

ежедневном пероральном введении крысам  $\text{HЧ TiO}_2$  (рутил, 30 дней, 10 мг/кг массы тела). Показано, что в тимусе наблюдается акцидентальная инволюция с уменьшением площади коркового вещества, усиление гибели лимфоцитов по пути апоптоза, снижение пролиферативной активности клеток, повышение содержания  $\text{CD68}^+$  макрофагов; в селезенке — редукция белой пульпы с уменьшением абсолютного количества клеток и плотности их расположения, но увеличение числа лимфоидных узелков, уменьшение количества пролиферирующих  $\text{Ki-67}^+$ -клеток; увеличение апоптотически гибнущих  $\text{p53}$ -иммунопозитивных клеток и содержания  $\text{CD68}^+$  макрофагов; в поверхностных шейных лимфатических узлах — гиперпластическая реакция с возрастанием количества вторичных лимфоидных узелков, усилением в их герминативных центрах пролиферативной активности клеток, а также увеличение числа  $\text{CD68}$ -иммунопозитивных клеток в мозговом веществе. Указанные изменения можно трактовать с позиции индуцированного вторичного иммунодефицита, который развивается на фоне воздействия  $\text{HЧ}$  (Хантов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Новиков Д.К. и соавт., 2011; Постовалова Е.А., 2018; Vaillant A.J., Curie A., 2018).

*Виноградов А.В.*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ**

ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1»,  
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Наличие генных мутаций у пациентов с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) является одним из важнейших прогностических факторов, учитываемым в международных классификациях, начиная с 2008 г., и позволяющим проводить персонализированную адаптацию программы полихимиотерапии в зависимости от мутационного спектра опухоли у конкретного больного. При этом установлено, что в более старшем возрасте пациенты с гораздо хуже отвечают на программную полихимиотерапию, чем пациенты молодого или зрелого возраста. При этом альтернативой стандартной полихимиотерапии при ОМЛ является аллогенная трансплантация костного мозга, применение которой существенно ограничено тяжелым коморбидным фоном у пациентов пожилого возраста [1-3]. Следовательно, исследова-

ние возрастных особенностей мутационных спектров при ОМЛ в различных возрастных группах больных актуально и востребовано в практической онкогематологии.

**Цель исследования** — определить средние частоты генных мутаций в различных возрастных группах взрослых больных острыми миелоидными лейкозами методом прямого автоматического секвенирования.

### **Материалы и методы**

Исследовали образцы костного мозга и периферической крови 145 больных ОМЛ в возрасте от 15 до 82 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2009 по 2019 г. Среди пациентов в возрасте от 15 до 45 было 36 человек, от 45 до 60–55, старше 60–54. Диагностику ОМЛ осуществляли, в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1–3], на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования.

Интранозологическая структура исследуемой группы больных была следующей: с морфологическим вариантом ОМЛ М0 — 6 больных (4,1%), М1 — 10 (6,9%), М2 — 63 (43,5%), М3 — 13 (9,0%), М4 — 35 (24,1%), М4эо — 3 (2,1%), М5 — 4 (2,8%), М6 — 6 (4,1%), М7 — 1 (0,7%), острый миелофиброз — 1 (0,7%), острый гибридный лейкоз (миело/лимфо) — 1 (0,7%), бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2 (1,4%).

Детекцию мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3, экзонов 7–12 и 16–19 гена KIT, экзонов 9–12 гена NPM1, экзонов 1–4 гена NRAS, экзонов 4–11 гена TP53, экзонов 6–9 гена WT1 осуществляли с использованием технологии прямого автоматического секвенирования по ранее описанной методике [4–7]. Выделение тотальной РНК осуществляли с использованием ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью. Участки кДНК, соответствующие исследуемым экзонам указанных генов, амплифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [4–7]. Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на автоматических генетических анализаторах ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) и 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) по прямой и обратной последовательностям согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0 [8]. Всего на наличие мутаций в кодирующих последовательностях гена FLT3 исследованы 133 пробы, гена TP53 — 112, NPM1 — 100, KIT — 95, NRAS — 81, WT1 — 77.

Проверку статистических гипотез проводили с использованием точного

критерия Фишера (F). Доверительные интервалы (ДИ) для средних частот мутаций генов определяли на основе биномиального распределения с вероятностью 95%.

### Результаты исследования

Среди исследованных генов с наибольшей частотой мутации определялись в кодирующей последовательности экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3 — 16,5% (n=22, при 95% ДИ от 11,4 до 23,4%), из которых преобладали внутренние tandemные дупликации (n=18, 13,5%, при 95% ДИ от 8,7 до 20,4%). Реже встречались несинонимичные однонуклеотидные замены в кодирующей последовательности тирозинкиназных доменов (n=4, 3,0%, при 95% ДИ от 1,2 до 7,5%). Статистически значимых различий в распределении FLT3 мутаций в исследуемых возрастных группах не выявлено.

Инсерции в экзоне 12 гена NPM1, ассоциированные с благоприятным прогнозом ОМЛ [1], определялись в 13,0% наблюдений (n=13, при 95% ДИ от 7,8 до 21,0%). Их частота была максимальной в группе пациентов в возрасте 45-60 лет (n=8, 22,9%, при 95% ДИ от 12,1 до 39,0%), минимальна — у пациентов пожилого и старческого возраста (n=2, 5,4%, при 95% ДИ от 1,5 до 17,7%), при этом различия являлись статистически достоверными (F=0,04, p<0,05). Однако в целом, частота выявления мутаций в гене NPM1 в исследуемой выборке была ниже, чем в других исследованиях, что может быть обусловлено особенностями ее цитогенетического профиля. Функционально значимые генетические изменения в кодирующей последовательности экзонов 1-4 гена NRAS, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом [7], определялись в 11,1% случаев (n=9, при 95% ДИ от 6,0 до 19,8%), статистически значимых возрастных отличий в частоте их встречаемости не выявлено.

Частота мутаций в кодирующей последовательности экзонов 4-11 антионкогена TP53 (включая ДНК-связывающий домен) составляла 8,9% (n=10, при 95% ДИ от 4,9 до 15,7%) и имела ярко выраженную возрастную динамику (F=0,00, p<0,05). В группе больных моложе 45 лет указанные мутации не определялись, в возрастной группе 45-60 лет выявлялись в одном наблюдении (2,6%, при 95% ДИ от 0,5 до 13,5%), у больных пожилого и старческого возраста — в 9 (20,0%, при 95% ДИ от 10,9 до 33,8%). Мутации были представлены несинонимичными заменами, делециями и инсерциями, локализовались в экзонах 5-9. Как правило, мутации в гене TP53 сочетались с комплексными аномалиями карнотипа (7 наблюдений), реже — с неуточненным карнотипом (n=2) и диплоидией (n=1).

Аномалии в кодирующей последовательности экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT определялись в 7,4% наблюдений (n=7, при 95% ДИ от 3,6 до 14,4%) и были представлены несинонимичными заменами нуклеотидов и делециями. Статистически значимых возрастных различий в частоте этих мутаций

не было выявлено, во всех исследуемых группах она варьировала в пределах 5,9-10,0%.

Средняя частота мутаций в антионкогене WT1 составила 5,2% (n=4, при 95% ДИ от 2,0 до 12,6%), и имела статистически незначимую тенденцию к уменьшению в возрастной группе ОМЛ старше 60 лет ( $F=0,29$ ,  $p>0,05$ ), в которой они не определялись ни в одном наблюдении. Мутации были представлены инсерциями и делециями. Для верификации выявленной тенденции необходимы дальнейшие исследования и расширение объема выборки.

### Заключение

Таким образом, среди исследованных генов, только средние частоты мутаций в кодирующих последовательностях экзона 12 гена NPM1 и экзона 5-9 гена TP53 имели статистически достоверные различия в группах больных ОМЛ молодого, зрелого, пожилого и старческого возраста. Эти изменения обуславливали, соответственно, статистически значимое уменьшение доли пациентов с благоприятным прогнозом общей выживаемости и увеличение — с неблагоприятным, в старших возрастных группах.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia // *Blood*. 2016; Vol. 127. pp. 2391-405.
2. Döhner H., Estey E.H., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel // *Blood*. 2017. Vol. 129 (4). pp. 424-447.
3. Vardiman J.V., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // *Blood*. 2009. Vol. 114 (5). pp. 937-952.
4. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах // *Российский онкологический журнал*. 2013. – №4. – С. 34-35.
5. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция внутренних tandemных дупликаций и точковых мутаций гена FLT3 при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2013. – №1. – С. 64-66.
6. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Комплексное исследование мутаций генов TP53, FLT3, KIT, N-RAS, NPM1 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого секвенирования // *Биомик*. 2012. – Т.3. - №1. – С. 22-243.
7. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использова-

нием технологии прямого автоматического секвенирования // Вестник Башкирского университета. 2014. – Т.19. - №3. – С. 845-847.

8. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. Vol. 28 (10). pp. 2731-2739.

*Сичкар Д. А., Макеев О. Г., Коротков А. В.,  
Яковлева Е. А., Щеглова А. В.*

## **ВОЗМОЖНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕПАТОЦИТОВ ИЗ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК), ТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ ГЕНОМ ФАКТОРА РОСТА ГЕПАТОЦИТОВ**

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»:  
ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет.  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

Прогрессирующая печеночная недостаточность является патологией, для терапии которой пересадка органа остается практически безальтернативным методом. Несмотря на очевидные успехи трансплантологии, эффективность пересадки печени остается невысокой. С учетом изложенного, целью данного исследования явилось изучение возможности коррекции цирротических изменений в печени путем введения ММСК после трансфектирования их эпизомным вектором, содержащим фактор роста гепатоцитов (HGF).

На экспериментальной модели хронического фиброзирующего повреждения печени (крысы-самцы породы Вистар (n=120), затравка СС14, длительность эксперимента 90 суток) изучена эффективность клеточной терапии при коррекции хронической печеночной недостаточности. Выполнено 3 группы опытов: I группа (n=30) — контрольная (введение физиологического раствора); II группа (n=30) — введение в печень суспензии донорских мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в дозе  $8 \times 10^6$  клеток; III группа (n=30) — введение в печень клеток, плазмидой, содержащей ген фактора роста гепатоцитов, в суммарной дозе  $8 \times 10^6$  клеток; IV группа (n=30) — введение животным плазмиды, содержащей в качестве полезного гена ген фактора роста гепатоцитов в дозе 0.03 мг по ДНК. Установлено, что клеточная терапия во II и III группах опытов способствовала достоверно ускоренной нормализации нарушенных функций печени: к 40-м (II груп-