

На правах рукописи

БАСХАЕВА ГАЛИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ГЕНА *IKZF1* ПРИ
В-КЛЕТОЧНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ**

14.01.21 - гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Паровичникова Елена Николаевна**
кандидат биологических наук **Бидерман Белла Вениаминовна**

Официальные оппоненты:

– **Карачунский Александр Исаакович** – доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации – директор Института онкологии, радиологии и ядерной медицины.

– **Мартынкевич Ирина Степановна** – доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2018 года в ____ часов

на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу:
125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru
Автореферат разослан «__» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Использование современных программ полихимиотерапии (ПХТ) значительно улучшило результаты лечения В-клеточных острых лимфобластных лейкозов (В-ОЛЛ) — у взрослых: ремиссии становится возможным достичь у 85—90% больных. Несмотря на это, 5-летняя общая выживаемость (ОВ) не превышает 40—50% [Inaba H., 2013; Bassan R., 2015; Paul S., 2016], а риск развития рецидива достигает 40—50%, в том числе у больных из группы стандартного риска с нормальным кариотипом [Paul S., 2016; Issa G., 2017]. В Российском многоцентровом исследовании ОЛЛ-2009, главным принципом которого является неинтенсивное, но постоянное химиотерапевтическое воздействие с малым числом трансплантаций аллогенного костного мозга (алло-ТКМ), у большинства больных Ph-негативным В-ОЛЛ была достигнута морфологическая ремиссия. Однако при анализе долгосрочных результатов 5-летняя ОВ больных составила 53,3%, безрецидивная выживаемость (БРВ) — 56%. При мультивариантном анализе были выделены следующие факторы риска: возраст старше 30 лет, лейкоцитоз $30 \times 10^9/\text{л}$ и более, уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) более 750 ед/л, обнаружение транслокации t(4;11) [Паровичникова Е.Н., 2017]. Наблюдаемые с высокой частотой рецидивы свидетельствуют о том, что выделенных факторов риска недостаточно для адекватного прогнозирования течения заболевания. Необходим поиск дополнительных маркеров онкогенных механизмов, которые приводят к селекции опухолевого клона, резистентного к применяемой терапии.

Современные достижения в области молекулярной генетики открывают новые возможности диагностики, прогнозирования и лечения В-ОЛЛ. В процессе лейкемогенеза изучается роль делеций и мутаций генов факторов лимфоидной транскрипции, регуляции клеточного цикла и опухолевой супрессии, генов регуляции апоптоза [Mullighan C., 2007]. Среди них особый интерес представляют aberrации гена *IKZF1* (Ikaros Family Zinc Finger 1), они встречаются в 75% случаев Ph-позитивных В-ОЛЛ [Iacobucci I., 2012; Mullighan C., 2008], в 15% случаев детских и 30—50% случаев взрослых Ph-негативных В-ОЛЛ [Kuiper R., 2010; Waanders E., 2011; Dorge P., 2013; Caye A., 2013; Beldjord K., 2014].

В нормальных условиях ген *IKZF1* образует транскрипционный фактор Ikaros [Olsson L., 2015], который является ключевым регулятором лимфоидных клеток на самых ранних этапах лимфопоэза, способствует их дифференцировке и созреванию, участвует в организации структуры хроматина [Cortes M., 1999; Georgopoulos K., 2002]. Нарушение функции Ikaros, возникающее в результате внутригенных делеций и точечных мутаций, приводит к блоку дифференцировки лимфоидных клеток, лежащему в основе патогенеза ОЛЛ [Olsson L., 2015].

В 2009 г. в педиатрическом исследовании было показано, что обнаружение мутаций гена *IKZF1* у больных В-ОЛЛ в мультивариантном анализе является независимым фактором риска, ассоциированным с высокой частотой развития рецидивов [Mullighan C., 2009]. Тогда же при исследовании профиля генной экспрессии с помощью технологии микрочипов у больных Ph-негативным В-ОЛЛ с мутациями *IKZF1* была выявлена специфическая генная экспрессия, сходная с характеристиками молекулярного профиля экспрессии у больных Ph-позитивным В-ОЛЛ. Так был открыт новый подтип ОЛЛ — Ph-подобный ОЛЛ, при котором отсутствует t(9;22), но выявляются абберантные гены, кодирующие тирозинкиназы и рецепторы цитокинов, что ведет к активации киназных путей. К ним относятся реаранжировки гена *CRLF2* (51% случаев), химерные гены ABL класса (9,8%), *JAK2* и *EPOR* (12,4%), другие мутации *JAK-STAT* пути (7,2%), а также мутации *RAS*-пути (3,6%) [Roberts K., 2014]. Как у детей, так и у взрослых больных этот вариант ассоциирован с выявлением минимальной остаточной болезни (МОБ) после полихимиотерапии (ПХТ), высокой частотой рецидивов, и, соответственно, неблагоприятным прогнозом [Roberts K., 2014].

Мутации в гене *IKZF1* при Ph-подобном ОЛЛ встречались чаще других — в 68% случаев, а бессобытийная выживаемость больных этой группы приближалась всего лишь к 18,5% [Roberts K., 2014]. Многочисленные исследования подтверждают связь делеций гена *IKZF1* с увеличением риска рецидива и неблагоприятным исходом как среди детей [Clappier E., 2015; Olsson L., 2015; Van der Veer A., 2013], так и среди взрослых больных Ph-негативным В-ОЛЛ [Yao Q., 2016; Ribera J., 2015]. Наряду с этим есть данные о том, что не все делеции *IKZF1* несут клиническую значимость [Kobitzsch B., 2017; Moorman A., 2017; Beldjord K., 2014]. Выделяют делеции, ведущие к образованию доминантно-негативных изоформ и делеции, ведущие к утрате функции. Однозначного представления о прогностическом значении каждой изоформы *IKZF1* у взрослых больных в настоящее время не существует. Изучение биологической и клинической роли мутаций *IKZF1* при В-ОЛЛ на различных программах терапии является актуальной проблемой.

В Российском педиатрическом исследовании была продемонстрирована неблагоприятная прогностическая значимость внутригенных делеций гена *IKZF1* [Цаур Г.А., 2016]. У взрослых больных значение делеций не установлено, в связи с чем представляется актуальным изучение роли внутригенных делеций *IKZF1* на протоколах Российской исследовательской группы.

Цель исследования

Оценить результаты лечения и клиренс минимальной остаточной болезни у взрослых больных В-ОЛЛ в зависимости от наличия внутригенных делеций гена *IKZF1* при использовании неинтенсивного, но постоянного цитостатического воздействия.

Задачи исследования

1. Провести исследование внутригенных делеций гена *IKZF1* у больных Ph-негативными и Ph-позитивными В-ОЛЛ до начала терапии.
2. Проанализировать клинико-лабораторные характеристики больных Ph-негативными и Ph-позитивными В-ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия внутригенных делеций *IKZF1*.
3. Оценить динамику минимальной остаточной болезни у больных Ph-негативными и Ph-позитивными В-ОЛЛ на разных этапах терапии.
4. Проанализировать связь внутригенных делеций *IKZF1* с динамикой минимальной остаточной болезни.
5. Оценить эффективность химиотерапии по протоколам ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2012, ОЛЛ-2016 у больных В-ОЛЛ в зависимости от наличия внутригенных делеций гена *IKZF1*.

Научная новизна

Впервые проведена оценка прогностической значимости внутригенных делеций гена *IKZF1* и изучена их связь с динамикой минимальной остаточной болезни у взрослых пациентов с В-ОЛЛ при неинтенсивном, но постоянном цитостатическом воздействии.

Практическая значимость

Определение мутаций гена *IKZF1* предоставляет возможность целенаправленно использовать новые терапевтические подходы при неэффективности стандартного цитостатического воздействия

Положения, выносимые на защиту

1. У больных с внутригенными делециями гена *IKZF1* значительно чаще детектируется минимальная остаточная болезнь на разных этапах терапии по сравнению с больными без делеций гена *IKZF1*.
2. Внутригенные делеции гена *IKZF1* не являются факторами неблагоприятного прогноза у больных острыми лимфобластными лейкозами при использовании неинтенсивного, но постоянного цитостатического воздействия, применяемого в протоколах Российской исследовательской группы по изучению ОЛЛ.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования и метод детекции внутригенных делеций гена *IKZF1* внедрены в рутинную клиническую практику научно-клинических подразделений ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ.

Апробация работы

Основные положения, материалы и результаты диссертации доложены и обсуждены на следующих конференциях, симпозиумах и конгрессах:

1. Научно-практическая конференция «Лейкозы и Лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (г. Москва, 19 января 2017).
2. 6-ой симпозиум Европейской научной ассоциации по лабораторной диагностике в онкогематологии (Лейден, ноябрь 2017).
3. Всероссийская научно-практическая конференция «Цитогенетика опухолей кроветворной системы» (Санкт-Петербург, 13-14 апреля, 2017 г).
4. IV Конгресс гематологов России (г. Москва, апрель 2018).

Апробация диссертации состоялась на заседании проблемной комиссии «Клинические исследования в гематологии (гемобластозы, депрессии кроветворения; ТКМ; миело- и лимфопролиферативные заболевания; опухоли лимфатической системы; патология красной крови; ИТП; порфирии)» ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ №9 от 04.07.2018 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, 5 тезисных сообщений (2 на русском языке и 3 на английском языке).

Объем и структура работы

Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, клинической характеристики больных и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Текст работы содержит 9 таблиц, 12 рисунков, 2 приложения. Список литературы включает 12 отечественных и 217 зарубежных источника.

Диссертация выполнена в отделении интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения (руководитель – д.м.н., профессор Е.Н. Паровичникова), отделении химиотерапии гематологических заболеваний (зав. отделением – к.м.н. Е.О. Грибанова), лаборатории молекулярной гематологии (зав. лабораторией – д.б.н. А.Б. Судариков), лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (зав. лабораторией – к.м.н. Гальцева И.В.), информационно-аналитическом отделе (руководитель – к.т.н. Куликов С.М.) при научном сотрудничестве с другими отделениями и лабораториями ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (директор – академик РАН, д.м.н., профессор В.Г. Савченко).

Материалы и методы

В исследование были включены 67 взрослых пациентов с впервые установленным В-ОЛЛ. Среди них группа с Rh-негативным В-ОЛЛ составила 49 больных (30 женщин и 19 мужчин в возрасте от 17 до 56 лет с медианой – 29 лет): 33 пациента получили лечение по протоколу ОЛЛ-2009 с августа 2009 по август 2016; остальные 16 пациентов, включенные в исследование с ноября 2016 по август 2017, получали лечение по протоколу ОЛЛ-2016. Медиана наблюдения составила 18,1 мес. (1,5-93,4). В группу с Rh-позитивным В-ОЛЛ включено 18 пациентов (9 женщин и 9 мужчин в возрасте от 17 до 68 лет с медианой – 31,5 год), им проводилось лечение по протоколам ОЛЛ-2009 (n=5) и ОЛЛ-2012 (n=13) в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) с февраля 2010 по август 2017. Медиана наблюдения составила 21,2 мес. (3,53-91,77).

Исследование ОЛЛ-2009 зарегистрировано на сайте ClinicalTrials.gov под номером NCT01193933, дизайн его был представлен ранее [Паровичникова Е. Н., 2014]. Новый исследовательский протокол ОЛЛ-2016 стартовал с ноября 2016 г., в нем были сохранены основные принципы протокола ОЛЛ-2009. Отличия от прежней программы включают: уменьшение суммарной дозы L-аспарагиназы за счет укорочения длительности ее применения до 1 года; отказ от высокодозной консолидации с метотрексатом и цитарабином; увеличение числа люмбальных пункций с 16 до 21; централизованный мониторинг МОБ на 70-й, 133-й, 190-й дни и перед алло-ТКМ методом многоцветной проточной цитометрии (МПЦ).

Протокол ОЛЛ-2012 основан на протоколе ОЛЛ-2009, отличие его заключается в деэскалации химиотерапии и включении в программу ИТК.

Больным проводили лечение в гематологических отделениях ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ России (n = 59), ГБУЗКО «Калужская областная клиническая больница» (n = 1), ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови ФМБА» (n = 2), ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н. А. Семашко» (n = 3), ГБУЗ «Волгоградский областной клинический онкологический диспансер № 1» (n = 1), ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» МЗ России (n = 1), ГБУЗ Республики Мордовия «Республиканская клиническая больница № 4» (n = 1).

Диагноз В-ОЛЛ был подтвержден на основании следующих клинических и лабораторных исследований: общего анализа крови, цитологического, цитохимического исследований костного мозга и данных иммунофенотипирования согласно критериям классификации Европейской группы по иммунологической характеристике лейкозов (European Group for the Immunological Characterization of Leukemias, EGIL) [Bene M., 1995; Bene M., 2011].

Клинико-лабораторная характеристика больных представлена в Таблице 1.

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика 67 больных, включенных в исследование

Показатель	В-ОЛЛ			
	BCR-ABL ⁻ (n = 49)		BCR-ABL ⁺ (n = 18)	
	n	%	n	%
ИФТ вариант острого лейкоза:				
Ранний пре-В (VI)	11	22	2	11
Общий В (VII)	29	59	13	72
Показатель	В-ОЛЛ			
	BCR-ABL ⁻ (n = 49)		BCR-ABL ⁺ (n = 18)	
	n	%	n	%
ИФТ вариант острого лейкоза:				
Пре-В (VIII)	8	16	2	11
В/миело	0	0	1	5,5
Кариотип:				
Нормальный	17	35	–	–
Цитогенетические аберрации				
Структурные				
Транслокация с вовлечением региона 11q23	7	14	–	–
t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1	2	4	–	–
делеция CDKN2A/9p21	5	10	–	–
iAMP21	1	2	–	–
Численные				
Гиперплоидия более 46 хромосом	10	20	2	11
Гипоплоидия менее 46 хромосом	0	0	1	5,5
Псевдодиплоидный кариотип	3	6	1	5,5
Моносомия 7	0	0	1	5,5
Комплексные нарушения кариотипа	3	6	0	0
Другие	3	6	0	0
Возраст, годы (медиана (диапазон))	29 (17—56)		31,5 (17—68)	
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$ (медиана (диапазон))	7,8 (0,4—556)		43,1 (2,8—261)	
Уровень ЛДГ, ед/л (медиана (диапазон))	850,5 (266—20062)		1279,5(415—5451)	
Бластные клетки, % (медиана (диапазон)):				
в костном мозге	80,4 (21—100)		88 (42—96)	
в периферической крови	34 (0—95)		69 (0—90)	
Спленомегалия	42	85	11	61
Гепатомегалия	34	69	11	61
Нейролейкемия	3	6	1	5,5

Как видно из Таблицы 1, иммунофенотип бластных клеток был определен у всех 18 больных Rh-положительным В-ОЛЛ. Ранний пре-В вариант (В1) был установлен у 2 (11%) больных, общий В (ВII) – у 13 (72%), пре-В (ВIII) – у 2 (11%), бифенотипический вариант (В/миело) – у 1 (5,5%) больного. При анализе цитогенетических aberrаций гипоплоидия была обнаружена у 1 (5,5%) больного, гиперплоидия – у 2 (11%), псевдодиплоидный кариотип определен у 1 (5,5%) больного и моносомия 7 – у 1 (5,5%). Медиана количества лейкоцитов составила $43,1 \times 10^9/\text{л}$ ($2,8 - 261 \times 10^9/\text{л}$), ЛДГ 1279,5 Ед/л (415-5451 Ед/л), бластных клеток в костном мозге и периферической крови 88% (42-96%) и 69% (0-90%), соответственно. У 11 (61%) больных диагностирована спленомегалия, у стольких же – гепатомегалия. Нейролейкемия выявлена у 1 (5,5%) больного.

В группе Rh-негативного В-ОЛЛ иммунофенотипический вариант бластных клеток известен у 48 пациентов, у 1 больного фенотип неизвестен. В 11 (22%) случаях диагностирован ранний пре-В вариант (В1), общий В (ВII) – в 29 (59%), пре-В (ВIII) – у 8 (16%) больных. При цитогенетическом исследовании у 18 (37%) больных был определен нормальный кариотип. Среди структурных перестроек кариотипа у 7 (14%) больных обнаружена транслокация с вовлечением региона 11q23, $t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1$ – у 2 (4%), делеция $CDKN2A/9p21$ – у 5 (10%), $iAMP21$ – у 1 (2%) больного; среди численных перестроек у 10 (20%) больных была диагностирована гиперплоидия, у 3 (6%) – псевдодиплоидный кариотип, у 3 – комплексные нарушения кариотипа и у 3 больных диагностированы другие аномалии кариотипа. Медиана количества лейкоцитов составила $7,8 \times 10^9/\text{л}$ ($0,4-556 \times 10^9/\text{л}$), ЛДГ 850,5 Ед/л (266-20062 Ед/л), бластных клеток в костном мозге – 80,4% (21-100%), в периферической крови 34% (0-95%). Спленомегалия диагностирована у 42 (86%) больных, гепатомегалия – у 34 (69%), нейролейкемия верифицирована у 3 (6%) пациентов.

Исследование клиренса МОБ методом МПЦ было выполнено 21 больному Rh-негативным В-ОЛЛ. Проводили окрашивание материала моноклональными антителами к CD19, CD10, CD34, CD38, CD45, CD20 («BD Biosciences») и CD58 («Beckman Coulter»). Анализ данных проводили на 6-цветном проточном цитометре BD FACS Canto II («BD Biosciences», США). Поиск МОБ осуществляли согласно стратегии «метода пустых мест» [Borowitz M., 2003; Попов А. М., 2016]. Минимальной популяцией считали популяцию, состоящую из 20 клеток. Минимальная чувствительность составляла 0,01% [Borowitz M., 2003; Попов А. М., 2016]. В протоколах ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016 терапия до 133-го дня не отличалась, а значит, клиренс МОБ на 70-й и 133-й дни не зависел от применяемого протокола.

Исследование МОБ по наличию химерного транскрипта *BCR-ABL1* выполнено 18 больным Rh-положительным В-ОЛЛ с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени

(ПЦР-РВ) с чувствительностью 10^{-4} на 70-й день терапии (окончание индукционной фазы лечения). МОБ-негативный статус устанавливали при количестве химерного транскрипта менее 0,01%. В качестве материала для исследования МОБ описанными методами использовали пунктат костного мозга объемом 0,5—1 мл с антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА).

Для исследования внутригенных делеций гена *IKZF1* применяли метод ПЦР, фрагментный анализ (ФА) и секвенирование по методу Сэнгера. Исследование выполнено 67 пациентам, среди них ретроспективная группа представлена 42 пациентами, проспективная – 25. В качестве материала для исследования использовали ДНК, которая была выделена из лейкомиических клеток образцов костного мозга, полученных до начала терапии, согласно ранее описанной методике [Сидорова Ю. В., 2011]. Исследование проводили согласно методике мультиплексной флуоресцентной ПЦР, специфичной к горячим точкам внутригенных делеций — Δ 2a-7, Δ 2a-8, Δ 2b-7, Δ 2b-8, Δ 4-7, Δ 4-G1 [Caye A., 2013]. ПЦР проводили на автоматическом термоциклере C1000 Thermal Cycler («BioRad», США). Реакционная смесь в конечном объеме 25 мкл содержала 50—200 нг ДНК, по 5 пмоль каждого праймера («Синтол», Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 95°C (4 мин), 30 циклов ПЦР: 95°C (30 с), 60°C (30 с), 72°C (1 мин) и окончательную элонгацию — 72°C (4 мин). Для ФА полученных ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот Нанофор05 (ФГБУН ИАП РАН, Россия) и программное обеспечение ДНК ФА v. 5.0.0.73 (ФГБУН ИАП РАН, Россия). Определение первичной нуклеотидной последовательности осуществляли прямым секвенированием по методу Сэнгера с помощью набора Big Dye X-terminator v. 1.1 («Thermofisher Scientific», США) согласно инструкции производителя. Полученные данные были сопоставлены с референсной последовательностью гена *IKZF1* (*NG_034231.1*) в онлайн-программе Standard Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Молекулярные исследования проводили вслепую относительно клинических данных.

Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение «SAS 9.4» (Sas institute inc., Cary, NC, USA).

При изучении клинико-гематологических особенностей у больных В-ОЛЛ с внутригенными делециями гена *IKZF1* рассматривали такие параметры, как – возраст, иммунофенотип, кариотип, исходное количество лейкоцитов в крови и активность ЛДГ, вовлечение ЦНС, наличие гепатоспленомегалии. Параметрические данные были представлены в виде средних значений и медианы с указанием минимального и максимального значений.

Эффективность лечения оценивали по следующим критериям: частота достижения полных ремиссий (ПР), ранняя летальность (смерть в период двух индукционных этапов),

рефрактерность к терапии (недостижение ПР после двух фаз индукции) и смерть в ремиссии. Смерть во время второй фазы индукции у больных в ПР после первой фазы считали смертью в консолидации.

Анализ долгосрочных результатов терапии проводили по методу Каплана-Мейера. В анализ вошли такие параметры как ОВ, БРВ и ВРР для всех больных и в группах с наличием и отсутствием внутригенных делеций *IKZF1*. Время ОВ рассчитывали от даты первого дня терапии до даты смерти от любых причин. Время БРВ рассчитывали от момента достижения ремиссии до рецидива или смерти от любых причин. Точкой цензурирования считали дату последнего контакта с больным. Расчет ВРР включал дату достижения полной ремиссии. Событием считали только рецидив заболевания. Цензурировали всех больных, кто был жив в полной ремиссии в момент проведения анализа.

Однофакторный анализ прогностического значения мутаций *IKZF1* проводился с помощью log-rank критерия. Результаты считались достоверными при значении $P < 0,05$.

Результаты исследований

Клинико-лабораторная характеристика больных Rh-негативным В-ОЛЛ

В исследование были включены 49 больных Rh-негативным В-ОЛЛ. Всем им проводили лечение по протоколам многоцентровых клинических исследований Российской исследовательской группы, ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016. Следует отметить, что всего в протокол ОЛЛ-2009 было рекрутировано 193 больных Rh-негативным В-ОЛЛ, из них в настоящее исследование вошли 33 (17%) пациента из ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, у которых в дебюте заболевания были заморожены образцы костного мозга. В новом протоколе ОЛЛ-2016 для больных из региональных центров была предусмотрена централизованная диагностика в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ, что позволило включить их в настоящее исследование. Мы включили 16 больных, которым осуществляли лечение по протоколу ОЛЛ-2016, из них 7 (44%) в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ и 9 (56%) в региональных центрах. Таким образом, ретроспективная группа представлена 33 больными и проспективная – 16 больными. В Таблице 2 представлен сравнительный анализ клинико-лабораторных характеристик больных на различных программах ПХТ.

Таблица 2 – Характеристика больных Rh-негативным В-ОЛЛ, которым выполнены различные программы полихимиотерапии

Параметры	В-ОЛЛ		P
	ОЛЛ-2009 (n=33)	ОЛЛ-2016 (n= 16)	
Центр			
Координационный центр, n (%)	33 (100)	7 (44)	–
Региональные центры, n (%)	0	9 (56)	–
Медиана возраста, лет	27 (17-56)	37,5 (18-54)	0,01
Возраст, лет			
<30 лет, n (%)	22 (67)	5 (31)	0,03
≥30 лет, n (%)	11 (33)	11 (69)	
Пол			
Мужчины, n (%)	14 (42)	5 (31)	0,5
Женщины, n (%)	19 (58)	11 (69)	
ИФТ вариант острого лейкоза:			
Ранний пре-В (VI), n (%)	7 (21)	4 (25)	0,46
Общий В (VII), n (%)	21 (64)	8 (50)	
Пре-В (VIII), n (%)	5 (15)	3 (19)	
Лейкоцитоз $\geq 30 \times 10^9/\text{л}$, n (%)	9 (27)	4 (25)	1
Повышение лактатдегидрогеназы ≥ 750 Ед/л, n (%)	15 (45)	12 (75)	0,07
Бластные клетки:			
В костном мозге, % (медиана (диапазон))	80,9 (34-98)	77,7 (21-100)	0,8
В периферической крови, % (медиана (диапазон))	25 (0-94)	39 (0-95)	0,8
Спленомегалия, n (%)	25 (75)	11 (68)	0,7
Нейролейкемия, n (%)	4 (12)	1(7)	0,28
Кариотип:			
Нормальный, n (%)	13 (39)	4 (25)	0,3
Цитогенетические aberrации			
• Структурные			
Транслокация с вовлечением региона 11q23, n (%)	4 (12)	3 (18)	0,5
t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1, n (%)	1 (3)	1 (6)	0,5
делеция CDKN2A/9p21, n (%)	5 (15)	–	
iAMP21, n (%)	1 (3)	–	
• Численные			
Гиперплоидия более 46 хромосом, n(%)	5 (15)	6 (37)	0,08
Комплексные нарушения кариотипа, n (%)	2 (6)	1 (6)	0,9
Группа риска			
• Промежуточная, n (%)	15 (45)	3 (19)	0,11
Высокая, n (%)	18 (54)	13 (81)	
• Алло-ТКМ, n (%)	5 (15)	1 (6)	0,4
• Ауто-ТКМ, n (%)	1 (3)	0	

p – статистическая значимость различий при сравнении групп пациентов, которым выполнена программа ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016

Как видно из Таблицы 2, единственным достоверным различием в группах больных на разных протоколах лечения стал возраст. На терапии по программе ОЛЛ-2009 было в 2 раза больше больных моложе 30 лет, на терапии по программе ОЛЛ-2016 наблюдалось обратное распределение ($p=0,03$). Такие различия обусловлены значимой долей больных из регионов на протоколе ОЛЛ-2016, среди которых у 6 (67%) из 9 возраст был старше 30 лет. Необходимо отметить, что такая неоднородность по возрасту была выявлена и при анализе всей когорты больных В-ОЛЛ на протоколе ОЛЛ-2009, где при сопоставлении исходных демографических и клинико-лабораторных параметров больных из федеральных и региональных центров возраст был единственным значимым отличием среди сравниваемых показателей [Паровичникова Е.Н., 2017].

В мультивариантом анализе у больных, получавших терапию по протоколу ОЛЛ-2009, возраст (старше 30 лет), инициальный лейкоцитоз ($30 \times 10^9/\text{л}$ и более) и $t(4;11)$ были выделены в качестве факторов неблагоприятного прогноза [Паровичникова Е.Н., 2017]. На основании этого в нашем исследовании были сформированы следующие группы риска: больные с наличием перечисленных признаков были отнесены к группе высокого риска, с их отсутствием – к группе стандартного риска. Из Таблицы 2 видно, что среди больных на протоколе ОЛЛ-2016 большинство были из группы высокого риска, что обусловлено более старшим возрастом пациентов. При этом среди тех, кого лечили по протоколу ОЛЛ-2009, наблюдалось относительно равное распределение по группам риска.

При анализе хромосомных аномалий у больных на протоколе ОЛЛ-2009 чаще, чем в другой группе определяли нормальный кариотип (39% против 25%). Различие не было достоверным, и, вероятно, связано с малой выборкой больных на протоколе ОЛЛ-2016. В опубликованных данных из всех больных, включенных в исследование ОЛЛ-2009, результаты СЦИ были представлены у 113 больных (60,4%), среди них нормальный кариотип был диагностирован у 49 (54,5%) [Паровичникова Е.Н., 2017]. Как представлено в Таблице 2, в исследовании ОЛЛ-2016 чаще определяли такие цитогенетические aberrации, как транслокация с вовлечением региона 11q23 (18% против 12%) и гиперплоидия (37% против 15%), однако эти различия не были статистически значимы. Комплексные нарушения были представлены с одинаковой частотой (6%). Исследования делеции CDKN2A/9p21 и iAMP21 методом FISH были выполнены у больных на протоколе ОЛЛ-2009 в рамках научно-исследовательской работы, частота их представлена в Таблице 2. Больным на новом протоколе ОЛЛ-2016 эти исследования не проводили.

Результаты терапии больных протоколах ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016 отражены в Таблице 3.

Таблица 3 – Результаты индукционной терапии больных Ph-негативным В-ОЛЛ

Критерий	Все больные n=49	ОЛЛ-2009 n=33	ОЛЛ-2016 n=16	p
Медиана наблюдения, мес	18,1 (1,5 – 93,4)	31,8 (1,7-93,4)	6,8 (1,5 – 11,6)	0,0001
ПР, n (%)	44 (90)	31 (96)	13 (86)	0,23
Рефрактерность, n (%)	3 (6)	1 (3)	2 (13)	
Летальность, n (%)	2 (4)	1 (3)	1 (6)	0,6

Медиана наблюдения за всеми больными составила 18,1 месяцев (от 1,5 до 93,4 месяцев). В ретроспективной группе она составила 31,8 месяцев (от 1,7 до 93,4 месяцев). В проспективной группе медиана наблюдения была значительно меньше – 6,8 месяцев (от 1,5 до 11,6 месяцев) ($p=0,0001$), что затрудняет сравнение долгосрочных результатов терапии для этих групп больных.

Как представлено в Таблице 3, частота достижения ПР всех 49 больных составила 90%, рефрактерность – 6%, ранняя летальность – 4%. С учетом того, что результаты индукционной терапии на протоколах не отличались, для дальнейшего анализа группы представлены как единая когорта больных.

Включенные в наше исследование больные из протокола ОЛЛ-2009 составляют лишь 17% из всех больных (33 из 193) многоцентрового исследования, что не исключает эффект селекции ввиду малочисленности группы. Так как это может отражаться на результатах терапии, выполнение однофакторного анализа исходных демографических и клинико-лабораторных характеристик и показателей ответа на терапию не проводилось.

Результаты исследования внутригенных делеций *IKZF1*

Исследование внутригенных делеций *IKZF1* методом ПЦР было выполнено 49 больным Ph-негативным В-ОЛЛ. Делеции были выявлены у 9 (18%) больных. Среди пациентов с делециями у 5 (55%) наблюдалась $\Delta 4-7$. Этот вариант был наиболее частым в общем спектре делеций. У 3 больных (33%) была обнаружена $\Delta 2-8$, у 2 (22%) – $\Delta 2-7$ и у 2 (22%) – $\Delta 4-8$. Один вариант делеции был диагностирован у 7 больных (77%), у 1 (11%) больного одновременно было диагностировано 2 варианта делеций: $\Delta 4-7$ и $\Delta 2-7$; и у 1 (11%) – одновременно 3 варианта: $\Delta 4-7$, $\Delta 4-8$, $\Delta 2-8$. Наличие делеций и их варианты определяли методом ФА. С целью подтверждения адекватности результатов ФА для первых 5 больных с делециями было выполнено секвенирование по Сэнгеру. Соответствие результатов обоих исследований позволило в дальнейшем проводить диагностику внутригенных делеций лишь одним методом

ФА. Проведен анализ клинико-лабораторных параметров группы больных с наличием и отсутствием внутригенных делеций гена *IKZF1*. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Сравнение различных клинико-лабораторных параметров у больных Ph-негативным В-ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия внутригенных делеций гена *IKZF1*

Показатели	Ph-негативный В-ОЛЛ		
	Делеция <i>IKZF1</i> (n=9)	Отсутствие делеции <i>IKZF1</i> (n=40)	P
Возраст			
≤ 30 лет, n (%)	5 (55)	20 (50)	0,76
>30 лет, n (%)	4 (44)	20 (50)	
Возраст, медиана, (минимум-максимум)	29 (18-29)	29 (17-56)	0,873
Мужчины/женщины, n (%)	4(44)/5(55)	15(38)/25(62)	0,693
Инициальный лейкоцитоз $> 30 \times 10^9/\text{л}$, n (%)	2(22)	17(43)	1
ИФТ вариант острого лейкоза:			
Ранний пре-В (В1), n (%)	1 (11)	10 (25)	0,13
Общий В (ВП), n (%)	8 (89)	21 (53)	
Пре-В (ВШ), n (%)	0	8 (20)	
Гепатомегалия	6 (66)	28 (70)	0,8
Спленомегалия, n (%)	5(55)	31(78)	0,17
Нейролейкемия, n (%)	1 (11)	3(8)	0,72
Повышение ЛДГ >750 Ед/л, n (%)	2(22)	25(63)	0,028
Экспрессия CD 34, n (%)	9 (100)	27 (68)	0,09
Экспрессия CD 13, n (%)	5 (55)	6 (15)	0,009
Экспрессия CD 33, n (%)	5 (55)	6 (15)	0,009
Экспрессия двух миелоидных маркеров CD13, CD33, n (%)	4(44)	1 (2,5)	0,0002
Исходная группа риска по ОЛЛ-2009, n (%)			
Стандартная (n=18), n (%)	3 (17)	15 (83)	0,8
Высокая (n=31), n (%)	6 (19)	25 (81)	
Нормальный кариотип, n (%)	5 (55)	12 (30)	0,14
Хромосомные aberrации, n (%)	4 (44)	28 (70)	

Как представлено в Таблице 4, у 8 из 9 больных с делециями *IKZF1* был определен общий В (ВII) иммунофенотип. При отсутствии делеций частота встречаемости этого варианта была реже (89% против 53%). Однако число больных невелико, поэтому отличия не достигают статистической достоверности. Необходимо отметить, что у единственного больного с ранним пре-В (ВI) иммунофенотипом и делецией *IKZF1* наблюдалось рефрактерное течение заболевания. Однако имеет ли более неблагоприятное значение наличие делеций *IKZF1* именно при раннем пре-В (ВI) иммунофенотипе сказать сложно, в литературе такой анализ не представлен.

Как отражено в Таблице 4, при анализе иммунофенотипических маркеров опухолевых клеток выявлено, что наличие делеций гена *IKZF1* в 100% случаев (у 9 больных) коррелировало с экспрессией на бластных клетках маркера стволовых кроветворных клеток CD34, в то время как в группе без делеций экспрессия последнего наблюдалась в 68% случаев (у 27 больных). Однако, выявленные различия не были статистически достоверными ($p=0,09$), возможно, из-за малочисленности групп.

Статистически значимые различия были обнаружены по признаку коэкспрессии миелоидного маркера CD 13 в группе больных с выявленными делециями по сравнению с другой группой – 55% (5 больных) против 15% (6 больных), соответственно ($p=0,009$). Аналогичные результаты получены по признаку коэкспрессии миелоидного маркера CD33. Примечательно, что коэкспрессия одновременно двух миелоидных маркеров CD13 и CD33 на бластных клетках обнаружена лишь в 2,5% случаев (1 больной) в группе с отсутствием делеций, что было статистически значимо при сравнении с группой больных с выявленными делециями, у которых эти маркеры присутствовали в 44% случаев (4 больных) ($p=0,0002$). Таким образом, была выявлена ассоциация внутригенных делеций *IKZF1* с коэкспрессией миелоидных маркеров на бластных клетках в дебюте заболевания по данным иммунофенотипического исследования.

При анализе демографических и клинико-лабораторных характеристик между группами больных с делециями и без делеций гена *IKZF1* не было обнаружено достоверных различий по возрасту, полу, инициальному лейкоцитозу (выше $30 \times 10^9/\text{л}$), гепатомегалии, спленомегалии, нейрорлейкемии и кариотипу. Взаимосвязь делеций гена *IKZF1* с группой риска также не была отмечена. Единственным достоверным различием между группами было более частое определение повышенной активности ЛДГ у больных с отсутствием делеций по сравнению с больными с делециями (63% против 22%, $p=0,028$).

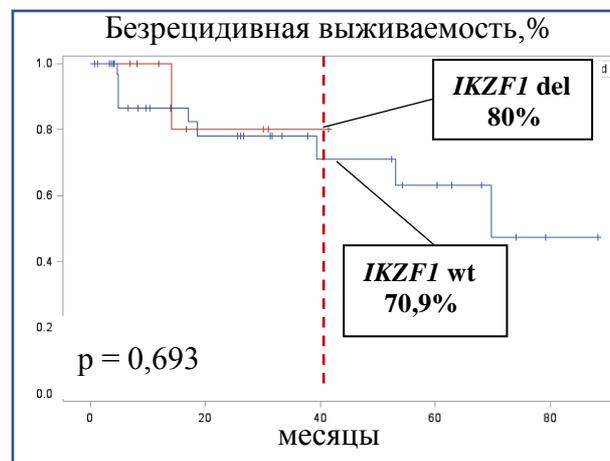
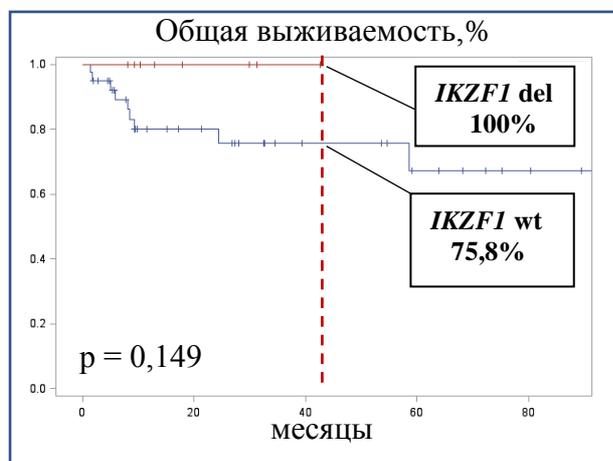
Эффективность лечения была проанализирована у всех 49 больных, результаты продемонстрированы в Таблице 5.

Таблица 5 – Сравнение результатов терапии у больных Ph-негативным В-ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия внутригенных делеций *IKZF1*

Показатели	Ph-негативный В-ОЛЛ		
	Делеция <i>IKZF1</i> (n=9)	Отсутствие делеции <i>IKZF1</i> (n=40)	P
ПР, n (%)	8 (89)	36 (95)	0,5
Рефрактерность, n (%)	1 (11)	2 (5)	
Летальность в индукции, n (%)	0	2 (5)	–
Рецидив, n(%)	1(11)	8 (20)	1

Как отражено в Таблице 5, при оценке частоты достижения клинико-гематологической ремиссии результаты были сопоставимы – ремиссия была достигнута у 8 (89%) больных ОЛЛ с делециями *IKZF1* и у 36 (95%) пациентов без делеций. Двое (4%) больных погибли в период индукционной терапии вследствие инфекционных осложнений, ни у кого из них мутаций обнаружено не было. Доля тех больных, у кого ремиссия была достигнута после предфазы, составила 12,5 % (с делецией *IKZF1*) и 8% (без делеции *IKZF1*), после I фазы индукции 75% и 82%, после II фазы индукции – 12,5% и 5%, соответственно, что статистически незначимо. Рефрактерность к проводимой терапии была диагностирована у 1 (11%) больного с делецией гена *IKZF1* и у 2 (5%) больных без нее.

При оценке долгосрочных результатов терапии (3-летние ОВ, БРВ, ВРР) на протоколах ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2016 в зависимости от наличия или отсутствия делеций гена *IKZF1* у больных Ph-негативным В-ОЛЛ достоверных различий не выявлено. Результаты продемонстрированы на Рисунке 1.



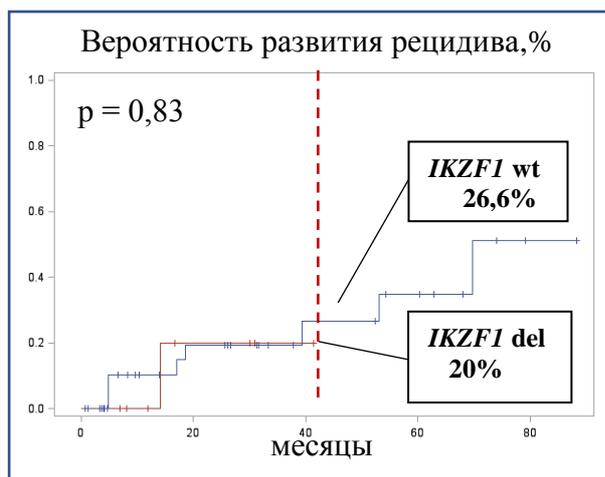


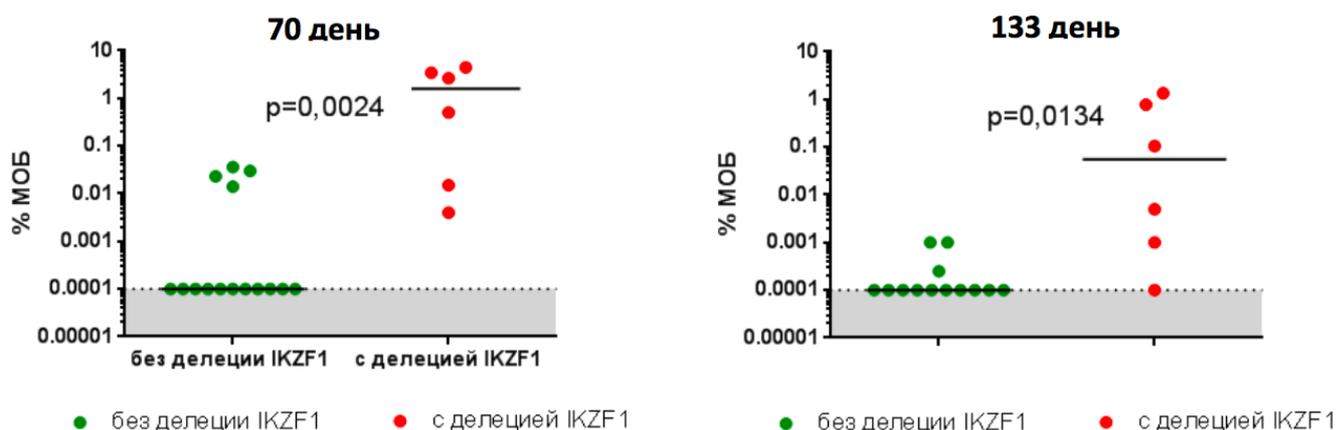
Рисунок 1 – Долгосрочные результаты терапии больных Ph-негативным В-ОЛЛ с внутригенными делециями гена *IKZF1* (*IKZF1 del*) и без делеций (*IKZF1 wt* – wild type)

Как представлено на Рисунке 1 ОВ у пациентов с Ph-негативным В-ОЛЛ с делецией *IKZF1* составила 100 % (n=9), без делеции – 75,8% (n=40) ($p = 0,149$). БРВ среди пациентов с делециями и без них составила 80% (n=8) и 70,9% (n=36) ($p = 0,693$), а ВРР – 20% и 26,6%, соответственно ($p=0,830$). Таким образом, полученные результаты дают основания предполагать, что внутригенные делеции *IKZF1* не являются факторами, влияющими на развитие неблагоприятных событий на протоколах ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016. Однако небольшая когорта больных и непродолжительный срок наблюдения не позволяют сделать окончательные выводы о клинической значимости делеций гена *IKZF1*.

Клиренс МОБ в зависимости от наличия внутригенных делеций *IKZF1* у больных Ph-негативным В-ОЛЛ

Среди больных Ph-негативным В-ОЛЛ, которым выполнено исследование делеций гена *IKZF1* (n=49), 21 больному проведена и оценка МОБ методом МПЦ. Из них 8 больных получали терапию по протоколу ОЛЛ-2009 и 13 – по протоколу ОЛЛ-2016. Клиренс МОБ оценивали на 70 (окончание 2 фазы индукции) и 133 дни протоколов (окончание 3 фазы консолидации). Отсутствие различий на этих этапах химиотерапии позволило объединить больных в единую группу для исследования клиренса МОБ. Делеции *IKZF1* были обнаружены у 6 больных (29%) и отсутствовали у 15 (71%). Медиана наблюдения больных без делеций составила 9,3 мес., больных с делециями – 15,6 мес..

Выполнено сравнение значений МОБ на 70 и 133 дни в группах больных в зависимости от наличия делеций *IKZF1*. Результаты исследования представлены на Рисунке 2.



Серым цветом выделена область МРБ негативности.

Рисунок 2 – Значения МОБ на 70 и 133 дни терапии у больных Rh-негативным В-ОЛЛ в зависимости от наличия делеций гена *IKZF1*

Как видно из Рисунка 2, при сравнении значений МОБ в зависимости от наличия делеций *IKZF1* как на 70, так и на 133 дни выявлены статистически достоверные различия между группами. На 70 день терапии у всех больных с делециями *IKZF1* была обнаружена МОБ, в то время как среди больных без делеций МОБ обнаружена только у 4 (26,6%) ($p=0,0024$). На 133 день у пациентов без делеций *IKZF1*, также как и на 70 день, частота выявляемости МОБ и ее значения были ниже, чем у пациентов с делециями *IKZF1* ($p=0,0134$). Графическое представление клиренса МОБ в сравниваемых группах больных отражено на Рисунке 3.

Как видно из Рисунка 3, у пациентов с делециями *IKZF1* отмечено снижение значений МОБ к 133 дню по сравнению с 70 днем ($p=0,016$), МОБ-негативный статус достигнут только у одного больного. Среди 3 пациентов без делеций *IKZF1*, у которых определялась МОБ, к 133 дню у всех наблюдается уменьшение МОБ по отношению к 70 дню ($p=0,063$), однако МОБ-негативный статус не был достигнут. Таким образом, было продемонстрировано, что у пациентов с внутригенными делециями гена *IKZF1* происходит более медленный клиренс опухолевых клеток.

На Рисунке 3 видно, что в большинстве случаев значения МОБ у больных с делециями были значительно выше таковых у больных без делеций.

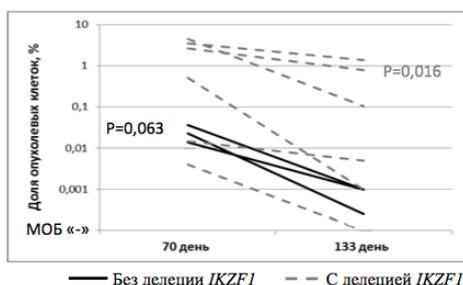


Рисунок 3 – Клиренс МОБ у больных Rh-негативным В-ОЛЛ в зависимости от наличия делеции *IKZF1*

Исследование внутригенных делеций *IKZF1* у больных Rh-положительным В-ОЛЛ

Исследование внутригенных делеций гена *IKZF1* было выполнено 18 больным Rh-положительным В-ОЛЛ. Делеции были обнаружены в 9 (50%) случаях, у 1 больного (6%) была диагностирована моносомия 7, что расценено как гаплонедостаточность исследуемого гена. Таким образом, в общей сложности выявлено 56% случаев с делециями гена *IKZF1*, что было достоверно чаще, чем при Rh-негативном В-ОЛЛ, где мутации этого гена были выявлены у 18% больных ($p=0,0074$).

Распределение вариантов делеций в нашем исследовании было следующим: $\Delta 4-7$ была выявлена у 4 больных (44%), $\Delta 2-7$ – также у 4 (44%), $\Delta 4-8$ – у 1 (11%) и $\Delta 2-8$ у 1 (11%). Частота встречаемости различных вариантов делеций была сопоставима с таковой у больных Rh-негативным В-ОЛЛ.

Таблица 6 – Сравнение различных клинико-лабораторных характеристик у больных Rh-положительным В-ОЛЛ в зависимости от наличия или отсутствия внутригенных делеций *IKZF1*.

Показатели	Rh-положительный В-ОЛЛ		
	Делеция <i>IKZF1</i> (n=10)	Отсутствие делеции <i>IKZF1</i> (n=8)	P
Возраст			
≤ 30 лет, n (%)	5 (50)	2 (25)	0,27
>30 лет, n (%)	5 (50)	6 (75)	
Мужчины/женщины, n (%)	5(50)/5(50)	4(50)/4(50)	1
ИФТ вариант острого лейкоза:			0.685
Ранний пре-В (В1), n (%)	1(10)	1(12,5)	
Общий В (ВII), n (%)	8(80)	5(62,5)	
Пре-В (ВIII), n (%)	1(10)	1(12,5)	
В/миело, n (%)	0	1(12,5)	
Инициальный лейкоцитоз			0,188
> 30 × 10 ⁹ /л, n (%)	4(40)	6(75)	
Гепатомегалия	6 (60)	5 (63)	0,9
Спленомегалия, n (%)	6 (60)	5 (63)	0,17
Нейролейкемия, n (%)	1 (10)	0	0,35
Повышение ЛДГ>750 Ед/л, n (%)	9(90)	6(75)	0,39

Показатели	Rh-положительный В-ОЛЛ		
	Rh-положительный В-ОЛЛ	Отсутствие делеции <i>IKZF1</i> (n=8)	P
Экспрессия CD 34, n (%)	8 (80)	5 (63)	0,37
Экспрессия CD 13, n (%)	4 (40)	1 (13)	0,19
Экспрессия CD 33, n (%)	5 (50)	3 (38)	0,59
Экспрессия двух миелоидных маркеров CD13, CD33, n (%)	2(20)	1 (13)	0,67
Молекулярная ремиссия на 70-ый день терапии, n (%)	7 (70)	3 (38)	0,16
ТКМ, n (%)	7 (70)	6 (75)	0,814

Как представлено в Таблице 6, корреляции с исследуемыми параметрами такими, как возраст, пол, инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$, ЛДГ более 750 Ед/л, гепатомегалия, спленомегалия, нейрорлейкемия, в зависимости от обнаружения делеций не установлено. У больных с делециями гена *IKZF1* также, как и при Rh-негативном В-ОЛЛ, чаще наблюдался В(II) иммунофенотип – у 80%, однако различия с частотой других иммунологических подтипов не были значимы. В отличие от Rh-негативного при Rh-положительном В-ОЛЛ не выявлено взаимосвязи между экспрессией миелоидных антигенов и наличием делеций *IKZF1*.

Эффективность лечения у больных Rh-положительным В-ОЛЛ оценивали по молекулярному ответу на 70 день химиотерапии в сочетании с ИТК первой линии (Таблица 6). *BCR-ABL* негативный статус был достигнут у 11(61%) больных, остальным 7 (38%) выполнена смена терапии ИТК. Наличие делеции *IKZF1* не имело значения при оценке молекулярной ремиссии на 70 день – 70% больных с делецией *IKZF1* и 38% без делеции достигли молекулярной ремиссии ($p=0,16$). Смертей в индукции не было зарегистрировано. Алло-ТКМ была выполнена 12 больным, из них 4-м во второй ремиссии заболевания, аутологичная ТКМ выполнена 1 пациенту. Медиана времени до ТКМ составила 10,1 мес (5,8 – 17,9). Как представлено на Рисунке 4 различий в долгосрочных результатах терапии (5-летние ОВ, БРВ, ВРР) не было обнаружено: среди больных В-ОЛЛ с делецией *IKZF1* ОВ составила 60% ($n=10$), без нее – 42% ($n=8$) ($p=0,41$), БРВ 25% ($n=10$) и 33% ($n=7$) ($p=0,96$), а ВРР 50% ($n=10$) и 50% ($n=7$), соответственно ($p=0,92$).

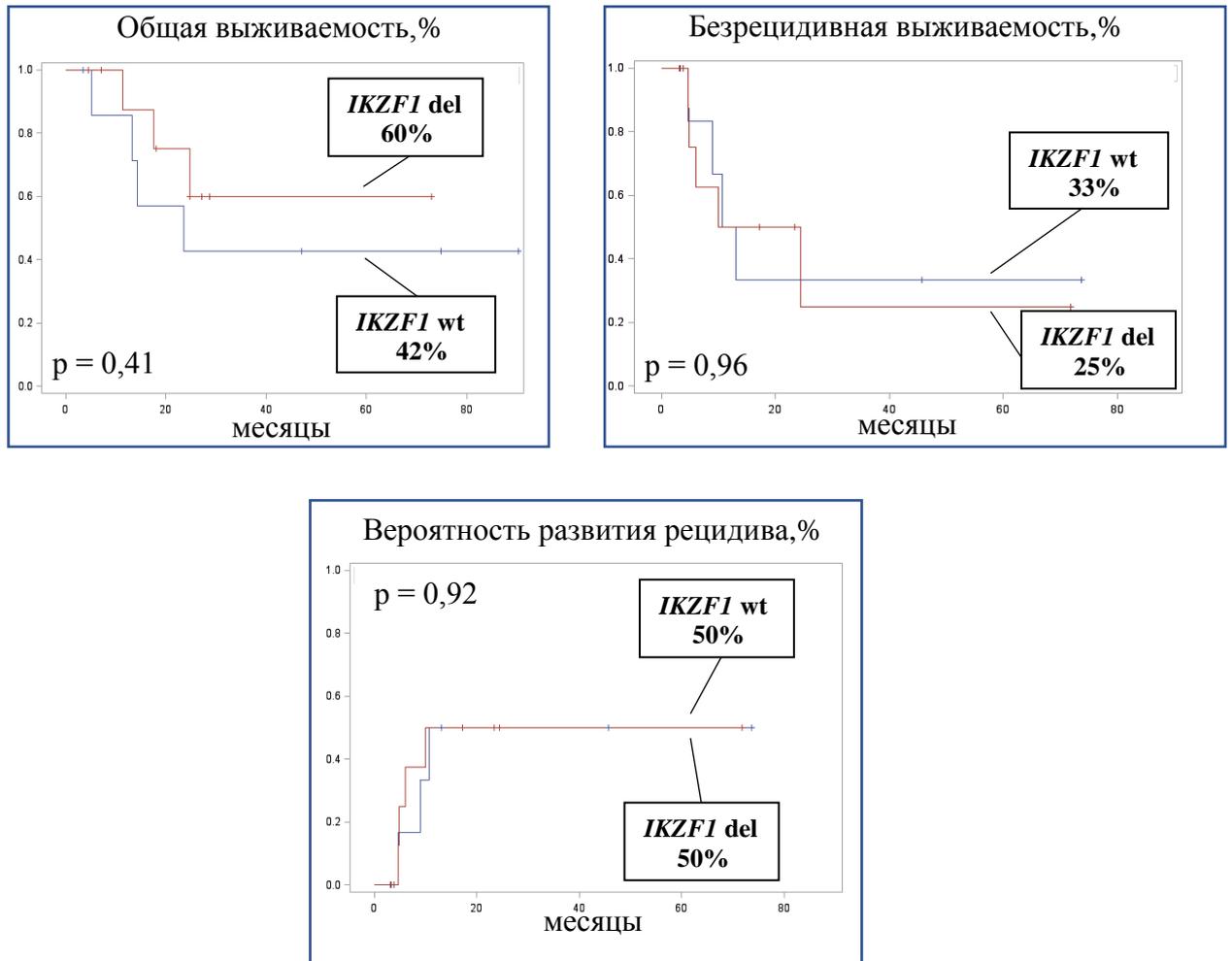


Рисунок 4 – Долгосрочные результаты терапии больных Rh-положительным В-ОЛЛ с внутригенными делециями гена *IKZF1* (*IKZF1 del*) и без делеций (*IKZF1 wt* – wild type)

Заключение

Целью нашего исследования стала оценка результатов лечения 67 взрослых больных В-ОЛЛ по протоколам Российской исследовательской группы в зависимости от обнаружения внутригенных делеций гена *IKZF1*. Для выполнения этого исследования в ФГБУ «НМИЦ гематологии» был отработан метод ПЦР, позволяющий выделить различные варианты внутригенных делеций исследуемого гена: доминантно-негативный вариант – Δ4-7 и вариант делеций, ведущих к утрате функции гена – Δ2-7, Δ2-8, Δ4-8.

У больных Rh-положительным ОЛЛ частота обнаружения делеций составила 55%, что было достоверно выше по сравнению с 18% при Rh-негативном ОЛЛ. При анализе спектра различных вариантов делеций при Rh-негативном ОЛЛ было обнаружено, что частота выявления Δ4-7 была самой высокой и составила 55%, Δ2-8 выявлена у 33% больных, а каждый из вариантов Δ2-7 и Δ4-8 был представлен у 22% больных с делециями. При Rh-положительном

ОЛЛ с одинаковой частотой выявлялись $\Delta 4-7$, $\Delta 2-7$ – у 44% больных и $\Delta 4-8$, $\Delta 2-8$ – у 11% больных. Можно отметить, что соотношение делеций доминантно-негативного типа и делеций, ведущих к утрате функции гена, было практически равным. В целом, частота и спектр делеций в нашей работе были сопоставимы с результатами, представленными в зарубежных исследованиях.

При анализе клинико-лабораторных показателей в дебюте заболевания была выявлена ассоциация внутригенных делеций *IKZF1* с коэкспрессией миелоидных маркеров CD13, CD33 на бластных клетках в дебюте заболевания по данным иммунофенотипического исследования у больных Ph-негативным В-ОЛЛ ($p=0,009$).

При анализе эффективности лечения больных Ph-негативным и Ph-позитивным В-ОЛЛ по протоколам Российской исследовательской группы не выявлено статистически значимых различий в сроках достижения ПР, ранней летальности и резистентности к терапии в зависимости от наличия внутригенных делеций гена *IKZF1*.

При оценке долгосрочных результатов терапии по протоколам Российской исследовательской группы у больных Ph-негативным и Ph-позитивным В-ОЛЛ терапии неблагоприятного прогностического значения делеций *IKZF1* не было установлено.

Сравнительный анализ статуса МОБ у больных с делециями и диким типом гена *IKZF1* продемонстрировал достоверно более медленный клиренс МОБ у больных с делециями *IKZF1*.

Выводы

1. Частота обнаружения внутригенных делеций гена *IKZF1* у больных Ph-позитивным В-ОЛЛ была значимо выше – 56% , чем у больных Ph-негативным В-ОЛЛ - 18% ($p=0,0097$).
2. Показано, что у больных Ph-негативным В-ОЛЛ с внутригенными делециями *IKZF1* частота обнаружения коэкспрессии на бластных клетках миелоидных антигенов CD13 и CD33 была значимо выше по сравнению с частотой их обнаружения у больных без делеций (OR = 30.4, 95% CI 2.8 –328.9).
3. Эффективность терапии больных Ph-негативным В-ОЛЛ по протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016 существенно не отличалась у больных с наличием делеций *IKZF1* и без них: полная ремиссия была достигнута у 89% и 95%, 3-летняя общая выживаемость составила 100% и 75,8%, безрецидивная выживаемость – 80% и 70,9%, а вероятность развития рецидива – 20 и 26,6%, соответственно.
4. Вероятность обнаружения минимальной остаточной болезни значимо зависит от наличия делеций *IKZF1* у больных Ph-негативном В-ОЛЛ: на +70 день терапии минимальная

остаточная болезнь была обнаружена у 100% больных с делециями *IKZF1* и у 26,6% без них ($p=0,0024$), на +133 день терапии – у 83% и 23% ($p=0,0134$), соответственно.

5. Показано, что у больных Ph-положительным В-ОЛЛ наличие делеции *IKZF1* не оказывало достоверного влияния на частоту достижения молекулярной ремиссии на +70/+133 дни терапии и на долгосрочные результаты: у больных В-ОЛЛ с делециями *IKZF1* 5-летняя общая выживаемость составила 60%, без делеций – 42%; безрецидивная – 25% и 33%, вероятность развития рецидива – 50% и 50%, соответственно.

Практические рекомендации

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что внутригенные делеции гена *IKZF1* у больных Ph-негативным и Ph-положительным В-ОЛЛ при выполнении протоколов Российской исследовательской группы не имеют прогностической значимости. Однако, небольшая когорта больных и короткий срок наблюдения за больными с делециями *IKZF1* затрудняют однозначную трактовку полученных результатов.

Многочисленные данные литературы демонстрируют целесообразность внедрения дополнительных диагностических методов, таких как оценка мутационной нагрузки, исследование МОБ с помощью детекции внутригенных делеций гена *IKZF1* методом ПЦР-РВ, что, возможно, позволит рассматривать внутригенные делеции гена *IKZF1* в качестве независимых прогностических факторов. Необходимо проведение дальнейшего исследования делеций и мутаций гена *IKZF1*, расширение диапазона молекулярной диагностики для своевременного выявления Ph-подобных ОЛЛ, возможности таргетного воздействия и оптимального планирования алло-ТКМ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Басхаева, Г.А. Роль мутаций гена *IKZF1* при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе у взрослых больных на протоколах Российского многоцентрового исследования / Г. А. Басхаева, Е. Н. Паровичникова, Б. В. Бидерман, О. А. Гаврилина, Ю. О. Давыдова, М. Ю. Дроков, К. И. Зарубина, И. А. Лукьянова, В. В. Троицкая, А. Н. Соколов, И. С. Пискунова, Е. А. Степанова, С. Ю. Смирнова, А. Б. Судариков, И. В. Гальцева, Т. Н. Обухова, В. Г. Савченко // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № 1. – С. 16 – 30.
2. Паровичникова, Е. Н. Острые В-лимфобластные лейкозы взрослых: выводы из Российского проспективного многоцентрового исследования ОЛЛ-2009 / Е. Н. Паровичникова, В. В. Троицкая, А. Н. Соколов, С. Н. Бондаренко, О. А. Гаврилина, Г. А. Басхаева, Б. В. Бидерман, И. А. Лукьянова, Л. А. Кузьмина, Г. А. Клясова, С. К. Кравченко, Е.О. Грибанова, Е. Е. Звонков, З.

Х. Ахмерзаева, О. Ю. Баранова, Т. С. Капорская, Т. В. Рыльцова, Е. Н. Зотина, О. С. Самойлова и др. // Терапевтический архив. – 2017. – Т. 89. – № 7. – С. 10–17.

3. Зарубина, К. И. Трудности диагностики и терапии Ph-подобных острых лимфобластных лейкозов: описание 3 клинических случаев / К. И. Зарубина, Е. Н. Паровичникова, Г. А. Басхаева, А. Е. Красильникова, О. А. Гаврилина, Б. В. Бидерман, А. Б. Судариков, С. Н. Бондаренко, Ю. О. Давыдова, И. В. Гальцева, А. Н. Соколов, В. В. Троицкая, В. Г. Савченко // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90. – № 7. – С. 110–117.

4. Басхаева, Г. А. Частота встречаемости и прогностическое значение мутаций гена *IKZF1* у взрослых больных Ph-позитивным и Ph-негативным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом на протоколах ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2012 / Г. А. Басхаева, Б. В. Бидерман, О. А. Гаврилина, К. И. Зарубина, Степанова Е. А., Донскова И. А., В. В. Троицкая, А. Б. Судариков, Е. Н. Паровичникова, Савченко В. Г. // Вестник гематологии. – 2017. – Т. 13. – № 2 – С. 39.

5. Басхаева, Г. А. Клиренс МОБ у больных Ph-негативным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом в зависимости от наличия мутаций гена *IKZF1* на протоколах ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2016 / Г. А. Басхаева, Б. В. Бидерман, Ю. О. Давыдова, О. А. Гаврилина, К. И. Зарубина, И. А. Лукьянова, В. В. Троицкая, А. Н. Соколов, А. Б. Судариков, И. В. Гальцева, Е. Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63. – № S1. – С. 43.

6. Baskhaeva, G. The frequency and impact of *IKZF1* deletions on minimal residual disease in adult Ph-negative B-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated in Russian acute lymphoblastic leukemia study / G. Baskhaeva, B. Biderman, J. Davydova, O. Gavriline, K. Zarubina, E. Stepanova, I. Lukyanova, V. Troitskaya, A. Sudarikov, I. Galtseva, E. Parovichnikova, V. Savchenko // Blood. – 2017. – Т. 130. – № S1 – С. 5002.

7. Baskhaeva, G. The frequency and prognostic significance of *IKZF1* deletions in adult Ph-positive and Ph-negative B-cell acute lymphoblastic leukemia patients treated in Russian acute lymphoblastic leukemia studies / G Baskhaeva, B Biderman, O Gavriline, K Zarubina, I Lukyanova, E Stepanova, V Troitskaya, A Sudarikov, E Parovichnikova // EHA-2017 (European Hematology Association learning center). – Abstract code. – pb 1636.

8. Baskhaeva, G.A. Minimal residual disease in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia patients with *IKZF1* deletions treated in Russian ALL study / G. A. Baskhaeva, B. V. Biderman, O. A. Gavriline, J. O. Davydova, E. A. Stepanova, K. I. Zarubina, I. A. Lukyanova, V. V. Troitskaya, I. V. Galtseva, A. B. Sudarikov, E. N. Parovichnikova, V. G. Savchenko // ESLHO abstract book. – 2017. – С. 162.

Список сокращений

- Алло-ТКМ – трансплантация аллогенного костного мозга
- БРВ – безрецидивная выживаемость
- ВРР – вероятность развития рецидива
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа
- МОБ – минимальная остаточная болезнь
- МПЦ – многоцветная проточная цитометрия
- ОВ – общая выживаемость
- ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз
- В-ОЛЛ – В-клеточный острый лимфобластный лейкоз
- ПХТ – полихимиотерапия
- ПР – полная ремиссия
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ФА – фрагментный анализ
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- BCR-ABL – патологический ген, образованный слиянием генов BCR и ABL
- CDKN2A – ген ингибитора циклинзависимой киназы 2A
- CRLF2 – ген подобного цитокиновым рецепторам фактора 2
- EPOR – ген рецептора эритропоэтина
- iAMP – интрахромосомная амплификация хромосомы 21
- IKZF1 – ген ДНК-связывающего белка Икарос
- JAK – ген семейства янус-киназ
- JAK-STAT – сигнальный путь передачи сигнала с рецепторов цитокинов
- Ph – филадельфийская хромосома
- PBX1 – ядерный ген, относящийся к транскрипционному фактору
- RAS – семейство генов, кодирующих малые G-белки (малые ГТФазы)
- TCF3 – транскрипционный фактор 3