значимости идентифицированных мутаций в исследование 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* со значением HR равным 23,17, $p=0,002$, что свидетельствует о значительно повышенном риске летального исхода. Мутации в генах *SRSF2* (HR=9,98, $p=0,003$) и *BCR* (HR=6,61, $p=0,001$), а также в генах эпигенетической регуляции транскрипции – *KMT2D* (HR=5,09, $p=0,021$) и *EZH2* (HR=7,13, $p=0,021$) характеризуются неблагоприятным прогнозом. Результаты анализа представлены на Рисунке 33.



А – точечный график (dot plot). Ось X показывает значение отношения рисков (HR), ось Y – отрицательный десятичный логарифм от p-значения. Красным отмечены гены, мутации в которых ассоциированы с низкой общей выживаемостью; Б – лесной график (forest plot).

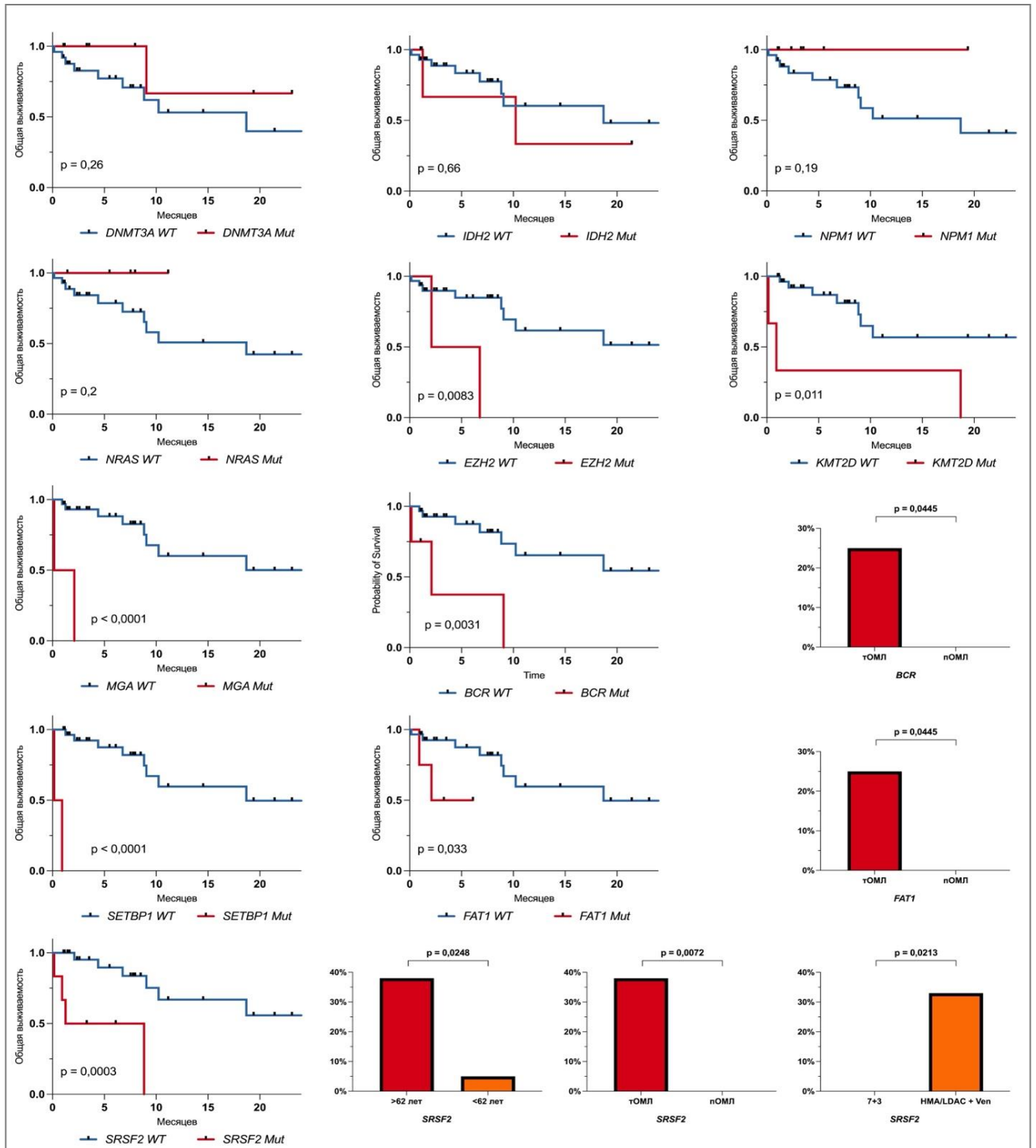
Указаны только гены, для которых p-значение по результатам регрессионного анализа было $\leq 0,5$. * – ось X представляет собой значение отношения рисков (HR), вычисленное в логарифмической шкале – $\ln(p\text{-value})$. HR – относительный риск; 95% CI – 95% доверительный интервал.

Рисунок 33 – Результаты однопараметрического регрессионного анализа Кокса

Интересно, что выявленные мутации в драйверных генах ОМЛ, такие как *IDH1*, *NPM1*, *NRAS* и *DNMT3A*, в данном анализе не продемонстрировали значимого влияния на длительность ОВ. Это может свидетельствовать о различиях в прогностической роли драйверных мутаций в зависимости от состава выборки, специфики терапии и некоторых других факторов.

В нашем исследовании мы проанализировали влияния мутаций в генах с учетом ранее выявленных клинико-лабораторных прогностических факторов, включая возраст, вариант ОМЛ (*de novo* или тОМЛ) и тип индукционной терапии. Такой подход позволил оценить независимое влияние молекулярных изменений на длительность ОВ.

Анализ показал, что мутации в гене *SRSF2* значимо чаще встречались у пациентов старшей возрастной группы (у 39% пациентов в возрасте >62 лет против 5% у пациентов в возрасте до 62 лет, $p < 0,0248$), при тОМЛ (39% против 0% при ОМЛ *de novo*, $p = 0,0007$) и чаще в группе индукционной терапии низкой интенсивности (33% против 0%, $p = 0,0213$). Это частично объясняет ассоциацию мутаций гена *SRSF2* с неблагоприятным прогнозом, поскольку возраст и тОМЛ изначально являются значимыми факторами риска. Подобные результаты были получены для мутаций в гене *BCR*, которые также чаще детектировались у больных с тОМЛ (25% против 0% у пациентов в возрасте до 62 лет) по сравнению с ОМЛ *de novo*, $p = 0,0445$. Мутации в генах *EZH2*, *KMT2D* и *MGA* не были связаны ни с одним из исследуемых клинических параметров. После учета клинических факторов (возраста, варианта ОМЛ и вида терапии) мутации в гене *SRSF2* (скорректированный HR=9,01, $p = 0,005$) сохранили свою статистическую значимость как независимые негативные прогностические факторы. В то же время значимость мутаций в гене *BCR* снизилась (скорректированный HR=2,71, $p = 0,185$) после учета клинических переменных, что указывает на важность их связи с возрастом пациентов. Таким образом, интеграция клинических и молекулярных данных позволила выделить независимые негативные прогностические факторы у пациентов с ОМЛ, которыми являются мутации в генах *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2* (Рисунок 34).

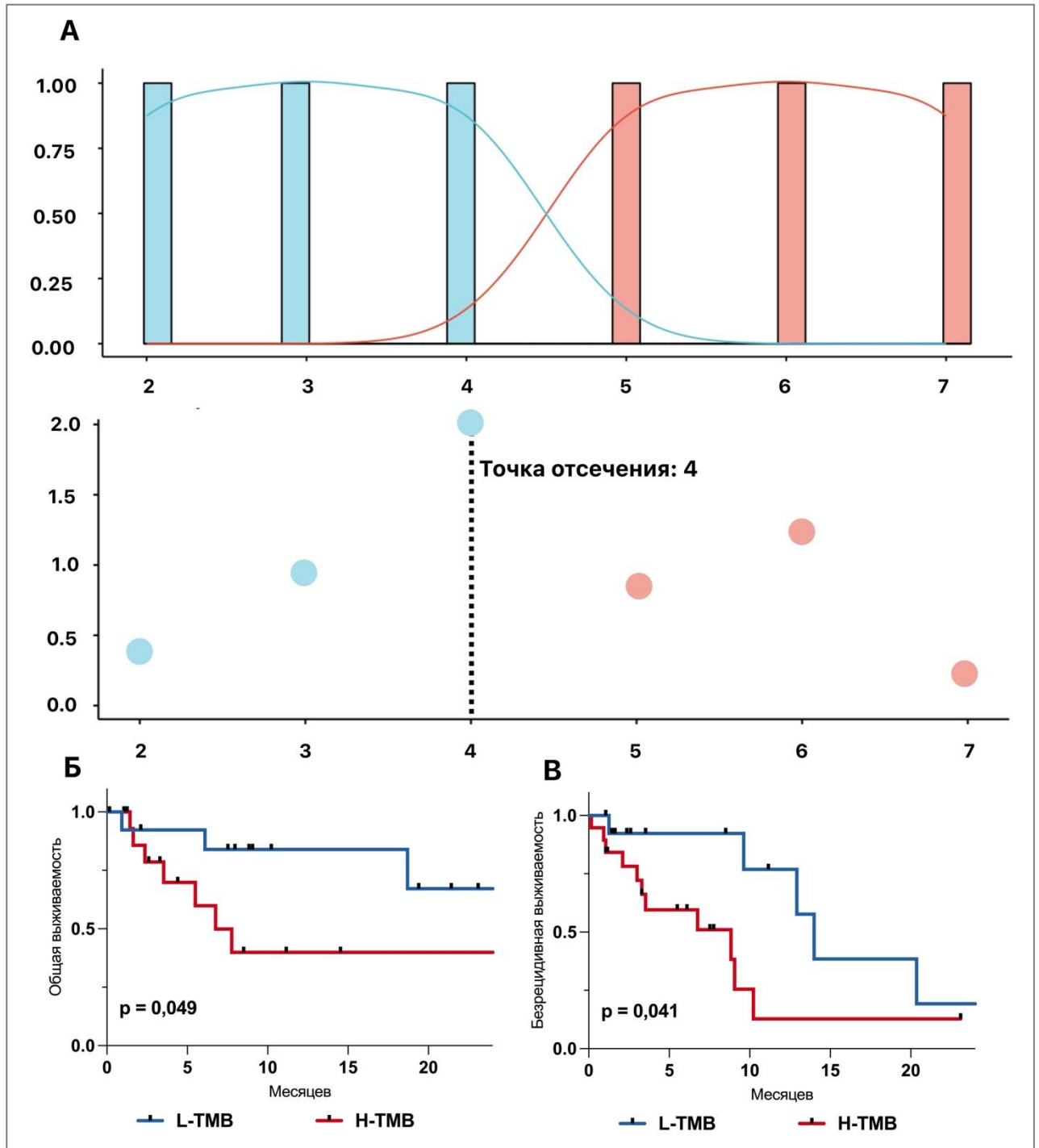


п-тОМЛ – соответственно первичный и трансформированный острый миелоидный лейкоз;
Mut – мутация; WT – вариант аллеля дикого типа.

Рисунок 34 – Результаты анализа 2-летней общей выживаемости в зависимости от мутационного статуса генов *BCR*, *DNMT3A*, *EZH2*, *FAT1*, *IGH2*, *KMT3D*, *MGA*, *NPM1*, *NRAS*, *SETBP1*, *SRSF2* и гистограммы распределения мутаций генов *BCR*, *FAT1*, *SRSF2* в зависимости от возраста, варианта ОМЛ и вида терапии

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 был определен пороговый уровень ОМН, который составил 4 мутации на образец. Пациенты с ОМН выше этого значения имели значимо худшую ОВ ($p=0,049$). Медиана ОВ пациентов с высокой ОМН составила 9,1 мес., а пациентов с низкой ОМН – 33,5 мес. Аналогичные результаты были получены в анализе 2-летней ВБР: 8,8 мес. против 14,0 мес. соответственно, $p=0,041$ (Рисунок 35). Это подтверждает важность ОМН как независимого прогностического фактора.

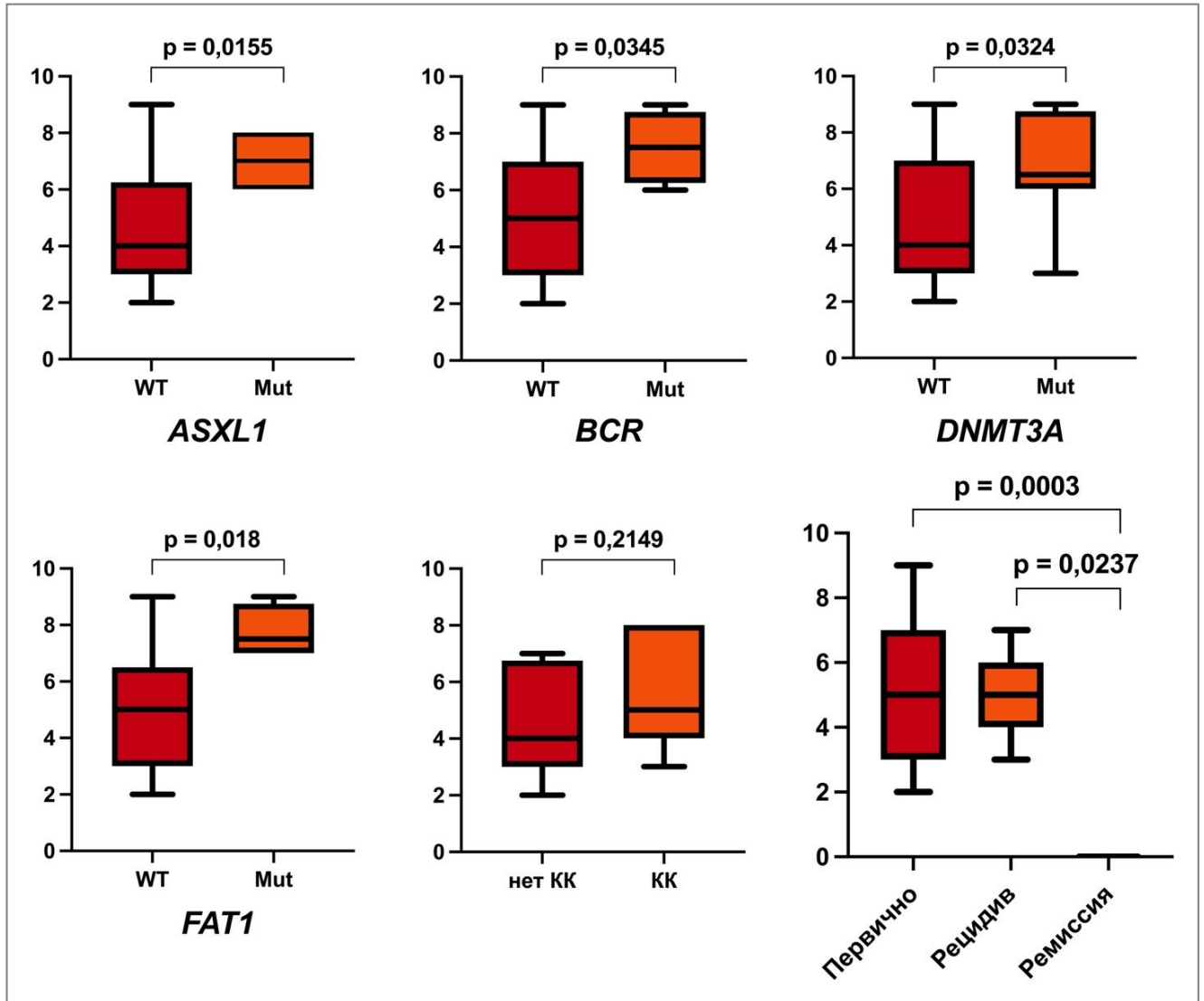
ОМН представляет собой совокупное количество соматических мутаций, выявляемых в геноме опухолевых клеток, вне зависимости от их функциональной значимости. Биологическая роль показателя ОМН заключается не в оценке степени патогенности мутаций, а в определении их потенциальной способности формировать неоантигены, экспрессирующиеся на поверхности опухолевых клеток. Даже мутации, не оказывающие прямого влияния на выживаемость клеток, могут способствовать повышению иммуногенности опухоли, что, в свою очередь, влияет на эффективность иммунного ответа и общий прогноз заболевания. Таким образом, проводился анализ ОМН всех мутаций, не только которые имели статистическое значимое влияние на показатели выживаемости.



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

Рисунок 35 – Прогностическая роль опухолевой мутационной нагрузки

Анализ ОМН в зависимости от мутационного статуса генов выявил некоторые различия (Рисунок 36).



KK – комплексный кариотип; Mut – мутация; WT – вариант аллеля дикого типа.

Рисунок 36 – Значение опухолевой мутационной нагрузки в зависимости от мутационного статуса генов *ASXL1*, *BCR*, *DNMT3A*, *FAT1*, комплексного кариотипа и периода, когда выполнялось NGS (в дебюте заболевания, в рецидиве или в ремиссии)

У пациентов с мутациями в генах *ASXL1*, *BCR*, *DNMT3A* и *FAT1* медианное значение ОМН было значительно выше, чем у носителей аллеля дикого типа данных генов. Для *ASXL1* медиана составила 7,0 мутаций на образец (6,0-8,0)

против 4,0 (2,0-6,0) у пациентов без мутаций, $p=0,0155$. Аналогичные результаты были получены для мутаций в гене *BCR*, где медиана ОМН достигла 7,5 (6,0-9,0) против 5,0 (2,0-9,0), $p=0,0345$. У больных с мутациями генов *DNMT3A* и *FAT1* медианы ОМН составили 6,5 (3,0-9,0) и 7,5 (7,0-9,0) соответственно, тогда как у пациентов без мутаций в этих генах значения были существенно ниже 4,0 (2,0-9,0), $p=0,0324$ и 5,0 (2,0-9,0), $p=0,018$ соответственно. Это подчеркивает связь повышенной мутационной нагрузки с определенными молекулярными изменениями.

Интересно, что наличие или отсутствие КК не влияло на уровень ОМН: медианные значения составили 5,0 (3,0-8,0) у пациентов с КК и 4,0 (2,0-7,0) у пациентов без него, $p=0,2149$. У пациентов в ремиссии, исследованных с помощью NGS, значимых мутаций обнаружено не было, что согласуется с минимальной опухолевой активностью в этой фазе заболевания. Более того, анализ ОМН у пациентов в дебюте заболевания и в рецидиве показал отсутствие статистически значимых различий: медиана составила 5,0 мутаций (2,0-9,0) в дебюте и 5,0 мутаций (3,0-7,0) в рецидиве, $p=0,9533$. Это позволяет предположить, что динамика мутационной нагрузки в ходе заболевания определяется преимущественно молекулярными характеристиками, а не фазой заболевания.

Таким образом, были выявлены значимые клинические и молекулярные прогностические факторы ОВ у пациентов с ОМЛ. Неблагоприятными клиническими предикторами ОВ оказались пожилой возраст, тОМЛ, а также проведение индукционной терапии низкой интенсивности. Среди молекулярных изменений значительное негативное влияние на прогноз оказали мутации в генах *BCR*, *EZH2*, *FAT1*, *KMT2D*, *MGA*, *SETBP1* и *SRSF2*, часть из которых ассоциировалась с повышенной ОМН. У пациентов в ремиссии мутации не выявлялись, а ОМН оставалась неизменной между дебютом заболевания и рецидивом.

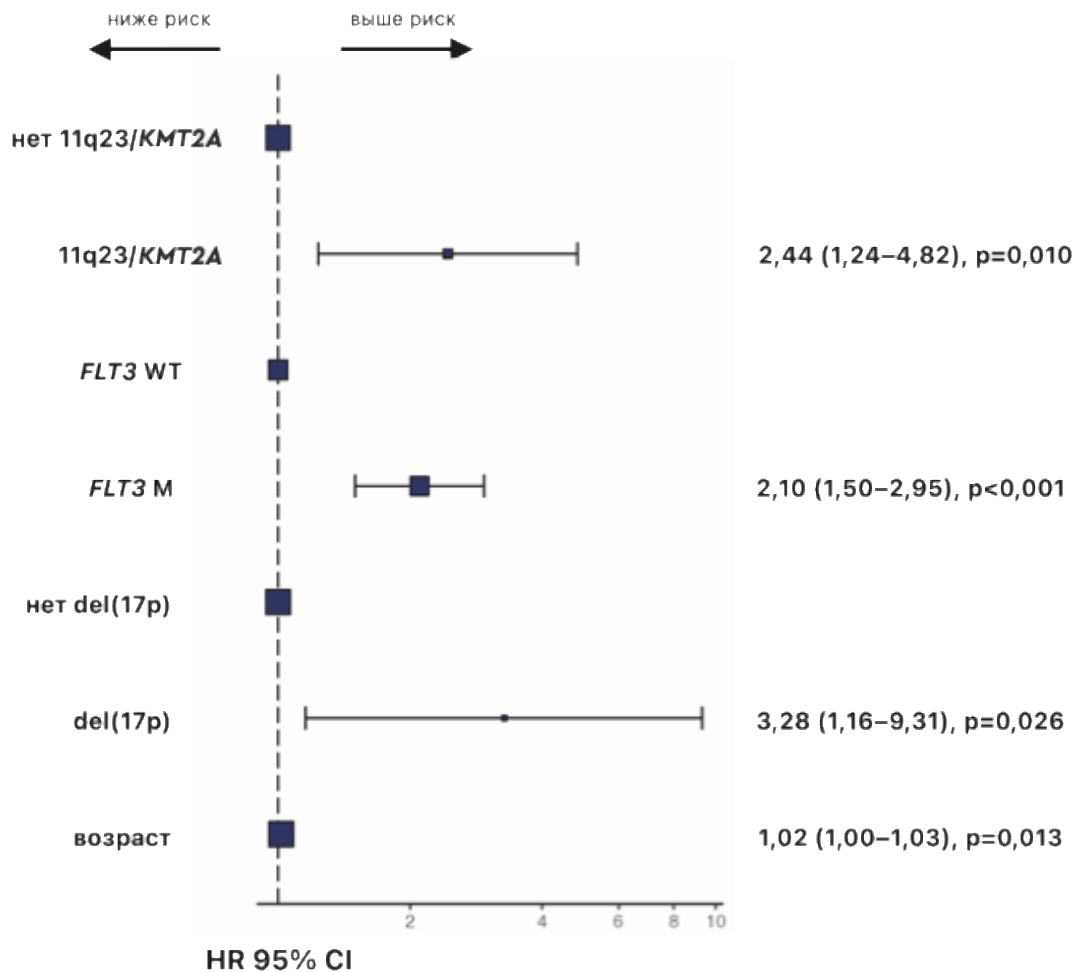
3.6 Многофакторный анализ независимых клинических и молекулярно-генетических факторов прогноза при остром миелоидном лейкозе

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. Такой подход позволял минимизировать влияние смешивающих факторов и выделить параметры, обладающие самостоятельной прогностической значимостью. Из анализа были исключены пациенты с ОПМ (n=26), а также больные с первичным диагнозом МДС, МПН или МДС/МПН (n=30), что обеспечивало большую клиническую однородность исследуемой когорты.

В окончательную многофакторную модель были включены 240 пациентов, у которых за период наблюдения зафиксировано 146 летальных исходов. 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), что подчеркивает клиническую значимость возрастного фактора даже при учете молекулярно-генетического профиля заболевания. 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 37).



M – мутация; OMH – опухолевая мутационная нагрузка; WT – вариант аллеля дикого типа.

Рисунок 37 – Forest plot многофакторной регрессионной модели Кокса для общей выживаемости у пациентов с острым миелоидным лейкозом после исключения больных с ОПЛ и первичными МДС/МПН

Представлены отношения рисков (HR) с 95% доверительными интервалами

В целом построенная модель обладала умеренной дискриминационной способностью (C-index 0,643) и была статистически значимой по результатам теста отношения функций правдоподобия ($\chi^2=32,27$; $p<0,001$), подтверждая совокупный вклад включенных переменных в прогноз ОБ. Проверка предположения пропорциональности рисков в целом не выявила выраженных

нарушений, хотя пограничная значимость глобального теста указывает на возможную временную вариабельность эффектов отдельных факторов и требует осторожной интерпретации результатов.

С целью определения наиболее значимых биологических предикторов БРВ и ОВ были построены многофакторные регрессионные модели пропорциональных рисков Кокса, 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 (Таблица 12).

Таблица 12 – Результаты регрессионного анализа Кокса

Предиктор	Однофакторный		Многофакторный	
	HR (95% ДИ)	p	HR (95% ДИ)	p
БРВ				
тОМЛ	4,29 (1,63-11,27)	0,003	4,65 (1,48-14,57)	0,008
ТМВ	2,82 (1,18-6,70)	0,019	13,32 (2,79-63,51)	0,001
<i>ASXL1</i>	1,11 (0,43-2,84)	0,834	0,23 (0,05-0,98)	0,046
<i>IDH2</i>	1,76 (0,67-4,65)	0,255	4,90 (1,37-17,52)	0,014
<i>KMT2D</i>	4,62 (1,30-16,45)	0,018	5,11 (1,07-24,38)	0,041
ОВ				
Возраст	1,05 (1,00-1,10)	0,039	1,06 (1,01-1,12)	0,022
ОМН	2,59 (0,90-7,48)	0,079	4,35 (1,41-13,40)	0,010
<i>DNMT3A</i>	0,20 (0,03-1,53)	0,121	0,06 (0,01-0,50)	0,010
Примечание – тОМЛ – трансформированный острый миелоидный лейкоз; HR – отношение рисков; ОМН – опухолевая мутационная нагрузка (≤ 5 – низкая и > 5 – высокая).				

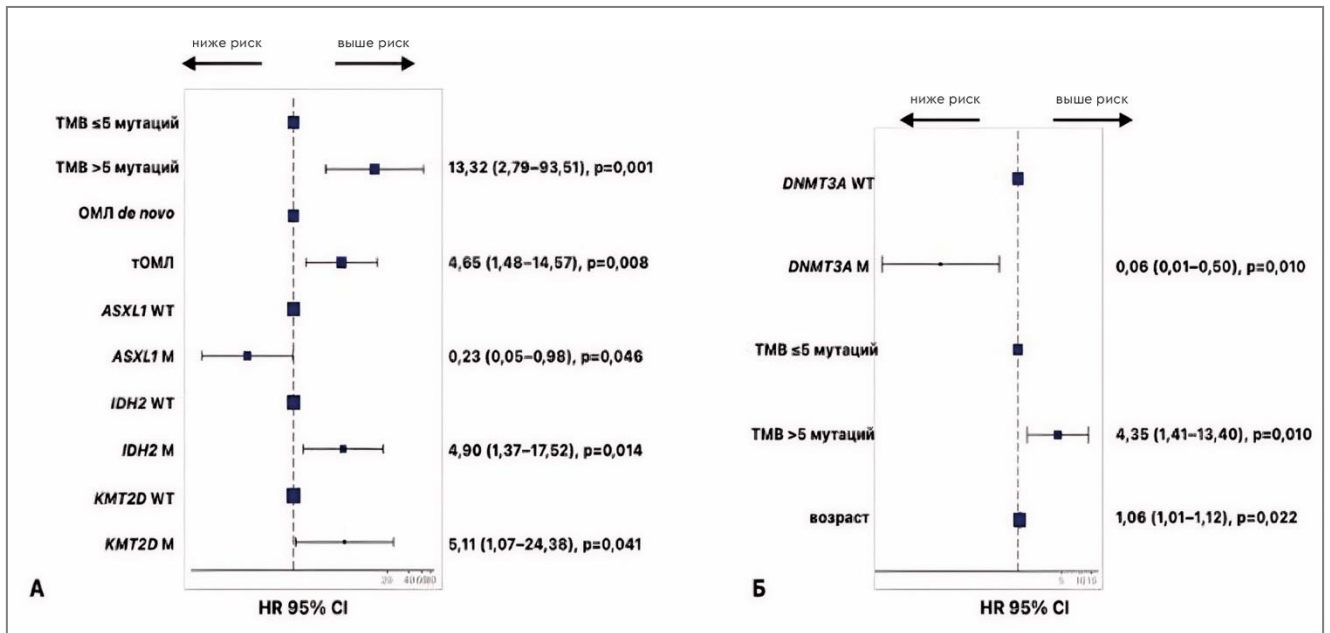
По результатам однофакторного анализа мутация гена *IDH2* также не связана с неблагоприятным исходом ОМЛ, что может говорить о конфаундинг-эффекте.

После корректировки на ОМН и другие характеристики заболевания данные мутации продемонстрировали независимую ассоциацию с БРВ, что подчеркивает сложное взаимодействие молекулярных нарушений в патогенезе ОМЛ.

В однофакторном анализе наблюдалась тенденция к снижению риска смерти у пациентов с мутацией *DNMT3A* – HR =0,20 (95% ДИ 0,03-1,53), однако данный эффект не достиг статистической значимости ($p=0,121$). Напротив, высокая ОМН (≥ 5 мутаций на образец) демонстрировала неблагоприятное влияние на прогноз, но также на уровне тенденции (HR=2,59, $p=0,079$). Возраст оказался статистически значимым фактором риска, ассоциированным с увеличением вероятности летального исхода по мере его возрастания. 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 38).

Обе модели продемонстрировали высокую дискриминационную способность (C-index $0,817\pm 0,061$ и $0,847\pm 0,046$) и были статистически значимыми (Likelihood ratio test: $\chi^2=24,79$; $p<0,001$ и $\chi^2=18,47$; $p<0,001$) соответственно в моделях БРВ и ОВ. Ни один из включенных предикторов не нарушает предположение о пропорциональных рисках: p (global) в моделях БРВ и ОВ составили 0,1034 и 0,3756 соответственно.

Полученные результаты важны с точки зрения определения прогноза, однако важно критично оценивать значения HR, поскольку анализ проводился на ограниченной выборке с небольшим количеством событий (23 и 16 соответственно в анализе БРВ и ОВ), а доверительные интервалы имеют широкий диапазон значений.



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

3.7 Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острых миелоидных лейкозов

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 цитогенетика, 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 принципиально является важным в выборе интенсивности терапии. Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров ОМЛ представлен на Рисунке 39.

Проведённое исследование, направленное на изучение эволюции генетических маркеров в прогнозе ОМЛ, позволило комплексно оценить значение определенных мутаций, их комбинацию, величину АН, а также влияние данных молекулярных характеристик на клинико-гематологические параметры, эффективность терапии и выживаемость пациентов.

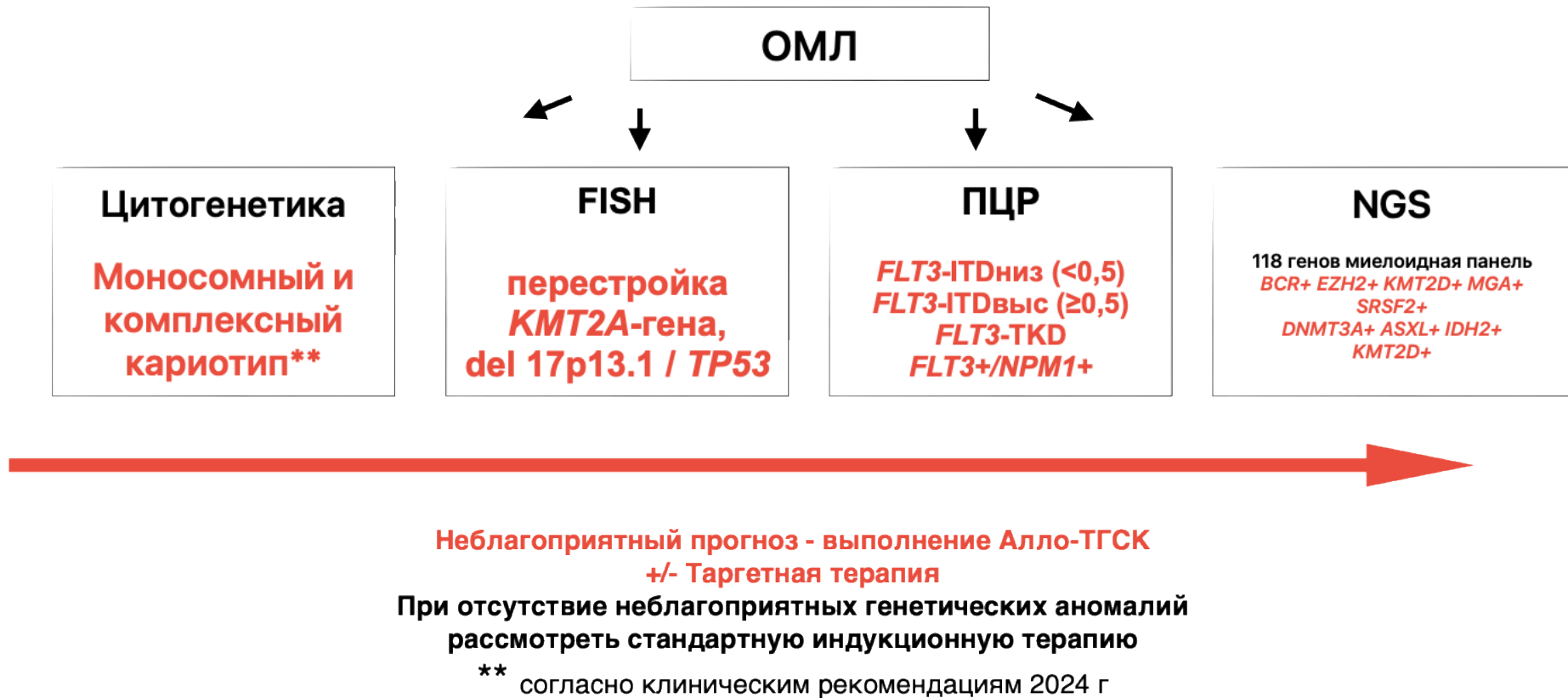
На этапе ПЦР диагностики выделены 3 основные прогностические группы: *NPM1*⁺, *FLT3*⁺ (ITD и TKD), и *NPM1*⁺/*FLT3*⁺. В последующем выделены 2 подгруппы, в зависимости от исходных уровней АН мутации *FLT3*-ITD⁺: с низкой АН (<0,5) и высокой АН (≥0,5).

Пациенты молодого возраста, имеющие удовлетворительный соматический статус, рассматривались кандидатами для проведения интенсивной терапии, предусматривающей стандартные индукционные и консолидационные курсы. Определение *FLT3*-позитивного статуса являлось показанием к проведению алло-ТГСК в ремиссии заболевания. Выявленные закономерности подтверждают необходимость индивидуализации лечебной тактики в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3*, а также сочетания с мутацией *NPM1*.

По результатам многофакторного анализа выделены неблагоприятные факторы влияющие на показатели ОБ: del(17p) и перестройка гена 11q23/*KMT2A*, выявленные методом FISH исследования, на БРВ – мутации в генах *ASXL1*, *IDH2*, *KMT2D* определяемые при NGS.

По результатам однопараметрического регрессионного анализа Кокса в ходе NGS диагностики выделены ключевые мутации в генах, обладающие неблагоприятным воздействием на длительность ОБ: *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2*.

Разработанный нами алгоритм направлен на реализацию принципов персонализированной медицины в лечении пациентов с ОМЛ и предусматривает индивидуальный выбор различных терапевтических опций – от применения таргетных препаратов, в том числе ингибиторов *FLT3*, до проведения алло-ТГСК.



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

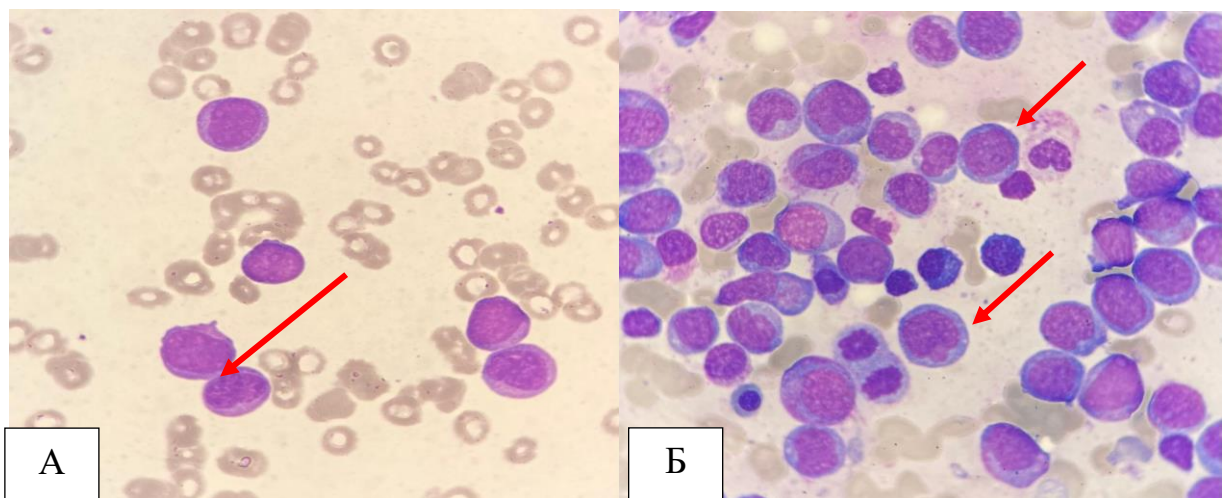
Рисунок 39 – Алгоритм диагностики ключевых неблагоприятных маркеров острых миелоидных лейкозов

В качестве примера применения данного алгоритма приводим клиническое наблюдение № 1. Больная Т.Л.А., 1964 г. р., в апреле 2016 г. (в возрасте 51 года) установлен диагноз острого миелонобластного лейкоза (М4-вариант), промежуточный риск по ELN 2017 (*FLT3-ITD^{выс}NPM1⁺*). Динамика показателей гемограммы и миелограммы подробно показана в Таблице 13.

Таблица 13 – Показатели периферической крови и костного мозга пациента Т.Л.А. на фоне специфической химиотерапии

Лабораторные показатели	Гемограмма	
	в дебюте заболевания 15.04.2016	клинико-гематологическая ремиссия 27.05.2016
Гемоглобин	122 г/л	125 г/л
Эритроциты	$4,56 \times 10^{12}/л$	$4,31 \times 10^{12}/л$
Лейкоциты	$43 \times 10^9/л$	$7,1 \times 10^9/л$
Тромбоциты	$172 \times 10^9/л$	$245 \times 10^9/л$
Бластные формы	86%	0,8%
	Миелограмма	
Бластные формы	80,8%	1,2%

Морфологическая картина периферической крови и костного мозга в дебюте заболевания представлена на Рисунке 40.



А – мазок периферической крови; Б – мазок пунктата костного мозга.

Стрелкой указан миелобласт.

Рисунок 40 – Морфологическая картина мазков в дебюте ОМЛ у пациента Т.Л.А.

Дополнительные клеточные маркеры в дебюте заболевания были следующими:

- цитохимическое исследование: миелопероксидаза – 30%+, липиды – 46%+, неспецифическая эстераза – 49%+, ингибирование фторидом натрия – полное;
- цитогенетическое исследование костного мозга: нормальный кариотип, 46 [XX];
- молекулярно-генетическое исследование крови: *FLT3-ITD*^{выс} (величина АН 1,250) и *NPM1* – обнаружены;
- иммунофенотипирование костного мозга: бласты 91%, миелоидный фенотип: CD34 - HLA-DR++ CD38++ cуMPO++ CD33++ CD117++ CD14 - CD64++ CD4++ CD7–.

Пациентке проводилось следующее поэтапное лечение.

1. Индукция ремиссии №1 с 25.04 – 01.05.16 «7+3»: цитарабин 100 мг/м² в/в суточное введение с 1-го по 7-й день; идарубицин 12 мг/м² в/в с 1-го по 3-й день.

2. Консолидация №1 с 31.05 – 04.06.16 по протоколу «HiDAC»: цитарабин 3 г/м² × 2 раза каждые 12 часов в/в на 1-й, 3-й, 5-й дни.

3. Консолидация №2 с 08.07 – 03.10.16, согласно протоколу «MiDAC»: цитарабин 1 г/м² × 2 раза каждые 12 часов в/в на 1-й, 3-й, 5-й дни.

4. Поддерживающая терапия: цитарабин 500 мг в/в + 6-меркаптопурин (500 мг внутрь) с 17.11 – 12.2016.

Учитывая средний возраст больной, а также наличие специфически неблагоприятного маркера *FLT3-ITD*^{выс} в дебюте заболевания, 18.03.2017 была проведена неродственная алло-ТГСК в качестве консолидации достигнутой ремиссии. Оценка уровней АН *FLT3-ITD* проводилась на фоне различных этапов лечения (Рисунок 41).

У больной на 01.06.2021 сохраняется ремиссия заболевания. Продолжено наблюдение у гематолога по месту жительства.



Рисунок 41 – Динамика аллельной нагрузки FLT3-ITD на различных этапах лечения пациента Т.Л.А.

В качестве примера динамики АН на фоне применения гилтеритиниба (ингибитор тирозинкиназы FLT3) приводим клиническое наблюдение № 2.

Больной К.С.И., мужчина, 1950 г. р. (68 лет на момент диагностики), у которого установлен диагноз «ОМЛ с диспластическими изменениями» (*FLT3-TKD⁺, NPM1⁺*). Благоприятный риск, согласно ELN 2017. Динамика показателей гемограммы и миелограммы представлена в Таблице 14.

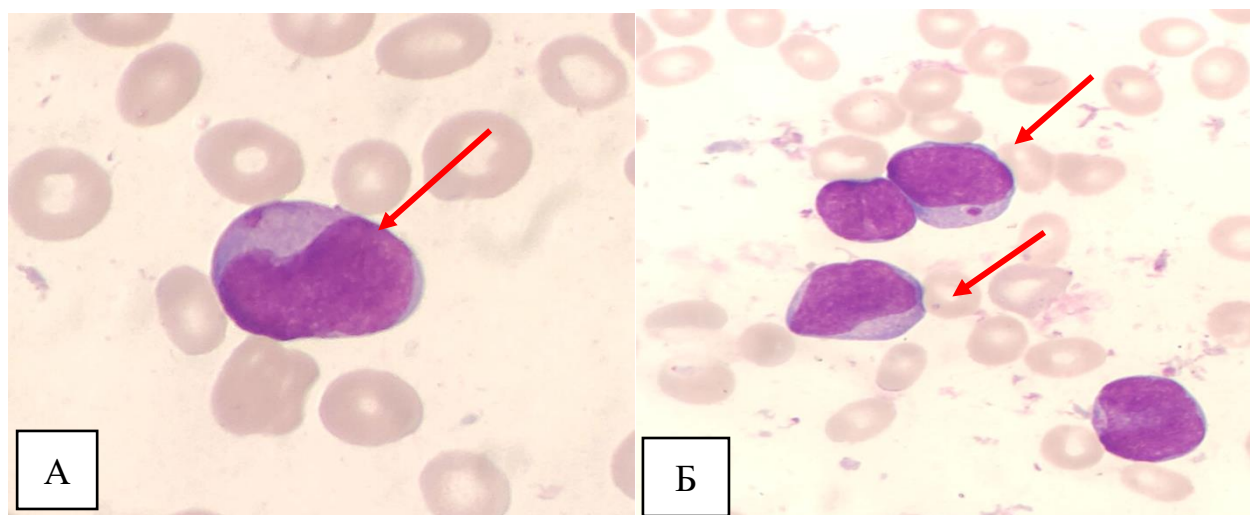
Таблица 14 – Показатели периферической крови и костного мозга пациента К.С.И. на фоне специфической химиотерапии

Лабораторные показатели	Гемограмма			
	в дебюте заболевания 21.03.2018	ремиссия-1 с неполным восстановлением гемопоза 08.05.2018	рецидив-1 09.10.2018	ремиссия-2 с неполным восстановлением гемопоза 15.11.2018
Гемоглобин	56 г/л	108 г/л	76 г/л	88 г/л
Эритроциты	$1,82 \times 10^{12}/л$	$2,02 \times 10^{12}/л$	$2,29 \times 10^{12}/л$	$1,92 \times 10^{12}/л$

Продолжение таблицы 14

Лабораторные показатели	Гемограмма			
	в дебюте заболевания 21.03.2018	ремиссия-1 с неполным восстановлением гемопоза 08.05.2018	рецидив-1 09.10.2018	ремиссия-2 с неполным восстановлением гемопоза 15.11.2018
Лейкоциты	$4,3 \times 10^9/\text{л}$	$1,4 \times 10^9/\text{л}$	$34,9 \times 10^9/\text{л}$	$3,0 \times 10^9/\text{л}$
Тромбоциты	$92 \times 10^9/\text{л}$	$86 \times 10^9/\text{л}$	$34,35 \times 10^9/\text{л}$	$39,78 \times 10^9/\text{л}$
Бластные формы	21%	0%	90%	0%
Миелограмма				
Бластные формы	39,3%	2%	58%	1,2%

Морфологическая картина периферической крови и костного мозга в дебюте заболевания представлена на Рисунке 42.



А – мазок периферической крови; Б – мазок пунктата костного мозга.

Стрелкой указан миелобласт.

Рисунок 42 – Морфологическая картина мазков в дебюте ОМЛ (пациент К.С.И.)

Лабораторные маркеры ОМЛ в дебюте заболевания (март 2018 г.):

- цитогенетическое исследование костного мозга: нормальный кариотип, 46, XY;
- молекулярно-генетическое исследование крови: *FLT3*-TKD – обнаружена;
- FISH исследование костного мозга: делеция локусов 7q22/7q31, моносомия 7 хромосомы, инверсия 3 хромосомы *inv(3)(q21q26)*, транслокация *t(3;3)(q21;q26)* не выявлены;
- иммунофенотипирование костного мозга: бластные клетки миелоидной природы со следующим фенотипом: CD34+ HLA-DR+ CD38+ СУТМРО+ CD117+ CD13+ CD33+ CD11B+ CD36+. Слабая коэкспрессия CD7+.

Пациенту проводилась следующая терапия.

1. Индукция ремиссии №1 с 10.04.18 – 16.10.18: «7+3» цитарабин (100 мг/м², в/в суточное введение с 1-го по 7-й дни; идарубицин (12 мг/м² в/в – с 1-го по 3-й день). Оценка эффекта терапии: ПР с неполным восстановлением гемопоэза от 08.05.18.

2. В связи с нарастанием сердечной недостаточности и комплексом осложнений начата поддерживающая терапия ГА: азацитидин 75 мг/м² п/к с 1-го по 7-й день. Проведены 3 цикла терапии с интервалом 5-6 недель. Длительность ремиссии составила 5 месяцев.

3. В дальнейшем был диагностирован ранний рецидив от 09.10.18 со следующими лабораторными данными:

- цитогенетическое исследование костного мозга: нормальный кариотип, 46 [XY];
- молекулярно-генетическое исследование крови: *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, *NPM1* – обнаружены.

Пациенту была проведена терапия раннего рецидива.

1. Циторедукция (гидроксикарбамид – 50 мг/кг) – с 15.10.18; инфузионная, гемотрансфузионная терапия, профилактика синдрома лизиса опухоли, профилактика фебрильной нейтропении.

2. Монотерапия: гилтеритиниб, 120 мг/сутки с 18.10.2018.

Динамика уровней АН *FLT3-ITD* на фоне применения гилтеритиниба представлена на Рисунке 43.

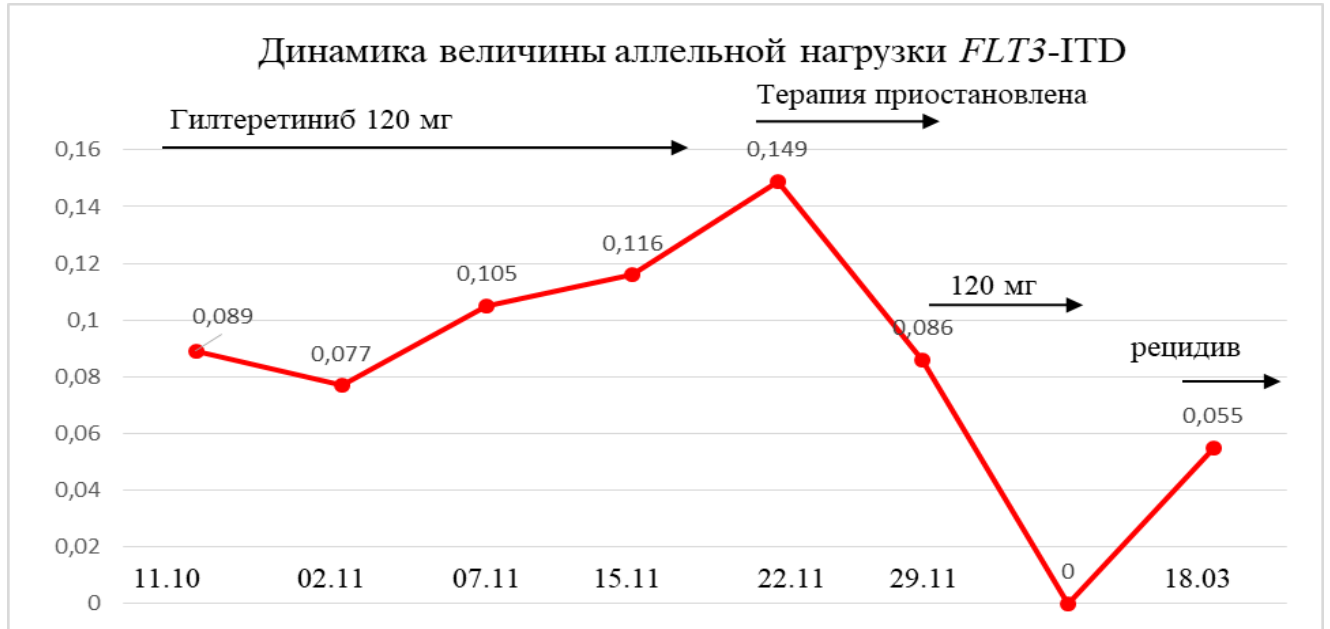


Рисунок 43 – Динамика величины аллельной нагрузки *FLT3-ITD* на фоне применения гилтеритиниба у пациента К.С.И.

На 15.11.18 была достигнута ПР-2 с неполным восстановлением гемопоэза. У больного сохранялась трансфузионная зависимость. При очередном контрольном обследовании констатирован рецидив-2 от 21.03.2019.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные представления о патогенезе и прогнозе ОМЛ претерпели значительные изменения с внедрением в клиническую практику молекулярно-генетических методов исследования, прежде всего NGS. Ранняя стратификация риска основывалась преимущественно на морфологических и цитогенетических характеристиках, в настоящее время ключевую роль в прогнозировании течения заболевания, выборе терапевтической тактики и определении показаний к алло-ТГСК занимают генетические маркеры.

Следовательно, клинический прогноз у пациентов с ОМЛ определяется множеством факторов, в особенности, возрастом и характером специфической терапии. Однако принципиальная роль в качестве маркеров прогноза принадлежит хромосомным aberrациям и генетическим аномалиям, которые позволяют правильно стратифицировать пациентов на группы риска и оптимизировать интенсивность цитостатической терапии [128].

На сегодняшний день большое значение уделяется возрастной категории пациентов, учитывая факт, что с возрастом увеличивается частота генных и хромосомных аномалий, а также формируется резистентность злокачественных клеток к цитостатическим препаратам [2; 20; 47]. Так, в многоцентровом клиническом исследовании AMLCG 99 проанализировано 2734 больных ОМЛ, где показано, что среди пациентов старше 60 лет 5-летняя ОВ была значительно хуже, чем у пациентов моложе 60 лет [137]. В нашем исследовании мы подтвердили аналогичные данные среди пациентов в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в гене *FLT3*: длительность ОВ у пациентов моложе 60 лет с *FLT3*⁺ составила 17,8 мес., в группе *FLT3*⁻ не была достигнута ($p=0,0041$). Медиана ОВ в группе старше 60 лет с *FLT3*⁺ составила 10,1 мес., в группе *FLT3*⁻ 37,2 мес. ($p<0,0001$).

Предварительная стратификация пациентов по группам риска является обязательным условием лечения пациентов ОМЛ, так как позволяет своевременно

пересмотреть интенсивность ХТ и запланировать проведение аллогенной ТГСК. Для рационального распределения пациентов на группы риска была усовершенствована классификация ELN 2022 [50].

Учитывая, что хромосомные aberrации не выявляются в большей части (до 45%) случаев ОМЛ, пациенты с НК, как правило, относятся к промежуточной группе риска (ELN 2022) [50]. Данная группа больных является крайне гетерогенной в плане возможного исхода заболевания и требует более глубокого изучения [33; 84].

При анализе группы пациентов с НК выяснилось, что НК часто коррелирует с мутациями в гене *FLT3*. Таким образом, мы проанализировали показатели выживаемости в промежуточной цитогенетической группе риска: медиана ОВ в группе *FLT3*⁺ составила 13,4 мес. по сравнению с группой без мутаций, где медиана не была достигнута ($p < 0,0001$).

Анализ методом ПЦР позволяет определять ряд химерных генов (*PML-RAR α* , *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*), соматические мутации в генах *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *IDH1,2*, а также гиперэкспрессию генов *WT1*, *EVII*, *ERG*, *MN1*, *BAALC*. Использование количественной ПЦР предоставляет возможность определить уровень их экспрессии, оценить глубину молекулярно-генетического ответа на терапию, а также проводить динамическую оценку опухолевого объема в течение программного лечения.

Одной из наиболее часто выявляемых мутаций с высоким прогностическим потенциалом при ОМЛ остается мутация в гене *FLT3*. По данным нашего исследования, частота встречаемости мутации *FLT3*-ITD составила 24%, *FLT3*-TKD – 5,5%, сочетание *FLT3*-ITD с *FLT3*-TKD – 1%, что соответствует опубликованным ранее отечественным и зарубежным данным [83; 117; 160; 200; 202; 208]. К примеру, M. Nakaо et al., впервые опубликовавшие данные о частоте мутации *FLT3*-ITD при ОМЛ, сообщили об ее встречаемости у 17% больных, а в последующих работах N. Govedarovic et al. уже сообщалось о 44,7% [84; 107]. В исследовании Е.В. Петровой и др., частота мутаций в гене *FLT3* составила 22%

[6], по данным Мотыко Е.В. и др. частота выявления мутации в генах *FLT3-ITD* – 23,2%, а *FLT3-TKD* – 6,6% [7].

Мутации в гене *FLT3*, как правило, встречаются при всех морфологических вариантах ОМЛ, наиболее часто при М3 и М5, реже – у пациентов с вариантами М6 и М7, что, вероятнее всего, обусловлено более низкой частотой этих вариантов ОМЛ [23]. В ходе нашего исследования мутации в гене *FLT3* определялись при всех морфологических вариантах, но не были выявлены в случае М6. Наиболее часто эти мутации отмечены у больных с М5, что было достоверно чаще, чем у больных с морфологическим вариантом М2 ($p=0,037$).

Мутации *NPM1* (ген нуклеофосмина) занимают второе место по частоте после *FLT3*. По многочисленным литературным данным, частота мутаций у больных ОМЛ составляет 25-35%, в сочетании с НК и с мутациями в гене *FLT3-ITD* [68; 202]. Наше исследование также показало высокую частоту встречаемости *NPM1* с мутацией в гене *FLT3-ITD* по сравнению с группами пациентов *FLT3⁻* и *FLT3-TKD* ($p=0,0001$).

Известно, что наличие мутаций в гене *FLT3* ассоциировано с высоким уровнем лейкоцитов и бластов в костном мозге [5; 208]. В частности, нами отмечен выраженный лейкоцитоз периферической крови при наличии мутаций в гене *FLT3* ($p<0,001$) по сравнению с *FLT3*-негативной группой. Мы определили, что в группе мужчин лейкоцитоз наблюдался при наличии обоих типов мутаций (ITD; TKD) ($p<0,001$). Лейкоцитоз у женщин отмечался только при мутации *FLT3-ITD⁺* ($p<0,05$). Наличие *FLT3-TKD⁺* в отличие от *FLT3-ITD* сопровождалось более выраженной тромбоцитопенией ($p=0,024$).

Лейкоцитоз у больных с мутациями в гене *FLT3*, как правило, обусловлен конститутивной активацией специфического рецептора, что способствует неконтрольной пролиферации, блокированию апоптоза и нарушению дифференцировки лейкозных клеток [5].

Обнаружена ассоциация между уровнями АН мутации *FLT3* и показателями гемограммы и миелограммы. Пациенты с повышенной АН *FLT3-ITD* имели более

высокие уровни лейкоцитоза в периферической крови ($p < 0,001$) и бластоза в костном мозге ($p = 0,04$) по сравнению с пациентами с *FLT3-ITD*^{низ}.

В ходе нашего диссертационного исследования были выявлены значимые различия в длительности ОБ в зависимости от мутационного статуса: *FLT3-ITD*⁺, *FLT3-TKD*⁺ и *FLT3*⁻ ($p < 0,0001$). Мы, однако, не выявили значимых различий в длительности БРВ между данными группами. Согласно работам зарубежных и отечественных авторов, уже сформировано достаточно четкое представление о неблагоприятном влиянии мутаций гена *FLT3* на показатели выживаемости ОБ.

Наличие мутации *FLT3-ITD* значимо коррелирует с короткой длительностью ОБ, что обусловило роль этой мутации в качестве существенного фактора прогноза у пациентов ОМЛ с НК. Полученные нами данные в целом не противоречат результатам других исследовательских групп. Так, по данным R.F. Schlenk, P.D. Kottaridis et al. было установлено, что больные ОМЛ с мутацией *FLT3-ITD* имеют неблагоприятный прогноз заболевания и короткую среднюю продолжительность жизни [5; 6; 28; 32; 70; 104; 204]. Такие пациенты являются кандидатами для проведения алло-ТГСК в первой полной ремиссии заболевания [1; 34]. Было неоднократно показано, что мутация *FLT3* определяет неблагоприятный прогноз и нивелирует благоприятное прогностическое значение других сопутствующих мутаций. Более того, прогноз заболевания у больных с комплексными мутациями всегда определяется наличием и величиной АН *FLT3-ITD* [5; 6; 34].

В отношении прогностической роли точечных мутаций *FLT3-TKD* до сих пор нет однозначного мнения. В то время как в некоторых исследованиях сообщалось о неблагоприятном влиянии мутации *TKD*, другие авторы описывали связь с хорошим прогнозом или отсутствие различий. Эти противоречивые данные, вероятно, объясняются небольшой когортой пациентов, а также различными режимами лечения. Интересно, что Vacher et al. показали, что прогностическое значение точечных мутаций *FLT3-TKD* зависит от сопутствующих мутаций в других генах. Например, точечные мутации *FLT3-TKD* имели дополнительный положительный прогностический эффект у пациентов,

несущих мутации *NPM1* или *CEBPA* и отрицательные эффекты в сочетании с уже неблагоприятными аномалиями, такими, как *FLT3-ITD* или *MLL-PTD* [158].

Ранее большое внимание уделялось уровням АН мутации гена *FLT3-ITD* в дебюте заболевания [51; 99; 168]. Прогностически важное значение придавалось соотношению мутантного аллеля ITD к аллелю дикого типа при его пороговом уровне, равном или более 0,5. В этой связи мы разделили пациентов с мутациями *FLT3-ITD* на две группы: с низким уровнем АН (менее 0,5) и с высоким уровнем ($\geq 0,5$). При этом была обнаружена корреляция между уровнями АН *FLT3-ITD* и длительностью ОБ и БРВ. В частности, медиана БРВ в группе *FLT3-ITD*^{выс} составила 6,6 мес., а в группе *FLT3-ITD*^{низ} - 23,3 мес. ($p < 0,0001$). Медиана ОБ пациентов *FLT3-ITD*^{выс} была значительно ниже по сравнению с *FLT3-ITD*^{низ} (10,1 мес. и 24,3 мес., соответственно, $p < 0,0001$).

Пациенты достигали ПР независимо от возрастной категории, чаще – в группе без мутаций в гене *FLT3*. Помимо этого, при анализе частоты развития ПР на фоне стандартных индукционных курсов «7+3» установлено, что пациенты с мутационным статусом *FLT3-ITD*^{низ}/*NPM1*⁺ достоверно чаще достигали ПР, нежели больные с *FLT3-ITD*^{выс}/*NPM1*⁺ ($p > 0,001$). Полученные данные предполагают обязательное включение таргетной терапии в индукционные режимы ХТ, преимущественно среди пациентов с АН *FLT3-ITD*^{выс}. Однако, по многочисленным данным, частота достижения ПР у больных с мутацией *FLT3-ITD* не отличалась от пациентов, не имеющих данной мутации [23].

Согласно полученным результатам, мы убедились в целесообразности проведения алло-ТГСК в первой полной ремиссии пациентам с *FLT3-ITD*^{выс}, которая способна улучшить показатели БРВ и ОБ [1; 97; 131]. Также выявлен положительный клинический эффект от проведения алло-ТГСК пациентам с *FLT3-ITD*^{выс}. В этой группе медиана наблюдения ОБ не была достигнута, а в группе без алло-ТГСК она составила 2,5 мес. ($p < 0,0001$). При анализе БРВ и ОБ среди пациентов с *FLT3*^{низ} мы не выявили статистически значимых различий.

На сегодняшний день в отечественных и зарубежных литературных источниках отсутствуют данные о временной динамике уровней АН мутации

FLT3. Учитывая, что данный тип мутации является потенциальным предиктором неблагоприятного прогноза, поскольку данная мутация ассоциирована со снижением средней продолжительности жизни, целесообразно определять уровни АН не только в дебюте заболевания, но и в процессе проводимой ХТ. Это позволяет оценить глубину молекулярно-генетического ответа на терапию и прогнозировать риск рецидива заболевания.

Решение данных проблем на сегодняшний день является актуальной задачей, которая может способствовать своевременному выявлению крайне неблагоприятной группы пациентов. Для выполнения данной цели научно-практическая работа была разбита на два этапа. На первом этапе мы определяли частоту мутаций в гене *FLT3*, затем проводилась ее количественная оценка. В последующем анализировали динамику величины АН мутации гена *FLT3-ITD* на фоне проведения ХТ и алло-ТГСК у всех пациентов, независимо от достижения ПР. Применение ХТ достоверно снижало АН ($p < 0,001$). Комбинированное лечение ХТ и алло-ТГСК продемонстрировало большую эффективность в сравнении с группой пациентов, кто получал исключительно химиотерапию ($p < 0,001$).

В последующем проведена оценка величины АН *FLT3-ITD* в зависимости от частоты достижения ПР. Достоверное уменьшение величины АН на фоне применения ХТ наблюдалось в группе пациентов, достигших ПР ($p < 0,001$), но не в группе без полной ремиссии ($p > 0,05$).

Таким образом, выраженное снижение уровней АН *FLT3*, как при ХТ, так и после ХТ с последующей алло-ТГСК, является благоприятным признаком, способствующим достижению ПР и длительному выживанию пациентов.

Неотъемлемой частью ведения пациентов ОМЛ является определение прогноза заболевания, что позволяет обосновать интенсивность специфической ХТ. Однако возникают сложности в вопросе об инициации циторедуктивной ХТ возрастным пациентам, особенно с мутацией в гене *FLT3*. Известно, что пациенты с мутациями гена *FLT3* относят к группе, которая имеет худший прогноз и в меньшей степени отвечает на стандартную ХТ [2; 5; 6; 32; 69; 71; 197; 204]. При

отсутствии противопоказаний проведение алло-ТГСК остается единственным радикальным методом лечения больных с ОМЛ, особенно у пациентов с мутацией в гене *FLT3*. Множество исследований указывает на преимущество проведения алло-ТГСК в данной группе пациентов [1; 28; 67; 93; 100; 121; 131; 147].

Применение высокодозной ХТ с последующей алло-ТГСК существенно расширило возможности лечения больных ОМЛ и улучшило показатели выживаемости. Интенсификация циторедуктивной терапии в настоящее время достигла дозолимитирующей токсичности, не позволяя улучшать результаты лечения за счет наращивания дозы химиопрепаратов. Таким образом, на первый план возникает необходимость разработки и внедрения новых видов терапии ОМЛ.

Высокая частота выявления и важное прогностическое значение мутации в гене *FLT3* позволяют считать ее перспективной терапевтической мишенью. В настоящее время разрабатываются и проходят клинические исследования несколько таргетных препаратов, направленных против тирозинкиназной активности FLT3. На разных этапах международных клинических исследований находятся препараты этой группы: мидостаурин, сорафениб, квизартиниб, гилтеритиниб [14; 41; 57; 65; 143; 171]. На сегодняшний день единственными одобренными таргетными препаратами на территории РФ для терапии ОМЛ *FLT3+* являются мидостаурин и гилтеритиниб. Они рекомендованы для взрослых пациентов в сочетании со стандартной индукционной, консолидирующей ХТ и последующей поддерживающей монотерапией, позволяя достичь ПР у 80% больных [14; 57; 62].

Нами была определена статистически достоверная корреляция между уровнями АН *FLT3-ITD* и показателями БРВ и ОВ на фоне проведенной ХТ. Кроме того, был установлен пороговый уровень АН *FLT3-ITD*, позволяющий прогнозировать длительность БРВ и ОВ с высокой чувствительностью и специфичностью (соответственно – 0,65 и 0,69, $p=0,001$).

Необходимо понимать, что ранее величина АН мутации *FLT3-ITD* в дебюте заболевания рассматривалась как один из ключевых прогностических факторов

при ОМЛ. Высокая АН интерпретировалась как независимый неблагоприятный маркер, позволяющий предположить более агрессивное течение заболевания и высокий риск рецидива. На основании этих представлений величина АН на момент диагностики активно использовалась при определении группы риска и выборе оптимальной терапевтической тактики. Однако результаты накопленных клинических исследований последних лет, а также внедрение в клиническую практику ингибиторов FLT3 и расширение возможностей молекулярного мониторинга привели к пересмотру данной позиции. В настоящее время показано, что значение АН в дебюте заболевания не является стабильным и самостоятельным предиктором исхода, поскольку оно может существенно изменяться под влиянием различных методов терапии. Таким образом, прогностическое значение имеет не столько абсолютная величина АН при первичной диагностике, сколько сам факт наличия мутации в гене *FLT3*, что требует включения ингибиторов FLT3 и рассмотрение вопроса о возможности проведения алло-ТГСК. На сегодняшний день критически важным является динамическое наблюдение за уровнем *FLT3*-позитивного клона на различных этапах лечения. Оценка АН на фоне различных этапов терапии позволяет объективно судить о глубине молекулярного ответа, раннем риске рецидива и необходимости модификации терапии. Доказано, что снижение АН под воздействием ХТ носит ограниченный характер, тогда как последовательное выполнение ХТ и алло-ТГСК обеспечивает наиболее значимое уменьшение доли лейкоэмического клона, что подтверждает целесообразность трансплантации у пациентов с *FLT3*-позитивным статусом.

Таким образом, трансформация подходов к оценке мутаций *FLT3* отражает смену парадигмы в прогностической стратификации ОМЛ:

- оценка АН в дебюте утратила решающее значение;
- фактическим прогностическим критерием является наличие мутации, а ведущим инструментом – динамический мониторинг её уровня;

- результаты молекулярного контроля должны служить одним из оснований для своевременного принятия решения о коррекции таргетной терапии и проведении алло-ТГСК.

Введение NGS в диагностику ОМЛ позволило перейти от анализа отдельных мутаций к комплексному исследованию полного мутационного профиля опухолевого клона. Традиционные методы молекулярной диагностики ограничены в своей способности выявлять редкие и множественные мутационные события. Применение NGS позволяет преодолеть эти ограничения, обеспечивая высокую чувствительность, что особенно важно для стратификации риска и мониторинга МОБ.

Использование NGS при ОМЛ предоставляет возможность одновременного анализа десятков клинически значимых генов. Это позволяет выявлять кооперативные и взаимно исключающие мутации, оценивать их вклад в патогенез и формировать индивидуальный прогностический профиль пациента.

В одном из зарубежных исследований ранее была проанализирована когорта из 204 пациентов с впервые выявленным ОМЛ с целью оценки мутационного статуса и прогноза заболевания методом NGS [133]. Согласно данному исследованию, молекулярный анализ выявил следующую частоту встречаемости мутаций в генах: *NPM1* (22,1%), *ASXL1* (18,1%), *TET2* (18,1%), *IDH2* (15,7%), *CEBPA* (14,7%), *FLT3-ITD* (13,2%) и *DNMT3A* (11,8%). Частота *NRAS*, *IDH1*, *TP53*, *C-KIT*, *RUNX1* составила 9,8%, 9,3%, 7,4%, 6,4%, 5,4%, соответственно. Другие гены имели крайне низкую частоту встречаемости среди обследованных пациентов. Анализируя мутационный ландшафт, была обнаружена взаимосвязь между *NPM1* и мутациями *IDH2*, *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, *TET2*, а также между *ASXL1* и мутацией *TET2*. Также отмечена попарная ассоциация *FLT3-ITD* и *DNMT3A* с мутациями *IDH2*. Взаимоисключающие мутации генов наблюдались между мутациями в генах *TP53* и *FLT3-ITD*, *RUNX1* и *NPM1*, *RUNX1* и *CEBPA*, а также *KIT* и *IDH2*.

В нашем исследовании частота выявленных мутаций была следующая: *ASXL1* (25%), *DNMT3A* (20%), *PTPN11* (20%), *KMT2C* (18%), *RUNX1* (18%), *RYR1* (18%), *SRSF2* (18%) и *TET2* (18%).

Каждая из выявленных мутаций имеет свой определенный клинический и прогностический потенциал. Ген *ASXL1* (Additional Sex Combs-Like 1) – является одним из ключевых эпигенетических регуляторов, мутации которого достаточно часто встречается – 5-10%. Белок ASXL1 входит в состав мультибелковых комплексов, регулирующих ремоделирование хроматина и экспрессию генов. Одна из основных функций – регуляция транскрипции генов, отвечающих за дифференцировку и апоптоз клетки. Наиболее частые мутации – frameshift и nonsense (12 экзон), приводят к укорочению белка, что в свою очередь способствует эпигенетической дестабилизации – блокированию процессов дифференцировки и апоптоза клеток. Мутация в гене *ASXL1* относится к категории неблагоприятного прогноза и не предусматривает использования специфических таргетных препаратов [180; 181].

Ген *DNMT3A* (DNA methyltransferase 3A) кодирует ДНК-метилтрансферазу, которая добавляет метильные группы к цитозинам в CpG-островках (участки ДНК, богатые динуклеотидами цитозин-гуанина, где цитозины подвергаются метилированию). Основные задачи гена – эпигенетическая регуляция (выключение или подавление экспрессии генов) и дифференцировка клеток. Наиболее частая мутация: R882H/C в каталитическом домене (~60% всех случаев). Типы мутаций: missense, nonsense, frameshift. Мутация в гене *DNMT3A* вызывает потерю метилтрансферазной активности – гипометилиция ДНК, а также нарушению дифференцировки гемопоэтических клеток. Мутация в гене *DNMT3A* детектируется в 20-25%, часто при НК; ассоциирована с неблагоприятным прогнозом, высоким риском рецидива и низкими показателями выживаемости. На сегодняшний день широкое применение получила эпигенетическая терапия (ингибиторы ДНК-метилтрансфераз – азацитидин и децитабин) [7; 19; 152; 159].

Ген *PTPN11* (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 11) – кодирует белок SHP2 (Src-homology region 2 domain-containing phosphatase-2), основные

функции которого: передача сигналов от рецепторов цитокинов и факторов роста; активация каскадов RAS/MAPK и PI3K/AKT, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток. Мутации в гене *PTPN11* – missense в домене N-SH2 (например, E76K) приводят к постоянной активации RAS/MAPK, избыточной пролиферации и блокированию дифференцировки клеток костного мозга. Частота встречаемости у 3-5% пациентов, чаще у детей и при муцинозных подтипах – типы опухолей, клетки которых выделяют муцин. Мутация характеризуется неблагоприятным прогнозом и рецидивирующим течением, особенно в сочетании с *RAS*, *FLT3* или *KIT*. В настоящее время ведутся разработки ингибиторов SHP2 [188].

Гены *KMT2C* и *KMT2D* (известные как *MLL3* и *MLL2*) относятся к семейству генов lysine methyltransferase и играют важную роль в эпигенетической регуляции. В норме кодируют гистоновую метилтрансферазу, регулируют процесс энхансеров и транскрипции генов, связанных с пролиферацией и дифференцировкой клеток. Мутации в генах приводят к снижению функции фермента, это способствует потере контроля над дифференцировкой миелоидных клеток с последующим формированием злокачественного клона. Мутации в гене *KMT2C* в популяции встречается редко (~5-7%); в гене *KMT2D* – реже 3-5%, чаще в комбинации с *ASXL1*, *TET2* и *SRSF2*. Наличие обеих мутаций определяет неблагоприятный прогноз, особенно в сочетании с мутациями эпигенетических регуляторов. Мутации в гене *KMT2C* и *KMT2D* в настоящее время могут рассматриваться как перспективная мишень для эпигенетической терапии (ингибиторы гистоновых метилтрансфераз и модуляторы энхансеров) [111].

Ген *RUNX1* (Runt-related transcription factor 1, также AML1) кодирует транскрипционный фактор и выполняет основные функции в клетке: контролирует дифференцировку миелоидного и лимфоидного ряда, формирует комплекс с CBF β . Основные типы мутации в гене *RUNX1*: missense, nonsense, frameshift, сплайсинговые мутации, которые способствуют нарушению нормальной активности транскрипционного фактора, блоку дифференцировки клеток, а также формированию онкогенного химерного белка, подавляющего

нормальную функцию *RUNX1*, к примеру, $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$. Определяются среди 10-15% взрослых пациентов с ОМЛ. Мутация в гене *RUNX1* является предиктором неблагоприятного прогноза – характеризуется высоким риском рецидива заболевания и низкими показателями ОВ. Проводится множество исследований таргетных препаратов (ингибиторы взаимодействия *RUNX1/CBF β* , эпигенетические модуляторы) [58].

Ген *RYR1* (Ryanodine receptor 1) кодирует рецептор рианодина, большой кальциевый канал эндоплазматического/саркоплазматического ретикулаума. Его основные функции в клетках – это регуляция кальциевого гомеостаза (контролирует высвобождение Ca^{2+} в цитоплазму), опосредовано влияет на апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток. Мутации в гене *RYR1* хорошо изучены при наследственных миопатиях различных типов и злокачественной гипертермии, однако в онкогематологии встречаются редко и не являются драйверными. В литературных источниках мутации в гене *RYR1* при ОМЛ описаны как случайные находки при NGS-панелях. Влияние на прогноз заболевания остаётся неясным, в отдельных исследованиях обсуждается, что нарушение кальциевых потоков может повышать устойчивость бластов к апоптозу [38].

Ген *SRSF2* (Serine/arginine-rich splicing factor 2) кодирует белок семейства SR-белков и выполняет основные функции в клетке: регуляция сплайсинга мРНК – помогает определять, какие экзоны включаются в зрелую мРНК; участвует в процессах, связанных с пролиферацией, апоптозом и дифференцировкой. Чаще всего встречается точечная мутация в гене *SRSF2* – P95, которая вызывает нарушения связывания *SRSF2* с РНК, а также нарушение дифференцировки клеток. Обнаруживаются у ~5-10% пациентов, чаще у пожилых и при вторичном ОМЛ из МДС. Известно, мутация в гене *SRSF2* – маркер неблагоприятного прогноза, ассоциирована с рецидивирующим течением и низкими показателями выживаемости. Является перспективной мишенью для таргетной терапии (идут исследования ингибиторов сплайсосомы) [30; 79; 90; 132].

Ген *TET2* (Ten-Eleven Translocation 2) кодирует фермент из семейства диоксигеназ, запускает процесс активной ДНК-деметилиации, а также регулирует экспрессию генов, участвующих в дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток. Типичные мутации в гене *TET2*: missense, nonsense, frameshift, делеции, приводят к нарушению деметилирования ДНК и экспрессии генов – нарушение их дифференцировки. Встречаются у 10-25% пациентов, особенно часто у пожилых и при вторичных формах ОМЛ из МДС. В изолированном виде прогноз неоднозначен, однако, в сочетании с *ASXL1*, *SRSF2* и *RUNX1* обладает неблагоприятным прогнозом и является показателем клональной эволюции. Представляет собой терапевтическую мишень, обладает высокой чувствительностью к ГА (азацитидин, децитабин) [59; 136].

Анализ сопутствующих и взаимоисключающих мутаций выявил связь между мутациями в генах *DNMT3A* и *NPM1* ($p=0,002$), *FAT1* и *PTPN11* ($p=0,0226$), *FAT1* и *SRSF2* ($p=0,0154$), *KMT2C* и *CUX1* ($p=0,0349$), а также *BRCA2* и *RYR1* ($p=0,0349$). Взаимоисключающие мутации были отмечены между *ASXL1* с *NPM1* и *IDH2*. Ассоциация сопутствующих мутаций предполагает функциональный синергизм между различными онкогенными путями в патогенезе ОМЛ. Однако наличие взаимоисключаемых мутаций подтверждает биологические доказательства того, что мутации являются ранними событиями в процессе лейкозогенеза [79].

В результате проведённого молекулярно-генетического анализа у пациентов были идентифицированы шесть наиболее значимых генов-драйверов заболевания: *IDH2*, *NPM1*, *NRAS*, *SRSF2*, *DNMT3A* и *EZH2*. Полученные данные отражают ключевые направления молекулярной эволюции ОМЛ и в целом соответствуют результатам крупных международных исследований – The Cancer Genome Atlas (TCGA, 2013) [201], Papaemmanuil et al. (NEJM, 2016) [80] и Beat AML Master Trial (Tyner et al., Nature, 2018) [77], которые определили молекулярную основу стратификации риска при ОМЛ. Выявленные мутации представляют собой основные молекулярные драйверы заболевания, отражающие три патогенетических механизма:

- эпигенетическая дисрегуляция (*DNMT3A*, *EZH2*, *IDH2*);

- нарушение дифференцировки и транскрипции (*NPM1*);
- активация сигнальных и сплайсинговых каскадов (*NRAS*, *SRSF2*).

В однофакторном регрессионном анализе Кокса мы обнаружили, что на длительность ОБ при ОМЛ статистически значимо влияют мутации в генах *BCR*, *EZH2*, *KMT2D*, *MGA* и *SRSF2*.

Ген *BCR* известен, благодаря транслокации $t(9;22)(q34;q11)/BCR-ABL1$, которая лежит в основе хронического миелоидного лейкоза, но может спорадически определяться у пациентов с ОМЛ. Ген *BCR* (Breakpoint Cluster Region) расположен на 22 хромосоме. Белок BCR участвует в регуляции сигнальных путей через серин/треонин-киназную активность. Определяющее значение имеет не точечная мутация, а транслокация $t(9;22)$, при которой образуется химерный ген *BCR/ABL1*. ОМЛ с мутациями в гене *BCR-ABL1* рассматриваются в группе неблагоприятного прогноза [49].

EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) – ген расположен на хромосоме 7q36, его основные функции – гистон-метилтрансфераза катализирует триметилирование гистона, а также контролирует эпигенетическую регуляцию генов. Мутация в гене *EZH2* чаще всего встречается при миелоидных опухолях: nonsense, frameshift, missense, она приводит к снижению или потере способности метилировать и нарушению дифференцировки миелоидных клеток. В ОМЛ такие мутации встречаются нечасто 2-5%, в основном у пожилых пациентов. Мутация в гене *EZH2* является неблагоприятным прогностическим маркером и может рассматриваться как перспективная мишень для таргетной терапии: идут клинические исследования ингибиторов *EZH2* [30; 79; 90; 132].

Ген *MGA* (MAX Gene Associated) – транскрипционный регулятор, локализованный на хромосоме 15q15. Является MAX-связывающим белком и входит в сеть MYC/MAX/MAD, которая регулирует рост, пролиферацию и дифференцировку клеток. *MGA* действует как супрессор онкогена MYC: связывается с MAX и блокирует активацию транскрипции MYC-зависимых генов, а также участвует в регуляции экспрессии генов. Мутация в гене *MGA* вызывает потерю способности связываться с MAX, нарушение MYC-сигнального пути

и тем самым способствует избыточной активации транскрипции генов пролиферации и нарушению контроля дифференцировки и апоптоза. Встречается около 2-4%, чаще при вторичных формах ОМЛ из МДС. Мутация коррелирует с неблагоприятным прогнозом, особенно в сочетании с мутациями в генах эпигенетических регуляторов – *ASXL1*, *TET2*, *RUNX1*. В перспективе может рассматриваться мишень для таргетной терапии [133].

Наличие *BCR/BCR::ABL1* при ОМЛ *de novo* – редкое явление, в ряде работ ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при стандартной терапии [95]. Роль *EZH2* в ОМЛ изучается активно, ряд работ демонстрируют негативное влияние мутации на ОВ и БРВ, однако, на уровне отдельных исследований результаты неоднородны – в некоторых когортах статистически значимого влияния не выявлено. Различия между исследованиями вероятно связаны с популяционной гетерогенностью, а также малой частотой встречаемости [66]. Наблюдения по влиянию *KMT2D* на ОВ в клинических когортах пока ограничены, но тенденция указывает на ассоциацию с худшим исходом заболевания [112]. Неблагоприятное влияние мутации в гене *MGA* согласуется с зарубежными данными, однако, в литературе пока отсутствуют крупные многоцентровые исследования [76]. Многочисленные исследования подтверждают, что *SRSF2* мутации ассоциированы с неблагоприятным прогнозом, особенно у пожилых пациентов и при вторичных формах ОМЛ [35].

При ОМЛ прогностическая и биологическая роль ОПМ остаётся предметом активного изучения. В результате проведённого анализа был определён пороговый уровень ОМН, который составил 4 мутации на образец. Пациенты с мутационной нагрузкой выше данного порогового значения имели достоверно более низкие показатели ОВ по сравнению с пациентами с низкой ОМН. В последние годы опубликован ряд исследований, в которых доказано, что повышенная мутационная нагрузка ассоциируется с неблагоприятными исходами у пациентов. Крупнейшее на сегодняшний день исследование (n=1540 пациентов) показало, что увеличение ОМН (>4-5 на пациента) достоверно ассоциировано с худшей ОВ независимо от цитогенетической группы риска [80]. В работе

швейцарской группы (Medinger et al., 2017 г.) при анализе панели из 54 генов с использованием NGS было показано, что пациенты с высокой мутационной нагрузкой (≥ 4 мутаций на образец) имели достоверно более низкие показатели 2-летней ОВ (32% против 64%; $p < 0,01$) [88]. Французское многоцентровое исследование продемонстрировало, что высокая мутационная нагрузка (> 3 -5 мутаций) чаще выявляется при вторичных ОМЛ и у пожилых пациентов. При этом ОМН являлась независимым неблагоприятным прогностическим фактором ОВ ($p = 0,004$) [43]. По данным немецкой группы исследователей, пациенты с ≥ 4 мутациями имели медиану ОВ 9,8 мес. против 22,4 мес. при ≤ 3 мутациях ($p < 0,001$) [103].

Эволюция знаний о молекулярных механизмах ОМЛ позволила перейти от универсальных терапевтических схем к персонализированному подходу, ориентированному на индивидуальные мутационные профили. Выявление мутаций в генах *NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *RUNX1*, *TET2*, *SRSF2* и других не только уточняет принадлежность пациента к определённой прогностической группе, но и определяет возможность использования таргетных и эпигенетических препаратов, а также оптимальные условия для проведения алло-ТГСГ.

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, оказывающие 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 ДАЛЬНЕЙШЕЙ 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Алло-ТГСК	– аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
АН	– аллельная нагрузка
А/И	– азациитидин/ивосидениб
А/П	– азациитидин/плацебо
А/Э	– азациитидин/энаседениб
БРВ	– безрецидивная выживаемость
БСВ	– бессобытийная выживаемость
ГА	– гипометилирующие агенты
ГО	– гемтузумаб озогомицин
КК	– комплексный кариотип
МДС	– миелодиспластический синдром
МДЦ	– малые дозы цитарабина
МК	– моносомный кариотип
МОБ	– минимальная остаточная болезнь
МПН	– миелопролиферативное новообразование
НВ	– неуточненный вариант
НК	– нормальный кариотип
ОВ	– общая выживаемость
ОМЛ	– острый миелоидный лейкоз
ОМН	– опухолевая мутационная нагрузка, ТМВ – tumour mutational burden
ОПЛ	– острый промиелоцитарный лейкоз
ПР	– полная клинико-гематологическая ремиссия
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
Р/Р	– рецидивирующее и/или резистентное течение заболевания
РФ	– Российская Федерация
тОМЛ	– трансформированный острый миелоидный лейкоз
ХТ	– химиотерапия

CBF	– core binding factor, основной связывающий фактор
<i>de novo</i>	– первичный острый миелоидный лейкоз
ECOG	– Eastern Cooperative Oncology Group, оценка общесоматического статуса
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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток при остром миелобластном лейкозе в первой ремиссии / С.Н. Бондаренко, Е.В. Семенова, В.Н. Вавилов [и др.] // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 85, № 7. – С. 18-25.
2. Возраст и кариотип – факторы риска у больных первичным острым миелоидным лейкозом / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Л.С. Мартыненко [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2010. – Т. 3, № 4. – С. 359-364.
3. Гальцева, И.В. Стратегия мониторинга минимальной статочной болезни у больных острыми миелоидными лейкозами методом мультипараметрической проточной цитометрии : дис. ... д-ра мед. наук : 3.1.28 / Гальцева И.В. – Санкт-Петербург, 2022. – С. 80-102.
4. Долгосрочные результаты лечения больных острыми миелоидными лейкозами по протоколу Российского многоцентрового рандомизированного исследования ОМЛ-10 / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова, В.В. Троицкая [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 60-65.
5. Клинико-гематологические и иммунофенотипические особенности больных *de novo* острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) с мутацией FLT3-ITD / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Ж.В. Чубукина [и др.] // Вестник гематологии. – 2012. – Т. 8, № 4. – С. 10-14.
6. Клинические, гематологические и молекулярно-генетические особенности острых миелоидных лейкозов с мутациями в генах FLT3, SKIT, NRAS и NPM1 / Е.В. Петрова, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т. 61, № 2. – С. 72-80.
7. Прогностическое значение генетических мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами: результаты совместного исследования гематологических клиник Санкт-Петербурга (Россия) и клиники Шарите

- (Германия) / Е.В. Мотыко, О.В. Блау, Л.Б. Полушкина [и др.] // Клиническая онкогематология. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 211-219.
8. Реброва, О.В. Статистический анализ медицинских данных с помощью пакета программ «Статистика» / О.В. Реброва. – Москва : Медиа Сфера, 2002. – 380 с.
 9. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О.П. Рыжкова, О.Л.Кардымон, Е.Б. Прохорчук [и др.] // Медицинская генетика. – 2019. – Т. 18, № 2. – С. 3-23.
 10. Юнкеров, В.И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований: лекции для адъюнктов и аспирантов / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. – Санкт-Петербург : ВМеда, 2005. – 266 с.
 11. A menin- MLL inhibitor induces specific chromatin changes and eradicates disease in models of MLL-rearranged leukemia / A.V. Krivtsov, K. Evans, J.Y. Gadrey [et al.] // Cancer Cell. – 2019. – Vol. 36. – P. 660-673.
 12. A phase I study of ziftomenib in combination with venetoclax or venetoclax/azacitidine, or standard induction cytarabine/daunorubicin (7+3) chemotherapy in combination with ziftomenib, for the treatment of patients with acute myeloid leukemia / A. Zeidan, A. Fathi, G. Issa [et al.] // Clin. Lymph. Myel Leuk. – 2023. – Vol. 9. – P. S308-309.
 13. A phase 1 study to determine the safety and tolerability of ziftomenib combinations for the treatment of KMT2A-rearranged or NPM1-mutant relapsed/refractory acute myeloid leukemia / A.D. Goldberg, D. Corum, J. Ahsan [et al.] // 65th American Society of Hematology Annual Meeting. – 2023. – Abstract 1553.
 14. A phase I/II trial of combination of midostaurin (PKC412) and 5-azacytidine (5-AZA) for the treatment of patients with refractory or relapsed (R/R) acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) / A. Nazha, H.M. Kantarjian, G. Borthakur [et al.] // Blood. – 2012. – Vol. 120, № 21. – Abstract 3587.

15. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients / A.K. Burnett, N.H. Russell, R.K. Hills [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 125, № 25. – P. 3878-3885.
16. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression / H. Yamazaki, M. Suzuki, A. Otsuki [et al.] // *Cancer Cell*. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 415-427.
17. AACR project GENIE: Powering precision medicine through an international consortium / AACR Project GENIE Consortium // *Cancer Discov*. – 2017. – Vol. 7. – P. 818-831.
18. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies / Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 97, № 8. – P. 2434-2439.
19. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia / G. Marcucci, K.H. Metzeler, S. Schwind [et al.] // *J. Clin. Oncol*. – 2012. – Vol. 30. – P. 742.
20. Age-specific incidence rates for cytogenetically-defined subtypes of acute myeloid leukemia / A.V. Moorman, E. Roman, R.A. Cartwright [et al.] // *Br. J. Cancer*. – 2002. – Vol. 86, № 7. – P. 1061-1063.
21. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation could improve survival of cytogenetically normal adult acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations / Y. Xu, Y. Sun, H. Shen [et al.] // *Am. J. Hematol*. – 2015. – Vol. 90. – P. 992-997.
22. Allo-SCT for high-risk AML-CR1 in the molecular era: impact of FLT3/ITD outweighs the conventional markers / S.M. Sengsayadeth, M. Jagasia, B.G. Engelhardt [et al.] // *Bone Marrow Transplant*. – 2012. – Vol. 47, № 12. – P. 1535-1537.
23. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB-subtype, and prognosis in the AMLCG study and

- usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease / S. Schnittger, C. Schoch, M. Dugas [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, № 1. – P. 59-66.
24. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB-subtypes and identification of subgroups with poor prognosis / C. Thiede, C. Stendel, B. Mohr [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 99, № 12. – P. 4326-4335.
25. Annesley, C.E. The Biology and Targeting of FLT3 in Pediatric Leukemia / C.E. Annesley, P. Brown // *Front. Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 263.
26. Assessment of minimal residual disease in standard-risk AML / A. Ivey, R.K. Hills, M.A. Simpson [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 374, № 5. – P. 422-433.
27. Azacitidine and Venetoclax in previously untreated acute myeloid leukemia / C.D. DiNardo, B.A. Jonas, V. Pullarkat [at al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2020. – Vol. 383, № 7. – P. 617-629.
28. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications / C.D. Baldus, C. Thiede, S. Soucek [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24, № 5. – P. 790-797.
29. Breems, D.A. Acute myeloid leukemia with monosomal karyotype at the far end of the unfavorable prognostic spectrum / D.A. Breems, B. Lowenberg // *Haematologica*. – 2011. – Vol. 96, № 4. – P. 491-493.
30. Bullinger, L. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways / L. Bullinger, K. Döhner, H. Döhner // *J. Clin. Oncol.* – 2017. – Vol. 35. – P. 934-946.
31. CKIT mutation cooperates with full-length AML1-ETO to induce acute myeloid leukemia in mice / Y. Wang, L.J. Zhao, C.F. Wu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – Vol. 108, № 6. – P. 2450-2455.
32. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes / R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364, № 26. – P. 2496-2506.

33. Clinical experience with the BCL2-inhibitor venetoclax in combination therapy for relapsed and refractory acute myeloid leukemia and related myeloid malignancies / C.D. Di Nardo, C.R. Rausch, C. Benton [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2018. – Vol. 93, № 3. – P. 401-407.
34. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG) / V.I. Gaidzik, R.F. Schlenk, P. Paschka [et al.] // *Blood.* – 2013. – Vol. 121, № 23. – P. 4769-4777.
35. Clinical implications of SRSF2 mutations in AML patients undergoing allogeneic stem cell transplantation / J. Grimm, M. Jentzsch, M. Bill [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2021. – Vol. 96, № 10. – P. 1287-1294.
36. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? / K. Mrozek, G. Marcucci, P. Paschka [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 2. – P. 431-4348.
37. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol / V.H. van der Velden, A. van der Sluijs-Geling, B.E. Gibson [et al.] // *Leukemia.* – 2010. – Vol. 24, № 9. – P. 1599-1606.
38. Clinical Significance of Ryanodine Receptor 1 Gene (RYR1) Variants: Proceedings of the 2013 MHAUS Scientific Conference / S. Riazi, N. Kraeva, S. Muldoon [et al.] // *Can. J. Anaesth.* – 2014. – Vol. 61, № 11. – P. 1040-1049.
39. Combination of crenolanib with sorafenib produces synergistic pro-apoptotic effects in FLT3-ITD-inhibitor-resistant acute myelogenous leukemias with FLT3 mutations / C. Gao, W. Zhang, R. Jacamo [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, № 21. – Abstract 3591.
40. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia / H. Inaba, E. Coustan-Smith, X. Cao [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 29. – P. 3625-3632.

41. Compassionate use of sorafenib in FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: sustained regression before and after allogeneic stem cell transplantation / S. Metzelder, Y. Wang, E. Wollmer [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, № 26. – P. 6567-6571.
42. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia / N. Duployez, A. Marceau-Renaut, N. Boissel [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – P. 2451-2459.
43. Comprehensive mutational profiling of secondary acute myeloid leukemia reveals distinct biological and clinical features / N. Duployez, A. Marceau-Renaut, N. Boissel [et al.] // *Leukemia*. – 2020. – Vol. 34, № 3. – P. 784-795.
44. Condensed versus standart schedule of high-dose cytarabine consolidation therapy with pegfilgrastim grown factor support in acute myeloid leukemia / S. Jaramillo, A. Benner, J. Krauter [et al.] // *Blood Cancer J*. – 2017. – Vol. 7, № 5. – P. e564.
45. Core-binding factor acute myeloid leukemia in first relapse: a retrospective study from the French AML Intergroup / M.A. Hospital, T. Prebet, S. Bertoli [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, № 8. – P. 1312-1319.
46. Crenolanib (CP868, 596) is a potent and selective type I FLT3 inhibitor that retains activity against AC220 resistance-causing FLT3 kinase domain mutants / C.C. Smith, E. Lasater, M. McCreery [et al.]. // *Blood*. – 2012. – Vol. 210, № 21. – Abstract 141.
47. Cytogenetic findings in adult *de novo* acute myeloid leukemia. A population-based study of 303/337 patients / B.S. Preiss, G.B. Kerndrup, K.G. Schmidt [et al.] // *Br. J. Haematol*. – 2003. – Vol. 123, № 2. – P. 219-234.
48. Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: a CALGB study / J. Yates, O. Glidewell, P. Wiernik [et al.] // *Blood*. – 1982. – Vol. 60, № 2. – P. 454-462.
49. Deciphering Potential Molecular Signatures to Differentiate Acute Myeloid Leukemia (AML) with BCR::ABL1 from Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Blast Crisis / L. Boucher, N. Sorel, C. Desterke [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 20. – P. 15441.

50. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the European Leukemia Net / H. Döhner, A.H. Wei, F. R. Appelbaum [et al.] // *Blood*. – 2022. – Vol. 140, № 12. – P. 1345-1377.
51. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation / R.F. Schlenk, S. Kayser, L. Bullinger [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 124, № 23. – P. 3441-3449.
52. Differentiation syndrome with lower-intensity treatments for acute myeloid leukemia / A.T. Fathi, E.M. Stein, C.D. DiNardo [et al.] // *Am. J. Hematol.* – 2021. – Vol. 96. – P. 735-746.
53. Does FLT3 mutation impact survival after hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia? A Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR) analysis / A. Deol, S. Sengsayadeth, K.W. Ahn [et al.] // *Cancer*. – 2016. – Vol. 122, № 19. – P. 3005-3014.
54. Döhner, H. Acute myeloid leukemia / H. Döhner, D.J. Weisdorf, C.D. Bloomfield. // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373, № 12. – P. 1136-1152.
55. Dombret, H. Gene mutation and AML pathogenesis / H. Dombret // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P. 5366-5367.
56. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with *de novo* acute myeloid leukemia (ALFA-0701): a randomized, open-label, phase 3 study / S. Castaigne, C. Pautas, C. Terre [et al.] // *Lancet* – 2012. – Vol. 379. – P. 1508-1516.
57. Effect of quizartinib (AC220) on response rates and long-term survival in elderly patients with FLT3-ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia / G. Martinelli, A.E. Perl, H. Dombret [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31, № 15. – Abstract 7021.
58. Effective therapy for AML with RUNX1 mutation by cotreatment with inhibitors of protein translation and BCL2 / C.P. Mill, W. Fiskus, C.D. DiNardo [et al.] // *Blood*. – 2022. – Vol. 139, № 6. – P. 907-921.

59. Effects of somatic mutations are associated with single nucleotide polymorphism (SNP) in the progression of individual acute myeloid leukemia patient: the two-hit theory explains inherited predisposition to pathogenesis / S. Park, Y. Koh, S.S. Yoon // *Genomics Inform.* – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 34-37.
60. Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia / M. Konopleva, D.A. Pollyea, J. Potluri [et al.] // *Cancer Discov.* – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. 1106-1117.
61. Efficacy and safety of enasidenib and azacitidine combination in patients with IDH2 mutated acute myeloid leukemia and not eligible for intensive chemotherapy / S. Venugopal, K. Takahashi, N. Daver [et al.] // *Blood Cancer J.* – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 10.
62. Efficacy and safety of quizartinib (AC220) in patients age ≥ 70 years with FLT3-ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia (AML) / A.E. Perl, H. Dohner, P.H. Rousselot [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 31, № 15. – Abstract 7023.
63. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death / S. Elmore // *Toxicol Pathol.* – 2007. – Vol. 35, № 4. – P. 495-516.
64. Enasidenib plus azacitidine versus azacitidine alone in patients with newly diagnosed, mutant-IDH2 acute myeloid leukaemia (AG221-AML-005): a single-arm, phase 1b and randomised, phase 2 trial / C.D. DiNardo, A.C. Schuh, E.M. Stein [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2021. – Vol. 22, № 11. – P. 1597-608.
65. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias / C.E. Carow, M. Levenstein, S.H. Kaufmann [et al.] // *Blood.* – 1996. – Vol. 87, № 3. – P. 1089-1096.
66. EZH2 mutations and impact on clinical outcome: an analysis in 1,604 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia / S. Stasik, J.M. Middeke, M. Kramer [et al.] // *Haematologica.* – 2020. – Vol. 105, № 5. – P. e228-e231.
67. 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 / M. Pratcorona, S. Brunet, J. Nomdedeu [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 14. – P. 2734-2738.
68. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal *de novo* acute myeloid leukemia and associated gene and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study / H. Becker, G. Marcucci, K. Maharry [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, № 4. – P. 596-604.
69. Final results of a phase 2 open-label, monotherapy efficacy and safety study of quizartinib (AC220) in patients with FLT3-ITD positive or negative relapsed/refractory acute myeloid leukemia after second-line chemotherapy or hematopoietic stem cell transplantation / M.J. Levis, A.E. Perl, H. Dombret [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, № 21. – Abstract 673.
70. FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia / A. Bains, R. Luthra, L.J. Medeiros [et al.] // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2011. – Vol. 135, № 1. – P. 62-69.
71. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with *de novo* cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications / S.P. Whitman, A.S. Ruppert, M.D. Radmacher [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, № 3. – P. 1552-1559.
72. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study / S.P. Whitman, K. Maharry, M.D. Radmacher [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, № 18. – P. 3622-3626.
73. FLT3 mutational status is an independent risk factor for adverse outcomes after allogeneic transplantation in AML / Y. Song, J. Magenau, Y. Li [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2016. – Vol. 51, № 4. – P. 511-520.

74. FLT3 mutations in the activating loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperploidy / T. Taketani, T. Taki, K. Sugita [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 103, № 3. – P. 1085-1088.
75. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia / A.J. Mead, D.C. Linch, R.K. Hills [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, № 4. – P. 1262-1270.
76. Functional characterization of cooperating MGA mutations in RUNX1::RUNX1T1 acute myeloid leukemia / M.E. Thomas 3rd, W. Qi, M.P. Walsh [et al.] // *Leukemia*. – 2024. – Vol. 38, № 5. – P. 991-1002.
77. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia / J.W. Tyner, C.E. Tognon, D. Bottomly [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 562, № 7728. – P. 526-531.
78. Fusion gene map of acute leukemia revealed by transcriptome sequencing of a consecutive cohort of 1000 cases in a single center / X. Chen, F. Wang, Y. Zhang [et al.] // *Blood Cancer J*. – 2021. – Vol. 11. – P. 112.
79. Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia / T.J. Ley, C. Miller, L. Ding [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 368, № 22. – P. 2059-2074.
80. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia / E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Bullinger [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 374, № 23. – P. 2209-2221.
81. Gilliland, D.G. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / D.G. Gilliland, J.D. Griffin // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, № 5. – P. 1532-1542.
82. Gilteritinib or chemotherapy for relapsed or refractory FLT3-mutated AML / A.E. Perl, G. Martinelli, J. E. Cortes [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2019. – Vol. 381, № 18. – P. 1728-1740.

83. Govedarovic, N. Frequency and prognostic impact of FLT3/ITD mutation in patients with acute myeloid leukaemia / N. Govedarovic, G. Marjanovic // J. BUON. – 2011. – Vol. 16, № 1. – P. 108-111.
84. Graubert, T.A. New molecular abnormalities and clonal architecture in AML: from reciprocal translocations to whole-genome sequencing / T.A. Graubert, A.M. Brunner, A.T. Fathi // Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book. – 2014. – Vol. 34. – P. e334-340.
85. Grimwade, D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? / D.Grimwade, S.D. Freeman // Blood. – 2014. – Vol.124, № 23. – P. 3345-3355.
86. Hematopoietic cell transplantation in patients with intermediate and high-risk AML: results from the randomized Study Alliance Leukemia (SAL) AML 2003 trial / J. Schetelig, M. Schaich, K. Schafer-Eckart, M. Hanel // Leukemia. – 2015. – Vol. 29. – P. 1060-1068.
87. Hematopoietic cell transplantation outcomes in monosomal karyotype myeloid malignancies / M.C. Pasquini, M.J. Zhang, B.C. Medeiros [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2016. – Vol. 22, № 2. – P. 248-257.
88. High mutational burden correlates with poor outcome in acute myeloid leukemia patients treated with intensive chemotherapy / M. Medinger, C. Lengerke, J. Passweg [et al.] // Blood Cancer J. – 2017. – Vol. 7, № 7. – P. e605.
89. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study / M. Terwijn, W.L. van Putten, A. Kelder [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2013. – Vol. 31, № 31. – P. 3889-3897.
90. Hou, H.-A. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies / H.-A. Hou, H.-F. Tien // J. Biomed. Sci. – 2020. – Vol. 27. – P. 1-13.
91. Hou, H.-A. Mutations in epigenetic modifiers in acute myeloid leukemia and their clinical utility / H.-A. Hou, H.-F. Tien // Expert Rev. Hematol. – 2016. – Vol. 9. – P. 447-469.

92. Hourigan, C.S. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia / C.S. Hourigan, J.E. Karp // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2013. – Vol. 10, № 8. – P. 460-471.
93. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML 15 trial / A.K. Burnett, R.K. Hills, D. Milligan [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, № 4. – P. 369-377.
94. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication / P. Paschka, R.F. Schlenk, V.I. Gaidzik [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, № 22. – P. 3636-3643.
95. Imatinib with intensive chemotherapy in AML with t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1. A DATAML registry study / C. Gondran, P.-Y. Dumas, E. Bérard [et al.] // *Blood Cancer Journal.* – 2024. – Vol. 14. – P. 91.
96. Impact of cytogenetics risk on outcome after reduced intensity conditioning allo-SCT from an HLA-identical sibling for patients with AML in first CR: a report from the acute leukemia working party of EBMT / P. Chevallier, M. Labopin, N. Milpied [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2012. – Vol. 47. – P. 1442-1447.
97. 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 / S. Brunet, M. Labopin, J. Esteve [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 7. – P. 735-741.
98. Impact of FLT3 mutations and promyelocytic leukemia-breakpoint on clinical characteristics and prognosis in acute promyelocytic leukemia / F. Kuchenbauer, C. Schoch, W. Kern [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2005. – Vol. 130, № 2. – P. 196-202.
99. Impact of FLT3-ITD mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia / D.C. Linch, R.K. Hills, A.K. Burnett [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 124, № 2. – P. 273-276.

100. Improved outcome after stem-cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML / M. Bornhauser, T. Illmer, M. Schaich [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, № 5. – P. 2264-2265.
101. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / F. Thol, F. Damm, A. Lüdeking [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 2889.
102. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome / S. Kayser, R.F. Schlenk, M.C. Londono [et al.] // *Blood*. – 2009. – Vol. 114, № 12. – P. 2386-2392.
103. Integrated mutational profiling identifies tumor mutational burden as an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia / M. Stahl, T. Herold, W. Walter [et al.] // *Blood Adv.* – 2022. – Vol. 6, № 14. – P. 4032-4045.
104. Integrative analysis of type-I and type-II aberrations underscores the genetic heterogeneity of pediatric acute myeloid leukemia / B.V. Balgobind, I.H. Hollink, S.T. Arentsen-Peters [et al.] // *Haematologica*. – 2011. – Vol. 96, № 10. – P. 1478-1487.
105. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B / R.J. Mayer, R.B. Davis, C.A. Schiffer [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1994. – Vol. 331, № 14. – P. 896-903.
106. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse / L.Y. Shih, C.F. Huang, J.H. Wu [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, № 7. – P. 2387-2392.
107. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia / M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai [et al.] // *Leukemia*. – 1996. – Vol. 10, № 12. – P. 1911-1918.
108. Ivosidenib and azacitidine in IDH1-mutated acute myeloid leukemia / P. Montesinos, C. Recher, S. Vives [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2022. – Vol. 386, № 16. – P. 1519-1531.

109. Jordan, C.T. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells / C.T. Jordan // *Leukemia*. – 2002. – Vol. 16, № 4. – P. 559-562.
110. Kale, J. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death / J. Kale, E.J. Osterlund, D.W. Andrews // *Cell. Death Differ.* – 2018. – Vol. 25, № 1. – P. 65-80.
111. KMT2C/D mutations in newly diagnosed acute myeloid leukaemia: Clinical features, genetic co-occurrences and prognostic significance / W. Wang, M. Yang, X. Zhang [et al.] // *Clin. Transl. Med.* – 2025. – Vol. 15, № 4. – P. e70284.
112. KMT2D Deficiency Promotes Myeloid Leukemias which Is Vulnerable to Ribosome Biogenesis Inhibition / J. Xu, A. Zhong, S. Zhang [et al.] // *Adv. Sci. (Weinh)*. – 2023. – Vol. 10, № 19. – P. e2206098.
113. Kottaridis, P.D. FLT3 mutation and leukemia / P.D. Kottaridis, R.E. Gale, D.C. Linch // *Br. J. Haematol.* – 2003 – Vol. 122, № 4. – P. 523-538.
114. Levis, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? / M. Levis. // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* – 2013. – Vol. 2013. – P. 220-226.
115. Levis, M.J. FLT3: ITDoes matter in leukemia / M. Levis, D. Small // *Leukemia*. – 2003. – Vol. 17, № 9. – P. 1738-1752.
116. Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer / A. Mayakonda, D.C. Lin, Y. Assenov [et al.] // *Genome Res.* – 2018. – Vol. 28, № 11. – P. 1747-1756.
117. Marcucci, G. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications / G. Marcucci, T. Haferlach, H. Dohner // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, № 5. – P. 475-486.
118. Menin inhibitor MI-3454 induces remission in MLL1-rearranged and NPM1-mutated models of leukemia / S. Klossowski, H. Miao, K. Kempinska [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2020. – Vol. 130. – P. 981-997.

119. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation / R.M. Stone, S.J. Mandrekar, B.L. Sanford [et al.] // N. Eng. J. Med. – 2017. – Vol. 377, № 5. – P. 454-464.
120. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party / G.J. Schuurhuis, M. Heuser, S. Freeman [et al.] // Blood. – 2018. – Vol. 131, № 12. – P. 1275-1291.
121. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes / C. Choudhary, J.V. Olsen, C. Brandts [et al.] // Mol. Cell. – 2009. – Vol. 36, № 2. – P. 326-39.
122. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients / S. Chotirat, W. Thongnoppakhun, O. Promsuwicha [et al.] // J. Hematol. Oncol. – 2012. – Vol. 5. – P. 5.
123. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia / O. Blau, R. Berenstein, A. Sindram [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2013. – Vol. 54, № 1. – P. 145-152.
124. Molecular characterization of clinical response and relapse in patients with IDH1m ND-AML treated with Ivo+AZA in the AGILE study / H. Döhner, D.M. Marchione, S. Choe [et al.] // Blood. – 2022. – Vol. 140, Suppl. 1. – P. 539-542.
125. Molecular characterization of *de novo* Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia / S. Konoplev, C.C. Yin, S.M. Kornblau [et al.] // Leuk. Lymphoma. – 2013. – Vol. 54, № 1. – P. 138-144.
126. Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse / K. Tobal, J. Newton, M. Macheta [et al.] // Blood. – 2000. – Vol. 95, № 3. – P. 815-819.
127. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor / C. Papadaki,

- A. Dufour, M. Seibl [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2009. – Vol. 144, № 4. – P. 517-523.
128. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype / D.A. Breems, W.L. Van Putten, G.E. De Greef [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, № 29. – P. 4791-4797.
129. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia / N. Feller, M.A. van der Pol, A. van Stijn [et al.] // *Leukemia.* – 2004. – Vol. 18, № 8. – P. 1380-1390.
130. Mutant isocitrate dehydrogenase 1 inhibitor ivosidenib in combination with azacitidine for newly diagnosed acute myeloid leukemia / C.D. DiNardo, A.S. Stein, E.M. Stein [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2021. – Vol. 39, № 1. – P. 57-65.
131. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia / R.F. Schlenk, K. Dohner, J. Krauter [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2008. – Vol. 358, № 18. – P. 1909-1918.
132. New food and drug administration-approved and emerging novel treatment options for acute myeloid leukemia / Z.R. Click, A.N. Seddon, Y.R. Bae [et al.] // *Pharmacotherapy.* – 2018. – Vol. 38, № 11. – P. 1143-1154.
133. Next-generation sequencing reveals gene mutations landscape and clonal evolution in patients with acute myeloid leukemia / C. Xiao, Z. Han, Q. Chun [et al.] // *Hematology.* – 2021. – Vol. 26, № 1. – P. 111-122.
134. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials / R.E. Gale, R. Hills, D. Kottaridis [et al.] // *Blood.* – 2005. – Vol. 106, № 10. – P. 3658-3665.
135. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype / S. Schnittger, C. Schoch, W. Kern [et al.] // *Blood.* – 2005. – Vol. 106, № 12. – P. 3733-3739.
136. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern / I.H. Hollink, M.M. van

- den Heuvel-Eibrink, S.T. Arentsen-Peters [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 13. – P. 3645-3656.
137. Older age is an independent risk factor in AML / T. Buchner, W. Berdel, C. Haferlach [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, № 11. – Abstract 555.
138. Outcome of patients with distinct molecular genotypes and cytogenetically normal AML after allogeneic transplantation / C. Schmid, M. Labopin, G. Socie [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 126, № 17. – P. 2062-2069.
139. Patterns of AML1-ETO transcript expression in patients with acute myeloid leukemia and t(8;21) in complete hematologic remission / S. Buonamici, E. Ottaviani, G. Visani [et al.] // *Haematologica*. – 2004. – Vol. 89, № 1. – P. 103-105.
140. Phase 1/2 study of venetoclax with low-dose cytarabine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia unfit for intensive chemotherapy: 1-year outcomes / A. Wei, S.A. Strickland, G.J. Roboz [et al.] // *Blood*. – 2017. – Vol. 130, № 1. – Abstracts 890.
141. Phase 2 study of azacytidine plus sorafenib in patients with acute myeloid leukemia and FLT-3 internal tandem duplication mutation / F. Ravandi, M.L. Alattar, M.R. Grunwald [et al.] // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, № 23. – P. 4655-4662.
142. Phase I study of midostaurin and azacitidine in relapsed and elderly AML patients / B.W. Cooper, T.L. Kindwall-Keller, H.M. Lazarus [et al.] // *J. Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* – 2012. – Vol. 15, № 7. – P. 428-432.e2.
143. Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia / R.M. Stone, T. Fischer, R. Paquette [et al.] // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26, № 9. – P. 2061-2068.
144. Phase Ib/2 study of venetoclax with low-dose cytarabine in treatment-naive patients age ≥ 65 with acute myelogenous leukemia / T.L. Lin, S.A. Strickland, W. Fiedler W [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34, № 15. – Abstract 7007.

145. Phase II study of the oral MEK inhibitor selumetinib in advanced acute myeloid leukemia: a University of Chicago phase II consortium trial / N. Jain, E. Curran, N.M. Iyengar [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 20, № 2. – P. 490-498.
146. Ponatinib in patients with refractory acute myeloid leukaemia: findings from a phase 1 study / N.P. Shah, M. Talpaz, M.W. Deininger [et al.] // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 162, № 4. – P. 548-552.
147. Potent graft-versus-leukemia effect after reduced-intensity allogeneic SCT for intermediate-risk AML with FLT3-ITD or wild-type NPM1 and CEBPA without FLT3-ITD / G. Laboure', S. Dulucq, M. Labopin [et al.] // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2012. – Vol. 18, № 12. – P. 1845-1850.
148. Predictive genomics: A cancer hallmark network framework for predicting tumor clinical phenotypes using genome sequencing data / E. Wang, N. Zaman, S. Mcgee [et al.] // *Semin Cancer Biol.* – 2015. – Vol. 30. – P. 4-12.
149. Preliminary data on a phase 1/2A first in human study of the menin- KMT2A (MLL) inhibitor KO-539 in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia / E.S. Wang, J.K. Altman, K. Pettit [et al.] // *Blood.* – 2020. – Vol. 136. – P. 7-8.
150. Preparation and characterization of monoclonal antibody conjugates of the calicheamicins: a novel and potent family of antitumor antibiotics / L.M. Hinman, P.R. Hamann, R. Wallace [et al.] // *Cancer Res.* – 1993. – Vol. 53, № 14. – P. 3336-3342.
151. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity / E. Taskesen, L. Bullinger, A. Corbacioglu [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 2469.
152. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia / J. Marková, P. Michková, K. Burčková [et al.] // *Eur. J. Haematol.* – 2012. – Vol. 88. – P. 128.

153. Prognostic impact of minimal residual disease in CBFB-MYH11-positive acute myeloid leukemia / A. Corbacioglu, C. Scholl, R.F. Schlenk [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, № 23. – P. 3724-3729.
154. Prognostic impact of monosomal karyotype in young adult and elderly acute myeloid leukemia: the Southwest Oncology Group (SWOG) experience / B.C. Medeiros, M. Othus, M. Fang [et al.] // *Blood.* – 2010. – Vol. 116, № 13. – P. 2224-2228.
155. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia / J.P. Patel, M. Gonen, M.E. Figueroa [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 336, № 12. – P. 1079-1089.
156. Prognostic significance of 11q23 aberrations in adult acute myeloid leukemia and the role of allogeneic stem cell transplantation / Y. Chen, H. Kantarjian, S. Pierce [et al.] // *Leukemia.* – 2013. – Vol. 27. – P. 836-842.
157. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm / S. Frohling, R.F. Schlenk, J. Breitruck [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 100, № 13. – P. 1380-1390.
158. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations / C.L. Green, K.K. Koo, R.K. Hills [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28. – P. 2739.
159. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association / A. Renneville, N. Boissel, O. Nibourel [et al.] // *Leukemia.* – 2012. – Vol. 26. – P. 1247.
160. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia / K. Mro'zek, G. Marcucci, D. Nicolet [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, № 36. – P. 4515-4523.

161. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia / T. Grob, M.A. Sanders, C.M. Vonk [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2022. – Vol. 41. – P. 756-765.
162. Prognostic value of minimal residual disease by real-time quantitative PCR in acute myeloid leukemia with CBF-MYH11 rearrangement: the French experience / R. Guieze, A. Renneville, J.-M. Cayuelas [et al.] // *Leukemia.* – 2010. – Vol. 24, № 7. – P. 1386-1388.
163. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias / J. Krauter, K. Gorlich, O. Ottmann [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2003. – Vol. 21, № 23. – P. 4413-4422.
164. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial / C. Willekens, O. Blanchet, A. Renneville [et al.] // *Haematologica.* – 2016. – Vol. 101, № 3. – P. 328-335.
165. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of 101 acute promyelocytic leukemia and to direct preemptive arsenic trioxide therapy / D. Grimwade, J.V. Jovanovic, R.K. Hills [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 22. – P. 3650-3658.
166. Prospective monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with inversion (16) by CBFbeta/MYH11 RT-PCR: implications for a monitoring schedule and for treatment decisions / K. Laczika, G. Mitterbauer, M. Mitterbauer [et al.] // *Leuk. Lymphoma.* – 2001. – Vol. 42, № 5. – P. 923-931.
167. Quantification of AML-ETO fusion transcript as a prognostic indicator in acute myeloid leukemia / S.J. Yoo, H.S. Chi, S. Jang [et al.] // *Haematologica.* – 2005. – Vol. 90, № 11. – P. 149-1501.
168. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length / Y. Kim, G.D. Lee, J. Park [et al.] // *Blood Cancer J.* – 2015. – Vol. 5, № 8. – P. e336.

169. Quizartinib versus salvage chemotherapy in relapsed or refractory FLT3-ITD acute myeloid leukaemia (QuANTUM-R): A multicentre, randomised, controlled, open-label, phase 3 trial / J.E. Cortes, S. Khaled, G. Martinelli [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2019. – Vol. 20. – P. 984-997.
170. Radius: A Phase 2 Randomized Trial Investigating Standard of Care \pm Midostaurin after Allogeneic Stem Cell Transplant in FLT3-ITD-Mutated AML / R.T.T. Maziarz, M.M. Patnaik, B.L. Scott [et al.] // *Blood Cancer J.* – 2018. – Vol. 132, Suppl. 1. – P. 662.
171. Real-time quantification of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state / S. Buonamici, E. Ottaviani, N. Testoni [et al.] // *Blood.* – 2002. – Vol. 99, № 2. – P. 443-449.
172. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European Leukemia Net study / D. Ciloni, A. Renneville, F. Hermitte [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, № 31. – P. 5195-5201.
173. Reilly J.T. Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis? / J.T. Reilly // *Br. J. Haematol.* – 2005. – Vol. 128, № 1. – P. 18-34.
174. Results of a HOVON/SAKK donor versus nodonor analysis of myeloablative HLA-identical sibling stem cell transplantation in first remission acute myeloid leukemia in young and middleaged adults: benefits for whom? / J.J. Cornelissen, W.L. van Putten, L.F. Verdonck [et al.] // *Blood.* – 2007. – Vol. 109, № 9. – P. 3658-3666.
175. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome / H. Kantarjian, S. O'Brien, J. Cortes [et al.] // *Cancer.* – 2006. – Vol. 106, № 5. – P. 1090-1098.

176. Revumenib maintenance therapy following revumenib-induced remission and transplant / A. Zucenka, G.C. Issa, M. Martha Arellano [et al.] // 65th American Society of Hematology Annual Meeting. – 2023. – Abstract 4950.
177. Risk stratification of intermediate-risk acute myeloid leukemia: integrative analysis of a multitude of gene mutation and gene expression markers / V. Rockova, S. Abbas, B.J. Wouters [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P. 1069.
178. Role of allogeneic stem cell transplantation in FLT3/ITD-positive AML / S. Meshinchi, R.J. Arceci, J.E. Sanders [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108, № 1. – P. 400-401.
179. Roles of tyrosine 589 and 591 in STAT5 activation and transformation mediated by FLT3-ITD / J.L. Rocnik, R. Okabe, J.C. Yu [et al.] // *Blood*. – 2006. – Vol. 108, № 4. – P. 1339-1345.
180. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinicopathologic and genetic features / V.I. Gaidzik, V. Teleanu, E. Papaemmanuil [et al.] // *Leukemia*. – 2016. – Vol. 30. – P. 2160.
181. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group / V.I. Gaidzik, L. Bullinger, R.F. Schlenk [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29, № 10. – P. 1364-1372.
182. Safety and efficacy of venetoclax plus low-dose cytarabine in treatment-naïve patients aged ≥ 65 years with acute myeloid leukemia / A. Wei, S.A. Strickland, G.J. Roboz [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 128, № 22. – Abstract 102.
183. Safety and preliminary efficacy of venetoclax with decitabine or azacitidine in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a non-randomised, open-label, phase 1b study / C.D. DiNardo, K.W. Pratz, A. Letai [et al.] // *Lancet Oncol.* – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 216-228.
184. Schlenk, R.F. Genomic applications in the clinic: use in treatment paradigm of acute myeloid leukemia / R.F. Schlenk, H. Döhner. // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. – 2013. – Vol. 2013, № 1. – P. 324-330.

185. Short, N.J. Acute myeloid leukaemia / N.J. Short, M.E. Rytting, J.E. Cortes // *Lancet*. – 2018. – Vol. 392, № 10147. – P. 593-606.
186. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2018 / R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal // *CA Cancer Clin*. – 2018. – Vol. 68, № 1. – P. 7-30.
187. Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia with FLT3-Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN) / A. Burchert, G. Bug, L.V. Fritz [et al.] // *J. Clin. Oncol*. – 2020. – Vol. 38. – P. 2993-3002.
188. Spectrum of Mutations in PTPN11 in Russian Cohort / A. Orlova, D. Guseva, N. Demina [et al.] // *Genes (Basel)*. – 2024. – Vol. 15, № 3. – P. 345.
189. Stahl, M. Differentiation syndrome in acute promyelocytic leukaemia / M. Stahl, M.S. Tallman // *Br. J. Haematol*. – 2019. – Vol. 187. – P. 157-162.
190. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale [et al.] // *Genet Med*. – 2015. – Vol. 17, № 5. – P. 405-424.
191. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML / S. Meshinchi, D.L. Stirewalt, T.A. Alonzo [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, № 10. – P. 4930-4933.
192. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors / P.D. Kottaridis, R.E. Gale, S.E. Langabeer [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100, № 7. – P. 2393-2398.
193. Sunitinib and intensive chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia and activating FLT3 Mutations: results of the AMLSG 10-07 study (Clinical Trials.gov No. NCT00783653) / W. Fiedler, S. Kayser, M. Kebenko [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120, № 21. – Abstract 1483.
194. Survey of activated FLT3 signaling in leukemia / T.L. Gu, J. Nardone, Y. Wang [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. e19169.

195. Tamborero, D. OncodriveCLUST: exploiting the positional clustering of somatic mutations to identify cancer genes / D. Tamborero, A. Gonzalez-Perez, N. Lopez-Bigas // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, № 18. – P. 2238-2244.
196. Targeting chromatin regulators inhibits leukemogenic gene expression in NPM1 mutant leukemia / M.W. Kühn, E. Song, Z. Feng [et al.] // *Cancer Discov.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1166-1181.
197. Targeting levels or oligomerization of nucleophosmin 1 induces differentiation and loss of survival of human AML cells with mutant NPM1 / R. Balusu, W. Fiskus, R. Rao [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 11. – P. 3096-3106.
198. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian [et al.] // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, № 20. – P. 2391-2405.
199. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms / J.D. Khoury, E. Solary, O. Abla [et al.] // *Leukemia*. – 2022. – Vol. 36. – P. 1703-1719.
200. The Cancer Genome Atlas Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: 2017 recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net / H. Döhner, E.H. Estey, S. Amadori [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 115, № 3. – P. 453-474.
201. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project / J.N. Weinstein, E.A. Collisson, G.B. Mills [et al.] // *Nat. Genet.* – 2013. – Vol. 45, № 10. – P. 1113-1120.
202. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia / R.E. Gale, C. Green, C. Allen [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, № 5. – P. 2776-2784.
203. The impact of TP53 mutations and TP53 deletions on survival varies between AML, ALL, MDS and CLL: an analysis of 3307 cases / A. Stengel, W. Kern, T. Haferlach [et al.] // *Leukemia*. – 2017. – Vol. 31. – P. 705.

204. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia / C. Allen, R.K. Hills, K. Lamb [et al.] // *Leukemia*. – 2013. – Vol. 27, № 9. – P. 1891-1901.
205. The menin inhibitor revumenib in KMT2A-rearranged or NPM1-mutant leukaemia / G.C. Issa, I. Aldoss, J. DiPersio [et al.] // *Nature*. – 2023. – Vol. 615. – P. 920-924.
206. The molecular basis of myeloid malignancies / T. Kitamura, D. Inoue, N. Okochi-Watanabe [et al.] // *Proc. Japan Acad. Ser. B*. – 2014. – Vol. 90. – P. 389-404.
207. The novel tyrosine kinase inhibitor AKN-028 has significant antileukemic activity in cell lines and primary cultures of acute myeloid leukemia / A. Eriksson, M. Hermanson, M. Wickström [et al.] // *Blood Cancer J*. – 2012. – Vol. 2, № 8. – P. e81.
208. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials / P.D. Kottaridis, R.E. Gale, M.E. Frew [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98, № 6. – P. 1752-1759.
209. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation / C.L. Green, C.M. Evans, L. Zhao [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, № 2. – P. 409-412.
210. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain / J. Griffith, J. Black, C. Faerman [et al.] // *Mol. Cell*. – 2004. – Vol. 13, № 2. – P. 169-178.
211. Therapeutic implications of menin inhibition in acute leukemias / G.C. Issa, F. Ravandi, C.D. DiNardo [et al.] // *Leukemia*. – 2021. – Vol. 35. – P. 2482-2495.
212. Therapeutic targeting of preleukemia cells in a mouse model of NPM1 mutant acute myeloid leukemia / H.J. Uckelmann, S.M. Kim, E.M. Wong [et al.] // *Science*. – 2020. – Vol. 367. – P. 586-590.

213. Thomas, X. Small Molecule Menin Inhibitors: Novel Therapeutic Agents Targeting Acute Myeloid Leukemia with KMT2A Rearrangement or NPM1 Mutation / X. Thomas // *Oncol Ther.* – 2024. – Vol. 12. – P. 57-72.
214. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia / L. Maurillo, F. Buccisano, M.I. Del Principe [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26, № 30. – P. 4944-4951.
215. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome / F.G. Rücker, R.F. Schlenk, L. Bullinger [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119. – P. 2114.
216. TTT-3002 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor that has the potential to overcome some of the limitations of current FLT3 inhibitors in treatment of acute myeloid leukemia / H.S. Wall, B.M. Nguyen, L. Li [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, № 21. – Abstracts 866.
217. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases / D.E. Schmidt-Arras, A. Bohmer, B. Markova [et al.] // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 25, № 9. – P. 3690-3703.
218. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia / C.D. DiNardo, K. Pratz, V. Pullarkat [et al.] // *Blood.* – 2019. – Vol. 133, № 1. – P. 7-17.