

гормонотерапии после комплексного лечения рака молочной железы. Так как данный вариант лечения позволяет лучше контролировать течение заболевания.

4. В любом случае наблюдение за пациентами из выборки будет продолжено в будущем с той целью, чтобы понимать подходы в терапии и выявлять факторы, которые могут способствовать рецидивам заболевания и увеличению смертности. Дальнейшее наблюдение позволит выработать персональные методы диспансерного наблюдения

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Рак молочной железы». – 2021. – 93 с. – URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/379_4 (дата обращения: 20.01.2024). – Текст: электронный.
2. Состояние онкологической помощи в России: рак молочной железы. Эпидемиология и выживаемость больных. Влияние эпидемии бета-варианта коронавируса SARS-CoV-2 (клинико-популяционное исследование). В.М. Мерабишвили, В.Ф. Семиглазов, А.В. Комяхов [и др.] / Опухоли женской репродуктивной системы // 2023. - №19(3). С.16-24.
3. Disparities in breast cancer mortality trends between 30 European countries: retrospective trend analysis of WHO mortality database / P. Autier, M. Boniol, C. Vecchia [et al.] // BMJ. – 2010. – Vol. 11, № 341. – 3620 p.
4. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up / S. Loibl, F. Andre, T. Bachelot [et al.] // Ann Oncol. – 2024. – Vol. 35, № 2. – P. 159-182.
5. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists / K. Johnson, E. Conant, M. Scott // Journal of Breast Imaging. – 2020. – Vol. 3, №1. – P. 12-24.
6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Breast Cancer Version 2.2024 — March 11, 2024 NCCN.org

Сведения об авторах

А.А. Суздалов* – студент лечебного факультета

Э.И. Гайсина - студент лечебного факультета

А.С. Сарапулова - студент лечебного факультета

И.Г. Усынин – аспирант кафедры онкологии УГМУ

С.М. Демидов – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедры онкологии и лучевой диагностики УГМУ.

Information about the authors

A.A. Suzdalov* - Student of the Faculty of General Medicine

E.I. Gaisina - Student of the Faculty of General Medicine

A.S. Sarapulova - Student of the Faculty of General Medicine

I.G. Usinin - Postgraduate student

S.M. Demidov – Professor, Doctor of Sciences (Medical)

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Syzdalov2015@mail.ru

УДК: 616-006.446.8

ПРИМЕНЕНИЕ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАЦИЙ ГЕНА *СЕВРА* ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ

Устинов Дмитрий Игоревич¹, Мухачева Татьяна Александровна², Емельянов Виктор Владимирович¹

¹Кафедра иммунохимии

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

²Лаборатория молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии

ГАОУЗ СО «Областная детская клиническая больница»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Мутации в гене *СЕВРА* являются одними из наиболее часто встречающихся генетических аномалий у пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Литературные данные свидетельствуют о клинической значимости таких мутаций, что обуславливает необходимость их выявления у всех первичных пациентов с ОМЛ. Наиболее удобным и наименее дорогостоящим для этой цели является метод фрагментного анализа. **Цель исследования** – отработать метод фрагментного анализа для выявления мутаций *СЕВРА* и определить частоту их встречаемости у детей и взрослых с ОМЛ. **Материал и методы.** Было исследовано 100 образцов ДНК, выделенной из костного мозга первичных пациентов с подтвержденным диагнозом ОМЛ, чей биологический материал был направлен на диагностику в Лабораторию молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАОУЗ СО «Областная детская клиническая больница» в период с 2017 по 2023 год. Выборка включала 50 взрослых и 50 детей в возрасте от 1 до 18 лет. Для каждого пациента были амплифицированы четыре фрагмента ДНК, перекрывающие всю кодирующую последовательность гена *СЕВРА*; полученные фрагменты были разделены методом капиллярного электрофореза. **Результаты.** Суммарно мутации гена *СЕВРА* были обнаружены в 14% случаев. Распределение мутаций по доменам гена гена *СЕВРА*: TAD1 - 14,3% (2 случая),

TAD1/2 - 28,6% (4), TAD2 - 57,1% (8), bZip - 28,6% (4). Среди них было 2 случая биаллельных (двойных) мутаций. Часть выявленных мутаций была верифицирована методом секвенирования. **Выводы.** Выявленная частота встречаемости мутаций гена *CEBPA* соответствуют литературным данным. Были отработаны условия метода фрагментного анализа для его последующего внедрения в клиническую практику.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, ОМЛ, *CEBPA*, фрагментный анализ, мутации, диагностика, скрининг.

FRAGMENT ANALYSIS FOR SCREENING *CEBPA* MUTATIONS IN PEDIATRIC AND ADULT PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Ustinov Dmitrii Igorevich¹, Mukhacheva Tatyana Alexandrovna², Emelianov Victor Vladimirovich¹

¹Department of Immunochemistry

Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Eltsin

²Laboratory of Molecular Biology, Immunophenotyping and Pathology

Regional Children's Clinical Hospital

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Mutations in the *CEBPA* gene are among the most common genetic abnormalities in patients with acute myeloid leukemia (AML). Previously published data indicate clinical significance of *CEBPA* mutations, which necessitates their identification in all primary patients with AML. The most convenient and cost-effective method for this aim is the fragment analysis. **The aim of this study** is the optimization of the fragment analysis conditions to detect *CEBPA* mutations and determine their incidence in children and adults with AML. **Material and methods.** We examined 100 DNA samples isolated from the bone marrow of primary patients diagnosed with AML, whose biological material was sent for diagnosis to the Laboratory of Molecular Biology, Immunophenotyping and Pathology of the Regional Children's Clinical Hospital between 2017 and 2023 years. The research cohort included 50 adults and 50 children aged 1-18 years. For each patient, we amplified four DNA fragments, covering the entire coding sequence of the *CEBPA* gene; we separated the resulting PCR fragments by capillary electrophoresis. **Results.** We detected mutations in the *CEBPA* gene in 14% of cases. Distribution of mutations by *CEBPA* domains was as follows: TAD1 - 14.3% (2 cases), TAD1/2 - 28.6% (4), TAD2 - 57.1% (8), bZip - 28.6% (4). Among them, there were two cases of biallelic (double) mutations. We confirmed several of the detected mutations by sequencing data. **Conclusion.** The observed incidence of *CEBPA* gene mutations corresponds to the previously published data. We optimized the fragment analysis conditions for its further implementation in clinical practice.

Keywords: acute myeloid leukemia, AML, *CEBPA*, fragment analysis, mutations, diagnosis, screening.

ВВЕДЕНИЕ

Мутации в гене *CEBPA*, кодирующем ССААТ-энхансер-связывающий белок альфа (С/ЕВР α), являются одними из наиболее широко известных генетических аномалий у пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). Классификация вариантов опухолей с миелоидной дифференцировкой Всемирной организации здравоохранения 2016 года выделяет ОМЛ с двойной (биаллельной) мутацией гена *CEBPA* в качестве отдельной группы ввиду ее значимости при определении прогноза течения заболевания [1].

Ген *CEBPA* расположен на 19 хромосоме (19q13.1), состоит из 1 экзона и кодирует фактор транскрипции С/ЕВР α , играющий роль в дифференцировке гранулоцитов [2]. Белок С/ЕВР α содержит два трансактивационных домена TAD1 и TAD2 на N-конце, необходимых для взаимодействия с другими транскрипционными факторами, и лейциновую застёжку (bZip) на C-конце, позволяющую белку связываться с ДНК. Большинство мутаций *CEBPA* являются вставками или делециями, которые часто приводят к сдвигу рамки считывания и, соответственно, синтезу укороченного белка [3]. В более ранних исследованиях было показано, что одновременное наличие мутаций в доменах TAD1/TAD2 и bZip (биаллельная мутация) связано с благоприятным прогнозом у пациентов с нормальным кариотипом (НК), при отсутствии внутренних tandemных дупликаций в гене *fms*-подобной тирозинкиназы 3 (*FLT3-ITD*). Однако позже была доказана клиническая значимость и одиночных мутаций в домене bZip, независимо от наличия мутаций в доменах TAD1 или TAD2 [4].

Выявление мутаций в гене *CEBPA* может влиять на определение терапевтической тактики, однако скрининг на эти мутации не является обязательным и проводится не для всех пациентов. Часто мутации *CEBPA* выявляют при анализе данных секвенирования нового поколения, однако этот метод до сих пор является дорогостоящим и не подходит для

массового скрининга пациентов. Альтернативой является метод фрагментного анализа, позволяющий в короткие сроки выявить наличие вставок и делеций в исследуемом гене.

Цель исследования – отработать метод фрагментного анализа для выявления мутаций *CEBPA* и определить частоту их встречаемости у детей и взрослых с ОМЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были выбраны 100 (50 взрослых, 50 детей) первичных пациентов с диагнозом ОМЛ, чей биологический материал был направлен на диагностику в Лабораторию молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница» в период с 2017 по 2023 годы. В выборку были включены пациенты с НК и отсутствием мутаций *FLT3-ITD* и *NPM1* (мутации *CEBPA* и *NPM1* являются взаимоисключающими [5]). Объектом исследования послужили образцы костного мозга (КМ), взятые у пациентов на момент постановки диагноза.

Выделение ДНК проводили при помощи набора HiPure Blood DNA Mini Kit (Magen Biotechnology, Guangzhou) в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием четырех пар праймеров, амплифицирующих фрагменты, перекрывающие всю кодирующую часть гена и включающие: (1) домен TAD1, (2) регион между TAD1 и TAD 2 (TAD1/2), (3) домен TAD2 и (4) домен bZip. Последовательности праймеров были взяты из статьи Benthous et al., 2008 (Таблица 1) [6].

Таблица 1.

Последовательности праймеров для ПЦР

Название	Последовательность (5'-3')	Длина продукта (дикий тип)
CEBPA 1F TAD1	FAM-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT	345 п.н.
CEBPA 1R TAD1	TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA	
CEBPA 2F TAD1/2	VIC-GCTGGGCGGCATCTGCCA	302 п.н.
CEBPA 2R TAD1/2	CCCCGACGCGCTCGTACAGG	
CEBPA 3F TAD2	FAM-CCGGCTACCTGGACGGCAGG	444 п.н.
CEBPA 3R TAD2	CGTTGCTGTTCTTGTCCACCGACTTCTT	
CEBPA 4F bZIP	VIC-CTCGGTGCCGCCGGCCT	349 п.н.
CEBPA 4R bZIP	AGTTGCCCATGGCCTTGAC	

Примечание: FAM (6-карбоксифлуоресцеин), VIC (фосфорамидит флуоресцеина) – красители, максимумы спектра флуоресценции которых находятся в синей и зеленой области спектра, соответственно.

Для каждого образца проводились четыре отдельные реакции ПЦР. Каждая реакция проходила в объеме 25 мкл и включала 2,5 мкл 10х-буфера Б (Синтол, Россия), 2 мкл 25 ммоль $MgCl_2$ (Promega Corporation, США), 1,5 мкл 10ммоль/л dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific, США), 1,5 мкл ДМСО, 2 мкл смеси праймеров по 5 пмоль/мкл каждого (ДНК-Синтез, Россия), 0,5 мкл 5 Ед/мкл SynTaq полимеразы (Синтол, Россия), 2 мкл исследуемой ДНК в концентрации 50-150 нг/мкл. Программа ПЦР включала следующие стадии: начальная денатурация при 95°C 5 мин; 50 циклов: денатурация 95°C 20 сек, отжиг 65°C 20 сек, элонгация 72°C 40 сек; финальная элонгация 72°C 20 мин.

Разделение амплифицированных фрагментов проводилось методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), при этом продукты ПЦР четырех реакций смешивались и анализировались вместе. Обработка результатов проводилась с помощью программы GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems, США).

Наличие и тип мутаций (вставка/делеция, размер фрагментов) определяли путем сравнения пиков на электрофореграммах исследуемых образцов с контролями дикого типа (wild-type, WT) (Рис. 1).

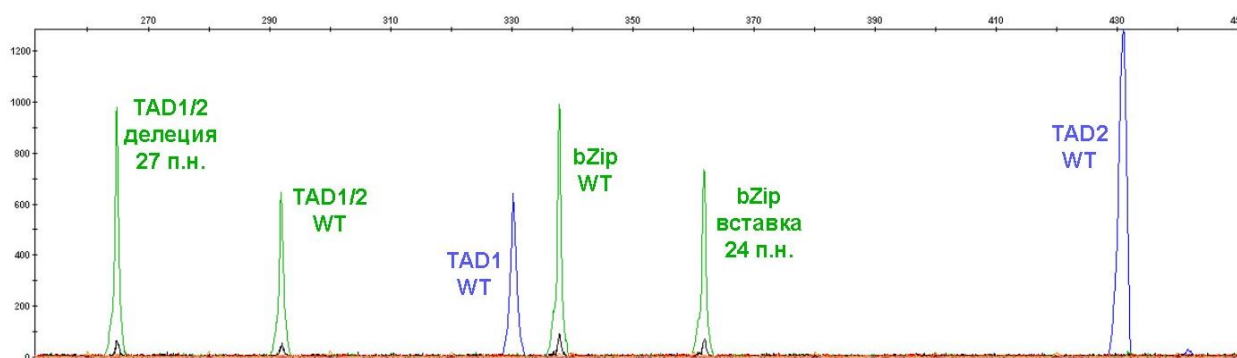


Рис.1 Пример электрофореграммы у пациента с биаллельной мутацией *CEBPA*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутации в гене *CEBPA* были обнаружены у 14 пациентов (6 взрослых и 8 детей). Среди них частота мутаций по доменам составила: TAD1 - 14,3% (1 случай среди взрослых, 1 среди детей), TAD1/2 - 28,6% (3 взрослых, 1 ребенок), TAD2 - 57,1% (4 взрослых, 4 ребенка), bZip - 28,6% (1 взрослый, 3 ребенка). Биаллельные мутации были обнаружены в 2 случаях. В одном случае (взрослый) были выявлены делеция 27 п.н. в регионе TAD1/2 и вставка 24 п.н. в домене bZip, что не приводило к сдвигу рамки считывания (Рис. 1). Во втором случае (ребенок) была определена делеция 1 п.н. в TAD1 со сдвигом рамки считывания и вставка 3 п.н. в bZip. Наиболее часто встречалась вставка 6 п.н. в домене TAD2 – 50% (4 случая среди взрослых, 3 среди детей).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании мутации *CEBPA* были обнаружены в 16% случаев у детей и в 12% случаев среди взрослых (14% от всей выборки), что соответствует литературным данным (15-18% случаев у больных ОМЛ с НК). При этом частота встречаемости мутаций сильно варьируется в разных исследованиях (от 6 до 20%), что, скорее всего, обусловлено различиями в исследуемых выборках [3, 5, 7].

Для 5 пациентов были доступны данные секвенирования, подтверждающие наличие мутаций, найденных методом фрагментного анализа. Примечательно, что у двух из них был идентифицирован генетический вариант c.584_589dup (p.His195_Pro196dup), представляющий собой вставку 6 п.н. в домене TAD2. Указанный вариант определяется как полиморфизм, не имеющий клинической значимости и встречающийся в здоровой популяции с частотой около 20% [7]. В нашей выборке подобные вставки встречались в половине случаев. Невозможность идентификации обнаруженных вставок и делеций, и, соответственно, определения их клинической значимости, является главным ограничением фрагментного анализа.

Этот метод также не позволяет детектировать нуклеотидные замены, поскольку они не приводят к изменению длин фрагментов ДНК. Клиническая значимость таких мутаций в гене *CEBPA* изучена недостаточно. В нескольких исследованиях было продемонстрировано, что некоторые точечные мутации на N-конце способны приводить к появлению стоп-кодона и синтезу укороченной изоформы белка, что может способствовать лейкозогенезу [2, 3]. Однако большинство авторов склоняется к мнению о том, что наличие только N-концевых нонсенс-мутаций не влияет на прогноз течения заболевания, и, следовательно, стратегию терапии [5, 7]. Отсюда следует, что данный недостаток фрагментного анализа не имеет большого значения.

При всем этом достоинства фрагментного анализа, а именно более низкая стоимость и меньшие затраты времени, делают его подходящим для скрининговой диагностики мутаций гена *CEBPA* у пациентов с ОМЛ.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости мутаций гена *CEBPA* в исследуемой выборке составила 14%: 12% среди взрослых пациентов и 16% среди детей. Мутации в домене bZip были выявлены в

4 случаях; в двух из них были выявлены также мутации в доменах TAD1/TAD2 (биаллельная мутация).

2. Полученные результаты соответствуют литературным данным и подтверждаются результатами секвенирования, что свидетельствует о чувствительности и надежности метода фрагментного анализа.

3. Фрагментный анализ представляет собой альтернативу секвенированию при скрининге пациентов с ОМЛ на мутации *CEBPA*, требуя меньших финансовых и временных затрат.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Острые миелоидные лейкозы». – 2020. – 95 с. – URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/ostrye_mieloidnye_lejkozy.pdf (дата обращения: 11.03.2024). Текст: электронный.
2. Nerlov, C. C/EBPα mutations in acute myeloid leukaemias / C. Nerlov // Nature Reviews Cancer. – 2004. – Vol. 4, №. 5. – P. 394-400.
3. Mendoza H., Laboratory evaluation and prognostication among adults and children with CEBPA-mutant acute myeloid leukemia / H. Mendoza, N. A. Podoltsev, A. J. Siddon // International journal of laboratory hematology. – 2021. – Vol. 43. – P. 86-95.
4. Acute myeloid leukemia with CEBPA mutations: current progress and future directions / L. Su, Y. Shi, Z. Liu, S. Gao // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 806137.
5. Leukemogenic nucleophosmin mutation disrupts the transcription factor hub that regulates granulomonocytic fates / X. Gu, Q. Ebrahim, R. Mahfouz [et al.] // The Journal of clinical investigation. – 2018. – Vol. 128, №. 10. – P. 4260-4279.
6. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia / T. Benthous, F. Schneider, G. Mellert [et al.] // British journal of haematology. – 2008. – Vol. 143., №. 2. – P. 230-239.
7. Characterization of CEBPA mutations in acute myeloid leukemia: most patients with CEBPA mutations have biallelic mutations and show a distinct immunophenotype of the leukemic cells / L. I. Lin, C. Y. Chen, D. T. Lin [et al.] // Clinical cancer research. – 2005. – Vol. 11., №. 4. – P. 1372-1379.

Сведения об авторах

Д.И. Устинов* – студент магистратуры по специальности «биотехнология»

Т.А. Мухачева – кандидат биологических наук, биолог

В.В. Емельянов – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.I. Ustinov* – M.S. student (Biotechnology)

T.A. Mukhacheva – Candidate of Sciences (Biology), Biologist

V.V. Emelianov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

udi96@yandex.ru

УДК: 616-092.18

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОК С ДИАГНОЗОМ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩИХ ОПЕРАЦИЙ

Федулов Андрей Андреевич, Петрова Дарья Дмитриевна, Ткачев Максим Валерьевич, Орлов Андрей Евгеньевич, Каганов Олег Игоревич

Кафедра онкологии

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Самара, Россия

Аннотация

Введение. Ключевым показателем хирургического лечения является количество послеоперационных койко-дней. Его снижение до определенного уровня имеет первостепенное значение. При лечении рака молочной железы одним из ключевых этапов является определение вовлеченности регионарных лимфатических узлов. Было разработано устройство для биопсии сигнального лимфатического узла (патент на полезную модель № 176191 11.01.2018). При визуализации сигнального лимфатического узла его фиксируют предложенным устройством и отделяют от прилежащих тканей. В дальнейшем передают врачам - патологоанатомам для проведения срочного гистологического исследования. **Цель исследования** – произвести сравнительную оценку результатов, экономических затрат исходя из количества койко-дней в группах сравнения после выполнения органосохраняющих операций. **Материал и методы.** Проведено ретроспективное исследование результатов лечения 132 больных с диагнозом РМЖ. Всем больным, включенным в исследование, выполнялись резекции молочных желез с биопсией СЛУ. Возраст пациентов, включенных в исследование, был от 35 до 78 лет. У всех больных групп сравнения диагностирован инвазивный рак. **Результаты.** Среднее время операции в контрольной группе составило 62,5 минут, а в основной 52,9, разница статистически значима. Средний объем кровопотери в