

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.23868/201912027

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ У БОЛЬНЫХ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТОВА.В. Виноградов^{1,2}, А.В. Резайкин¹, С.В. Сазонов^{1,3}, А.Г. Сергеев¹, М.Ю. Капитонова⁴¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия² Свердловская областная клиническая больница № 1, Екатеринбург, Россия³ Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия⁴ Университет Малайзии Саравак (ЮНИМАС), Малайзия**MUTATION LANDSCAPE OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN ELDERLY PATIENTS**A.V. Vinogradov^{1,2}, A.V. Rezaykin¹, S.V. Sazonov^{1,3}, A.G. Sergeev¹, M.Y. Kapitonova⁴¹ Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia² Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Ekaterinburg, Russia³ Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia⁴ University Malaysia Sarawak (UNIMAS), Malaysia

e-mail: a.vinogradov@egov66.ru

Молекулярно-генетический профиль острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) в возрастной группе пациентов старше 60 лет имеет особенности, обусловленные старением кроветворных клеток-предшественниц.

Цель исследования — определить частоту мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе старше 60 лет.

Анализировали пробы костного мозга и периферической крови 54 больных ОМЛ (возраст 60 лет и старше), которые были распределены по группам в соответствии с морфологическим вариантом ОМЛ: М0 — 2 пациента, М1 — 6, М2 — 27, М3 — 2, М4 — 11, М5 — 1, М6 — 3, острый миелофиброз — 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 1. Детекцию мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* проводили методом прямого автоматического секвенирования.

В обследованной группе преобладали больные ОМЛ из подгрупп неблагоприятного (33,3%, n=18) и неуточненного (42,6%, n=23) цитогенетического прогнозов. Дополнительный анализ биоматериала пациентов с использованием технологии прямого автоматического секвенирования позволил в 38,9% (n=21) случаев обнаружить скрытые патогенетически значимые мутации, в том числе у 3 больных (27,3%) — в подгруппе промежуточного, у 11 (61,1%) — неблагоприятного и у 7 (30,4%) — неуточненного цитогенетического прогнозов. С наибольшей частотой выявлялись мутации в генах *TP53* (20,0%) и *FLT3* (18,4%), частота прогностически значимых мутаций остальных исследованных генов не превышала 10,0%: *NRAS* — 7,7% (n=2), *KIT* — 5,9% (n=2), *NPM1* — 5,4% (n=2), *DNMT3A* — 9,1% (n=1). Молекулярные изменения в кодирующей последовательности гена *WT1* в биообразцах (n=26) не определялись, в т.ч. в 8 пробах пациентов ОМЛ с хромосомными aberrациями, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом. Множественные (две и более) функционально значимые мутации были обнаружены в 11,1% проб (n=6). При этом наиболее часто в кооперации участвовали мутации гена *FLT3*, в том числе *FLT3* ITD — в 4 случаях.

Выявление критических генных мутаций методом прямого автоматического секвенирования в 35,9% случаев (n=10) позволило уточнить прогностическую стратификацию ОМЛ из групп неуточненного и промежуточного прогнозов. Во всех указанных наблюдениях определялись генные мутации, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом. В целом, по результатам цитогенетического и дополнительного молекулярно-генетического исследований, благоприятный прогноз общей вероятностной выживаемости был установлен в 2 наблюдениях (3,7%), промежуточный — в 9 (16,7%), неблагоприятный — в 27 (50,0%), неуточненный — в 16 (29,6%).

Ключевые слова: мутация, острый миелоидный лейкоз, пожилой и старческий возраст, ген *DNMT3A*, ген *FLT3*, ген *KIT*, ген *NPM1*, ген *NRAS*, ген *TP53*, ген *WT1*, прямое секвенирование.

The molecular genetic landscape of acute myeloid leukemia (AML) have specific features in elderly patients, and these features correlates with hematopoietic progenitor cells senescence.

Aim: to estimate the frequency of mutations in *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes in AML patients in elderly.

Bone marrow and peripheral blood samples obtained from 54 AML patients aged over 60 years old. Distribution of the patients according to FAB-classification was as follows: AML M0 — 2, M1 — 6, M2 — 27, M3 — 2, M4 — 11, M5 — 1, M6 — 3, acute myelofibrosis — 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm — 1. Detection of mutations in *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes performed by automatic direct sequencing technique.

In the study group were more common patients with unfavorable (33.3%, n=18) and unspecified (42.6%, n=23) cytogenetics. The average frequency of functionally significant mutations in all investigated genes among the treated AML patients was 38.9% (n=21), including 3 cases (27.3%) with normal karyotype, 11 cases (61.1%) with unfavorable cytogenetics, 7 cases (30.4%) with unspecified karyotype. Average frequency of mutations in *TP53* gene exons 4–11 was 20.0%, *FLT3* gene exons 12–15 and 19–21 18.4%, *DNMT3A* exons 18–26 — 9.1%, *NRAS* gene exons 1–4 — 7.7%, *KIT* gene exons 7–12 and 16–19 — 5.9%, *NPM1* gene exons 9–12 — 5.4% (n=2), *DNMT3A* — 9.1% (n=1). Multiple point mutations in investigated genes were detected in 11.1% AML specimens (n=6, usually *FLT3* gene mutations, including *FLT3* ITD in 4 cases). Additional gene mutations detection using direct sequencing allowed to clarify the prognostic stratification of AML from groups of unspecified and intermediate prognosis in 35.9% (n=10). In all cases, they were associated with an unfavorable prognosis. Thus, using of cytogenetic and additional molecular genetic research, a favorable prognosis of overall survival was established in 2 cases (3.7%), intermediate — in 9 cases (16.7%), unfavorable — in 27 cases (50.0%), and unspecified — in 16 (29.6%).

Keywords: acute myeloid leukemia, elderly, *DNMT3A* gene, *FLT3* gene, *KIT* gene, *NPM1* gene, *NRAS* gene, *TP53* gene, *WT1* gene, sequencing.

Введение

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — это злокачественные новообразования крови, заболеваемость которыми увеличивается с возрастом, достигая максимума в группах больных пожилого и старческого возраста. Они развиваются вследствие соматических мутаций в ключевых прото- и антионкогенах кровяных клеток-предшественниц, характеризуются сложной клональной архитектурой и динамическими изменениями молекулярно-генетического профиля в процессе онкогенеза [1]. Так, мутации генов *NPM1*, *FLT3*, *NRAS* возникают на поздних стадиях онкогенеза и связаны с клинической манифестацией лейкоза. Напротив, мутации в генах *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2* появляются, как правило, на ранних стадиях злокачественной трансформации и могут длительно персистировать в фазе ремиссии, обуславливая риск развития рецидивов. При этом некоторые мутации могут определяться в лейкоцитах периферической крови здоровых доноров задолго до манифестации заболевания, и их частота также коррелирует с возрастом. Указанный феномен характеризуется как «клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом» и ассоциирован с повышенным риском развития лейкозов с частотой 0,5–1,0% в год [1–3].

Цель исследования — определить частоту мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* у больных ОМЛ в возрастной группе 60 лет и старше.

Материал и методы

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 54 больных ОМЛ в возрасте 60 лет и старше после получения информированного согласия, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период 2009–2018 гг. Среди пациентов было 26 мужчин (48,1%) и 28 женщин (51,9%). Средний возраст больных составлял $67,7 \pm 1,8$ лет.

Диагностику ОМЛ проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [4, 5] на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследований. По показаниям выполняли трепанобиопсию подвздошной кости с последующим гистологическим и иммуногистохимическим анализом [6]. Морфологический вариант ОМЛ определяли согласно франко-американско-британской (FAB) классификации [7], в соответствии с которой пациенты были распределены по подгруппам: М0 — 2 пациента, М1 — 6, М2 — 27, М3 — 2, М4 — 11, М5 — 1, М6 — 3, острый миелофиброз — 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 1.

Всем пациентам было выполнено цитогенетическое и(или) молекулярно-генетическое исследование аспирата костного мозга: полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени на транслокации $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q11)$, $t(9;22)(q34;q11)$, инверсию $inv(16)(p13;q22)$, аномалии сегмента 11q23. В 23 пробах костного мозга пациентов с ОМЛ уточнить вариант генетической поломки с применением цитогенетического и ПЦР-методов не удалось. Они, соответственно, были классифицированы как ОМЛ с неуточненным кариотипом [8].

Детекцию криптических генных мутаций осуществляли с помощью технологии прямого автоматического секвенирования. Всего на наличие мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена *FLT3* в изучаемой выборке были протестированы 49 проб периферической крови и костного мозга, экзонов 4–11 гена *TP53* — 45, экзонов

9–12 гена *NPM1* — 37, экзонов 7–12 и 16–19 гена *KIT* — 34, экзонов 1–4 гена *NRAS* — 26, экзонов 6–9 гена *WT1* — 26, экзонов 18–26 гена *DNMT3A* — 11. Праймеры, использованные для детекции мутаций в указанных генах, а также лабораторные протоколы исследований, описаны нами ранее [9, 10].

Проверку статистических гипотез проводили с применением точного критерия Фишера (F). Доверительные интервалы (ДИ) для средних частот мутаций генов определяли на основе биномиального распределения.

Результаты

Наиболее частым типом хромосомных aberrаций в обследованной группе больных являлись комплексные хромосомные aberrации (22,2%, $n=12$, при 95% ДИ от 13,2 до 34,9%). В 20,4% случаев ($n=11$, при 95% ДИ от 11,8 до 32,9%) определялся нормальный кариотип лейкоэмических blasts. Специфические структурные aberrации хромосом, ассоциированные с благоприятным прогнозом, были выявлены в 2 пробах (3,7%, при 95% ДИ от 1,0 до 12,5%), в том числе транслокация $t(8;21)(q22;q22)$ и транслокация $t(15;17)(q22;q11)$ — по одному случаю (1,9%, при 95% ДИ от 0,3 до 9,9%). Изолированные специфические хромосомные aberrации, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом, в исследуемой выборке не определялись. Неслучайная хромосомная аномалия трисомия хромосомы 8 была обнаружена в 4 образцах (7,4%, при 95% ДИ от 2,9 до 17,5%) при ОМЛ М2, М4 и бластной плазмацитоидной дендритоклеточной опухоли, случайные изохромосомы $i(7)$ и $i(7)(p10)$ — по одному случаю (1,9%, при 95% ДИ от 0,3 до 9,9%) при ОМЛ М2.

Патогенетически значимые для ОМЛ мутации в экзонах 4–11 гена *TP53* являлись наиболее частыми клинически значимыми криптическими генными мутациями, выявленными в исследуемой группе больных ОМЛ, они определялись в 9 биообразцах (20,0%, при 95% ДИ от 10,9 до 33,8%) при ОМЛ М2, М4, М6. В 7 биообразцах указанные аномалии были ассоциированы с комплексными хромосомными aberrациями (при ОМЛ М2, М4, М6), по одному случаю (при ОМЛ М2) — с нормальным и неуточненным кариотипом лейкоэмических клеток. В 7 пробах (15,6%, при 95% ДИ от 7,8 до 28,8%) были выявлены нуклеотидные замены (при ОМЛ М2, М4, М6), по одному случаю (2,2%, при 95% ДИ от 0,4 до 11,5%) — делеция и tandemная дупликация гена *TP53* (при ОМЛ М2). У одного пациента при ОМЛ М2 с кариотипом 45, XY, $del(2)(q)$, $iso(9)(q)$, $r(12)$, $del(17)(q)$, $add(19)(p)$, -15 одновременно были обнаружены две транзиции в кодирующей последовательности гена *TP53* — $c.292C>T$ и $c.817C>T$. Первая из них обуславливала замену $p.98P>S$ в пролиновом домене белка p53, вторая — $p.273R>C$ в ДНК-связывающем домене. Во всех остальных случаях определялись изолированные мутации, обуславливавшие инактивацию белка p53. Они были представлены тремя транзициями ($c.377A>G$, $c.659A>G$, $c.817C>T$), тремя трансверсиями ($c.395A>C$, $c.733G>T$, $c.841G>T$), фреймшифт-мутацией ($c.645delG$) и tandemной дупликацией 19 нуклеотидов, начиная с позиции 960 от начала кодирующей последовательности гена *TP53*. Подробная характеристика мутаций в гене *TP53* у больных ОМЛ представлена в табл. 1.

Генетические изменения в экзонах 12–15 и 19–21 гена *FLT3*, значимые для онкогенеза ОМЛ, были выявлены в 9 пробах (18,4%, при 95% ДИ от 10,0 до 31,4%) при морфологических вариантах М1, М2, М4 и М5. Среди них в 1 образце была обнаружена трансверсия $c.2479A>T$ (2,0%,

Таблица 1. Характеристика патогенетически значимых мутаций в гене *TP53*, выявленных у больных ОМЛ пожилого и старческого возраста

Вариант по FAB	Кариотип	Мутация	Локализация мутации в гене	Локализация и тип мутации в белке
M2	46, XX	c. 377 A>G	Экзон 5	ДНК-связывающий домен, р.126 Y>C
M2	>50, XXX (околотриплоидия)	c. 395A>C	Экзон 5	ДНК-связывающий домен, р.132 K>T
M2	47, XY, del(3)(p12), del(5)(q31), add(17)(p13), -7, +21, +mar	c. 645delG	Экзон 6	ДНК-связывающий домен, фреймшифт
M2	42, X, add(1)(q31), add(12)(q24), del(15)(p12), add(16)(p13), del(18)(?12), -3, -9, -13, -X	c. 841 G>T	Экзон 8	ДНК-связывающий домен, р.281 D>Y
M2	Неуточненный (низкая митотическая активность)	TD	Экзон 9	С-концевой/ NLS (сигнал ядерной локализации), фреймшифт
M2	45, XY, del(2)(q), iso(9)(q), r(12), del(17)(q), add(19)(p), -15	c. 292 C>T, c. 817 C>T	Экзоны 4 и 8	Пролиновый домен, р. 98 P>S, ДНК-связывающий домен, р. 273 R>C
M4	52, XYY, inv(3)(p12;q24), +1, +9, +11, +13, +19, +Y, +mar	c. 733 G>T	Экзон 7	ДНК-связывающий домен, р.245 G>C
M6	46, XX, del(5q)(3.2), add(18p)(1.1.3) or t(5;18)(q2.3;p1.1)/46, XX, del(17p)(1.2), add(18p)(1.1.3) or t(17;18)(p1.2;p1.1)/47, XX, del(5q)(3.2), add(18p)(1.1.3) or t(5;18)(q2.3;p1.1), +mar/46, XX	c. 659A>G	Экзон 6	ДНК-связывающий домен, р.220 Y>C
M6*	40–45, XY, del(4)(p14), -5, dup(7)(q11;q22), del(11)(q21), del(17)(p12), -19, +Ph, +mar1-4 [7]/ 41–45, XY, del(4)(p14), -5, del(6)(q23), dup(7)(q11;q22), del(11)(q21), +Ph, +mar1-3 [6]/ 40–45, XY, del(4)(p14), -5, dup(7)(q11;q22), del(11)(q21), inv(17)(q21;q25), -19, +Ph, +mar1-4 [5]/ 44, XY, del(4)(p14), -5, dup(7)(q11;q21), -19, +Ph [2]	c. 817 C>T	Экзон 8	ДНК-связывающий домен, р. 273 R>C

Примечание: *при ПЦР-исследовании транскрипт химерного BCR-ABL в пробе не выявлен

Таблица 2. Результаты исследования проб больных ОМЛ пожилого и старческого возраста с несколькими мутациями

Подтип по FAB	Характеристика выявленных мутаций в генах					
	<i>DNMT3A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>NPM1</i>	<i>TP53</i>	Кариотип
M1	WT	ITD	c. 1621A>C, c. 2586G>C	Инсерция типа A	WT	Неуточненный
M4	c. 2645 G>A	ITD	WT	WT	WT	Неуточненный
M5	WT	ITD	n. Del 1529-1774	WT	WT	Неуточненный
M2	NA	ITD	WT	Инсерция типа Ural-2	WT	Нормальный
M2	WT	c. 1683 A>G	c. 1621A>C, c. 2586G>C	WT	TD	Неуточненный
M2	WT	WT	WT	NA	c. 292 C>T, c. 817 C>T	45, XY, del(2)(q), iso(9)(q), r(12), del(17)(q), add(19)(p), -15

Примечание: функционально значимые мутации (в т. ч. гена *KIT* c. 1621A>C) выделены полужирным шрифтом, случаи выявления полиморфного аллеля гена *TP53* с. 215 C>G в таблицу не включены; WT — дикий тип (изменений кодирующей последовательности в сравнении с референсной не обнаружено), ITD — внутренняя тандемная дупликация, TD — тандемная дупликация, NA — исследование не проводилось

Таблица 3. Частота выявления патогенетически значимых генных мутаций при ОМЛ

Исследуемая группа	Частота мутаций в исследованных генах, %						
	<i>DNMT3A</i>	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>TP53</i>	<i>WT1</i>
ОМЛ, возраст 15–45 лет [16]	7,1	21,9	10,0	10,7	13,0	0,0	11,1
ОМЛ, возраст 60 лет и старше	9,1	18,4	5,9	5,4	7,7	20,0	0,0
ОМЛ, возраст 65 лет и старше [17]	27,0	12,0	–	16,0	12,0	21,0	–

Примечание: «–» — исследование не проводилось

при 95% ДИ от 0,4 до 10,6%), в 8 (16,3% при 95% ДИ от 8,5 до 29,0%) — внутренние тандемные дупликации (ITD) и инсерции, различающиеся по длине и локализации в кодирующих последовательностях юкстамембранного и киназного доменов. Во всех случаях выявленные ITD обуславливали чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам тирозинкиназ I типа [11–13].

Кооперация *FLT3* ITD с мутациями в других исследованных генах зафиксирована у 4 пациентов (44,4%, при 95% ДИ от 18,9 до 73,3%, табл. 2).

Частота детекции точечных мутаций в кодирующей последовательности экзонов 18–26 гена *DNMT3A* в исследуемой выборке составила 9,1% (при 95% ДИ от 1,6 до 37,8%). Выявленная мутация была представлена транзицией с. 2645 G>A, обусловливавшей замену остатка аргинина на гистидин в позиции 882 кодируемого белка, и определялась при ОМЛ М4 с неуточненным кариотипом и *FLT3* ITD (табл. 2).

Мутации в гене *NRAS* были найдены у 2 пациентов (7,7%, при 95% ДИ от 2,1 до 24,2%) при ОМЛ М2 и представлены, соответственно, функционально значимыми заменами с. 35 G>A и с. 181 C>A. Случаев их кооперации с другими молекулярными повреждениями зафиксировано не было.

Инсерции в экзоне 12 гена *NPM1* были обнаружены у 2 пациентов при ОМЛ М1 и М2 (5,4%, при 95% ДИ от 1,5 до 17,7%) и соответственно, представлены мутациями типа А и Ural-2 [6]. Наряду с ними в пробах выявлялись дополнительные мутации — *FLT3* ITD и трансверсия с. 1621 A>C в гене *KIT* (табл. 2). Проведенные статистические расчеты показали, что мутации генов *NPM1* и *FLT3* являлись неслучайными генетическими событиями, кооперация которых в онкогенезе ОМЛ обуславливала ухудшение прогноза общей выживаемости *NPM1*-позитивных пациентов [6].

Структурные изменения в кодирующей последовательности гена *KIT* определялись в 12 пробах (35,2%, при 95% ДИ от 20,0 до 52,7%). Среди них в 8 случаях выявлялись изолированные синонимичные замены (23,5%, при 95% ДИ от 21,5 до 52,1%, с. 2586 G>C, с. 1638 A>G, с. 2394 C>T), в 2 случаях (5,9%, при 95% ДИ от 1,6 до 19,1%) — несинонимичная замена с. 1621 A>C в сочетании с трансверсией с. 2586 G>C, по 1 случаю (2,9%, при 95% ДИ от 0,5 до 14,9%) — делеция (п. Del 1529-1774) в сочетании с трансверсией с. 2586 G>C и замена с. 1621 A>C в сочетании с транзигациями с. 1636 A>G и с. 1821 T>C. При ОМЛ М5, наряду с мутациями в гене *KIT*, определялась также мутация *FLT3* ITD (табл. 2). В 2 образцах с трансверсиями с. 1621 A>C и с. 2586 G>C были обнаружены также клинически значимые изменения других прото- и антионкогенов: при ОМЛ М1, — инсерция типа А в гене *NPM1* и мутация *FLT3* ITD, а при ОМЛ М2 — тандемная дупликация в гене *TP53* (табл. 2). По литературным данным трансверсия с. 1621 A>C является полиморфным

аллельным вариантом гена *KIT*, не имеющим самостоятельного прогностического значения при ОМЛ [14, 15], что подтверждается полученными нами результатами о случайном характере ее сочетания с другими функционально значимыми генетическими аномалиями при ОМЛ [16]. Делеция п. Del 1529-1774 в кодирующей последовательности экзонов 10 и 11 гена *KIT*, приводящая к утрате 82 остатков аминокислот в белке Kit, была описана нами ранее при ОМЛ М2 с транслокацией t(8;21)(q22;q22) и ОМЛ М4 с инсерцией типа А в экзоне 12 гена *NPM1* [16]. По данным, опубликованным в работе [15], мутации в экзоне 11 гена *KIT* являются патогенетически значимыми, т.к. затрагивают участок рецептора, обеспечивающий ингибирование его аутофосфорилирования. Следовательно, в подобных случаях должен прорабатываться вопрос о назначении таргетного лечения ингибиторами тирозинкиназ I типа в рамках клинических исследований.

Структурные изменения в кодирующей последовательности гена *WT1* в исследованных пробах (n=26) не определялись, однако в 3 образцах (11,5%, при 95% ДИ от 4,0 до 28,9%) при ОМЛ М2, М3 и М5 было найдено преобладание экспрессии транскрипционного варианта типа D, тогда как в остальных случаях транскрипты типа А и D выявлялись в эквивалентном количестве.

Обсуждение

Функционально значимые мутации в кодирующих последовательностях экзонов 18–26 гена *DNMT3A*, 12–15 и 19–21 гена *FLT3*, 7–12 и 16–19 гена *KIT*, 1–4 гена *NRAS*, 9–12 гена *NPM1* и 4–11 гена *TP53* были обнаружены с использованием технологии прямого автоматического секвенирования в 21 исследованной пробе от больных ОМЛ в возрасте 60 лет и старше (38,9%, при 95% ДИ от 27,0 до 52,2%), что коррелировало с ранее полученными результатами (табл. 3).

В целом оказалось, что с максимальной частотой при ОМЛ в возрастной группе пациентов 60 лет и старше определялись функционально значимые мутации в гене *TP53* (20,0%), что было существенно выше, чем у больных ОМЛ в возрасте 15–45 лет (табл. 3) и сопоставимо с результатами исследования Н. Döhner с соавт. (2018) [17]. Частота генетических изменений в гене *FLT3* была сопоставима с таковой в ранее обследованной группе больных ОМЛ в возрасте 15–45 лет [16], однако не превышала 20,0%. Имевшие патогенетическое значение при ОМЛ мутации в гене *KIT* выявлялись в группе больных ОМЛ старше 60 лет с частотой 5,9% (n=2, при 95% ДИ от 1,6 до 19,1%). Мутации в генах *DNMT3A*, *NRAS* и *NPM1* обнаруживались с более низкой частотой (9,1%, 7,7% и 5,4%, соответственно) по сравнению с результатами работы Н. Döhner с соавт. (2018) [17]. Для мутаций гена *DNMT3A* и инсерций экзона 12 гена *NPM1* это частично можно объяснить цитогенетическим профилем выборки (диплоидия определялась лишь в 20,4% наблюдений).

По две и более функционально значимые мутации в исследованных генах были обнаружены у 6 больных ОМЛ в возрасте 60 лет и старше (11,1% при 95% ДИ от 5,2 до 22,2%, табл. 2). У 3 больных при ОМЛ М1, М2, М4 и М5 была выявлена кооперация мутации *FLT3* ITD с мутациями в генах *KIT* и *NPM1* (по 2 случая), а также *DNMT3A* (1 случай, табл. 2). У одного больного при ОМЛ М2 с мутацией TD в гене *TP53* ко-мутацией являлась трансверсия с. 1621A>C в гене *KIT*. У другого пациента при ОМЛ М2, были обнаружены одновременно две мутации в гене *TP53*. Таким образом, только в пяти пробах (9,3%, при 95% ДИ от 4,1 до 20,0%) определялось по два патогенетически значимых при ОМЛ молекулярных события.

Определенный интерес в исследованной выборке вызывают результаты детекции генетических аномалий в пробах от пациентов с редкими гематологическими заболеваниями, относящимися к ОМЛ — острым миелофиброзом, острым промиелоцитарным лейкозом (ОПЛ) и бластной плазмоцитоидной дендритоклеточной опухолью, т.к. сведения об их молекулярно-генетических особенностях у лиц пожилого и старческого возраста ограничены [1, 5, 17]. Так, в двух пробах от пациентов с ОПЛ (мужчины, возраст 60 и 62 года) мутаций в исследованных прото- и антионкогенах выявлено не было: у одного пациента цитогенетически определялась транслокация $t(15;17)(q22;q21)$, а у другого — методами цитогенетики и ПЦР хромосомные поломки не обнаружались. Оба случая характеризовались ранней летальностью на фоне проведения индукционной полихимиотерапии, включающей полностью транс-ретиноевую кислоту. При остром миелофиброзе (женщина, 67 лет) также не удалось выявить значимых мутаций в генах *FLT3*, *NPM1*, *KIT*, *TP53* и хромосомных aberrаций цитогенетическим и ПЦР-методами. Также не были обнаружены значимые изменения в исследованных генах у большого бластной плазмоцитоидной дендритоклеточной опухоли (мужчина, 61 год), хотя в данном случае был определен aberrантный кариотип лейкозных бластов (трисомия хромосомы 8). Для последних двух пациентов была характерна первичная резистентность опухолей к проводимому химиотерапевтическому лечению. Это свидетельствует о возможном участии в онкогенезе указанных разновидностей миелоидных лейкозов иных молекулярных событий, для детекции которых необходимо использовать технологии массового параллельного секвенирования.

В целом, в обследованной группе преобладали пациенты с неблагоприятным и неуточненным цитогенетическим прогнозом. Однако дополнительный

анализ биоматериала пациентов с применением технологии прямого автоматического секвенирования позволил в 38,9% случаев выявить скрытые патогенетически значимые мутации исследованных генов, в т.ч. в 3 случаях (27,3%) — в подгруппе промежуточного, в 7 (30,4%) — неуточненного и в 11 (61,1%) — неблагоприятного прогнозов. При этом прогностическая стратификация ОМЛ ухудшалась у 9 пациентов (26,5%, при 95% ДИ от 14,6 до 43,2%) в группах промежуточного и неуточненного цитогенетического прогнозов. У остальных пациентов она не менялась, т.к. выявленные хромосомные aberrации были ассоциированы с неблагоприятным прогнозом.

Таким образом, по результатам цитогенетического и дополнительного молекулярно-генетического исследований благоприятный прогноз общей вероятностной выживаемости был установлен у 2 пациентов (3,7%, при 95% ДИ от 1,0 до 12,5%), промежуточный — у 9 (16,7%, при 95% ДИ от 9,1 до 28,8%), неблагоприятный — у 27 (50,0%, при 95% ДИ от 37,1 до 62,9%), неуточненный — у 16 (29,6%, при 95% ДИ от 16,5 до 50,0%). Полученные данные необходимо учитывать для планирования и разработки персонализированных программ лечения больных ОМЛ пожилого и старческого возраста и включить технологии секвенирования в алгоритмы диагностики ОМЛ, предусмотренные национальными клиническими рекомендациями.

Выводы

1. Кумулятивная частота детекции патогенетически значимых мутаций в генах *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS* и *TP53* у больных ОМЛ пожилого и старческого возраста составляла 38,9%.

2. С максимальной частотой у больных ОМЛ в возрасте 60 лет и старше определялись мутации в генах *TP53* (20,0%) и *FLT3* (18,4%), частота клинически значимых мутаций остальных исследованных генов варьировала в диапазоне 5,4–9,1%, а мутации в гене *WT1* не определялись.

3. Частота обнаружения множественных генных мутаций у больных ОМЛ в возрасте 60 лет и старше составляла 11,1%, наиболее часто в кооперации участвовали мутации гена *FLT3*.

4. Применение метода прямого секвенирования позволило уточнить прогноз у 26,5% больных ОМЛ из групп промежуточного и неуточненного цитогенетического прогнозов за счет выявления криптических мутаций в генах *TP53*, *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *NPM1* и *DNMT3A*. Однако прогноз стандартного химиотерапевтического лечения ОМЛ во всех случаях ухудшался.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35(9): 934–46.
2. Desai P., Mencia-Trinchant N., Savenkov O. et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat. Med.* 2018; 24(7): 1015–23.
3. Zink F., Stacey S.N., Norddahl G.L. et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* 2017; 130: 742–52.
4. 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; 114: 937–52.
5. 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; 127: 2391–405.
6. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и др. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена *NPM1* при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2013; 4: 124–7. (Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R. et al. Comparative

analysis of *NPM1* gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Journal of Ural Medical Academic Science* 2013; 4: 124–7).

7. Walter R.B., Othus M., Burnett A.K. et al. Significance of FAB subclassification of “acute myeloid leukemia, NOS” in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood* 2013; 121: 2424–31.

8. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Изотов Д.В. и др. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2016; 4: 38–51. (Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V. et al. *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science* 2016; 4: 38–51).

9. 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: 34–5. (Vinogradov A.V. Technology development of *CDKN2A/ARF*, *FLT3*,

KIT, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* gene mutations detection during acute myeloid leukemia. Russian Journal of Oncology 2013; 4: 34–5).

10. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций в гене *DNMT3A* при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования. Бюллетень сибирской медицины 2015; 14(1): 18–23. (Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. *DNMT3A* gene point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Bulletin of Siberian Medicine 2015; 14(1): 18–23).

11. Smith C.C., Wang Q., Chin C.S. et al. Validation of ITD mutations in *FLT3* as a therapeutic target in human acute myeloid leukemia. Nature 2012; 485: 260–3.

12. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. Blood 2011; 118: 60–8.

13. Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R. et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the *FLT3* tyrosine kinase receptor. Blood 2009; 113: 4074–7.

14. Szatkowski D., Hellmann A. The overexpression of *KIT* proto-oncogene in acute leukemic cells is not necessarily caused by the gene mutation. Acta Haematol. 2015; 133: 116–23.

15. Heldin C.H., Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013; 5(8): a009100.

16. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В. и др. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15–45 лет. Гены и клетки 2018; 14(3): 72–7. (Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V. et al. Clinical and pathological features *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes mutations detection in acute myeloid leukemia patient aged 15–45 years old. Genes and Cells 2018; 14(3): 72–7).

17. Döhner H., Dolnik A., Tang L. et al. Cytogenetics and gene mutations influence survival in older patients with acute myeloid leukemia treated with azacitidine or conventional care. Leukemia 2018; 32(12): 2546–57.

Поступила: 28.05.2019