

А.В. Виноградов

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРАТИФИКАЦИИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ ВЗРОСЛЫХ

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

С 2008 г. наличие отдельных хромосомных и генных мутаций, имеющих прогностическое значение при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) было включено в классификацию Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для миелоидных опухолей. В следующем пересмотре классификации указанный перечень был расширен за счет более детального описания как хромосомных, так и генных мутаций [1, 2]. Указанный перечень был интегрирован в российские клинические рекомендации по ОМЛ, однако в качестве обязательного метода генетического обследования пациентов в них указано только стандартное цитогенетическое исследование. При этом авторы рекомендаций справедливо отмечают, что даже указанная методика до настоящего времени не внедрена повсеместно в гематологических центрах, соответственно доступ к ней больных в ряде регионов по-прежнему ограничен [7, 8].

Цель исследования — определить современные технологии генетической стратификации ОМЛ взрослых и выполнить их сравнительный анализ.

Материалы и методы

Собственные исследования выполнялись в 2008-2021 гг. на базах гематологических центров ГАУЗ СО «Свердловская об-

ластная клиническая больница №1», ГБУЗ СО «Центральная городская больница №7 город Екатеринбург», лабораторных отделений указанных больниц, а также молекулярно-генетических лабораторий ФГБУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России и ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница». В качестве исследуемого материала использовали периферическую кровь и костный мозг взрослых больных ОМЛ (n=209). Используемые методы обследования описаны в ранее опубликованных работах [4, 5].

В соответствии с актуальной версией национальных клинических рекомендаций по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов Минздрава России [8], всем больным с впервые выявленными ОМЛ проводилось кариотипирование, молекулярно-генетическое исследование мРНК-транскриптов химерных устойчиво выявляемых при ОМЛ генов RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, PML-RARA, MLL3-MLL, DEK-NUP214, а также гена BCR-ABL методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методом прямого секвенирования исследовали мутации в генах NPM1, FLT3, TP53, а также в гене c-KIT — при ОМЛ со специфическими аномалиями, ассоциированными с благоприятным прогнозом [3, 8]. Методом ПЦР с последующим фрагментным анализом определяли инсерции в гене NPM, внутренние tandemные дупликации и мутацию D835 в тирозинкиназном домене в гене FLT3.

Результаты исследования

Цитогенетические исследования (G-banding)

Кариотипирование выполнено всем пациентам (n=209). В результате исследования в 53 случаях были определены устойчиво выявляемые при ОМЛ генетические аномалии, ассоциированные с благоприятным прогнозом: t(8;21)(q22;q22) (n=12), inv(16)(p13;q22) (n=13), t(15;17)(q22;q12) (n=17). Специфические аномалии, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом (t(9;11)(p22;q23), t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21;q26), t(9;22)(q24;q11) и др.) обнаружены у 11 пациентов. В наибольшем количестве проб определялся нормальный кариотип (n=77,

36,8%), реже встречались кариотипы с трисомиями хромосом (n=25, 12,0%), комплексными аномалиями (3 и более) (n=22, 10,5%), прочими структурными aberrациями, ассоциированными с неопределенным прогнозом (n=14, 6,7%). В 10 случаях (4,8%) были выявлены моносомии и делеции длинного плеча хромосом 5 и 7, характерные для ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией. В трех случаях (1,4%) определялся моносомный кариотип заболевания, также ассоциированный с предшествовавшей ОМЛ миелодисплазией [1, 3, 8].

Молекулярно-генетические исследования химерных генов методом ПЦР

ПЦР-исследование устойчиво выявляемых при ОМЛ генетических аномалий, включенных в классификацию ВОЗ, выполнено в 145 случаях. С наибольшей частотой определялся химерный мРНК-транскрипт PML-RARA — 15 наблюдений (10,3%). Транслокация t(8;21)(q22;q22) и инверсия inv(16)(p13;q22), ассоциированные с благоприятным прогнозом, определялись в 12 (8,3%) и 7 (4,8%) пробах, соответственно. Ассоциированные с неблагоприятным прогнозом транскрипты химерных генов MLL3-MLL и BCR-ABL были выявлены каждый в трех наблюдениях (2,1%). Общая результативность метода составила 27,6%.

Молекулярно-генетические исследования точечных мутаций методом прямого секвенирования

Мутации в генах NPM1, FLT3, TP53 и c-KIT, включенные в классификацию ВОЗ для миелоидных опухолей и рекомендации European LeukemiaNet [1, 3, 8], исследованы методом прямого секвенирования в 75, 103, 72 и 14 пробах, соответственно. Оценка мутационного статуса гена c-KIT проводилась только в пробах, положительных по t(8;21)(q22;q22) и inv(16)(p13;q22), при так называемых СВФ-лейкозах. В гене FLT3 мутации выявлены в 16 наблюдениях (15,5%), преобладающим типом были внутренние tandemные дубликации (n=14, 13,3%), несинонимичные замены в тирозинкиназных доменах встречались зна-

чительно реже ($n=2$, 1,9%). Инсерции в экзоне 12 гена NPM1 определялись в 7 биообразцах (9,3%), преобладающим вариантом, при этом, была инсерция типа А. В двух случаях в исследованных образцах одновременно определялись мутации NPM1 и FLT3 (2,7%). Мутации в антионкогене TP53 определены в 7 пробах (9,7%) и были представлены в большинстве случаев однонуклеотидными заменами в кодирующей последовательности ДНК-связывающего домена. В 6 случаях мутации TP53 выявлялись у больных с комплексными хромосомными aberrациями, в 1 — с нормальным кариотипом. Мутации с-KIT при СВФ-ОМЛ были выявлены в 3 пробах (21,4%), в т.ч. двух — положительных по $t(8;21)(q22;q22)$, одной — по $inv(16)(p13;q22)$. Кумулятивная частота выявления мутаций во всех исследуемых генах составила 30,1%.

Молекулярно-генетические исследования точечных мутаций методом ПЦР

Параллельное исследование мутаций в генах NPM1 и FLT3 методом ПЦР с последующим фрагментным анализом выполнено у 44 больных. Мутации в исследованных генах определялись в эквивалентном количестве наблюдений — 12 (27,3%), что соответствовало общей эффективности метода. В 5 случаях (11,4%) мутации определялись одновременно в обоих исследованных генах. Мутации в гене NPM1 были представлены инсерциями в экзоне 12, в гене FLT3 — внутренними тандемными дупликациями ($n=10$, 22,7%) и однонуклеотидными заменами в кодоне D835 тирозинкиназного домена ($n=2$, 4,5%).

Обсуждение результатов

Таким образом, применение различных методов генетической стратификации лейкозов позволяет выявлять те или иные генные и хромосомные мутации с различной эффективностью и частотой (таблица).

Таблица
Сравнительная характеристика различных методов
генотипирования ОМЛ

Название	Выявляемые мутации	Частота выявления	Особенности применения	Ограничения
Стандартная цитогенетика	Хромосомные мутации	63,2%	Выявляет любые хромосомные мутации	В 15-20% случаев материал не пригоден для интерпретации
ПЦР для детекции химерных генов	Мутации, сопровождающиеся образованием химерного мРНК-транскрипта	27,6% (для RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, PML-RARA, MLL3-MLL, DEK-NUP214, BCR-ABL)	Выявляет конкретные мРНК-транскрипты химерных генов	При малом объеме материала исследование невозможно (менее 5%), PML-RARA — только при остром промиелоцитарном лейкозе
Прямое секвенирование генных мутаций	Мутации в пределах исследуемых областей генов	30,1% (для NPM1, FLT3, TP53, c-KIT)	Выявляет все возможные генные мутации в исследуемой области	При малом объеме материала исследование невозможно (менее 5%), c-KIT — только при СВФ-ОМЛ
ПЦР для детекции мутаций в генах NPM1 и FLT3	Мутации определенного типа в конкретных областях гена	27,3% (эквивалентно для NPM1 и FLT3)	Выявляет мутации только определенного типа в исследуемой области	При малом объеме материала исследование невозможно (менее 5%), FLT3 — только внутренние дупликации и мутация D835, NPM1 — только инсерции в экзоне 12

При этом одновременно могут выявляться как различные хромосомные, так и генные мутации. Например, при комплексных хромосомных aberrациях часто выявляются мутации в гене TP53, а при транслокации t(8;21)(q22;q22) и inv(16)(p13;q22) — мутации в гене c-KIT. Напротив, мутации в гене NPM1 наиболее

часто выявляются при нормальном кариотипе опухоли, однако зачастую сопровождаются мутациями в гене FLT3. Различные сочетания мутаций при этом имеют неодинаковое значение для прогноза общей выживаемости пациентов. Напротив, наличие химерного транскрипта гена PML-RARA обуславливает во всех случаях благоприятный прогноз независимо от наличия иных хромосомных и генных мутаций [6-8].

Заключение

Таким образом, для прогностической стратификации и подбора адекватного ей лечебного режима при ОМЛ взрослых необходимо применение различных методов генотипирования с последующей интегральной оценкой полученных результатов.

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., Сазонов С.В. и соавт. Мутационный статус острого миелобластного лейкоза с созревани-ем (M2) у взрослых больных // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2021. – Т. 16. № 1. – С. 18-21.
6. Кашлакова А.И., Паровичникова Е.Н., Бидерман Б.В. и соавт. Определение молекулярно-генетического профиля у взрос-

лых больных острыми миелоидными лейкозами методом секвенирования нового поколения // Гематология и трансфузиология. 2020. – Т. 65. №4. – С. 444-459.

7. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афансьев Б.В. и соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых // Гематология и трансфузиология. 2014. – Т. 59. - № S2. – С. 2-29.

8. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афансьев Б.В. и соавт. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. М.: Национальное гематологическое общество, 2018. – 70 с.