

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Кашлакова Анастасия Игоревна

**Изучение молекулярно-генетического профиля кроветворных клеток у
пациентов с острыми миелоидными лейкозами**

3.1.28. – Гематология и переливание крови

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук Паровичникова Елена Николаевна

Москва, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Современные классификации острых миелоидных лейкозов.....	12
1.2 Генетические мутации при острых миелоидных лейкозах	15
1.2.1 Мутации гена, кодирующего нуклеофосмин	16
1.2.2 Мутации генов эпигенетической регуляции	18
1.2.3 Мутации генов сигнальных путей.....	19
1.2.4 Мутации генов, ассоциированных с клональным кроветворением	21
1.3 Принципы терапии острых миелоидных лейкозов	28
1.4 Мониторинг минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами.....	30
1.5 Заключение обзору литературы.....	33
Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	34
2.1 Характеристика пациентов	34
2.2 Протокол многоцентрового исследования «ОМЛ-21»	37
2.3 Дизайн исследовательской работы	39
2.4 Молекулярно-генетические исследования	41
2.4.1 Подготовка биологического материала для выполнения секвенирования нового поколения	41
2.4.1.1 Выделение ядерных клеток из костного мозга.....	41
2.4.1.2 Выделение геномной ДНК из ядерных клеток	43
2.4.1.3 Амплификация целевых регионов исследуемых генов	44
2.4.2 Высокопроизводительное секвенирование	49
2.4.3 Секвенирование по Сэнгеру	54

2.4.4 Детекция мутаций генов <i>FLT3-ITD</i> , <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i>	56
2.5 Статистическая обработка данных.....	57
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1 Клинико-лабораторные характеристики пациентов, включённых в исследование.....	59
3.1.1 Молекулярно-генетический профиль заболевания у пациентов на этапе первичной диагностики	59
3.1.2 Ассоциация клинических данных с исходными молекулярно-генетическими характеристиками опухоли	65
3.1.3 Длительность цитопении у пациентов после первого курса терапии, в зависимости от исходных молекулярно-генетических характеристик опухоли	68
3.1.4 Результаты лечения и показатели выживаемости у пациентов, в зависимости от исходного молекулярно-генетического профиля заболевания	71
3.2 Изменения мутационного статуса генов в процессе лечения и клиренс минимальной остаточной болезни	81
3.2.1 Мутационный статус генов различных функциональных классов у пациентов после курсов терапии.....	81
3.2.2 Анализ динамики аллельной нагрузки мутаций генов и клиренс минимальной остаточной болезни, исследованный методом иммунофенотипирования.....	85
3.3 Рецидивы острых миелоидных лейкозов.....	91
3.3.1 Мутационный статус генов различных функциональных классов у пациентов в рецидиве заболевания	91
3.3.2 Факторы риска развития рецидива	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	98

ВЫВОДЫ	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЕ А (справочное) Классификация острых миелоидных лейкозов и связанных новообразований (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (справочное) Классификация острых миелоидных лейкозов и связанных новообразований (Всемирная организация здравоохранения, 2016 г.)	125
ПРИЛОЖЕНИЕ В (справочное) Классификация острых миелоидных лейкозов (International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias) с указанием процентного содержания бластных клеток в костном мозге, необходимых для установления диагноза	126
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (справочное) Хромосомные aberrации, позволяющие стратифицировать пациентов с острыми миелоидными лейкозами в группу «С» (ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией) в рамках протокола «ОМЛ-21»	127
ПРИЛОЖЕНИЕ Д (справочное) Дизайн протокола «ОМЛ-21» и схемы предусмотренных протоколом курсов лечения	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) – злокачественные заболевания системы крови, при которых опухолевый клон формируется в миелоидном компартменте кроветворения, – характеризуются крайним генетическим разнообразием. Согласно данным литературы, подавляющее большинство пациентов с ОМЛ имеют сразу несколько драйверных генетических мутаций (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* и другие). Их появление в стволовых клетках крови (СКК) или клетках-предшественницах придаёт этим клеткам пролиферативное преимущество и запускает процесс лейкемогенеза. Основой для развития злокачественной трансформации клеток может быть клональное кроветворение (КК) – биологическое состояние, при котором происходит клональная экспансия потомков клетки, приобретшей адаптивное преимущество в результате появления мутаций определённых генов. Таким образом, КК является как бы «прелейкемическим» состоянием, а появление генетических мутаций, в результате которых оно развивается, – ранним событием при формировании лейкемического клона. Гены, ассоциированные с КК, наиболее часто выявляемые у пациентов с ОМЛ – *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*.

Таким образом, ОМЛ представляет собой сложную систему, в которой могут сосуществовать различные опухолевые клоны. С течением времени эти клоны эволюционируют, и направление их эволюции определяет прогноз заболевания у пациентов с ОМЛ. Представляется актуальным исследовать мутационный профиль кроветворных клеток у пациентов с ОМЛ на разных этапах терапии; потенциальным результатом этой работы может стать определение новых молекулярно-генетических маркеров. Планируется оценить эффективность терапии у пациентов, в зависимости от наличия тех или иных генетических нарушений, и сопоставить полученные данные с клиренсом минимальной остаточной болезни, исследованной классическими методами.

Степень разработанности темы диссертации

Изучению патогенетических механизмов, лежащих в основе развития ОМЛ, посвящено большое число научных работ. Активно изучаются генетические аспекты ОМЛ, чему способствует появление новых высокоинформативных технологий генетической диагностики. Определение генетических характеристик опухоли имеет критическое значение для дифференцированного подхода к лечению, поэтому современные клинические рекомендации по лечению ОМЛ предполагают комплексное исследование характеристик опухоли, включающее выполнение не только цитологического и иммунофенотипического исследований костного мозга (КМ), но и цитогенетических и молекулярно-генетических исследований.

Другим важнейшим компонентом дифференцированного подхода к лечению пациентов с ОМЛ является исследование клиренса минимальной остаточной болезни (МОБ). Наиболее применимым методом для отслеживания МОБ является иммунофенотипирование методом многоцветной проточной цитометрии (ИФТ МПЦ). Однако несмотря на все достоинства метода (универсальность, высокая чувствительность, быстрота исполнения), он не позволяет детально охарактеризовать болезнь и спрогнозировать её течение уже на этапе первичной диагностики.

Несмотря на успехи в изучении фундаментальных основ ОМЛ и совершенствование методов клинической диагностики, понимание природы ОМЛ остаётся неполным. Некоторые аспекты заболевания изучены недостаточно, а данные о прогностической значимости многих характерных для ОМЛ генетических нарушений остаются противоречивыми. Представляется актуальным исследовать генетический ландшафт ОМЛ, изучить его изменения в процессе лечения и сопоставить полученные данные с клиренсом МОБ, исследованной методом ИФТ МПЦ, у пациентов, получающих терапию в рамках единого протокола Российской исследовательской группы.

Цель работы

Охарактеризовать мутационный профиль кроветворных клеток и определить его изменения у пациентов с острыми миелоидными лейкозами в процессе лечения.

Задачи исследования

1. Определить частоту встречаемости и спектр мутаций генов различных функциональных классов (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) у пациентов с острыми миелоидными лейкозами (за исключением острых миелоидных лейкозов, связанных с миелодисплазией, и острых миелоидных лейкозов с *inv(16)(p13.1q22)/CBFB::MYH11*).

2. Сопоставить молекулярно-генетический профиль кроветворных клеток у пациентов с острыми миелоидными лейкозами с частотой достижения ремиссии, рефрактерного течения заболевания, клиренсом минимальной остаточной болезни, исследованной методом иммунофенотипирования, и частотой развития рецидивов.

3. Определить частоту персистенции мутаций генов клонального кроветворения (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) в период полной ремиссии и её ассоциацию с вероятностью развития рецидива.

4. Оценить долгосрочные результаты терапии у пациентов с острыми миелоидными лейкозами, в зависимости от спектра мутаций генов различных функциональных классов и изменения этого спектра в процессе лечения.

5. Изучить изменения мутационного профиля кроветворных клеток у пациентов с рецидивом заболевания и сравнить их с исходными данными.

Научная новизна

1. Выполнена комплексная оценка молекулярно-генетических нарушений у пациентов с острыми миелоидными лейкозами, получавших программное лечение по единому протоколу Российской исследовательской

группы, и сопоставление полученных данных с демографическими и клинико-лабораторными данными, а также с клиренсом минимальной остаточной болезни, исследованной методом иммунофенотипирования.

2. Выполнено динамическое исследование мутационного профиля кроветворных клеток у пациентов с острыми миелоидными лейкозами на разных этапах терапии, и показано, что при исчезновении в процессе лечения одной и более из исходных генетических мутаций, вероятность развития рецидива на сроке наблюдения 2 года была значимо меньше.

Практическая значимость

1. Протокол Российской исследовательской группы (два курса индукции ремиссии «7+3», два флударабин-содержащих курса консолидации, выполнение трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток у 65% пациентов) показал высокую эффективность: полная ремиссия достигнута у 88% пациентов, первично-рефрактерное течение заболевания констатировано у 7,5% пациентов, ранняя летальность составила 3%; 4-летняя общая выживаемость составила 66,3%, 4-летняя безрецидивная выживаемость – 59,2%.

2. Обнаружение исходных мутаций генов, ассоциированных с клональным кроветворением, не требует изменений терапевтического воздействия, однако персистирование сочетанных мутаций указанных генов может обуславливать повышенный риск развития рецидива, что диктует необходимость комплексной оценки опухолевого клиренса на всех этапах лечения.

Методология и методы исследования

Исследование носило проспективный и ретроспективный характер; всего в исследование было включено 67 пациентов с впервые установленным диагнозом ОМЛ. Работа выполнена на базе различных клинических и лабораторных подразделений ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Комплекс

исследований, выполненный всем вошедшим в исследование пациентам, включал цитологическое, иммунофенотипическое, цитогенетические и молекулярно-генетические исследования КМ. Акцент был сделан на исследовании мутаций различных генов, в частности, генов, ассоциированных с КК. Лечение пациентов осуществлялось в рамках протокола многоцентрового исследования «ОМЛ-21» либо по аналогичным программам до регистрации протокола.

Личный вклад соискателя

Разработка дизайна исследования и планирование работы выполнены автором под руководством научного руководителя, д.м.н. Паровичниковой Е.Н. Автор принимал непосредственное участие в обследовании и лечении пациентов, включённых в исследование. Самостоятельно выполнена ключевая часть работы, посвященная изучению мутационного статуса генов КК, включавшая следующие этапы: поиск и сортировка биоматериала в криобанке лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, выполнение амплификации целевых регионов исследуемых генов, контроль результатов амплификации методом электрофореза в агарозном геле, выполнение высокопроизводительного секвенирования (ВПС) исследуемых генов, валидация полученных данных при помощи секвенирования по Сэнгеру, анализ и интерпретация полученных лабораторных данных. Сбор клинических данных по лечению пациентов, включённых в исследование, анализ литературных данных по теме работы, описание результатов исследования, формулировка научных положений и выводов выполнены лично автором. Статистическая обработка данных выполнена совместно с информационно-аналитическим отделом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Положения, выносимые на защиту

1. Уменьшение в процессе лечения числа определяемых в дебюте острого миелоидного лейкоза мутаций генов клонального кроветворения ассоциировано с меньшей вероятностью развития рецидива на сроке наблюдения 2 года ($p = 0,18$; ОР = 2,7).

2. Наличие исходных мутаций гена *ASXL1* ассоциировано с первичной рефрактерностью ($p = 0,03$; ОШ = 7,2), а наличие мутаций гена *DNMT3A* – с персистенцией минимальной остаточной болезни, определённой методом иммунофенотипирования ($p = 0,3$; ОШ = 5).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется адекватным для поставленных задач объёмом выборки, тщательным анализом и грамотной статистической обработкой клинических и лабораторных данных.

Промежуточные результаты работы представлены в устном докладе «Разнообразие вариантов генов *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* у больных острыми миелоидными лейкозами» на Второй научно-практической конференции имени академика В.Г. Савченко (Москва, 2023 год), а также в докладе «Молекулярно-генетическое разнообразие острых миелоидных лейкозов» на конференции «Лейкозы и лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (Москва, 2025 год).

Апробация диссертационной работы состоялась на заседании проблемной комиссии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России «Фундаментальные и клинические исследования в гематологии; проблемы клинической и производственной трансфузиологии» (протокол №4 от 24.03.2025).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационной работы опубликовано 5 работ в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, а также 15 тезисных сообщений, из которых 7 – в англоязычных сборниках конференций.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертационная работа проиллюстрирована 25 рисунками, содержит 25 таблиц и 5 приложений (А, Б, В, Г, Д). Список литературы содержит 154 литературных источника: 5 отечественных и 149 зарубежных.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Современные классификации острых миелоидных лейкозов

В июле 2024 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) была опубликована обновлённая классификация опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей, работа над которой велась с 2022 г. (5-е издание) (Приложение А) [87]. Предыдущая версия классификации, вышедшая в 2017 г. (4-е издание), учитывала морфологические и молекулярно-генетические характеристики опухоли, а также принимала во внимание некоторые данные анамнеза (связь с предшествующей химиотерапией (ХТ), наличие сопутствующих хромосомных патологий и т.д.) (Приложение Б) [96]. Тем не менее, постоянно обновляющиеся данные о патогенезе миелоидных опухолей, в частности, ОМЛ, прогностической значимости тех или иных соматических генетических мутаций, биологических особенностях опухоли диктовали необходимость в совершенствовании существующей классификации. В пересмотренной классификации ОМЛ разделяют на три основные категории: «ОМЛ, определяемые генетическими аномалиями», «ОМЛ, определяемые дифференцировкой» и «Миелоидную саркому». Добавлены новые подкатегории, в зависимости от наличия тех или иных генетических аномалий («ОМЛ с перестройками *NUP98*», «ОМЛ с другими генетическими аномалиями»), исключена подкатегория «ОМЛ с мутациями гена *RUNX1*». Подкатегория «ОМЛ с химерным геном *BCR::ABL1*» перестала быть предварительной. Некоторые подкатегории были расширены. Подкатегория «ОМЛ с $t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A$ » в обновлённой классификации переработана в «ОМЛ с перестройками *KMT2A*», что подразумевает любые перестройки с вовлечением гена *KMT2A*, которых у пациентов с ОМЛ на сегодняшний день описано более 80. Наиболее частыми из них являются *MLLT3::KMT2A*, *AFDN::KMT2A*, *KMT2A::ELL* и *MLLT10::KMT2A* [71]. То же касается подкатегории «ОМЛ с $inv(3)(q21.3q26.2)$ или $t(3;3)(q21.3;q26.2);GATA2-MECOM$ », которая была расширена до «ОМЛ с перестройками *MECOM*». Важное уточнение было сделано

относительно подкатегории «ОМЛ с биаллельными мутациями гена *СЕВРА*», конвертированную в «ОМЛ с мутациями гена *СЕВРА*». В эту группу теперь предлагают относить не только пациентов с биаллельными мутациями *СЕВРА*, но также и пациентов с одиночными мутациями *СЕВРА* в домене bZIP. Подкатегория «Миелоидные новообразования, связанные с предшествующей терапией» стала составной частью отдельного раздела «Вторичные миелоидные новообразования» и более не является специфичной для ОМЛ. Были также существенно изменены критерии, позволяющие отнести заболевание к группе «ОМЛ, связанные с миелодисплазией (ОМЛ-МД)». Определяющими признаками ОМЛ-МД теперь являются не данные анамнеза (наличие предшествующего миелодиспластического синдрома (МДС) или миелопролиферативного заболевания (МПЗ) или морфологические признаки дисплазии в КМ, а цитогенетические и молекулярные аномалии, ассоциированные с миелодисплазией. К ним относят, в частности, впервые выделенные в классификации ВОЗ мутации генов *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* и *ZRSR2* [87]. Категория «ОМЛ, определяемые дифференцировкой» фактически осталась неизменной.

В 2022 г. была также предложена классификация международной группы экспертов ICC (ICC – от англ. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias) (Приложение В) [50]. Классификация ICC учитывает патогенетическую общность МДС и ОМЛ и вводит для некоторых категорий («ОМЛ с мутациями гена *TP53*», «ОМЛ с мутациями генов/цитогенетическими аномалиями, связанными с миелодисплазией» и «ОМЛ, по-другому не специфицированные») понятие МДС/ОМЛ – переходный нозологический вариант, который устанавливают при выявлении в КМ 10-19% бластных клеток. Вариант заболевания с мутациями гена *TP53* выделяют в отдельную категорию. Предшествующие МДС или МДС/МПЗ и наличие в анамнезе химио-, иммунотерапии или лучевой терапии по поводу другого злокачественного новообразования перестают быть группообразующими признаками: вместо этого их, наряду с наследственной предрасположенностью, определяют лишь как «уточняющие характеристики» заболевания. Среди мутаций

генов, связанных с миелодисплазией, помимо тех, что перечислены в обновлённой классификации ВОЗ, отмечают также мутации гена *RUNX1*.

При стратификации пациентов по группам прогноза в клинической практике используют классификацию Европейской сети по изучению лейкозов – ELN (от англ. European LeukemiaNet [113]). Обновлённая версия этой классификации была представлена в 2022 г. (Таблица 1)

Таблица 1 – Группы прогноза ОМЛ 2022 European LeukemiaNet (ELN), определяемые на основании исходных молекулярно-генетических характеристик опухоли

Группа прогноза	Генетические аномалии
Благоприятный	<ul style="list-style-type: none"> • $t(8;21)(q22;q22)$; <i>RUNX1::RUNX1T1</i> • $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; <i>CBFB::MYH11</i> • Мутации <i>NPM1</i> без мутаций <i>FLT3-ITD</i> • Мутации <i>bZIP CEBPA</i> внутри рамки считывания
Промежуточный	<ul style="list-style-type: none"> • Мутации <i>NPM1</i> с мутациями <i>FLT3-ITD</i> • Дикая тип <i>NPM1</i> с мутациями <i>FLT3-ITD</i> • $t(9;11)(p21.3;q23.3)$/<i>MLLT3::KMT2A</i> • Цитогенетические и/или молекулярные аномалии, не классифицированные как благоприятные или неблагоприятные
Неблагоприятный	<ul style="list-style-type: none"> • $t(6;9)(p23;q34)$; <i>DEK::NUP214</i> • $t(v;11q23.3)$/<i>KMT2A</i>-перестройки • $t(9;22)(q34.1;q11.2)$/<i>BCR::ABL1</i> • $t(8;16)(p11;p13)$/<i>KAT6A::CREBBP</i> • $inv(3)(q21.3q26.2)$ или $t(3;3)(q21.3;q26.2)$/<i>GATA2</i>; <i>MECOM (EVII)</i> • $t(3q26.2;v)$/<i>MECOM(EVII)</i>-перестройки • -5 или $del(5q)$; -7; -17/<i>abn(17p)</i> • Комплексный кариотип, моносомный кариотип • Мутации <i>ASXL1</i>, <i>BCOR</i>, <i>EZH2</i>, <i>RUNX1</i>, <i>SF3B1</i>, <i>SRSF2</i>, <i>STAG2</i>, <i>U2AF1</i> или <i>ZRSR2</i> • Мутации <i>TP53</i>

Основные изменения в классификации ELN 2022 г. (предыдущая версия была представлена в 2017 г.) коснулись мутаций гена *FLT3-ITD*: было ликвидировано различие между прогностическими группами, в зависимости от аллельного соотношения мутаций этого гена. Также был существенно расширен перечень генетических аномалий, наличие которых позволяет стратифицировать пациентов в группу неблагоприятного прогноза, в частности, перечислены мутации генов

ASXL1, *BCOR*, *EZH2*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* и *ZRSR2*, добавленные также и в классификацию ВОЗ 2022 г.

Таким образом, можно проследить общую тенденцию в формировании современных классификаций ОМЛ. Все они выстроены с учётом того, что ОМЛ – это совокупность генетически разнородных, отличных друг от друга вариантов заболевания. Используемые ранее классификации, такие как классификация Франко-Американо-Британской группы, учитывавшие только цитоморфологические характеристики опухоли, в настоящее время устарели.

1.2 Генетические мутации при острых миелоидных лейкозах

Причиной развития ОМЛ являются так называемые драйверные мутации генов, возникающие в стволовых кроветворных клетках и клетках-предшественницах. В процессе своей эволюции опухолевый клон может приобретать дополнительные мутации. Как показывают исследования, чаще всего у пациентов с ОМЛ выявляют не одну, а сразу несколько драйверных мутаций [39, 40, 113]. Это позволяет рассматривать каждый случай ОМЛ как сложную динамическую систему, характеризующуюся множественными генетическими нарушениями и постоянным развитием сосуществующих опухолевых клонов.

Хотя в белок-кодирующих участках генома взрослых пациентов с ОМЛ, в среднем, обнаруживают меньше мутаций, чем при злокачественных солидных опухолях, комбинаторное разнообразие мутаций, определяющее фенотип и прогноз болезни, необычайно велико [16, 39].

В проекте TCGA (от англ. The Cancer Genome Atlas) двумстам пациентам с впервые выявленным ОМЛ были проведены полногеномное ($n = 50$) и полноэкзомное ($n = 150$) секвенирования. Было выявлено суммарно 2315 однонуклеотидных замен и 270 инсерций и делеций в кодирующих участках генома. В среднем, у одного человека определяли по 13 генетических мутаций 1-й категории патогенности (англ. Tier). Согласно каталогу CGC (от англ. The Cancer Gene Census), мутации относят к 1-й категории патогенности («патогенные»)

мутации) в том случае, если гены, в которых они возникают, участвуют в регуляции процессов канцерогенеза. Появление в них мутаций, изменяя экспрессию генов, способствует злокачественной трансформации клеток, и роль мутаций этих генов при тех или иных злокачественных новообразованиях подробно описана в литературе. Ко 2-й категории патогенности («вероятно патогенные», Tier 2) относят мутации в генах, являющихся онкогенами или генами опухолевой супрессии, то есть принимающих участие в регуляции онкогенеза, однако чья роль в процессах злокачественного перерождения клеток описана в литературе недостаточно. К 3-й категории патогенности («неопределённого значения», Tier 3) относят мутации генов, связь которых с развитием злокачественных новообразований не описана [91]. В исследовании TCGA гены, наиболее часто мутированные при ОМЛ, были разделены на 9 функциональных классов: гены, кодирующие нуклеофосмин (*NPM1*), гены опухолевой супрессии (*TP53*, *WT1*), гены эпигенетической регуляции, или гены, связанные с метилированием ДНК (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), гены сигнальных путей (*FLT3*, *KIT*, *PTPN11*), гены, кодирующие факторы транскрипции (*RUNX1*, *CEBPA*), гены-модификторы хроматина (*ASXL1*, *BCOR*), гены, кодирующие факторы сплайсинга (*SRSF2*, *SF3B1*) и гены двух других классов (гены, кодирующие белки когезина, и химерные гены) [39].

1.2.1 Мутации гена, кодирующего нуклеофосмин

Ген *NPM1* расположен на длинном плече 5 хромосомы (5q35) и кодирует белок нуклеофосмин [97]. Нуклеофосмин находится, в основном, в ядрышке клетки, где он взаимодействует с белками опухолевой супрессии ARF и p53 и участвует в регуляции генетической стабильности клетки [127, 135]. Кроме того, этот белок осуществляет транспорт белковых компонентов рибосом из ядра в цитоплазму и играет ведущую роль в образовании рибосомных комплексов и регуляции трансляции [133, 134].

Мутации гена *NPM1* являются наиболее частыми генетическими мутациями у взрослых пациентов с впервые выявленным ОМЛ, их выявляют приблизительно у 30% пациентов [82]. Согласно рекомендациям ELN 2022, пациентов с мутациями *NPM1* (при условии отсутствия мутаций *FLT3-ITD*) относят к группе благоприятного прогноза. Следует оговориться, что при этом необходимо также учитывать сопутствующие хромосомные aberrации. В случае если мутации гена *NPM1* у пациентов сочетаются с неблагоприятными цитогенетическими аномалиями, этих пациентов стратифицируют в группу неблагоприятного прогноза [113]. Немецкая исследовательская группа, проанализировав данные девяти международных регистров, показала, что прогностическое значение неблагоприятных хромосомных аномалий превалирует над прогностической значимостью мутаций гена *NPM1* [18].

Приблизительно в 70-75% случаев мутации гена *NPM1* сочетаются с мутациями генов эпигенетической регуляции (*DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2^{R140}*, *TET2*), в 20-40% случаев – с мутациями генов сигнальных путей: *FLT3-ITD/TKD* и *NRAS^{G12/13}* [40], реже – с мутациями генов, кодирующих факторы сплайсинга (*SRSF2*) [49]. Мутации *NPM1* практически не выявляют одновременно с мутациями гена-модификатора хроматина *ASXL1* [17].

Сочетания мутаций *NPM1* и других генов могут быть ассоциированы с разным прогнозом у пациентов с ОМЛ. В результате исследования, выполненного на базе альянса HARMONY, в которое было включено 1039 пациентов с *NPM1^{мут}* ОМЛ, было показано, что наилучшим прогнозом обладали пациенты с одновременными мутациями генов *NPM1*, *FLT3-ITD*, *IDH* (при условии отсутствия других генетических аномалий) и пациенты с сочетанными мутациями *NPM1* и хотя бы одного из перечисленных генов: *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *RAD21*. Худший прогноз наблюдали у пациентов с сочетанными мутациями *NPM1* и *TP53*, а также у пациентов с сочетанными мутациями *NPM1*, *FLT3-ITD* и *DNMT3A*. Пациенты с другими мутационными сочетаниями были отнесены к группе промежуточного прогноза [91].

1.2.2 Мутации генов эпигенетической регуляции

К генам эпигенетической регуляции (иначе – генам, связанным с метилированием ДНК) относят *IDH1* и *IDH2*, а также *DNMT3A* и *TET2*. Значение мутаций генов *DNMT3A* и *TET2* при ОМЛ будет подробно описано в разделе «Мутации генов, ассоциированных с клональным кроветворением».

Гены *IDH1* и *IDH2* кодируют ферменты изоцитратдегидрогеназу НАДФ⁺ 1 и изоцитратдегидрогеназу НАДФ⁺ 2, соответственно. Оба этих фермента участвуют в клеточном метаболизме, катализируя НАДФ⁺ зависимое окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием альфа-кетоглутарата в цикле трикарбоновых кислот [61]. Альфа-кетоглутарат играет важную роль в поддержании процессов эпигенетической регуляции [122, 136, 146]. Мутации в генах изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 приводят к нарушению окисления изоцитрата, в результате чего вместо нормального альфа-кетоглутарата в клетке накапливается онкометаболит 2-гидроксиглутарат [107, 147]. Избыточное количество этого вещества за счёт ингибирования ферментов, участвующих в метилировании ДНК (например, ферментов семейства *TET*), приводит к гиперметилированию ДНК и блоку нормальной дифференцировки клеток [124].

Мутации генов *IDH1/IDH2* выявляют у 7-20% пациентов с ОМЛ. Некоторые исследователи относят их к генам КК, отмечая, что мутации этих генов возникают на ранних этапах лейкемогенеза и могут длительно персистировать у пациентов с ОМЛ в ремиссии заболевания, а также выявляться у людей без миелоидных новообразований (особенно *IDH2*) [26, 49, 81, 137]. Другие исследователи считают, что мутации этих генов являются драйверными, то есть непосредственно приводят к развитию ОМЛ. Так или иначе, наличие мутаций генов *IDH1/IDH2* сопряжено с высоким риском развития ОМЛ [32, 70, 78, 105].

Мутации генов *IDH1/IDH2* чаще всего выявляют у пациентов с ОМЛ из группы промежуточного прогноза, в частности, у пациентов с нормальным кариотипом (НК) и трисомией 8 [44, 72].

Данные прогностической значимости мутаций *IDH1/IDH2* остаются крайне противоречивыми. Согласно результатам некоторых исследований, наличие мутаций этих генов является неблагоприятным прогностическим фактором [6, 44, 70, 97]. Другие данные показывают, что с худшим прогнозом коррелирует только наличие мутаций *IDH1*, в то время как мутации *IDH2*, главным образом, в кодоне R172, наоборот, сопряжены с лучшими долгосрочными результатами терапии [40, 51, 139]. Большинство авторов обращает внимание, что для оценки прогностической значимости мутаций *IDH1/IDH2* необходимо учитывать сопутствующий молекулярный ландшафт каждого конкретного случая ОМЛ. Мутации генов *IDH1* и *IDH2* взаимоисключают друг друга, а также практически не встречаются одновременно с мутациями гена *TET2*. Чаще всего их наблюдают одновременно с мутациями генов *NPM1* и *FLT3-ITD* [4].

1.2.3 Мутации генов сигнальных путей

К одним из наиболее часто встречающихся при ОМЛ мутаций (около 30% всех впервые диагностированных ОМЛ) относятся мутации гена *fms*-подобной тирозинкиназы 3 *FLT3* [40]. Этот ген преимущественно экспрессируется в СКК и клетках-предшественницах [121, 148]. При связывании *FLT3* рецептора с лигандом, экспрессируемым клетками костномозгового микроокружения, происходит активация тирозинкиназного рецептора. Активированный тирозинкиназный рецептор регулирует клеточную дифференцировку, пролиферацию и апоптоз [38]. Мутации гена *FLT3* приводят к гиперэкспрессии и чрезмерной активации тирозинкиназного рецептора и, как следствие, нарушению хрупкого равновесия между нормальными процессами кроветворения [7].

Два наиболее значимых варианта мутаций гена *FLT3* – внутренние тандемные дубликации в околосмембранном домене ITD (от англ. internal tandem duplications) и мутации в тирозинкиназном домене TKD (от англ. tyrosine kinase domain). Первый вариант мутаций выявляют чаще, приблизительно у 25-30% пациентов с ОМЛ, в то время как второй – лишь у 5-10%. Пациенты, у которых

наиболее часто обнаруживают мутации гена *FLT3*, имеют НК [53, 103, 104, 117, 118, 132, 140, 145, 152].

Мутации гена *FLT3* имеют принципиальное значение в диагностике и лечении ОМЛ, в особенности *FLT3-ITD*. Их учитывают при стратификации пациентов по группам прогноза в соответствии как с европейскими (рекомендации ELN), так и американскими рекомендациями NCCN (от англ. National Comprehensive Cancer Network) [69]. Согласно данным многочисленных исследований, наличие мутаций *FLT3-ITD* является негативным прогностическим фактором и связано с меньшей продолжительностью ремиссии, более высоким риском развития рецидива и худшими долгосрочными результатами терапии [103, 117, 118, 140, 142, 145, 149, 152]. Однозначные данные о прогностической значимости мутаций *FLT3-TKD*, напротив, отсутствуют. Некоторые данные демонстрируют, что наличие мутаций *FLT3-TKD* сопряжено с плохим прогнозом [104, 117, 140], другие свидетельствуют об обратном [119]. Третьи исследования показывают, что мутации *FLT3-TKD* не имеет прогностического значения у пациентов ОМЛ вообще [132, 138, 142]. В рекомендациях ELN, в отличие от рекомендаций NCCN, наличие мутаций *FLT3-TKD* не учитывается.

Мутации гена *FLT3* возникают на поздних этапах лейкемогенеза. Они часто сочетаются с мутациями генов *NPM1*, *DNMT3A*, *IDH1/IDH2*, *TET2* и практически не встречаются одновременно с мутациями генов *NRAS/KRAS*, *KIT* и *CEBPA* [39, 54, 111].

Другие, реже мутирующие при ОМЛ гены сигнальных путей – *PTPN11* и *KIT*. Ген *PTPN11* кодирует фермент протеин-тирозинфосфатазы нерецепторного типа 11, участвующий в многочисленных процессах передачи сигналов, необходимых для нормального кроветворения [90]. *KIT* протоонкоген, рецепторная тирозинкиназа – продукт гена *KIT* – представляет собой кластер дифференцировки 117, экспрессируемый на поверхности СКК и миелоидных клеток-предшественниц. При связывании со стволовым фактором роста происходит активация рецептора CD117, что, в свою очередь, приводит к активации сигнального пути, играющего роль в выживании, пролиферации и

дифференцировке клеток [88, 130]. Возникновение мутаций в этих двух генах приводит к нарушению процессов нормального кроветворения и развитию опухоли.

Мутации *PTPN11* определяют у 4-8% пациентов с ОМЛ [36, 40, 47, 90]. Их обнаруживают во всех цитогенетических группах, в то время как мутации гена *KIT* выявляют почти исключительно у пациентов с ОМЛ с аномалиями кор-связывающего фактора CBF (от англ. core-binding factor), то есть с транслокацией $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$ и инверсией $inv(16)(p13.1q22)$ либо транслокацией $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$. Мутированный *KIT* выявляют у 20-45% пациентов с CBF-ОМЛ [64, 73].

Прогноз заболевания у пациентов с мутациями генов сигнальных путей *PTPN11* и *KIT* хуже, чем у пациентов с диким типом этих генов. Для мутаций *KIT* это более характерно для пациентов с $t(8;21)$, чем для пациентов с $inv(16)$ [73]. Наличие мутаций *PTPN11*, согласно некоторым исследованиям, также сопряжено с более низкой эффективностью терапии и более высоким риском смерти [90].

1.2.4 Мутации генов, ассоциированных с клональным кроветворением¹

Гемопозитические стволовые клетки (ГСК) являются одними из наиболее активно делящихся клеток организма, и появление соматических генетических мутаций на разных этапах их жизненного цикла свойственно нормальному гемопоэзу. По мере старения организма число приобретённых мутаций неизменно растёт. Хотя большинство таких мутаций в геноме СКК являются нейтральными, некоторые могут придавать стволовой клетке пролиферативное преимущество. В этом случае будет развиваться КК – состояние, при котором происходят пролиферация одной СКК или клетки-предшественницы и формирование клона её потомков, несущих мутации определённых генов [98].

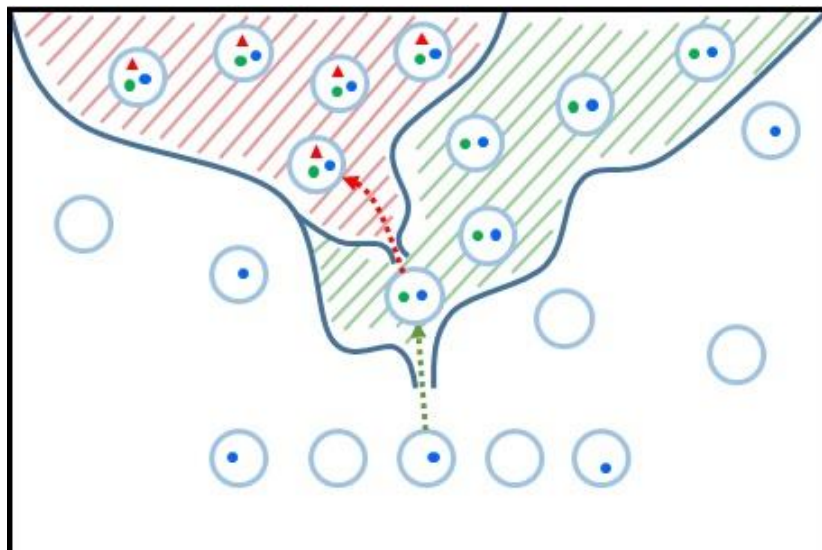
¹ По данному разделу опубликована статья: Кашлакова А.И. Клональное кроветворение и острые миелоидные лейкозы / Кашлакова А.И., Бидерман Б.В., Паровичникова Е.Н. // Онкогематология. – 2023. – Vol. 18. – № 3. – P. 92-101. – DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-92-101.

Мутации генов, ассоциированных с КК, могут быть выявлены у людей без гематологических заболеваний. В 2014 г. было проведено несколько масштабных исследований по секвенированию генома здоровых людей, не имеющих признаков заболеваний системы крови. В одном из них было выполнено полноэкзомное секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) клеток крови 17182 человек с использованием панели из 160 генов. Было обнаружено, что, во-первых, КК ассоциировано, главным образом, с соматическими мутациями трёх генов – *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* (гены ДТА), – во-вторых, что частота выявления этих мутаций и развития КК увеличивается с возрастом, хотя о связи КК с возрастом было известно и ранее [27, 65, 144]. Среди лиц моложе 40 лет мутации генов ДТА выявляли редко, среди лиц в возрасте от 70 до 79 лет – у 9,5%, в возрасте от 80 до 89 лет – у 11,7%, и, наконец, в возрасте от 90 до 108 лет – у 18,4%. На основе длительного наблюдения за дальнейшей судьбой участников исследования (медиана наблюдения составила 95 месяцев) был сделан третий вывод: наличие мутаций генов ДТА ассоциировано с повышенным риском развития злокачественных новообразований системы крови, хотя абсолютный риск злокачественной трансформации остаётся низким. Лишь у 4% людей с мутациями КК развивались злокачественные новообразования крови, что сопоставимо с риском 0,5-1% в год, в зависимости от аллельной нагрузки VAF (от англ. Variant Allele Frequency) выявленной мутации. Из 16 людей с развившимися впоследствии гемобластомами у 31% (n = 5) ранее было выявлено КК [5].

В другом схожем исследовании выборка составила 12380 человек, все они не имели гематологических заболеваний. КК было выявлено у 10% людей старше 65 лет, и лишь у 1% людей моложе 50 лет. Наиболее часто обнаруживали так же мутации генов *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*. Наличие КК было сопряжено с повышенным риском развития злокачественных новообразований системы крови (отношение рисков (OR) = 12,9 (5,8-28,7); доверительный интервал (ДИ) = 95%). Из всех заболевших 42% ранее имели КК [23].

В исследовании Хie и соавт., в котором были исследованы образцы крови 2728 человек с разными типами злокачественных опухолей (в том числе, солидных)

из проекта TCGA, было выявлено 77 мутаций в рак-ассоциированных генах, из которых 83% (n = 64) определяли в 19 лейкоз- и/или лимфома-ассоциированных генах. Наиболее часто обнаруживали мутации девяти генов: *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *ASXL1*, *TP53*, *GNAS*, *PPM1D*, *BCORL1* и *SF3B1*. Полученные результаты секвенирования у пациентов с солидными опухолями (n = 58) сравнили с результатами гематологических больных из разных нозологических групп: МДС/МПЗ (n = 151), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ, n = 160) и ОМЛ (n = 200). Было показано, что гены, мутации в которых обнаруживали наиболее часто и практически во всех группах, – *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и *TP53*. На основе полученных данных Хіе и соавт. сделали вывод, что появление мутаций генов, встречающихся во всех когортах (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и др.), может быть иницилирующим событием при развитии клональной экспансии СКК, т.е. при развитии КК, и ранним событием в случае развития гемобластозов. Мутации в других генах, часто выявляемые в дебюте заболевания (например, в генах *NPM1*, *FLT3*, *RUNX1* у пациентов с ОМЛ), являются скорее событиями второго порядка – кооперирующими мутациями, возникающими на более поздних этапах лейкемогенеза, и играющими роль в прогрессии заболевания [105]. Схематично схема развития КК и дальнейшего развития гемобластозов представлена на Рисунке 1.



«Фоновые» мутации (синие точки) – случайные мутации, появление которых в СКК свойственно нормальному гемопоэзу. «Ранние мутации» (зелёные точки) – мутации, возникающие на ранних этапах лейкогенеза (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и др.). «Кооперирующие» или «драйверные» мутации (красные треугольники) – мутации генов (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1* и др.), появление которых приводит к непосредственному формированию злокачественного клона (красной штриховкой)

Рисунок 1 – Модель лейкогенеза: от нормального кроветворения к формированию злокачественного клона

В 2015 г. Steensma и соавт. предложили ввести термин «клональное кроветворение неопределённого потенциала» (ККНП – CHIP, от англ. clonal hematopoiesis of indeterminate potential). Согласно определению авторов, ККНП констатируют при наличии кроветворного клона с мутацией гена, ассоциированного со злокачественными опухолями кроветворной ткани, в отсутствие цитопении и каких-либо гематологических заболеваний, отвечающих критериям ВОЗ, при этом VAF выявленной мутации должна быть не менее 2%. Это же определение в настоящее время приводят в классификации опухолей ВОЗ. Величина VAF 2% была выбрана условно, как минимальное клинически значимое пороговое значение, которым оперируют при использовании технологий высокопроизводительного секвенирования (ВПС – NGS, от англ. Next Generation Sequencing) [25, 80, 87]. При применении таргетного секвенирования с коррекцией ошибок, тем не менее, могут быть выявлены клоны и меньшего размера. Согласно работе Young и соавт., клоны с минимально определяемой VAF 0,03% обнаруживали у 95% здоровых людей старше 50 лет (медиана возраста – 56,6 лет).

Выявленные мутации персистировали в течение длительного времени и были обнаружены у тех же участников исследования повторно спустя более чем десять лет (медиана возраста – 68,1 год) [22].

Таким образом, согласно современным представлениям, мутации генов, ассоциированных с ККНП, являются ранними, «предрасполагающими» и сами по себе не приводят к развитию гемобластозов. Развитие мутаций в генах ККНП приводит к трансформации здоровой СКК в прелейкемическую стволовую клетку крови (пре-ЛСКК), которая даёт начало небольшим субклонам. Частота возникновения таких мутаций, как уже было указано, увеличивается с возрастом. Пре-ЛСКК трансформируется в собственно лейкемическую стволовую клетку крови (ЛСКК) в результате приобретения дополнительных молекулярно-генетических повреждений. Пролиферация ЛСКК, в свою очередь, приводит к развитию злокачественных миелоидных новообразований [21, 26, 52, 154].

Для обозначения кооперирующих генетических мутаций, то есть более поздних событий, которые могут быть непосредственным пусковым механизмом для развития злокачественной опухоли, некоторые исследователи предлагают использовать термин «клональное кроветворение онкогенного потенциала» (ККОП – СНОР, от англ. clonal hematopoiesis of oncogenic potential). Разделение генов, ассоциированных с КК, на гены ККНП и гены ККОП пока остаётся условным. Тесная биологическая взаимосвязь этих двух состояний не позволяет с уверенностью отнести мутированные при этом гены в какую-то одну группу.

К генам, ассоциированным с ККНП, в которых часто обнаруживают мутации у пациентов с ОМЛ, относят гены различных функциональных классов, однако основными считают гены *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*. Именно в них выявляют более 90% мутаций ККНП [77].

Ген *DNMT3A* кодирует фермент ДНК-метилтрансферазу 3 альфа, отвечающий за метилирование CpG островков в составе ДНК. Появление мутаций гена *DNMT3A* приводит к гиперметилованию этих участков. Гиперметилование CpG островков в промоторах генов опухолевой супрессии приводит к гипофункции генов-супрессоров, что играет роль в лейкемогенезе [35].

Мутации гена *DNMT3A* обнаруживают у 12-22% пациентов с ОМЛ, наиболее часто – у пациентов из группы промежуточного цитогенетического риска, в том числе, с НК. Частота встречаемости мутаций *DNMT3A* у пациентов с НК составляет 27-37% [17, 35, 48, 94]. Наличие мутаций гена *DNMT3A* является фактором неблагоприятного прогноза. Согласно данным литературы, у пациентов с ОМЛ с мутациями *DNMT3A* наблюдают худшие долгосрочные результаты терапии [62], а некоторые исследования демонстрируют также, что их наличие сопряжено с более низкой частотой достижения ремиссий [17, 48]. Сложность интерпретации прогностической значимости тех или иных мутаций обусловлена необычайной комбинаторностью генетических нарушений при ОМЛ. Так, мутации гена *DNMT3A* наиболее часто сосуществуют с мутациями генов *NPM1*, *FLT3-ITD* и *IDH1/IDH2*. Данные о влиянии мутаций гена *DNMT3A* на прогноз заболевания в зависимости от наличия мутаций других генов разнятся. Некоторые работы, сравнивая долгосрочные результаты терапии в группах пациентов с мутациями генов *FLT3-ITD*, *NPM1* и *DNMT3A*, продемонстрировали, что мутированный *DNMT3A* является предиктором неблагоприятного прогноза только в отсутствие мутаций *FLT3-ITD* и *NPM1* [62]. Другие работы, напротив, демонстрируют, что худшие показатели общей выживаемости (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ), а также самый высокий риск развития рецидива наблюдаются у пациентов с одновременными мутациями всех трёх генов: *FLT3-ITD*, *NPM1* и *DNMT3A* [17, 110].

Другой ген эпигенетической регуляции, который относят к генам, ассоциированным с ККНП, – ген *TET2*. Он кодирует фермент Tet метилцитозин диоксигеназу 2, который участвует в деметилировании ДНК. Равновесные процессы метилирования и деметилирования ДНК играют важную роль в регуляции клеточных процессов. В случае смещения этого равновесия происходит нарушение нормальной дифференцировки клеток. Возникновение мутаций в гене *TET2*, экспрессируемом, главным образом, в СКК и клетках-предшественницах, приводит к нарушению процессов их созревания и дифференцировки и экспансии клеток миелоидного ряда [31, 41, 83, 84]. Мутации гена *TET2* наблюдают у 6-27%

пациентов с ОМЛ [39, 40, 95]. Как и мутации *DNMT3A*, их чаще всего обнаруживают у пациентов из группы промежуточного цитогенетического риска, в частности – у пациентов с НК [85, 95]. Мутации в гене *TET2* ассоциируют с неблагоприятным прогнозом заболевания. Согласно данным двух больших мета-анализов (в первом было проанализировано 8 исследований, в которые были суммарно включены 2552 пациентов с ОМЛ, во втором – 16 исследований, в которые были включены суммарно 4378 пациентов), наличие мутаций этого гена коррелирует с худшими показателями как ОВ, так и БРВ у пациентов с ОМЛ, независимо от группы цитогенетического риска и группы прогноза по ELN [85, 95]. Мутации гена *TET2* при ОМЛ могут встречаться одновременно с широким спектром мутаций, однако их практически не наблюдают совместно с мутациями генов *IDH1*, *IDH2* и *WT1* [86, 93].

Наконец, третий ген, мутации в котором наиболее часто выявляют при ККНП – *ASXL* транскрипционный регулятор 1 (*ASXL1*). Его относят к функциональному классу генов-модификаторов хроматина. Белок, кодируемый геном *ASXL1*, как и белки, кодируемые *DNMT3A* и *TET2*, участвует в эпигенетической регуляции, однако, в отличие от последних, не модифицирует ДНК напрямую. Он относится к белкам группы *polycomb*, которые, модифицируя гистоны, подавляют активность генов, ответственных за клеточную дифференцировку [6, 123]. Мутации гена *ASXL1* встречаются при различных миелоидных новообразованиях. У пациентов с МДС с мутациями *ASXL1* повышен риск трансформации в ОМЛ [141]. При ОМЛ мутации *ASXL1* встречаются чаще при вторичных вариантах заболевания (30%), чем при впервые выявленных ОМЛ (6%) [63]. Мутации *ASXL1* обнаруживают во всех прогностических группах. Их наличие ассоциировано с меньшей эффективностью терапии, и их относят к факторам плохого прогноза [11, 12, 13, 40, 63, 141]. Уже в рекомендациях ELN 2017 г. пациентов с ОМЛ с мутированным *ASXL1* стратифицировали в группу неблагоприятного прогноза [33]. В рекомендациях ELN 2022 г. мутации гена *ASXL1*, как и гена *RUNX1*, перестали быть группообразующими и вошли в перечень мутаций генов, связанных с миелодисплазией [113]. Мутации гена *ASXL1* практически не встречают

одновременно с мутациями генов *NPM1*, *FLT3-ITD*, *DNMT3A* [3, 11]. Они ассоциированы, прежде всего, с мутациями *RUNX1* и *IDH2*^{R140} [13].

Мутации генов, ассоциированных с КК, могут длительно персистировать у пациентов с ОМЛ в ремиссии заболевания [20, 23, 76, 109, 115, 116, 126, 128]. Тем не менее, данные об их прогностической значимости остаются противоречивыми. Некоторые исследования демонстрируют, что постремиссионная персистенция мутаций генов ДТА ассоциирована с более низкими показателями ОВ и БРВ и более высоким риском развития рецидива [9, 19, 68]. В одной из работ было показано, персистенция «канонических» мутаций генов *DNMT3A* и *ASXL1* (т.е. замен в кодоне R882 гена *DNMT3A* и мутаций со сдвигом рамки считывания в кодоне G646fs*12 гена *ASXL1*) не обладали прогностической значимостью, в то время как наличие «неканонических» мутаций этих генов на момент выполнения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) коррелировало с худшей ОВ и более высоким риском развития рецидива [58]. По другим данным, мутации генов ДТА сами по себе не влияют на прогноз заболевания даже в случае их длительной персистенции у пациентов с ремиссией ОМЛ [34, 60, 67]. Как уже было отмечено, эти мутации возникают на ранних этапах лейкогенеза; в процессе своей эволюции прелейкемические клетки приобретают повреждения других генов, что и является пусковым механизмом для развития опухолевого клона. Вероятно, именно эти поздние события (например, появление мутаций *FLT3-TKD*, *NRAS*, *PTPN11*, *ДИКИЙ1*, *TP53*, *RUNX1*) являются прогностически значимыми [49].

1.3 Принципы терапии острых миелоидных лейкозов

Лечение ОМЛ направлено на установление контроля над заболеванием, а по возможности – на полное излечение. Для достижения ремиссии проводят курсы индукционной терапии, затем – курсы консолидации для её закрепления. В некоторых случаях пациентам выполняют алло-ТГСК.

Несмотря на появление большого числа новых препаратов (таргетных препаратов, моноклональных антител), базовые подходы к терапии ОМЛ за последние десятилетия не изменились. В основе индукционных курсов у пациентов, которым возможно проведение интенсивной терапии, по-прежнему лежит применение цитарабина в сочетании с антрациклиновыми антибиотиками. Стандартным курсом индукции ремиссии остаётся курс «7+3», предполагающий использование стандартных доз цитарабина в сочетании с дауно- или идарубицином, реже – с митоксантроном. В качестве альтернативной схемы индукционной терапии в рекомендациях ELN и NCCN предлагают курс «FLAG-IDA», подразумевающий введение высоких доз цитарабина в сочетании с идарубицином и флударабином. Внедрение в индукционные схемы гемтузумаба озогамицина (ГО) – конъюгата моноклональных антител, обладающих специфичностью к антигену CD33, с цитотоксическим агентом N-ацетил-гамма-калихеамицином – является опциональным и предпочтительно только у пациентов из групп благоприятного и промежуточного прогноза [114, 120]. При наличии мутаций гена *FLT3* в первую линию терапии включают мультикиназный ингибитор мидостаурин. По данным исследования RATIFY, применение мидостаурина в сочетании со стандартными химиотерапевтическими схемами увеличивало 4-летнюю ОВ на 7,1% (с 44,3 до 51,4%) у пациентов с ОМЛ в возрасте 18-59 лет, а 4-летнюю БРВ – на 7,6% (с 20,6 до 28,2%) [1].

Курсы консолидации основаны на применении цитарабина в средних либо высоких дозах. Согласно рекомендациям ELN, предпочтительным является введение средних доз цитарабина (1 – 1,5 г/м²), поскольку высокие дозы цитарабина, при их выраженной токсичности, не продемонстрировали большей эффективности у пациентов с ОМЛ [29]. Тем не менее, в рекомендациях NCCN в качестве базовой схемы консолидирующей терапии приводят именно «HiDAC» – высокие дозы цитарабина (1,5 – 3 г/м²). Интересно, что пациентам из группы благоприятного прогноза в курсы консолидации рекомендуют включать ГО. У пациентов из группы промежуточного прогноза его применение также возможно.

Помимо стандартных химиотерапевтических схем, у пациентов с ОМЛ в качестве курсов индукции и консолидации ремиссии применяют различные виды низкодозного воздействия. Такие схемы могут включать гипометилирующие препараты (азацитидин, децитабин), цитарабин в низких дозах, а также различные таргетные препараты: венетоклакс (селективный ингибитор *BCL-2*), ивосидениб (ингибитор *IDH1*), энасидениб (ингибитор *IDH2*), гилтеритиниб (ингибитор *FLT3* и *AXL*) и другие.

Следует отметить, что, согласно рекомендациям ELN и NCCN, выбор между интенсивным цитостатическим и низкодозным воздействием осуществляют на основании оценки общего состояния пациентов. Хотя есть некоторые отличия в терапевтических стратегиях у пациентов, в зависимости от исходных молекулярно-генетических характеристик опухоли (например, у пациентов с мутациями гена *FLT3* применяют ингибиторы тирозинкиназ, а пациентам из группы неблагоприятного прогноза рекомендуют обязательно выполнять алло-ТГСК при достижении ремиссии), в целом, решение об использовании интенсивных либо неинтенсивных протоколов принимают, оценивая возможную токсичность курса и риски развития жизнеугрожающих состояний [69, 113].

1.4 Мониторинг минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми миелоидными лейкозами

МОБ – термин, используемый для обозначения небольшой популяции опухолевых клеток, которая может быть выявлена только при использовании высокочувствительных методов исследования. Исследование МОБ на разных этапах терапии пациентам с ОМЛ выполняют, чтобы оценить глубину ремиссии и отследить динамику опухолевого клиренса. Эти данные позволяют оценить потенциальный риск развития рецидива у пациентов в ремиссии заболевания и, как следствие, выстроить оптимальную терапевтическую стратегию [56]. Основные методы для определения МОБ – ИФТ МПЦ и различные молекулярно-

генетические методы, прежде всего, полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ).

Метод ИФТ МПЦ основан на определении лейкоз-ассоциированного иммунофенотипа (ЛАИФ), т.е. профиля aberrантной экспрессии маркеров и комбинаций этих маркеров клетками опухолями, позволяющего отличить их от нормальных кроветворных клеток [30, 43]. Рекомендованная чувствительность метода при исследовании МОБ методом ИФТ (ИФТ МОБ) составляет $10^{-3} - 10^{-4}$, хотя максимальная возможная чувствительность равна 10^{-5} . Персистенция ИФТ МОБ у пациентов в полной ремиссии (ПР) является фактором неблагоприятного прогноза и предиктором рецидива [8, 10, 42, 57]. Преимущества метода ИФТ МПЦ при определении ИФТ МОБ, помимо высокой чувствительности, заключаются в его применимости у подавляющего большинства пациентов с ОМЛ, относительной универсальности и быстроте выполнения.

Наиболее стандартизированным молекулярно-генетическим методом, используемым для мониторинга МОБ, является ПЦР-РВ. Преимущество метода заключается в его высокой чувствительности, достигающей 10^{-6} , однако его применяют только при наличии некоторых устойчивых хромосомных и генетических аномалий. Ключевыми мишенями для отслеживания МОБ методом ПЦР-РВ являются транслокации *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1* и мутации гена *NPM1* [66]. В первых двух случаях определяют уровень химерного транскрипта относительно экспрессии контрольного гена; при наличии мутации *NPM1* оценивают аллельную нагрузку. ПЦР-РВ для мониторинга МОБ используют также у пациентов с перестройками *KMT2A*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1* и мутациями гена *WT1*, однако исследования экспрессии этих маркеров менее стандартизованы [2].

Главный недостаток метода ПЦР-РВ заключается в ограниченности его применения. Перестройки *CBF* выявляют лишь у 12-15% пациентов с ОМЛ, и ещё реже их обнаруживают у пожилых пациентов [15, 75, 92]. Кроме того, известно, что химерные транскрипты *CBFB::MYH11* и *RUNX1::RUNX1T1* могут длительно персистировать у пациентов в ПР. Чётко определённые критерии оценки результатов ПЦР-РВ при определении уровня химерных генов при этом

отсутствуют. Согласно исследованию французской группы, вероятность развития рецидива (ВРР) была значительно выше в группе пациентов с СВФ-ОМЛ, у которых редукция МОБ после 1-го курса консолидации составила менее трёх порядков – 54% против 22% [74]. Схожие результаты были получены в другом исследовании: значительно более высокую ВРР наблюдали у пациентов, достигших редукции уровня химерного транскрипта менее чем на три порядка после окончания курсов консолидации: 61,1% по сравнению с 33,7% у пациентов с редукцией МОБ на три порядка и более. При этом у 39,4% пациентов с ОМЛ, у которых не развился рецидив заболевания, персистенцию химерного транскрипта в небольшом проценте наблюдали, в среднем, в течение полутора лет по окончании лечения [129]. В исследовании британской группы были получены несколько иные результаты. Наибольшей прогностической значимостью обладало снижение уровня химерного транскрипта после 1-го курса индукции, а не консолидации, более чем на три порядка для пациентов с $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$. Целевое значение редукции транскрипта для пациентов с $inv(16)(p13.1q22)$ либо транслокацией $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$ было определено как снижение количества копий $CBFB::MYH11$, как минимум, в десять раз в периферической крови (ПК) [59].

Мутации гена *NPM1*, как уже было упомянуто ранее, выявляют приблизительно в 30% случаев ОМЛ. Часто их наблюдают совместно с другими хромосомными и генетическими нарушениями, которые могут обладать большей прогностической значимостью, чем мутации *NPM1*. В таких случаях пригодность мутаций *NPM1* как маркера МОБ вызывает сомнения. Так, например, было показано, что в случае если мутации гена *NPM1* сосуществуют с неблагоприятными цитогенетическими aberrациями, то именно эти aberrации определяют прогноз заболевания [18].

Другим возможным молекулярно-генетическим методом для определения МОБ у пациентов с ОМЛ является ВПС. Хотя технически этот метод более сложен, чем ПЦР-РВ, он позволяет одновременно исследовать мутационный статус сразу нескольких генов у большого числа пациентов, что позволяет в короткие сроки

выполнить комплексную оценку молекулярно-генетического ландшафта каждого случая заболевания и его изменений в процессе лечения.

1.5 Заключение обзору литературы

Генетическое многообразие ОМЛ и сложность патогенетических механизмов, совокупное действие которых приводит к развитию заболевания, не вызывает сомнений. Открытие новых биологических явлений (в частности, КК), лежащих в основе развития миелоидных новообразований, позволило изменить наши представления о лейкемогенезе. Развитие ОМЛ больше не воспринимается как событие, возникающее в результате стохастических генетических повреждений в кроветворных клетках. Теперь его можно рассматривать, скорее, как один из возможных вариантов эволюции сравнительно распространённого феномена – КК.

Различные чувствительные методы молекулярно-генетических исследований, в том числе, ВПС, позволяют выполнить комплексную оценку молекулярно-генетического профиля кроветворных клеток у пациентов с ОМЛ и, в частности, определить наличие генетических повреждений, ассоциированных с КК – событий, которые, согласно нынешним представлениям, формируют основу для развития ОМЛ. Изучение динамических изменений этой сложной мозаики представляет интерес не только с научной точки зрения, но и с практической, так как, в конечном счёте, может позволить выделить новые факторы прогноза, сформировать более точные методы мониторинга опухолевого клиренса и, соответственно, выстроить оптимальную стратегию лечения для пациентов с ОМЛ.

Глава 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика пациентов

Исследование носило проспективный и ретроспективный характер. Всего в исследование было включено 67 пациентов с впервые установленным диагнозом ОМЛ (53 женщины и 14 мужчин в возрасте от 18 до 59 лет, медиана возраста – 36 лет). В проспективную часть исследования с января 2021 года по январь 2023 года вошло 53 пациента, включённых в многоцентровое рандомизированное контролируемое клиническое исследование по оценке роли алло-ТГСК в первой полной ремиссии, МОБ-негативной после первого курса, у больных ОМЛ в возрасте моложе 60 лет «Протокол ОМЛ – 21 (лечение больных *de novo* острыми миелоидными лейкозами в возрасте 18-59 лет)». Этот протокол подразумевает разделение пациентов на три группы – «А», «В» и «С», – в зависимости от выявляемых в дебюте заболевания цитогенетических аномалий. Группу «А» составляют пациенты с ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$, группу «С» – пациенты с ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией. Перечень хромосомных aberrаций, позволяющих отнести пациентов к группе ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией, приведён в Приложении Г. Группа «В» является самой обширной, поскольку в неё стратифицируют пациентов со всеми остальными нарушениями кариотипа. В проспективную часть настоящего диссертационного исследования были включены пациенты из группы «В» протокола «ОМЛ-21», а также беременные женщины ($n = 7$), не включённые в протокол (поскольку беременность на момент диагностики ОМЛ является критерием исключения), однако соответствовавшие всем остальным критериям включения в «ОМЛ-21». Принципы терапии у этих пациенток были идентичны протокольным. В ретроспективную часть работы были включены пациенты, у которых выявляли хромосомные aberrации, позволявшие сопоставлять их с пациентами из группы «В» протокола «ОМЛ-21», и получавших аналогичное программное лечение с января 2019 года по ноябрь 2021 года.

Все включенные в исследование пациенты проходили обследование и лечение в следующих подразделениях Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации:

1. Отделение химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (заведующая отделением – к.м.н. Фидарова З.Т.)

2. Дневной стационар онкологии и химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения (заведующая отделением – к.м.н. Лукьянова И.А.)

3. Отделение химиотерапии гематологических заболеваний (заведующая отделением – к.м.н. Грибанова Е.О.)

4. Отделение гематологии и химиотерапии острых лейкозов и лимфом (заведующая отделением – к.м.н. Горенкова Л.Г.)

5. Отделение химиотерапии гемобластозов и трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (заведующая отделением – к.м.н. Кузьмина Л.А.)

6. Дневной стационар иммунохимиотерапии после трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (заведующая отделением – к.м.н. Васильева В.А.)

Диагноз ОМЛ всем пациентам устанавливали на основании результатов комплексного обследования. Необходимый диагностический минимум включал следующие исследования: общий анализ крови, цитологическое, иммунофенотипическое, цитогенетическое и молекулярно-генетические исследования КМ. Эти исследования были выполнены на базе следующих лабораторий ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ:

1. Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория (заведующая лабораторией – к.м.н. Двирнык В.Н.)

2. Лаборатория кариологии (заведующая лабораторией – к.м.н. Обухова Т.Н.)

3. Лаборатория иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (заведующая лабораторией – д.м.н. Гальцева И.В.)

4. Лаборатория молекулярной гематологии (заведующий лабораторией – д.б.н. Судариков А.Б.)

Клинико-лабораторная характеристика пациентов из проспективных и ретроспективных групп представлена в Таблице 2.

Таблица 2 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов, включённых в исследование

Показатель	Значение в группе		
	Проспективная (n = 53)	Ретроспективная (n = 14)	Общая (n = 67)
Пол, n (%)			
• Мужчины	10 (18,9)	4 (28,6)	14 (20,9)
• Женщины	43 (81,1)	10 (71,4)	53 (79,1)
Возраст, медиана (диапазон), лет	38 (18-59)	32 (18-46)	36 (18-59)
Концентрация гемоглобина в дебюте, медиана (диапазон), г/л	87 (53-126)	99 (55-116)	89 (53-126)
Количество лейкоцитов крови в дебюте, медиана (диапазон), $\times 10^9/\text{л}$	25 (1-275)	99 (1,1-286)	32 (1-286)
Количество тромбоцитов крови в дебюте, медиана (диапазон), $\times 10^9/\text{л}$	55 (5-339)	62,5 (30-146)	56 (5-339)
Количество бластных клеток в КМ в дебюте, медиана (диапазон), %	60 (8-98)	67,9 (20,8-90,4)	61,2 (8-98)
Хромосомные aberrации в дебюте, n (%)			
• Нормальный кариотип	33 (62,3)	10 (71,4)	43 (64,2)
• t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	8 (15,1)	–	8 (11,8)
• Перестройки гена <i>KMT2A</i>	3 (5,7)	3 (21,4)	6 (9)
○ t(6;11)(q27;q23.3)/ <i>AFDN::KMT2A</i>	3	1	4
○ t(9;11)(p22;q23)/ <i>KMT2A::MLLT3</i>	–	1	1
○ Другая перестройка <i>KMT2A</i>	–	1	1
• t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i>	1 (1,9)	–	1 (1,5)
• Неклассифицируемые численные аномалии	6 (11,3)	–	6 (9)
○ Трисомия 8 хромосомы	4	–	4
○ Трисомия 14 хромосомы	1	–	1
○ Трисомия 21 хромосомы	1	–	1
• Неклассифицируемые структурные аномалии	2 (3,7)	1 (7,2)	3 (4,5)
○ t(2;17)(p21;q11)	1	–	1
○ t(5;5)(q31;q35)	1	–	1
○ t(4;5)(q12;q35)	–	1	1

Из 67 пациентов, включённых в исследование, у 64,2% (n = 43) при выполнении стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) определяли НК. Нарушения кариотипа выявили у 35,8% пациентов (n = 24). Наиболее частыми

устойчивыми генетическими аномалиями были транслокация *RUNX1::RUNX1T1*, которую определили у 11,8% пациентов (n = 8), и различные перестройки гена *KMT2A*: они были выявлены у 9% пациентов (n = 6). У одного пациента была выявлена транслокация *DEK::NUP214*. Помимо устойчивых генетических аномалий, у 9% (n = 6) пациентов выявляли неклассифицируемые численные аномалии, среди которых наиболее частой была трисомия 8 (n = 4), а у двух человек были выявлены трисомия 14 и трисомия 21. Неклассифицируемые структурные аномалии были выявлены у трёх пациентов: $t(2;17)(p21;q11)$, $t(5;5)(q31;q35)$ и $t(4;5)(q12;q35)$. Описаний этих перестроек в литературе мы не обнаружили.

2.2 Протокол многоцентрового исследования «ОМЛ-21»

Многоцентровое рандомизированное контролируемое клиническое исследование «Протокол ОМЛ – 21 (лечение больных *de novo* острыми миелоидными лейкозами в возрасте 18-59 лет)» было инициировано в феврале 2021 года (исследование зарегистрировано на сайте [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) под номером NCT05339204).

Как уже было отмечено ранее, при включении в протокол пациентов стратифицируют по трём группам, в зависимости от выявляемых в дебюте заболевания цитогенетических аномалий: «А», «В» и «С». Программа терапии в разных группах отличается. Пациентам из группы А (ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$) выполняют последовательно 2 курса индукции по схеме «7+3», 2 курса консолидации «FLAG», далее – 6 курсов поддерживающей ХТ по схеме «5+5». Выполнение алло-ТГСК пациентам из этой группы в первой ПР не предусмотрено. Пациентам из группы «С» (ОМЛ с изменениями, связанным с миелодисплазией) проводят курсы низкодозного воздействия с включением гипометилирующих препаратов и/или венетоклакса. Алло-ТГСК этим пациентам выполняют как можно быстрее при достижении ПР. Группа «В» (ОМЛ с любыми хромосомными aberrациями, за исключением $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$ и изменений, связанных с миелодисплазией)

является единственной когортой, в которой в процессе терапии выполняют рандомизацию. После 1-го курса индукции по схеме «7+3» пациентам выполняют цитологическое исследование КМ. В случае если была достигнута костномозговая ремиссия заболевания (бластные клетки в КМ < 5%), оценивают статус ИФТ МОБ. Пациентам с ИФТ МОБ позитивной ремиссией заболевания продолжают курсы индукции и консолидации ремиссии по программе, аналогичной программе для группы «А» (ещё один курс «7+3», далее – два курса «FLAG») и выполняют алло-ТГСК. При достижении ИФТ МОБ негативности после 1-го курса ХТ пациентов рандомизируют на две ветви: ветвь 1 – продолжение стандартного химиотерапевтического лечения, в том числе курсов поддерживающей ХТ, с выполнением отложенной алло-ТГСК (т.е. только во второй ПР), ветвь 2 – продолжение ХТ с обязательной ранней алло-ТГСК (в течение 4-5 месяцев от момента достижения ПР). При наличии мутаций гена *FLT3* к химиотерапевтическому воздействию добавляют таргетный препарат мидостаурин. Подробная схема протокола «ОМЛ-21» представлена в Приложении Д. В ретроспективную часть работы вошли пациенты, получавшие лечение в «НМИЦ гематологии» до старта проекта многоцентрового исследования «ОМЛ-21» по аналогичной программе.

Таким образом, в качестве 1-го курса индукции 100% пациентов (n = 67), включённых в исследование, был проведён курс «7+3». Трое человек после 1-го курса ХТ выбыли из исследования (двое пациентов погибли в ранние сроки, одна была выписана из стационара по собственному желанию); таким образом, в дальнейшем анализе участвовали 64 пациента. Из них 84,4% (n = 54), в соответствии с протоколом, провели 2-й курс «7+3». У 14,1% пациентов (n = 9) была выполнена смена терапии: в связи с развитием тяжёлых инфекционных осложнений (n = 7), отсутствием опухолевого клиренса после 1-го курса ХТ (n = 1), непереносимостью цитарабина (n = 1). У одной пациентки сразу перешли к курсу консолидации «FLAG», минуя 2-й курс «7+3». Пациенты с исходными мутациями гена *FLT3-ITD*, помимо ХТ, получали мультикиназный ингибитор мидостаурин на всех этапах лечения (индукция и консолидация ремиссии, поддерживающая

терапия либо терапия после алло-ТГСК). Информация о проведённых пациентам курсах противоопухолевого лечения представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика курсов противоопухолевой терапии, проведённых пациентам, включённым в исследование

Курс лечения	Проспективная группа (n = 53)	Ретроспективная группа (n = 14)
Курс индукции №1, n пациентов (%) • «7+3»	53 (100)	14 (100)
	Всего в общей группе: 67/67 (100)	
	Проспективная группа (n = 50)	Ретроспективная группа (n = 14)
Курс индукции/консолидации №2, n пациентов (%) • «7+3» • «FLAG» • Смена терапии: ○ «МДЦ» ○ Монотерапия гилтеритинибом ○ «НАМ» ○ «Дас+Ven»	44 (88)	10 (71,4)
	Всего в общей группе: 54/64 (84,4)	
	–	1
	6 (12)	3 (21,4)
	Всего в общей группе: 9/64 (14,1)	
	3 (6)	3 (21,4)
	Всего в общей группе: 6/64 (9,4)	
	1	–
	1	–
	1	–
Примечания – «7+3»: Цитарабин 200 мг/м ² /сут. постоянная в/в инфузия, дни 1-7, Даунорабин 60 мг/м ² в/в 1 раз в сутки, дни 1-3; «МДЦ» (малые дозы цитарабина): Цитарабин 10 мг/м ² п/к 2 раза в сутки, дни 1-28; «НАМ»: Цитарабин 3 г/м ² в/в 2 раза в сутки, дни 1-3, Митоксантрон 10 мг/м ² в/в 1 раз в сутки, дни 3-5; «Дас+Ven»: Децитабин 20 мг/м ² в/в 1 раз в сутки, дни 1-5, Венетоклакс внутрь 100 мг (день 1), 200 мг (день 2), 400 мг (дни 3-28)		

2.3 Дизайн исследовательской работы

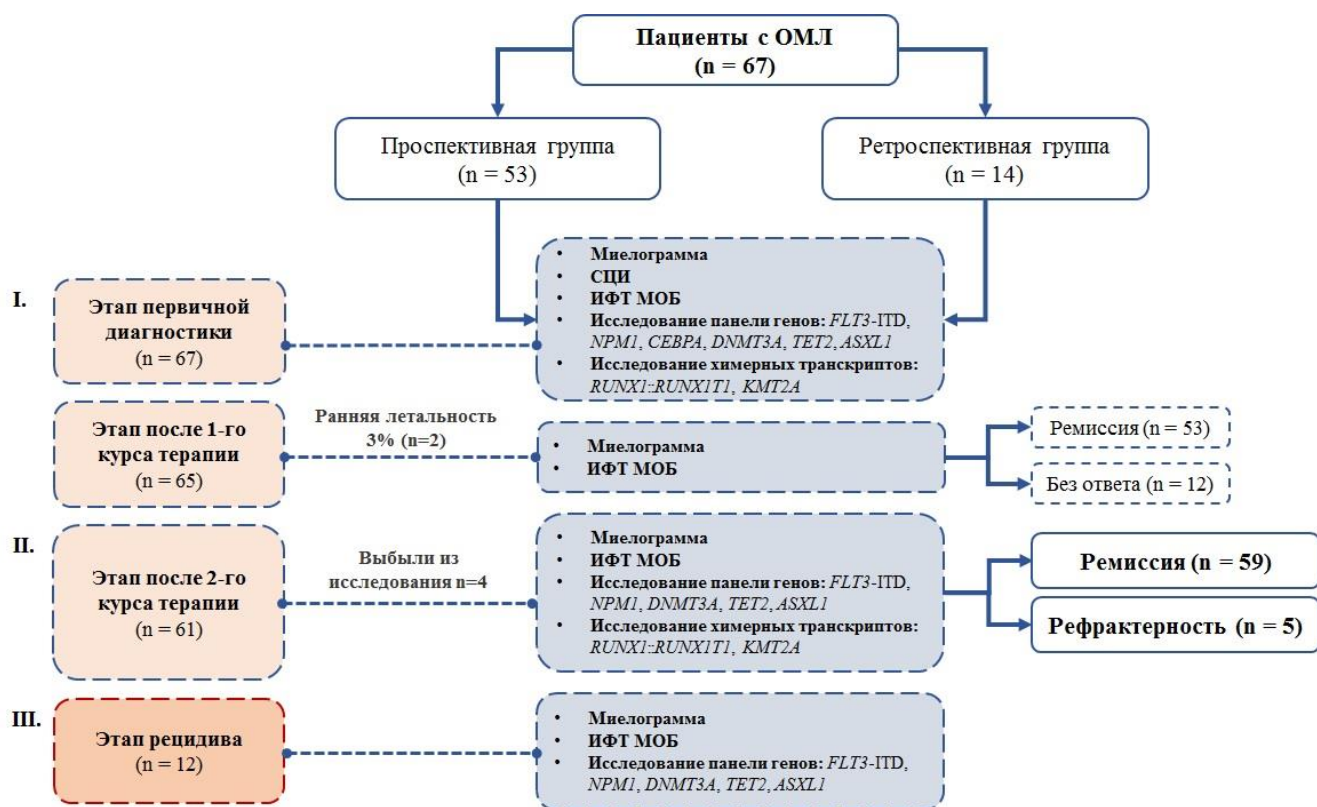
Для установления диагноза ОМЛ выполняли цитологическое исследование КМ (миелограмма), СЦИ и ИФТ клеток КМ. Эти исследования, как и определение мутационного статуса генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, на этапе первичной диагностики были выполнены всем 67 пациентам, включённым в исследование. Статус генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* исследовали методом ПЦР с фрагментным анализом (ПЦР-ФА), статус генов *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* – методом

ВПС. Исследование уровня химерных транскриптов *RUNX1::RUNX1T1* и *KMT2A* методом ПЦР-РВ выполняли только пациентам, у которых были выявлены соответствующие цитогенетические аномалии по данным СЦИ. Эффективность терапии оценивали по данным миелограммы и определения ИФТ МОБ после 1-го курса терапии. Повторные СЦИ КМ и молекулярно-генетические исследования в этой точке не выполняли.

Мутационный статус исследуемых генов в динамике определяли на этапе после 2-го курса терапии, поскольку одной из задач исследования было сопоставить молекулярный профиль ОМЛ с частотой достижения ПР, рефрактерного течения заболевания и клиренсом ИФТ МОБ. Первично-рефрактерное течение заболевания, согласно протоколу «ОМЛ-21, констатировали при недостижении ПР после двух курсов терапии. На этом же этапе констатировали персистенцию ИФТ МОБ в случае сохраняющейся ИФТ МОБ позитивности. Мутационный статус генов *FLT3-ITD* и *NPM1* оценивали только у пациентов, у которых были выявлены соответствующие мутации на этапе первичной диагностики (методом ПЦР-ФА и методом количественной аллель-специфичной ПЦР-РВ, соответственно), статус генов ДТА оценивали у всех пациентов (методом ВПС). Цитологическое исследование КМ и ИФТ после 2-го курса терапии всем пациентам выполняли в рамках рутинной клинической практики.

Третьей контрольной точкой в настоящей исследовательской работе был этап рецидива. В рецидиве пациентам, помимо стандартных исследований, выполняли повторное определение мутационного статуса всех генов (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*).

Дизайн исследовательской работы представлен на Рисунке 2.



I этап – этап первичной диагностики (число пациентов – 67); II этап – этап после 2-го курса терапии (число пациентов – 61; 2 пациента погибли в ранние сроки, 1 пациентка погибла в ремиссии до выполнения контрольных исследований после 2-го курса терапии, 2 пациентов выписаны из стационара, у 1 пациентки отсутствовал материал для исследований); III этап – этап рецидива (число пациентов – 12, в работе проанализирован материал 8 пациентов)

Рисунок 2 – Дизайн диссертационной работы

2.4 Молекулярно-генетические исследования

2.4.1 Подготовка биологического материала для выполнения секвенирования нового поколения

2.4.1.1 Выделение ядерных клеток из костного мозга

Для выполнения молекулярно-генетических исследований использовали ДНК, выделенную из аспириатов КМ. Аспират КМ набирали при выполнении контрольных пункций КМ в пробирки с добавлением антикоагулянта этилендиаминтетраацетата (ЭДТА, 4% цитрат натрия) объёмом 1 мл. При обработке образцов КМ первым этапом выполняли выделение ядерных клеток:

осуществляли лизис эритроцитов, далее отмывали ядерные клетки от обломков лизированных структур и осуществляли дозированное распределение клеточного осадка по пробиркам. Растворы, использовавшиеся для выделения ядерных клеток, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Растворы для выделения ядерных клеток

Раствор	Компоненты раствора	Дополнительная подготовка
ELS (20 ^X Erythrocyte Lysing Solution)	166 г NH ₄ Cl, 20 г KHCO ₃ , 0,749 г EDTA, 0,1 г Trypan Blue, H ₂ O до 1 л.	Перед использованием разводили в 20 раз для получения 1 ^X раствора ELS.
SSC (20 ^X Saline-sodium Citrate Buffer)	175,32 г NaCl, 88,23 г Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , H ₂ O до 1 л.	Перед использованием разводили в 20 раз для получения 1 ^X раствора SSC.

Следовали протоколу:

- 1) К 1 мл аспирата КМ добавляли 1^X раствора ELS (Erythrocyte Lysing Solution) до 10 мл.
- 2) Перемешивали на ротационном смесителе в течение 5-10 минут.
- 3) Центрифугировали в течение 10 минут при 200g и удаляли супернатант путём сливания в специальную ёмкость.
- 4) Добавляли 10 мл 1^X раствора ELS. Кратко перемешивали.
- 5) Центрифугировали в течение 10 минут при 200g и удаляли супернатант путём сливания в специальную ёмкость.
- 6) Добавляли 1^X раствора SSC из расчёта 1,3-1,5 мл на число пробирок для данного образца. Перемешивали встряхиванием и переносили в пробирки объёмом 1,5 – 2,0 мл.
- 7) Центрифугировали в течение 5 минут при 200g и удаляли супернатант с помощью водоструйного насоса, не задевая клетки. Встряхивали (разбивали) осадок.

2.4.1.2 Выделение геномной ДНК из ядерных клеток

Полученный клеточный осадок использовали для выделения геномной ДНК, которое осуществляли с помощью метода солевой экстракции [131]. В основе метода лежит осаждение белков в присутствии насыщенного раствора NH_4Cl , осаждение ДНК изопропанолом и промывка перегнанным 70% этиловым спиртом. Используемые в работе растворы приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Растворы для выделения геномной ДНК

Раствор	Компоненты раствора
WCLB (White Cell Lysis Buffer)	100 мМ Tris-Cl (pH 7,6), 40 мМ EDTA (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 0,2% SDS
Насыщенный раствор NH_4Cl	–
Изопропанол	–
Перегнанный 70% этиловый спирт	–

Процедуру осуществляли, согласно протоколу:

- 1) Перемешивали клеточный осадок встряхиванием.
- 2) К полученному клеточному осадку добавляли 600 мкл раствора для лизиса WCLB.
- 3) Содержимое эппендорфа тщательно перемешивали многократным пипетированием до состояния гомогенности.
- 4) Добавляли 200 мкл насыщенного раствора NH_4Cl для осаждения белков и перемешивали содержимое эппендорфа в течение 10 секунд на Vortex.
- 5) Центрифугировали в течение 10 минут при 12000 g.
- 6) Переносили супернатант объёмом 800 мкл в чистый подписанный эппендорф объёмом 2 мл. В него же добавляли 800 мкл изопропанола комнатной температуры.
- 7) Содержимое эппендорфа перемешивали на Vortex.
- 8) Центрифугировали в течение 10 минут на максимальной скорости в центрифуге типа Eppendorf.

9) Удаляли образовавшийся супернатант водоструйным вакуумным насосом, используя одноразовые стерильные наконечники.

10) К осадку добавляли 1000 мкл 70% перегнанного этилового спирта и центрифугировали в течение 5 минут при 12000 g.

11) Насухо удаляли супернатант водоструйным вакуумным насосом, используя одноразовые стерильные наконечники.

12) Осадок ДНК подсушивали в течение 10 минут при комнатной температуре, оставив открытыми крышки пробирок. Далее растворяли в 50-150 мкл деионизированной H₂O.

Если у больных констатировали развёрнутый костномозговой или МОБ рецидив, использовали ДНК, выделенную из КМ. В одном случае использовали ДНК, выделенную из биоптата опухоли, поскольку у больной развился изолированный экстрамедуллярный рецидив заболевания. Образцы ДНК хранили в биобанке лаборатории молекулярной гематологии при температуре -20°C. У больных из ретроспективной группы использовали архивный материал – образцы ДНК, хранившиеся в биобанке аналогичным образом.

2.4.1.3 Амплификация целевых регионов исследуемых генов

Целевые регионы исследуемых генов амплифицировали в мультиплексных ПЦР-реакциях на ДНК-амплификаторе C1000 Thermal Cycler (BioRad, США). Для амплификации гена *DNMT3A* использовали две системы праймеров – Mix1 и Mix2 – и отдельно праймеры к экзону 22. Для приготовления систем брали по 5 мкл всех необходимых праймеров (концентрация 100 пмоль/мкл) и разводили полученную смесь стерильной деионизированной водой для ПЦР до конечного объёма 100 мкл. Последовательность применявшихся праймеров для амплификации *DNMT3A* отображена в Таблице 6.

Таблица 6 – Последовательности праймеров для амплификации *DNMT3A*

Название системы праймеров	Экзоны	Прямой (F)/ Обратный (R) праймеры	Последовательность секвенирования (5' → 3')	Длина продукта, пар нуклеотидов
Mix1	exon 7_8	F	AGGTGGCCTTGCTAATTCCT	772
		R	GGATCAAGAACCTTCCCCCA	
	exon 11_13	F	TGTAAGTACCTTGGCACCT	1162
		R	TGGACACAGTCAGCCAGAAG	
	exon 17	F	ATAGGACTTGGGCCTACAGC	376
		R	AGGGTGAAGAGAAAGAGGGC	
exon 20	F	GTGGCTCCTGAGAGAGAAGT	326	
	R	AGAGCAGCTAGTCATTCAGCA		
Mix2	exon 9_10	F	CAAGTGTAAGCCTCGGCAA	603
		R	AAGCTGGGTGCCCTCATTT	
	exon 14_16	F	CCTGGTGGTTTCTGACCCTT	841
		R	CCCCATCCTGGGACAAG	
	exon 18_19	F	ACGTTGCCTTTATCCTCCCA	513
		R	TGAAGCAGCAGTCCAAGGTA	
	exon 21	F	TGTTTGCGGGGAGTTTGAAG	345
		R	ACACTAGCTGGAGAAGCAGG	
	exon 23	F	GGTCCTGCTGTGTGGTTAGA	378
		R	TTCCGCTCTGTGGTTTTTG	
Exon22	exon 22	F	TGGCGAGTACCTGGCATATT	326
		R	CTGTTCCCAGGACGTTTGTG	

Для приготовления реакционной смеси использовали реагенты «Синтол», Россия. Смесь содержала следующие компоненты: буфер для ПЦР 10x – 2,5 мкл, dNTP (2,5 мМ) – 2,5 мкл, MgCl₂ (2,5 мМ) – 2,5 мкл, ДНК матрица – 2 мкл, SynTaq ДНК-полимераза (5 ед/мкл) из расчёта 1 мкл на 4 реакции, система праймеров – Mix1 (1 мкл), либо Mix2 (1 мкл), либо Exon22 (1 мкл F + 1 мкл R), деионизованная вода для ПЦР до общего объёма 25 мкл.

Программа амплификации содержала следующие этапы: предварительная денатурация ДНК при температуре 95°C (5 минут), далее 35 циклов ПЦР – денатурация при температуре 95°C (30 секунд), отжиг при 60°C (30 секунд), элонгация при 72°C (45 секунд) и финальная элонгация при температуре также 72°C (10 минут). Амплификация завершалась охлаждением продукта до 12°C.

Для амплификации целевых регионов *TET2* использовали также две системы праймеров – Mix1 и Mix2. Состав этих систем приведён в Таблице 7.

Таблица 7 – Последовательности праймеров для амплификации *TET2*

Название системы праймеров	Экзоны	Прямой (F)/ Обратный (R) праймеры	Последовательность секвенирования (5' → 3')	Длина продукта, пар нуклеотидов
Mix1	exon 3(1)	F	TTTCCATGCTCTTTAGAAATTCAACT	1102
		R	GCTAGCTTTGTGGTTCCCTG	
	exon 3(3)	F	AGTCACTGTGTGGCACTAGAT	1499
		R	AATTGCTGCCAGACTCAAGA	
	exon 5_6	F	CCGTTCAATTTCTCAGGATGTGG	1114
		R	TTCCSTATCAGTGGCCGCAAA	
	exon 8	F	CCTAACCCCTACTCCTGGCAC	502
		R	GCAGTGGTTTCAACAATTAAGAGG	
	exon 10	F	GGACCTGTAGTTGAGGCTGT	479
		R	TGATGGGGGCAAAACCAAAA	
	exon 11(2)	F	CACCCAATCTGAGCAATCCA	924
		R	GGTGAGCTGAGGTTTTTCCC	
Mix2	exon 3(2)	F	AGCTGCAATGCTAAATACCTGTT	1213
		R	CTCAGTCTCTGAAGCCTGTTG	
	exon 4	F	GCCCTTAATGTGTAGTTGGGG	360
		R	TGACTCTCTGGTGAATAGCACA	
	exon 7	F	AGTTCTGTGTGTGGTTATGCC	432
		R	AGTGTGTATCTACAGTTTGGGAAAA	
	exon 9	F	TGTGTCATTCCATTTTGTCTCTGG	468
		R	GCCGCCATGTAAGATGTGAC	
	exon 11(1)	F	CCTGTTTCTGTTCTCTCTTACCC	833
		R	GGGCATGAAGAGAGCTGTTG	

Состав реакционной смеси в конечном объеме 25 мкл был идентичен (за исключением систем праймеров) составу смеси для амплификации *DNMT3A*. Программа амплификации и схема изготовления систем праймеров также не отличались.

Для амплификации целевого региона (экзон 12) гена *ASXL1* применяли четыре пары праймеров:

- 1) ASXL1_AF (5'-AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT-3')
- ASXL1_AR (5'-TGCTCTGTTCTGCAGGCAAT-3')
- 2) ASXL1_BF (5'-GATGAGGAGCAAGGACCCAC-3')
- ASXL1_BR (5'-TTGGACAGTGGGGCAGATTG-3')
- 3) ASXL1_CF (5'-GGGATCTTCGGTGGACAAGG-3')

ASXL1-CR (5'-TTGGAGTCTGTACCCACCA-3')

4) ASXL1_DF (5'-AATGTGGCTGCAACCCTTCA)

ASXL1_DR (5'-GCCACATCAGGCTCTGTCTT-3')

Состав конечной реакционной смеси для выполнения ПЦР в данном случае не отличался от таковых для генов *DNMT3A* и *TET2*. Программа амплификации состояла из следующих этапов: 1) предварительная денатурация ДНК в течение 10 минут при температуре 95°C, далее 2) 35 циклов ПЦР – денатурация в течение 20 секунд при температуре 95°C, отжиг в течение 30 секунд при температуре 62°C, элонгация в течение 60 секунд при 72°C и 3) финальная элонгация в течение 10 минут так же при температуре 72°C. Последним этапом амплификации было охлаждение продукта до 12°C.

Контроль результатов ПЦР осуществляли методом электрофореза в агарозном геле. В качестве красителя использовали бромистый этидий, который вносили непосредственно в 2% агарозный гель, в качестве буфера – 0,5x раствор TBE (буфер трис-боратный с ЭДТА). После добавления амплификатов в застывший гель выполняли электрофорез при напряжении 150В и оценивали результаты в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

После проверки результатов ПЦР методом электрофореза смешивали по 3 мкл всех полученных амплификатов исследуемых генов и осуществляли их очистку при помощи магнитных частиц (Таблица 8).

Подготовку к процедуре осуществляли следующим образом:

1. Приготавливали свежий 80% раствор этанола;
2. Подготавливали реагенты, согласно инструкции.

Таблица 8 – Растворы для очистки амплификатов генов

Реагент	Температура хранения	Подготовка
AMPure XP beads	От 2°C до 8°C	Оставляли на столе до нагрева до комнатной температуры. Хорошо перемешивали, в том числе на Vortex.
Деионизованная вода	От +4°C до +20°C	–

Протокол процедуры:

- 1) Кратко центрифугировали стрипы со смесью амплификатов при комнатной температуре, чтобы содержимое осело на дне лунки.
- 2) В каждую лунку добавляли 48 мкл магнитных частиц AMPure XP (из расчёта 1,8 объёма магнитных частиц AMPure XP на 1 объём амплификата).
- 3) Закрывали стрипы, перемешивали на вортексе, кратко осаждали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 4) Помещали стрипы в магнитный штатив и оставляли, пока раствор не становился полностью прозрачным (приблизительно 2 минуты).
- 5) Удаляли супернатант и дважды промывали оставшееся содержимое лунок 80% раствором этанола.
- 6) Повторно осматривали лунки с промытыми магнитными частицами и при необходимости удаляли оставшиеся мелкие капли этанола пипеткой.
- 7) Подсушивали при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 8) Снимали стрипы со штатива и добавляли в каждую лунку 53 мкл буфера TE (или деионизованной воды).
- 9) Закрывали стрипы, перемешивали на вортексе, кратко осаждали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 10) Помещали стрипы в магнитный штатив и оставляли, пока раствор не становился полностью прозрачным (приблизительно 2 минуты).
- 11) Переносили 50 мкл супернатанта из каждой лунки в соответствующие лунки чистых стрипов.

Концентрацию полученных пулов продуктов измеряли с помощью компактного флуориметра Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США).

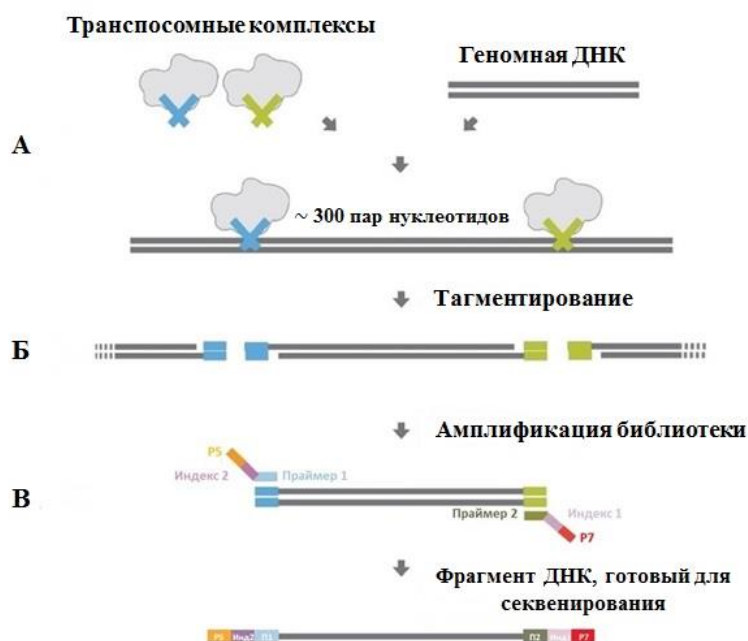
Данный этап является точкой безопасной остановки, т.е. полученные очищенные пулы продуктов могут храниться при температуре от -25°C до -15°C в течение 7 дней.

2.4.2 Высокопроизводительное секвенирование

Мутационный статус генов *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* исследовали методом ВПС Illumina/Solexa. Секвенирование выполняли в следующих контрольных точках: этап первичной диагностики, этап после 2-го курса терапии, а также на этапе рецидива.

Метод Illumina/Solexa относится к методам секвенирования путём синтеза, в основе которых лежит регистрация присоединяемых ДНК-полимеразой одновременно к большому количеству одноцепочечных молекул ДНК меченых нуклеотидов [89]. Он состоит из трёх больших этапов: подготовка библиотеки, секвенирование, анализ данных

Подготовку библиотеки, т.е. совокупности фрагментов геномной ДНК, нуклеотидную последовательность которых необходимо расшифровать, осуществляли, согласно протоколу Nextera XT DNA Library Prep [46]. Схема этого этапа представлена на Рисунке 3.



А – Транспозомные комплексы Nextera XT присоединяют адаптерные последовательности к целевому фрагменту геномной ДНК, Б – Фрагментация и мечение ДНК (тагментирование), В – Амплификация ДНК и добавление индексов

Рисунок 3 – Процесс подготовки библиотеки (протокол Nextera XT DNA Library Prep)

На этапе тагментирования геномной ДНК осуществляли фрагментацию и мечение ДНК специальными адаптерными последовательностями – частично комплементарными олигонуклеотидами. Используемые реагенты приведены в Таблице 9.

Таблица 9 – Реагенты, использовавшиеся при процедуре тагментирования ДНК

Реагент	Температура хранения	Подготовка
АТМ (Amplicon Tagment Mix)	От -25°C до -15°C	Оттаивали пробирку на льду, переворачивали 3-5 раз, коротко центрифугировали.
NT (Neutralize Tagment Buffer)	От -25°C до -15°C	Проверяли наличие осадка. Если был осадок, перемешивали на Vortex до растворения.
TD (Tagment DNA Buffer)	От -25°C до -15°C	Оттаивали пробирку на льду, переворачивали 3-5 раз, коротко центрифугировали.

Использовали следующие параметры программы TAG в амплификаторе:

- Нагрев крышки до 100°C
- Объем реакции – 25 мкл
- 55°C в течение 5 минут
- Охлаждение до 10°C

Протокол процедуры был следующим:

1) В каждую лунку стрипов строго в указанном порядке добавляли реагенты в следующем объеме: 1. TD – 5 мкл 2. 0.5 нг ДНК (предварительно разведенной до концентрации 0,2нг\мкл) – 2,5 мкл.

2) Пипетировали смесь.

3) В каждую лунку плашки добавляли 2,5 мкл АТМ.

4) Пипетировали смесь 10 раз, после чего закрывали стрипы.

5) Коротко осаждали при комнатной температуре.

6) Помещали стрипы в амплификатор и запускали программу TAG. Как только в программе достигали температуры 10°C, немедленно переходили к пункту 7 (поскольку используемые транспосомные комплексы ещё активны).

- 7) В каждую лунку стрипов добавляли 2,5 мкл NT.
- 8) Пипетировали смесь 10 раз, после чего закрывали стрипы.
- 9) Коротко осаждали при комнатной температуре
- 10) Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут.

Далее следовал этап амплификации библиотеки. Цель этапа – амплификация тагментированной ДНК, а также присоединение в процессе ПЦР специальных индексов к обоим концам амплифицированных фрагментов ДНК. Используемые реагенты приведены в Таблице 10.

Таблица 10 – Реагенты для амплификации библиотеки

Реагент	Температура хранения	Подготовка
Индексы (i7 и i5)	От -25°C до -15°C	Оттаивали пробирки при комнатной температуре, перемешивали на Vortex, коротко центрифугировали.
NPM (Nextera PCR Master Mix)	От -25°C до -15°C	Оттаивали на льду, перемешивали на Vortex, коротко центрифугировали.

Использовали следующие параметры программы NXT PCR в амплификаторе:

- Нагрев крышки до 100°C
- Объем реакции – 25 мкл
- 72°C в течение 3 минут
- 95°C в течение 30 секунд
- 12 циклов: 95°C в течение 10 секунд, 55°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 30 секунд, 72°C в течение 5 минут
- Охлаждение до 10°C

Протокол процедуры был следующим:

1) Добавляли к каждому образцу по 2,5 мкл обоих индексов – i5 и i7. При работе с индексами открывали пробирку только с одним из них, чтобы избежать перепутывания крышек и смешения реагентов.

2) В каждую лунку с образцами добавляли 7,5 мкл NPM.

- 3) Пипетировали смесь 10 раз, после чего закрывали стрипы.
- 4) Коротко осаждали при комнатной температуре.
- 5) Помещали стрипы в амплификатор и запускали программу NXT PCR.

Данный этап является точкой безопасной остановки: при необходимости полученные продукты можно хранить при температуре от -15°C до -25°C в течение 7 дней, либо оставить в амплификаторе на 24 часа.

Очистку библиотеки выполняли при помощи магнитных частиц AMPure XP (Mlumina, США), согласно протоколу, аналогичному таковому для очистки ПЦР-продукта.

Концентрацию полученной библиотеки измеряли с помощью компактного флуориметра Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США). Все библиотеки разводили до концентрации 4 нмоль/л и смешивали в равных пропорциях. Далее осуществляли денатурацию итоговой суммарной библиотеки и разведение до загрузочной концентрации 10 пмоль/л. Для этого использовали реагенты, приведённые в Таблице 11.

Таблица 11 – Реагенты для очистки библиотеки

Реагент	Подготовка
HT1 (Hybridization Buffer)	HT1, хранившийся при температуре от -25 до -15°C , оттаивали при комнатной температуре.
0,2N раствор NaOH	1 мл раствора приготавливали смешиванием 800 мкл деионизованной воды и 20 мкл 1,0N раствора NaOH. Свежеприготовленный раствор 0,2N NaOH использовали в течение 12 часов.
Mlumina PhiX Control	1 мл денатурированного PhiX контроля в концентрации 20 пмоль/л приготавливали смешиванием 2 мкл PhiX библиотеки (10 нМ), 3 мкл деионизованной воды, 5 мкл свежеприготовленного раствора 0,2N NaOH и 990 мкл буфера HT1. Полученный раствор могли хранить при температуре от -25 до -15°C в течение 4-х недель.

Следовали протоколу денатурации и разведения библиотеки до концентрации 4 нмоль/л:

- 1) В микроцентрифужной пробирке смешивали 5 мкл библиотеки с концентрацией 4 нмоль/л и 5 мкл свежеприготовленного 0,2N раствора NaOH.

- 2) Кратко перемешивали на Vortex и центрифугировали при комнатной температуре на 280 g в течение 1 минуты.
- 3) Инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 4) В пробирку с денатурированной библиотекой добавляли 990 мкл подготовленного буфера NT1.

В результате получали 1 мл раствора с денатурированной библиотекой концентрацией 20 пмоль/л. Далее разводили полученный раствор до загрузочной концентрации 10 пмоль/л:

- 1) Смешивали 300 мкл раствора с денатурированной библиотекой в концентрации 20 пмоль/л и 300 мкл буфера NT1.
- 2) Пробирку переворачивали и кратко центрифугировали.
- 3) Добавляли 30 мкл денатурированного PhiX контроля в концентрации 20 пмоль/л.

Подготовленную библиотеку загружали в специально предназначенный для этого резервуар предварительно размороженного картриджа с реактивами MiSeq Reagent Kit v2 Micro (Illumina, США). Проточную кювету, согласно инструкции производителя, тщательно промывали деионизованной водой и этанолом от избытка буферных солей и высушивали безворсовой салфеткой, после чего загружали в секвенатор MiSeq (Illumina, США) в отсек для проточной кюветы. В отсек для реактивов загружали бутылку с буфером PR2, пустую бутылку для сброса отходов и подготовленный картридж с реактивами и библиотекой. После загрузки всех необходимых компонентов в секвенатор создавали протокол, содержащий информацию об образцах, и начинали запуск. После каждого запуска осуществляли промывку прибора, согласно инструкции производителя [45].

На последнем этапе осуществляли анализ данных секвенирования. Фильтрация данных, удаление служебных последовательностей, картирование прочтений, поиск и аннотирование вариантов осуществляли при помощи утилит Trimmomatic [14], BWA [125], SAMtools [150], Vardict [151] и Annovar [153].

2.4.3 Секвенирование по Сэнгеру

Минимальное клинически значимое пороговое значение VAF, учитываемое при интерпретации результатов ВПС, составляет 2%, однако при определённых условиях могут быть выявлены клоны и с меньшей аллельной нагрузкой. В нашей работе при исследовании мутационного статуса генов, ассоциированных с КК, учитывали только мутации генов с $VAF \geq 3\%$ 1^й-3^й категорий патогенности («патогенные», «вероятно патогенные» и «варианты неопределённого значения») [79]. Синонимные однонуклеотидные замены и полиморфизмы из анализа были исключены.

Сложность и многоэтапность метода ВПС может приводить к появлению артефактов, связанных с потерей покрытия, уменьшению его однородности и так далее. Чтобы минимизировать количество ошибок при обработке полученных результатов, выявленные мутации генов были дополнительно валидированы при помощи секвенирования по Сэнгеру. Так как аналитическая чувствительность этого метода, по разным оценкам, составляет 10-20%, проводили валидацию только мутаций с $VAF \geq 10\%$.

Этапы амплификации целевых регионов генов и контроля результатов ПЦР не отличались от таковых при подготовке к ВПС, за исключением того, что все пары праймеров на соответствующие регионы использовались по отдельности, а не в мультиплексных реакциях. Для ферментативной очистки ПЦР-продукта использовали набор ExoProStar™ (Illustra™, Cytiva, США): смешивали 6 мкл ПЦР-продукта с 2 мкл реагента и инкубировали 15 мин при 37 °C, затем 15 мин при 82 °C.

Секвенирование ПЦР-продукта производили с использованием набора BrilliantDye Terminator v1.1 (Nimagen, Нидерланды), согласно инструкции производителя. В реакционную смесь добавляли 1 мкл терминатора BrilliantDye, 1,5 мкл буфера для секвенирования, 1 мкл соответствующего праймера, 2 мкл очищенного ПЦР-продукта и 4,5 мкл деионизованной воды.

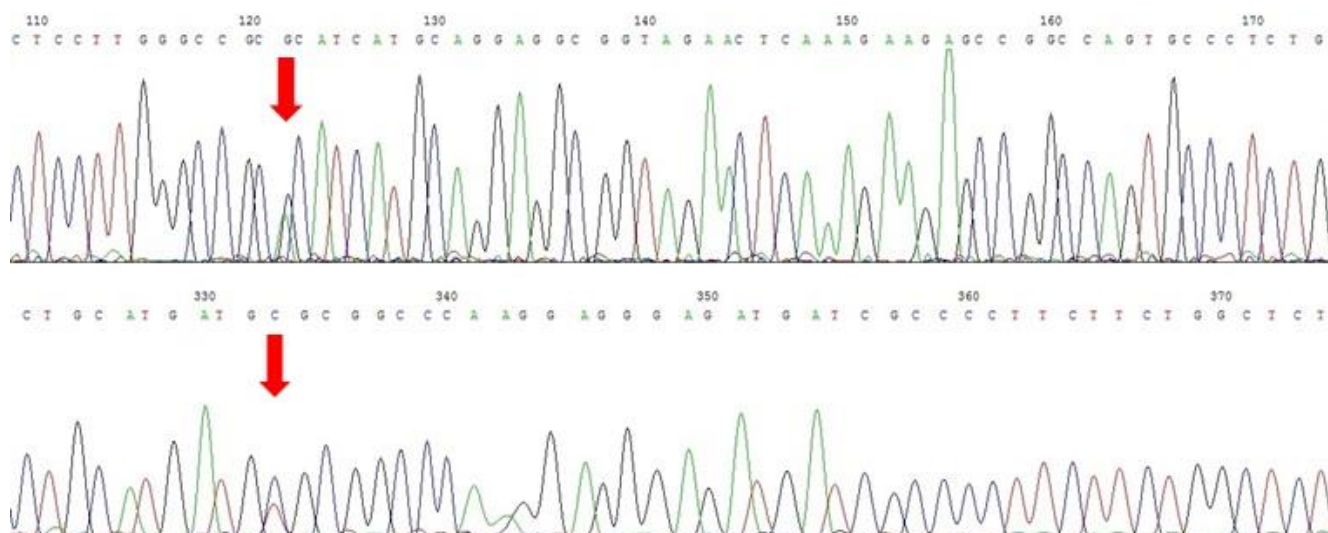
Параметры программы секвенирования в амплификаторе были следующими:

- Нагрев крышки до 100°C
- Объем реакции – 10 мкл
- 95°C в течение 2 минуты
- 25 циклов: 95°C в течение 10 секунд, 50°C в течение 5 секунд, 60°C в течение 4 минут
- Охлаждение до 4°C

Очистку производили с помощью набора iX-Pure (Nimagen, Нидерланды), включающий растворы Purification Resin и Activator. Эти растворы смешивали целиком и хранили при температуре 4 °C, далее для очистки на 10 мкл продукта реакции секвенирования вносили 55 мкл полученной смеси. После этого плашку либо пробирку помещали в шейкер и перемешивали на протяжении 20 минут при 2000 об./мин., затем центрифугировали в плащечной центрифуге (Eppendorf, Германия) на протяжении 5 мин на скорости 3000 об./мин до полного осаждения частиц Purification Resin.

Капиллярный электрофорез производили на генетическом анализаторе Нанофор 05 (Институт Аналитического Приборостроения РАН, Россия) с использованием модулей для секвенирования на капиллярах 35 см с режимом неполного погружения капилляров, время инъекции 1 или 3 сек.

Полученные хроматограммы автоматически обрабатывали в программе SeqAnalysis (Thermo Fisher Scientific, США). Пример хроматограммы у пациента с верифицированной миссенс-мутацией гена *DNMT3A* приведён на Рисунке 4.



Красными стрелками указаны мутантные пики. Выявленная миссенс-мутация (exon19:c.C2222T:p.A741V) представлена заменой цитозина на тимин в нуклеотидной последовательности 19-го экзона гена *DNMT3A*.

Рисунок 4 – Капиллярная хроматограмма у пациента с мутацией гена *DNMT3A*, полученная в результате валидации данных ВПС методом секвенирования по Сэнгеру

2.4.4 Детекция мутаций генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*

Исходный мутационный статус генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA* (домены TAD1, TAD 1/2, bZIP) оценивали с помощью метода ПЦР-ФА, аналитическая чувствительность которого составляет 10^{-2} . Мутации гена *CEBPA* в домене TAD2 (инсерции 6 пар нуклеотидов без сдвига рамки считывания), характеризующиеся как полиморфизмы [108], были исключены из анализа. В работе были использованы стандартные, описанные ранее протоколы [99, 102, 106, 112, 143]. Последовательность использовавшихся праймеров представлена в Таблице 12.

Таблица 12 – Последовательности праймеров для амплификации *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*

Домены	Прямой (F)/ Обратный (R) праймеры	Последовательность нуклеотидов	Длина продукта, пар нуклеотидов
<i>CEBPA</i>			
TAD1	F	FAM-5'-GGCGAGCAGGGTCTCCGGGT-3'	322 (-92+253)
	R	5'-TGTGCTGGAACAGGTCGGCCA-3'	
TAD 1/2	F	R6G-5'-GCTGGGCGGCATCTGCGA-3'	294 (153-454)
	R	5'-CCCCGACGCGCTCGTACAGG-3'	
bZip	F	TAMRA-5'-CTCGGTGCCCGCCGGCCT-3'	341 (721-1070)

Продолжение таблицы 12

	R	AGTTGCCCATGGCCTTGAC	
<i>FLT3</i>			
ITD	F	FAM-AGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC	370
	R	gtttcttCATCTTTGTTGCTGTCCTTCCAC	
<i>NPM1</i>			
	F	(HEX) R6G - ACTCTCTGGTGGTAGAATGAA	330
	R	gtttcttGGCATTTTGGACAACACATTC	

Для исследования динамического изменения аллельной нагрузки мутаций гена *NPM1* использовали метод количественной аллель-специфичной ПЦР-РВ, аналитическая чувствительность которого составляет $10^{-4} - 10^{-5}$ [101].

2.5 Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных применяли программное обеспечение «SAS 9.4» (Sas institute inc., Cary, NC, США) и «Python 3.12.0». Результаты считали достоверными при значении $p < 0,05$.

При изучении ассоциации клинико-демографических показателей с наличием генетических мутаций у пациентов с ОМЛ рассматривались такие параметры, как возраст, пол, исходный кариотип, исходная концентрация гемоглобина и исходное количество лейкоцитов и тромбоцитов в ПК, инициальное количество бластов в КМ, наличие гиперлейкоцитоза и нейрорлейкемии в дебюте заболевания, беременность. Параметрические данные были представлены в виде средних значений или медианы. Для анализа результатов использовали классические методы описательной статистики, частотный и корреляционный анализы. Для анализа таблиц сопряжённости использовался критерий хи-квадрат. Для анализа непрерывных параметров применяли критерий Стьюдента.

Эффективность лечения оценивали по следующим критериям: длительность миелотоксического агранулоцитоза, длительность тромбоцитопении, частота достижения ПР, частота первичной рефрактерности к терапии, которую констатировали при недостижении ПР после двух курсов противоопухолевой

терапии, персистенция ИФТ МОБ, которую констатировали при сохранении ИФТ МОБ позитивного статуса также после двух курсов противоопухолевой терапии.

Анализ долгосрочных результатов терапии проводили по методу Каплана-Мейера. В анализ вошли такие параметры, как ОБ, БРВ для всех пациентов, в зависимости от наличия или отсутствия мутаций генов *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *FLT3-ITD*, *NPM1*, транслокации *RUNX1::RUNX1T1* и перестроек с вовлечением гена *KMT2A*, а также категории патогенности выявленных мутаций. Значение ОБ рассчитывали от даты диагноза до даты смерти от любых причин или последнего контакта. Значение БРВ рассчитывали от момента достижения ремиссии до развития рецидива заболевания, или смерти от любых причин, или последнего контакта. Точкой цензурирования считали дату последнего контакта с пациентом. Однофакторный анализ прогностического значения факторов проводился с помощью log-rank критерия.

Временную динамику показателей аллельной нагрузки мутаций генов и ИФТ МОБ оценивали с помощью процедур многомерного ковариационного анализа и регрессионного анализа повторных измерений.

Прогностическую значимость изменений мутационного статуса генов оценивали с помощью Landmark анализа.

Многофакторный анализ проводили с использованием модели пропорциональных рисков Кокса. Для отбора значимых связей использовали сценарии пошаговой селекции факторов.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Клинико-лабораторные характеристики пациентов, включённых в исследование

3.1.1 Молекулярно-генетический профиль заболевания у пациентов на этапе первичной диагностики

Из 67 пациентов, включенных в исследование, на этапе первичной диагностики у 94% пациентов (n = 63) определяли различные генетические нарушения (мутации генов, устойчивые либо неклассифицируемые хромосомные aberrации), изолированно либо в сочетании. У 20,9% пациентов (n = 14) определяли устойчивые хромосомные перестройки, при которых возможно определение химерного транскрипта относительно экспрессии контрольного гена методом ПЦР-РВ: t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1* (n = 8) или перестройки гена *KMT2A* (n = 6). Лишь у 6% пациентов в общей группе (n = 4) не обнаружили никаких генетических нарушений.

Мутации генов *NPM1* и *FLT3-ITD* были одними из самых часто обнаруживаемых генетических мутаций: их выявили у 40,3% (n = 27) и 30% пациентов (n = 20), соответственно. Среди мутаций гена *NPM1* самыми частыми были мутации типа А (70,4%, n = 19), значительно реже определяли мутации типа В (14,8%, n = 4), D (3,7%, n = 1) и мутации редкого типа (11,1%, n = 3). Мутации гена *CEBPA* выявили у 11,9% (n = 8) пациентов.

Спектр выявленных генетических нарушений представлен в Таблице 13.

Таблица 13 – Варианты генетических нарушений у пациентов с ОМЛ на этапе первичной диагностики

Генетические нарушения	n пациентов с нарушениями, %	Экзон гена или вариант перестройки, n пациентов
<i>FLT3</i>	20 (30)	Экзоны 14-15 (домен ITD), n=20
<i>NPM1</i>	27 (40,3)	Экзон 11 (тип А), n=19
		Экзон 11 (тип В), n=4

Продолжение таблицы 13

		Экзон 11 (тип D), n=1
		Экзон 11 (редкие типы), n=3
<i>CEBPA</i>	8 (11,9)	Экзон 1 (домены TAD1, TAD 1/2), n=4 Экзон 1 (домен bZIP), n=6
Перестройка <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	8 (12)	–
Перестройки с вовлечением гена <i>KMT2A</i>	6 (9)	<i>AFDN::KMT2A</i> , n=4 <i>KMT2A::MLLT3</i> , n=1 Ген-партнер не уточнен, n=1
<i>DNMT3A</i>	21 (31,3)	Экзоны 8-10, n = 6 Экзон 15, n = 1 Экзоны 18-19, n = 8 Экзоны 22-23, n = 9
<i>TET2</i>	8 (11,9)	Экзон 3, n = 3 Экзон 6, n = 1 Экзон 10, n = 1 Экзон 11, n = 3
<i>ASXL1</i>	7 (10,4)	Экзон 12, n = 7

Распределение наиболее значимых генетических нарушений у пациентов с ОМЛ на этапе первичной диагностики представлены на Рисунке 5.

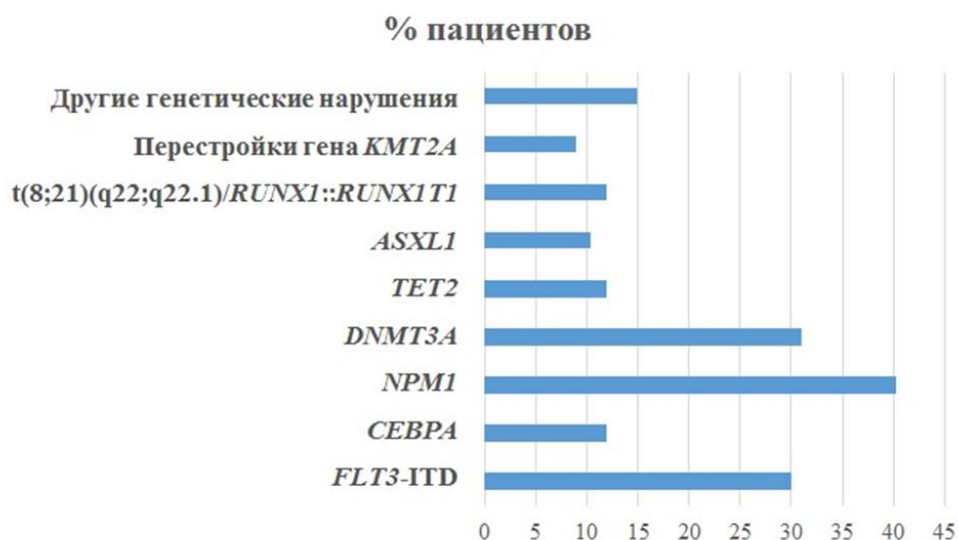


Рисунок 5 – Наиболее значимые генетические нарушения у пациентов с ОМЛ в дебюте заболевания

Мутационный статус генов КК исследовали методом ВПС, позволяющим получить больше информации о типе мутаций (инсерции и делеции со сдвигом либо без сдвига рамки считывания, точечные миссенс- и нонсенс-мутации, мутации

сайта сплайсинга) и их координатах в исследуемом гене. При анализе результатов ВПС с помощью открытых баз данных необходимо было охарактеризовать категорию патогенности каждой из выявленных генетических мутаций и исключить из анализа синонимичные однонуклеотидные замены и полиморфизмы. По этим причинам ниже мутационный профиль генов КК будет охарактеризован более детально. В ходе проведённого исследования на этапе первичной диагностики у 44,8% пациентов ($n = 30$) была выявлена хотя бы одна мутация в одном из генов, ассоциированных с КК – *DNMT3A*, *TET2* или *ASXL1*. У 25,4% пациентов ($n = 17$) выявили изолированные мутации гена *DNMT3A*, у 7,5% пациентов ($n = 5$) – изолированные мутации *TET2*, у 4,5% ($n = 3$) – изолированные мутации *ASXL1*. Сочетанные мутации хотя бы двух генов выявляли у 7,5% пациентов ($n = 5$), из них у одного человека мутации были выявлены во всех трёх генах. Патогенность обнаруженных генетических мутаций оценивали с использованием открытых баз данных, ориентируясь, в первую очередь, на каталог Ассоциации Молекулярной Патологии (АМП, AMP – от англ. Association for Molecular Pathology) [79]. Обнаруженные мутации разделяли на «патогенные», «вероятно патогенные» или «неопределённого значения».

Наиболее часто обнаруживали генетические мутации *DNMT3A*: у 31,3% пациентов ($n = 21$) при диагностике ОМЛ выявляли хотя бы одну мутацию этого гена, из них у 14,3% ($n = 3$) – две различные мутации. Помимо мутаций «горячей точки» в 23 экзоне, т.е. мутаций в 882-м кодоне (R882H и R882C), различные варианты мутаций этого гена были выявлены также в 8, 9, 10, 15, 18, 19 и 22 экзонах. Всего было выявлено 18 различных мутаций, из них более половины (55,5%) составили миссенс-мутации, 11,1% – нонсенс-мутации, 16,7% – мутации со сдвигом рамки считывания (инсерции и делеции). Наконец, 11,1% обнаруженных мутаций были представлены мутациями сайта сплайсинга и 5,6% – делециями без сдвига рамки считывания. Все выявленные мутации, кроме замен в кодоне 882, были уникальными, т.е. каждую из них выявляли только у одного пациента. Из всех выявленных мутаций гена *DNMT3A* 55,6% определяли как патогенные, 5,5% – как вероятно патогенные, 38,9% – как мутации неопределённого значения.

Мутации гена *TET2* встречались реже и были обнаружены лишь у 11,9% пациентов (n = 8). Каждую из них выявляли только у одного пациента. Сочетания различных мутаций гена *TET2* выявлены не были. Мутации обнаруживали в 3, 6, 10 и 11 экзонах. Из всех выявленных мутаций 37,5% составляли миссенс-мутации, столько же – мутации со сдвигом рамки считывания, 25% – нонсенс-мутации. Одну половину выявленных мутаций относили к патогенным, другую половину – к мутациям неопределённого значения.

Реже всего выявляли мутации гена *ASXL1*, суммарно у 10,4% пациентов (n = 7), при этом у одного пациента были выявлены одновременно две разные мутации. Одна из них – exon12:c.G1958A;p.G653E – была обнаружена у двух пациентов. Из семи найденных мутаций три были представлены миссенс-мутациями, три – мутациями со сдвигами рамки считывания, одна – нонсенс-мутацией. Все выявленные мутации определяли как патогенные.

Разнообразие выявленных мутаций генов *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* у пациентов на этапе первичной диагностики представлено в Таблице 14.

Таблица 14 – Варианты исходных генетических мутаций *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* у пациентов, включённых в исследование

Ген	Экзоны	Мутации	Тип	Патогенность (каталог АМП)
<i>DNMT3A</i>	8	exon8:c.C1010T;p.S337L	Mc	НЗ
	9	exon9:c.T1022C;p.V341A	Mc	НЗ
		exon9:c.1122+1G>A	Сп	П
	10	exon10:c.G1136A;p.R379H A	Mc	НЗ
		exon10:c.1238dupG;p.F414Lfs*7	СдР	П
		exon10:c.G1126C;p.A376P	Mc	НЗ
	15	exon15:c.1742_1743del;p.W581*	Нс	П
	18	exon18:c.C2086T;p.Q696X	Нс	П
		exon18:c.G2120A;p.G707D	Mc	П
	19	exon19:c.C2245T;p.R749C	Mc	П
		exon19:c.2269_2270insGAGA;p.N757Rfs*9	СдР	П
		exon19:c.2189delT;p.L730Pfs*49	СдР	П
		exon19:c.2193_2195del;p.F732del	Дел	НЗ

Продолжение таблицы 14

		exon19:c.C2222T;p.A741V	Mc	НЗ
		exon19:c.2174-1G>A	Сп	ВП
	22	exon22:c.A2500G;p.T834A	Mc	НЗ
	23	exon23:c.G2645A;p.R882H	Mc	П
		exon23:c.C2644T;p.R882C	Mc	П
<i>TET2</i>	3	exon3:c.2346_2347del;p.E783Mfs*5	СдР	П
		exon3:c.C2961A;p.C987X	Нс	П
		exon3:c.T1217C;p.L406P	Mc	НЗ
	6	exon6:c.C3781T;p.R1261C	Mc	НЗ
	10	exon10:c.4312dupA;p.R1440Tfs*38	СдР	П
	11	exon11:c.C5680A;p.P1894T	Mc	НЗ
		exon11:c.5446_5449delinsGTCGGTAGA;p.L1816Vfs*6	СдР	НЗ
exon11:c.A4627T;p.R1543X		Нс	П	
<i>ASXL1</i>	12	exon12:c.G1958A;p.G653E	Mc	П
		exon12:c.G2236A;p.A746T	Mc	П
		exon12:c.T1780C;p.C594R	Mc	П
		exon12:c.1888_1910del;p.E635Rfs*15	СдР	П
		exon12:c.2287delC;p.L764Yfs*8	СдР	П
		exon12:c.1978_1979delinsC;p.G660Pfs*43	СдР	П
		exon12:c.C2309A;p.S770X	Нс	П
Примечания – Каталог АМП – каталог Ассоциации Молекулярной Патологии; П – патогенные мутации, ВП – вероятно патогенные мутации, НЗ – мутации неопределённого значения; Mc – миссенс-мутации, Сп – мутации сайта сплайсинга, СдР – мутации со сдвигом рамки считывания, Нс – нонсенс-мутации, Дел – делеции без сдвига рамки считывания.				

Были исследованы закономерности совместного возникновения в дебюте заболевания мутаций генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* и устойчивых хромосомных aberrаций, доступных к исследованию методом ПЦР-РВ: транслокации t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1* и перестроек гена *KMT2A* (Рисунок 6).

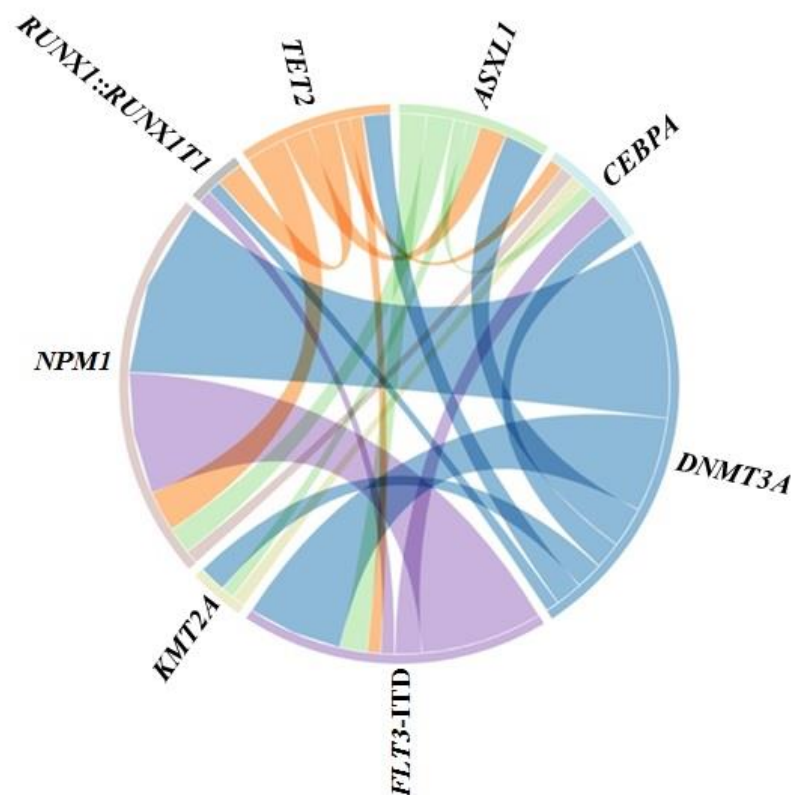
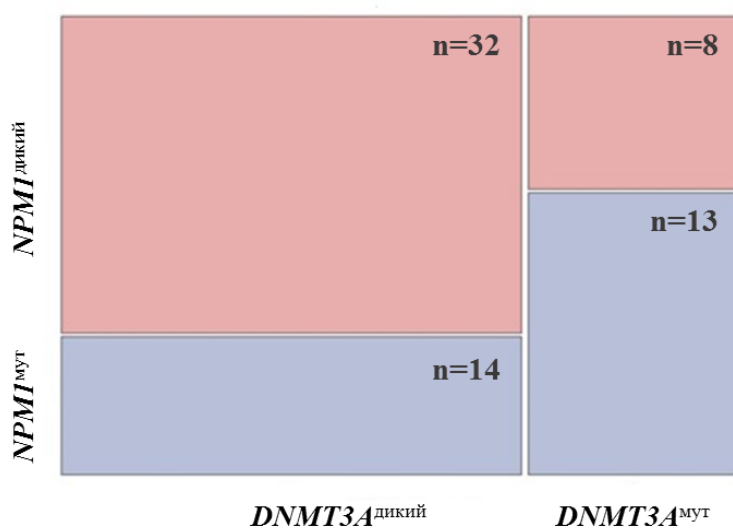


Рисунок 6 – Сочетание исходных исследуемых генетических нарушений (мутации генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, перестройки *RUNX1::RUNX1T1*, перестройки с вовлечением гена *KMT2A*) у пациентов с ОМЛ

С помощью критерия Фишера была обнаружена статистически значимая ассоциированность мутаций генов *DNMT3A* и *NPM1* ($p = 0,01$): комбинацию этих мутаций выявили у 13 человек (Рисунок 6).



n – число пациентов

Рисунок 6 – Мозаичная диаграмма: распределение исходных мутаций генов *NPM1* и *DNMT3A* у пациентов с ОМЛ

Другими наиболее частыми комбинациями генетических мутаций были *FLT3-ITD* + *NPM1* (n = 10), *FLT3-ITD* + *DNMT3A* (n = 7), *NPM1* + *CEBPA* (n = 6), *FLT3-ITD* + *CEBPA* (n = 5).

3.1.2 Ассоциация клинических данных с исходными молекулярно-генетическими характеристиками опухоли

Была проанализирована взаимосвязь мутационного статуса исследуемых генов и следующих показателей: пол, возраст на момент развития заболевания, показатели ПК (концентрация гемоглобина, количество лейкоцитов и тромбоцитов), наличие нейрорлейкемии, НК по данным СЦИ. Непрерывные переменные анализировались с помощью критерия Стьюдента, категориальные – с помощью анализа таблиц сопряжённости и критерия Фишера.

Значимыми оказались различия по возрасту, в зависимости от наличия мутаций *NPM1* ($p = 0,04$) и мутаций *CEBPA* ($p = 0,03$) (Таблица 15).

Таблица 15 – Медиана возраста на момент развития ОМЛ, в зависимости от статуса генов *NPM1* и *CEBPA*

Статус гена	Возраст, медиана лет (диапазон)	<i>p</i>
<i>NPM1</i> ^{мут}	42 (20-59)	0,04
<i>NPM1</i> ^{дикий}	35 (18-59)	
<i>CEBPA</i> ^{мут}	31 (18-46)	0,03
<i>CEBPA</i> ^{дикий}	38 (18-59)	

Кроме того, были получены статистически значимые различия для концентрации гемоглобина при диагностике ОМЛ, в зависимости от наличия мутаций одного из трёх генов, ассоциированных с КК ($p = 0,02$), в частности, гена *ASXL1* ($p = 0,02$) (Рисунок 7).

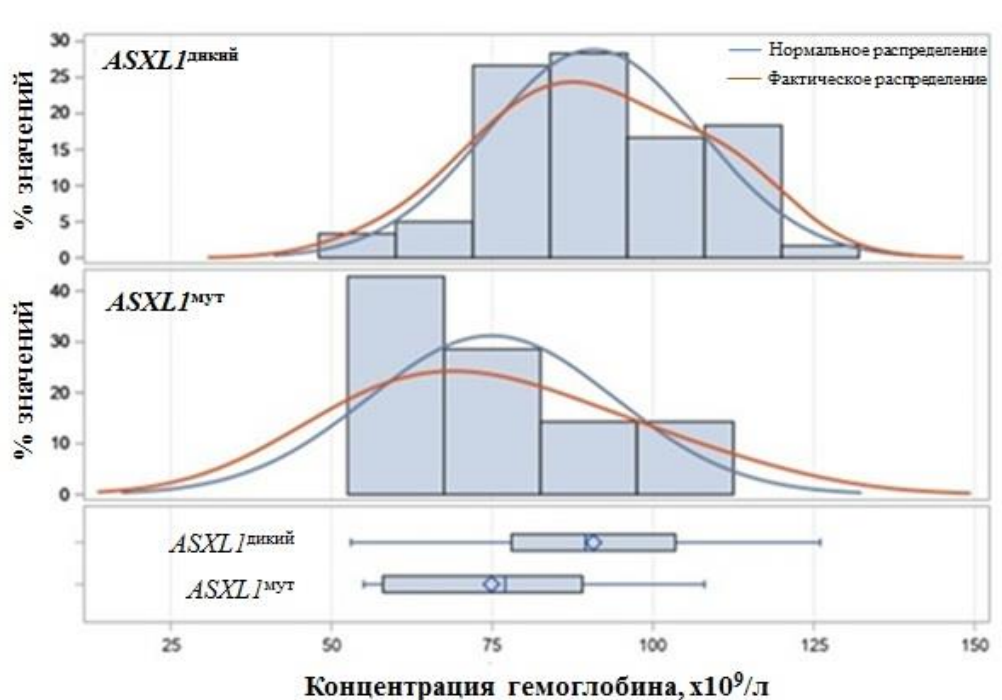


Рисунок 7 – Распределение концентрации гемоглобина при диагностике ОМЛ, в зависимости от наличия мутации гена *ASXL1*

Наличие мутаций *DNMT3A*, *TET2*, *CEBPA* и перестроек *KMT2A* оказалось на границе значимости (Таблица 16).

Таблица 16 – Различие в концентрации гемоглобина при диагностике ОМЛ, в зависимости от мутационного статуса исследуемых генов

Статус гена	Концентрация гемоглобина, г/л, медиана (диапазон)	<i>p</i>
<i>DNMT3A</i> ^{мут}	85 (52-116)	0,08
<i>DNMT3A</i> ^{дикий}	89,5 (55-126)	
<i>TET2</i> ^{мут}	76 (55-103)	0,07
<i>TET2</i> ^{дикий}	89 (53-126)	
<i>ASXL1</i> ^{мут}	77 (55-108)	0,02
<i>ASXL1</i> ^{дикий}	89,5 (53-126)	
Гены ДТА (есть мутации)	77 (53-116)	0,02
Гены ДТА (нет мутаций)	91 (59-126)	
<i>CEBPA</i> ^{мут}	94 (76-116)	0,08
<i>CEBPA</i> ^{дикий}	86 (53-126)	
Есть перестройки <i>KMT2A</i>	102,5 (78-118)	0,07
Нет перестроек <i>KMT2A</i>	88 (53-126)	

Помимо этого, была выявлена связь между наличием мутаций *FLT3-ITD* и большим количеством лейкоцитов в ПК: медиана лейкоцитоза у пациентов с мутированным *FLT3-*

ITD составила $87,5 \cdot 10^9/\text{л}$ (5,29 – 286), в то время как у пациентов без мутаций медиана составила $18,7 \cdot 10^9/\text{л}$ (1,01 – 254,42) ($p = 0,03$) (Рисунок 8). Также наличие мутаций *FLT3*-ITD достоверно чаще было ассоциировано с гиперлейкоцитозом в начале заболевания ($p = 0,05$; ОШ = 4,9 (1,5 – 15,5)).

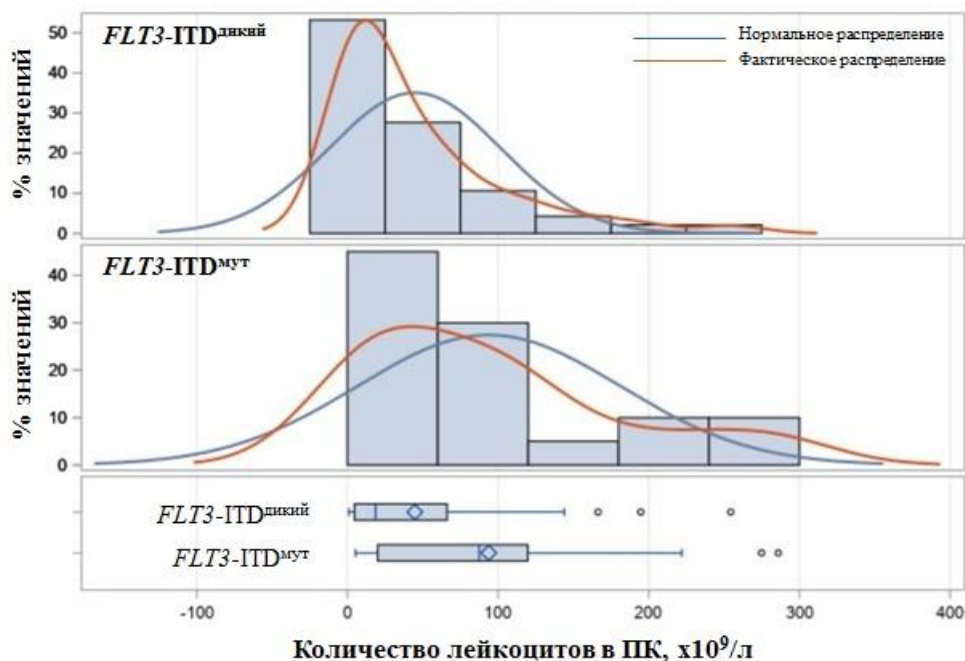


Рисунок 8 – Распределение количества лейкоцитов в ПК при диагностике ОМЛ, в зависимости от наличия мутации *FLT3*-ITD

Статистически значимых результатов об ассоциации нейрорлейкемии с наличием тех или иных генетических мутаций получено не было, на границе значимости оказались только мутации гена *FLT3*-ITD ($p = 0,07$; ОШ 2,6 (0,9 – 7,7) и перестройки *KMT2A* ($p = 0,08$; ОШ = 4,4 (0,7 – 26,3)).

Была выявлена взаимосвязь между НК и наличием мутаций генов *DNMT3A* ($p = 0,05$; ОШ = 3,7 (0,9 – 11,2) и *NPM1* ($p < 0,0001$; ОШ = 15,3 (3,2 – 73,8)).

Стоит отметить, что из 53 женщин, включенных в настоящее исследование, у 7 ОМЛ диагностировали на фоне беременности. Было выполнено сравнение молекулярных профилей заболевания у беременных и небеременных женщин: статистически значимых отличий в результате сравнения не выявлено (Таблица 17).

Таблица 17 – Молекулярно-генетический профиль ОМЛ у беременных и небеременных женщин

Генетические нарушения	ОШ	<i>p</i>
<i>FLT3-ITD</i>	0,44 (0,38 – 9,05)	0,44
<i>NPM1</i>	0,20 (0,02 – 1,72)	0,11
<i>CEPBA</i>	0,42 (0,28 – 5,04)	0,22
<i>DNMT3A</i>	0,29 (0,03 – 2,54)	0,23
<i>TET2</i>	3,42 (0,51 – 22,87)	0,18
<i>ASXL1</i>	0,93 (0,09 – 8,94)	0,94
t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	0,78 (0,08 – 7,32)	0,82
Перестройки гена <i>KMT2A</i>	1,46 (0,14 – 15,10)	0,74

3.1.3 Длительность цитопении у пациентов после первого курса терапии, в зависимости от исходных молекулярно-генетических характеристик опухоли

Была проанализирована длительность миелотоксического агранулоцитоза (МТА) и тромбоцитопении у пациентов после 1-го курса ХТ. Этот параметр оценивали только у пациентов, достигших ПР. Длительность МТА определяли как промежуток времени между уменьшением количества лейкоцитов (от момента начала 1-го курса ХТ) менее $1 \cdot 10^9/\text{л}$ либо уменьшением абсолютного количества нейтрофилов менее $0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ и восстановлением их количества до указанных значений до начала 2-го курса терапии. Фактором, достоверно ассоциированным с большей длительностью МТА, было наличие мутаций гена *DNMT3A* ($p = 0,048$) (Рисунок 9). На границе значимости также оказались следующие факторы: наличие мутаций генов *DTA* ($p = 0,082$) и *CEPBA bZIP* ($p = 0,077$), а также наличие транслокации *RUNX1::RUNX1T1* ($p = 0,089$).

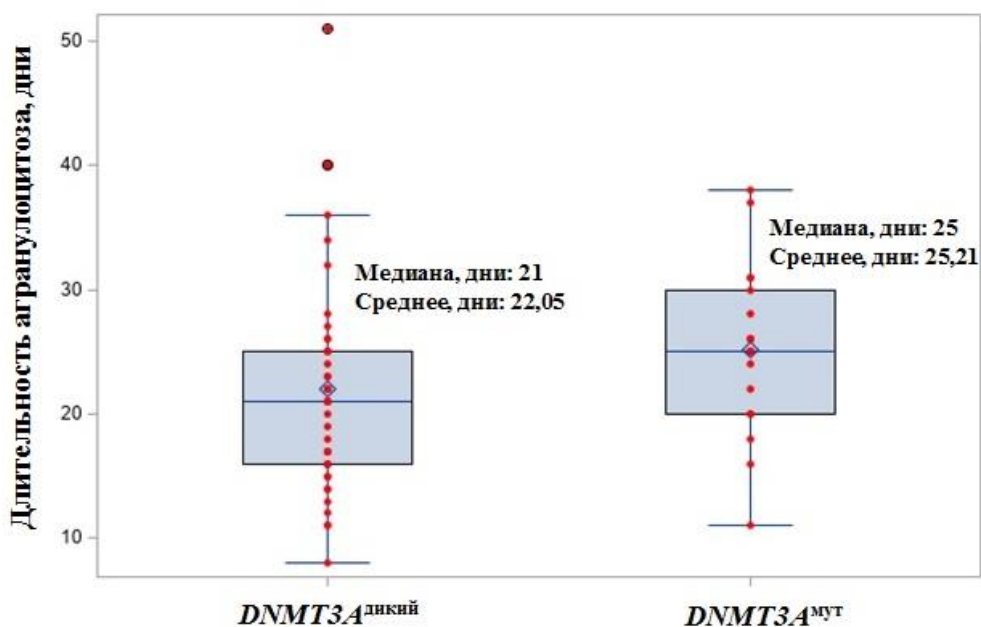


Рисунок 9 – Длительность МТА, в зависимости от наличия исходных мутаций гена *DNMT3A*

Длительность тромбоцитопении также считали от момента начала 1-го курса до начала 2-го курса ХТ, в качестве критерия тромбоцитопении использовали уменьшение количества тромбоцитов в ПК менее $100 \cdot 10^9/\text{л}$. Фактор, достоверно ассоциированный с большей длительностью тромбоцитопении – наличие мутаций гена *FLT3-ITD* ($p = 0,016$) (Рисунок 10).

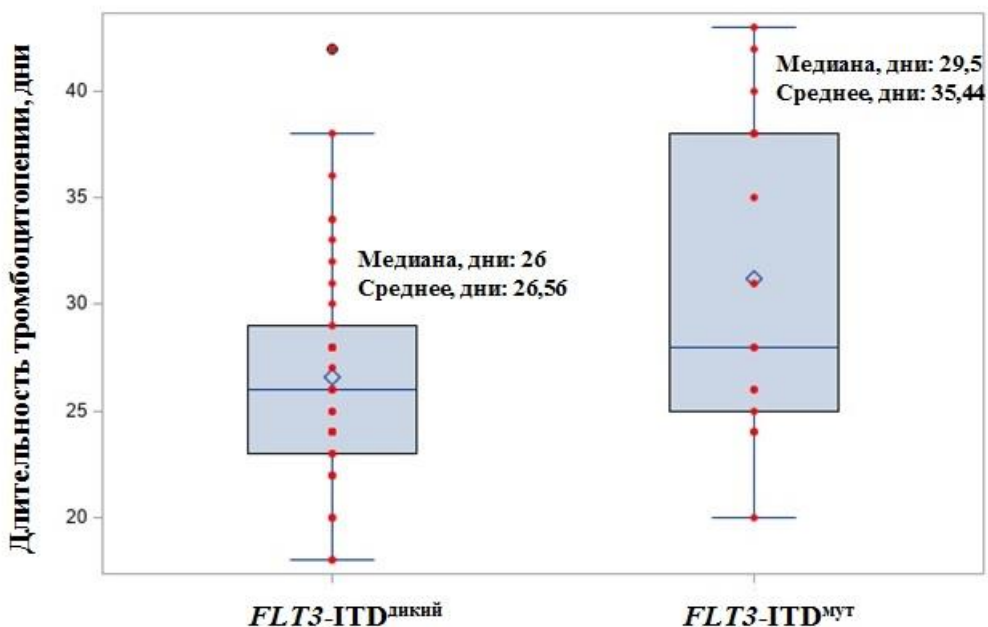


Рисунок 10 – Длительность тромбоцитопении, в зависимости от исходного мутационного статуса гена *FLT3-ITD*

Обобщённые данные о длительности МТА и тромбоцитопении у пациентов, в зависимости от наличия тех или иных исходных генетических мутаций, продемонстрировавших свою значимость, представлены в Таблице 18.

Таблица 18 – Длительность МТА и тромбоцитопении у пациентов с различными генетическими нарушениями

Ген	Длительность цитопении, дни, медиана (диапазон)	Длительность цитопении, дни, среднее	Стандартное отклонение	<i>p</i>
Миелотоксический агранулоцитоз (МТА)				
<i>FLT3-ITD</i> ^{мут}	25 (13-51)	25,74	9,07	0,11
<i>FLT3-ITD</i> ^{дикий}	22 (8-40)	21,81	7,70	
<i>NPM1</i> ^{мут}	25 (8-37)	24,04	7,20	0,12
<i>NPM1</i> ^{дикий}	21 (11-51)	22,29	9,06	
<i>CEBPA (TAD1, TAD1/2)</i> ^{мут}	19,5 (11-34)	21	7,54	0,34
<i>CEBPA (TAD1, TAD1/2)</i> ^{дикий}	23 (8-51)	23,71	8,33	
<i>CEBPA bZIP</i> ^{мут}	16 (11-26)	17,83	5,60	0,077
<i>CEBPA bZIP</i> ^{дикий}	23 (8-51)	23,87	8,26	
<i>DNMT3A</i> ^{мут}	25 (11-38)	25,21	6,69	0,048
<i>DNMT3A</i> ^{дикий}	21 (8-51)	22,05	8,83	
<i>TET2</i> ^{мут}	22 (12-26)	20,86	5,24	0,6
<i>TET2</i> ^{дикий}	22 (8-51)	23,34	8,60	
<i>ASXL1</i> ^{мут}	23 (20-30)	23,80	3,96	0,68
<i>ASXL1</i> ^{дикий}	22 (8-51)	22,98	8,59	
Гены DTA (есть мутации)	25 (11-38)	24,32	6,44	0,082
Гены DTA (нет мутаций)	21 (8-51)	22,14	9,38	
<i>RUNX1::RUNX1T1(+)</i>	18 (12-26)	18,63	4,96	0,089
<i>RUNX1::RUNX1T1(-)</i>	23 (8-51)	23,73	8,52	
Перестройки <i>KMT2A(+)</i>				
Перестройки <i>KMT2A(-)</i>				
Тромбоцитопения				
<i>FLT3-ITD</i> ^{мут}	29,5 (20-108)	35,44	19,49	0,016
<i>FLT3-ITD</i> ^{дикий}	26 (18-42)	26,56	5,43	
<i>NPM1</i> ^{мут}	26 (20-42)	27,62	6,08	0,72
<i>NPM1</i> ^{дикий}	28 (18-108)	30,84	15,78	
<i>CEBPA (TAD1, TAD1/2)</i> ^{мут}	28 (20-43)	30,33	8,22	0,33
<i>CEBPA (TAD1, TAD1/2)</i> ^{дикий}	26 (18-108)	28,92	13,05	
<i>CEBPA bZIP</i> ^{мут}	28 (22-43)	29,40	7,99	0,63
<i>CEBPA bZIP</i> ^{дикий}	26 (18-108)	29,12	12,75	
<i>DNMT3A</i> ^{мут}	29 (20-38)	29,44	6,17	0,23
<i>DNMT3A</i> ^{дикий}	26 (18-108)	29,33	14,42	
<i>TET2</i> ^{мут}	28 (22-38)	29,14	6,12	0,63
<i>TET2</i> ^{дикий}	26 (18-108)	29,40	13,03	
<i>ASXL1</i> ^{мут}	32 (25-43)	33	8,91	0,21
<i>ASXL1</i> ^{дикий}	26 (18-108)	29,09	12,59	
Гены DTA (есть мутации)	28 (20-43)	29,63	6,41	0,12
Гены DTA (нет мутаций)	26 (18-108)	29,18	15,41	

Продолжение таблицы 18

<i>RUNX1::RUNX1T1(+)</i>	24 (18-31)	24,63	4,17	0,11
<i>RUNX1::RUNX1T1(-)</i>	27 (18-108)	30,14	13,08	
Перестройки <i>KMT2A(+)</i>	26,5 (23-33)	27,50	4,23	0,99
Перестройки <i>KMT2A(-)</i>	26 (18-108)	29,59	12,99	

3.1.4 Результаты лечения и показатели выживаемости у пациентов, в зависимости от исходного молекулярно-генетического профиля заболевания

С целью оценки эффективности терапии у всех пациентов, включённых в исследование, после каждого курса терапии выполняли комплексное исследование КМ. ПР констатировали при снижении процентного содержания бластных клеток в КМ до $\leq 5\%$ при нормальном соотношении всех ростков кроветворения и отсутствии бластных клеток с палочками Ауэра по данным цитологического исследования КМ, при отсутствии экстрамедуллярных лейкемических очагов, а также восстановлении количества нейтрофилов $\geq 1 \cdot 10^9/\text{л}$ и тромбоцитов $\geq 100 \cdot 10^9/\text{л}$ в ПК. Полную ремиссию с неполным гематологическим восстановлением (нпПР) констатировали при соответствии критериям ПР, но сохраняющихся нейтропении $< 1 \cdot 10^9/\text{л}$ и/или тромбоцитопении $< 100 \cdot 10^9/\text{л}$ в ПК. Исползованные критерии ответа соответствовали критериям, указанным в национальных Клинических рекомендациях по лечению острых миелоидных лейкозов 2024 года [100]. Первично-рефрактерное течение заболевания, согласно протоколу «ОМЛ-21», констатировали при недостижении ремиссии заболевания после 2 курсов индукции ремиссии. Результаты основных этапов терапии (индукции, консолидации ремиссии) у пациентов, вошедших в исследование, представлены в Таблице 19.

Таблица 19 – Результаты индукции и консолидации ремиссии у пациентов, включенных в исследование

Показатель	Проспективная группа (n = 53)	Ретроспективная группа (n = 14)	Общая группа (n = 67)
I. Ремиссия, n пациентов (%)			
После 1 курса терапии	41	12	53/67 (79,1)
После 2 курса терапии	5	1	59/67 (88)
ПР, n/n ремиссий после 2 курсов терапии (%)	38	9	47/59 (79,7)
нпПР, n/n ремиссий после 2 курсов терапии (%)	8	4	12/59 (20,3)
II. Статус ИФТ МОБ у пациентов с ремиссией ОМЛ			
ИФТ МОБ негативность, n/n ремиссий после 2 курсов терапии (%)	35	13	48/59 (81,4)
ИФТ МОБ позитивность, n/n ремиссий после 2 курсов терапии (%)	11	–	11/59 (18,6)
III. Первичная рефрактерность, n пациентов (%)	4	1	5/67 (7,5)
IV. Ранняя летальность, n (%)	2	–	2/67 (3)
V. Аллю-ТГСК, n (%)	29	11	40/61 (65,6)

В проспективной группе ремиссия после 1-го курса ХТ была достигнута у 77,4% пациентов (n = 41), в ретроспективной – у 85,7% (n = 12). Суммарно в общей группе после 1-го курса ХТ ремиссия была достигнута у 79,1% пациентов (n = 53). Ранняя летальность в общей группе составила 3% (n = 2).

На этапе после 2-го курса терапии общая группа составляла 64 человека (50 человек из проспективной группы и 14 – из ретроспективной), так как, помимо двух погибших в ранние сроки пациентов, одна пациентка отказалась от дальнейшего лечения и была выписана из стационара по собственному желанию. Все эти три человека входили в проспективную часть исследования. После 2-го курса терапии ремиссия была достигнута ещё у 5 пациентов из проспективной группы и у одного пациента из ретроспективной. Таким образом, ремиссия заболевания в общей группе после двух курсов индукции и консолидации была достигнута у 88% пациентов (n = 59). У большей части пациентов как в проспективной (82,6%, n = 38), так и в ретроспективной (69,2%, n = 9) группе была достигнута ПР, нпПР констатировали у 17,4% (n = 8) и у 30,8% (n = 4) в каждой из групп, соответственно. Суммарно в общей группе у 79,7% пациентов (n = 47) была достигнута

ПР, у 20,3% ($n = 12$) – нПР заболевания. При анализе зависимости между теми или иными исходными генетическими маркерами и достижением ПР либо нПР было показано, что более высокая вероятность нПР достоверно ассоциирована с наличием исходных мутаций *FLT3-ITD* ($p = 0,01$; ОШ = 5,1 (1,35 – 19,85) (Рисунок 11). У пациентов, достигших ремиссии в результате первых двух курсов лечения, оценивали статус ИФТ МОБ. В проспективной группе ИФТ МОБ негативный статус констатировали у 76,1% пациентов ($n = 35$), ИФТ МОБ позитивный статус – у 23,9% ($n = 11$), в ретроспективной группе ИФТ МОБ негативность была констатирована у 100% пациентов ($n = 13$).

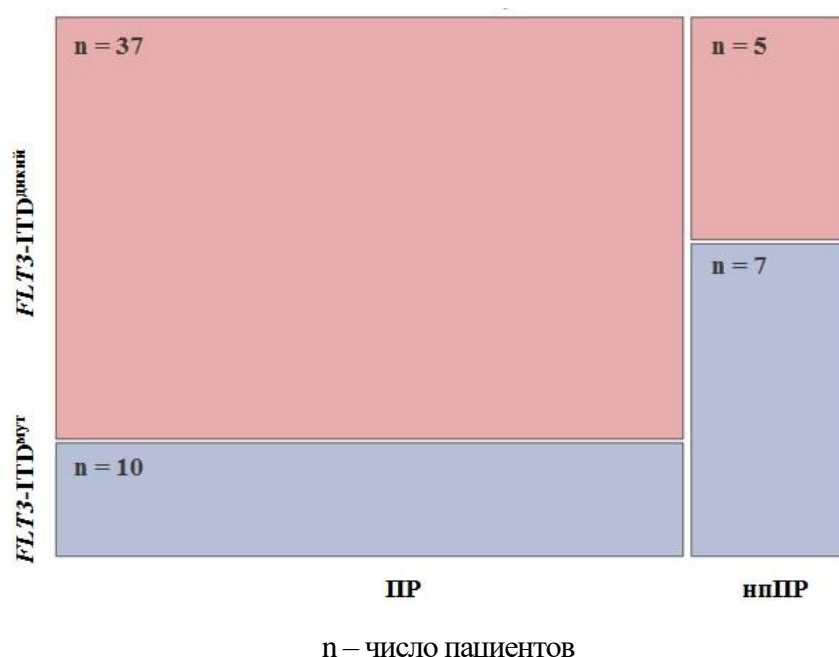


Рисунок 11 – Мозаичная диаграмма: распределение ПР и нПР у пациентов с ОМЛ после 2 курсов терапии, в зависимости от наличия исходных мутаций гена *FLT3-ITD*

Первично-рефрактерное течение заболевания было констатировано у 7,5% пациентов ($n = 5$) в общей группе, из них четверо входили в проспективную часть исследования, один – в ретроспективную. По результатам однофакторного анализа значимым фактором, ассоциированным с первичной рефрактерностью, было наличие мутаций гена *ASXL1* ($p = 0,03$, ОШ = 7,2). На границе значимости фактор числа мутаций DTA ($p = 0,09$): большее число любых мутаций генов *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* было ассоциировано с большей вероятностью первично-рефрактерного течения заболевания (Рисунок 12). Наличие мутаций гена *NPM1* (p

= 0,046) имело обратную связь с первичной рефрактерностью: в группе пациентов с мутированным *NPM1* рефрактерных пациентов не было.

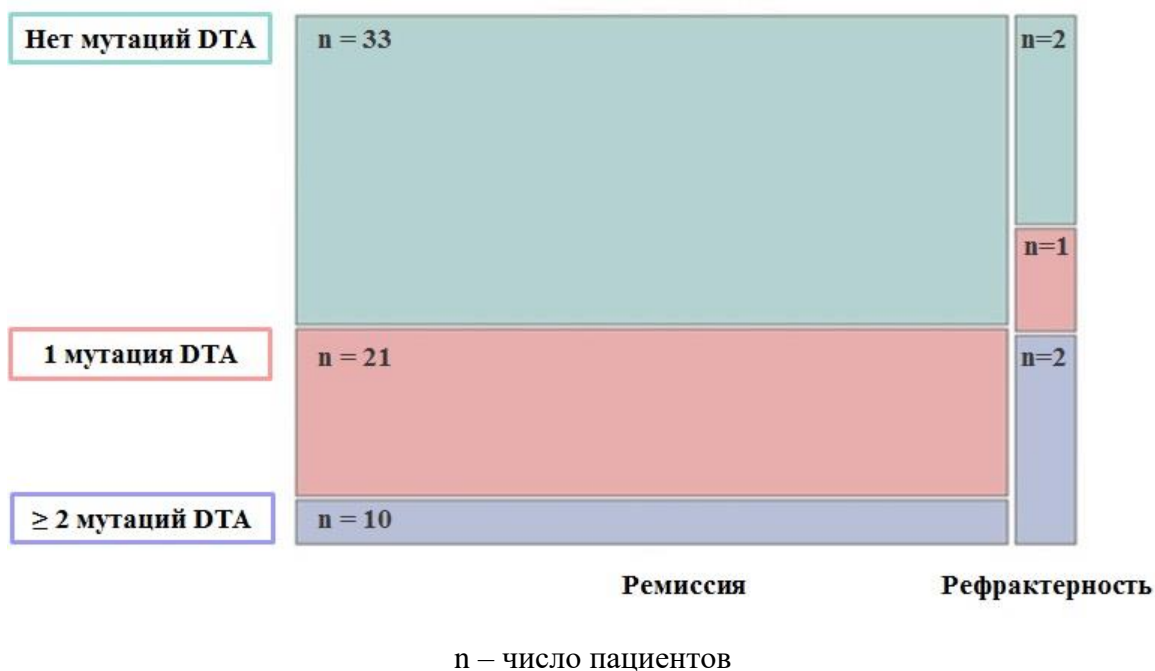
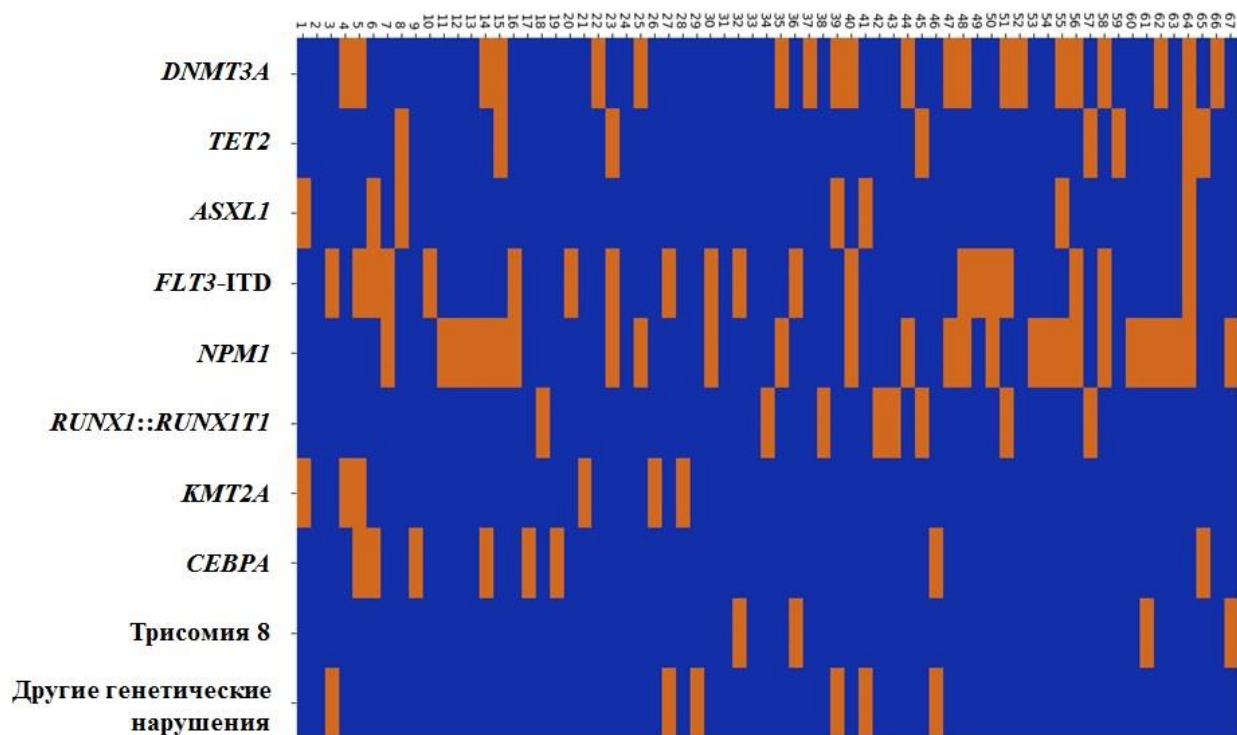


Рисунок 12 – Мозаичная диаграмма: распределение результатов терапии после двух курсов терапии у пациентов, в зависимости от исходного числа мутаций генов, ассоциированных с КК

При проведении многофакторного анализа в список кандидатов для пошаговой регрессионной модели Кокса вошли факторы наличия генетических нарушений из исследуемого списка (мутации генов *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, перестройки *RUNX1::RUNX1T1*, перестройки *KMT2A*). Кроме того, для мутаций генов *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1* был учтён такой параметр как категория патогенности («патогенные», «вероятно патогенные» мутации и мутации «неопределённого значения»). В результате на границе значимости был фактор наличия мутаций *ASXL1* ($p = 0,056$, ОШ = 7,2). Таким образом, была подтверждена ассоциация наличия исходных мутаций гена *ASXL1* у пациентов с ОМЛ со статусом ответа на терапию после 2 курсов с учётом возможного влияния и взаимодействия других факторов.

Необходимо отметить, что определение прогностической значимости отдельных мутаций было сопряжено с некоторыми трудностями, что обусловлено

частым сосуществованием различных генетических нарушений при ОМЛ (Рисунок 13).



Рыжим цветом обозначено наличие генетической мутации и/или хромосомной поломки, синим цветом обозначено отсутствие генетической мутации и/или хромосомной поломки

Рисунок 13 – Распределение генетических нарушений у пациентов с ОМЛ до начала лечения

Показатели 4-летней ОВ и 4-летней БРВ в общей группе составили 66,3% и 59,2%, соответственно, с учётом того, что алло-ТГСК была выполнена 65,6% пациентов ($n = 40$). Графики ОВ и БРВ в общей группе представлены на Рисунке 14.

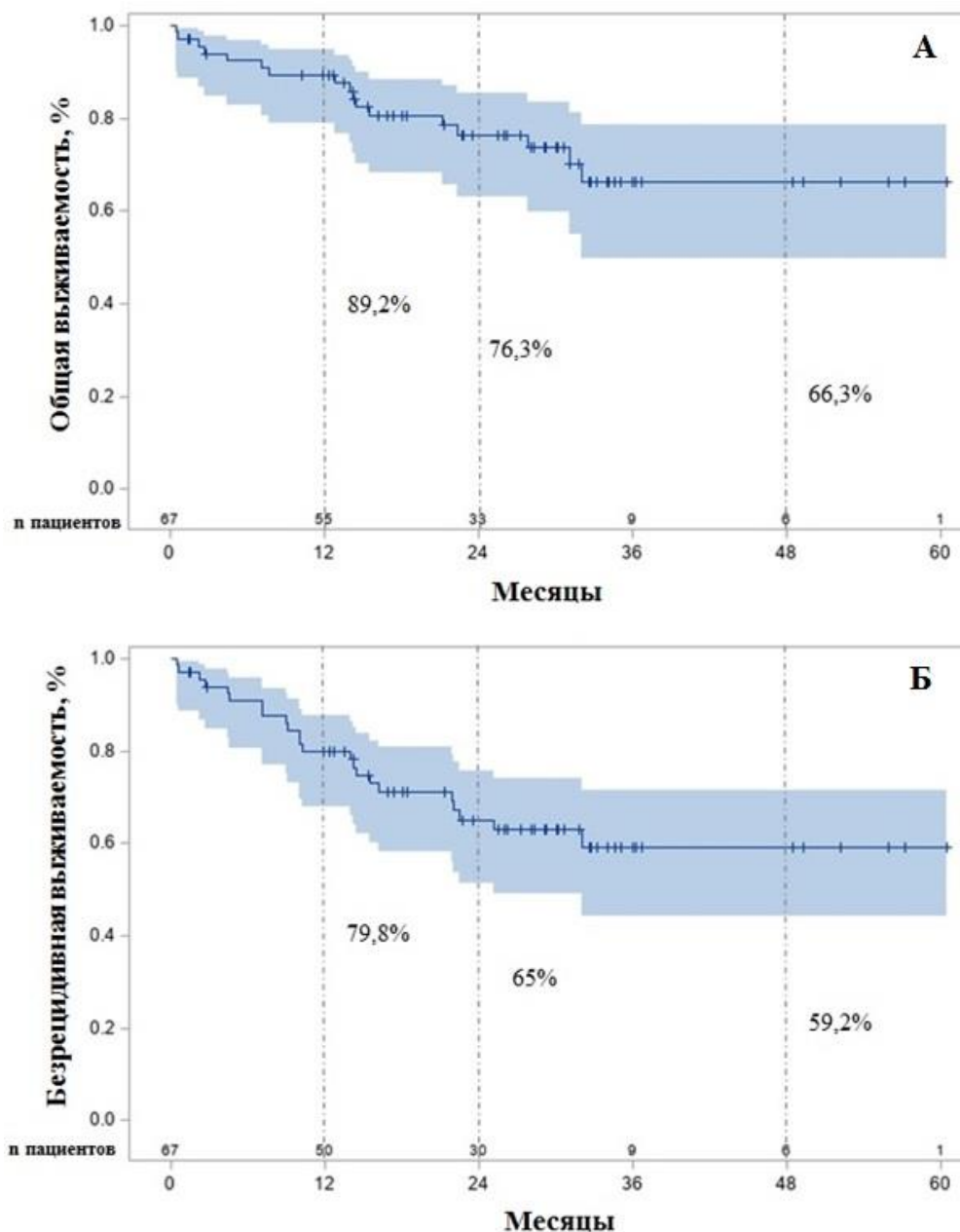


Рисунок 14 – Показатели общей (А) и безрецидивной (Б) выживаемости в общей группе на сроках наблюдения 12, 24 и 48 месяцев

Чтобы оценить показатели выживаемости у пациентов с теми или иными генетическими нарушениями, выявленными до начала лечения, провели однофакторный событийный анализ с использованием кривых Каплана-Майера и логарифмического рангового критерия. Была проанализирована ОВ, в зависимости от наличия мутаций каждого из исследованных генов (*FLT3-ITD*, *CEBPA*, *NPM1*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), а также от наличия транслокации *RUNX1::RUNX1T1* и перестроек гена *KMT2A*. Дополнительно как фактор исследовали наличие любой

из мутаций генов, ассоциированных с КК (ДТА). Графики ОВ у пациентов с ОМЛ представлены на Рисунке 15.

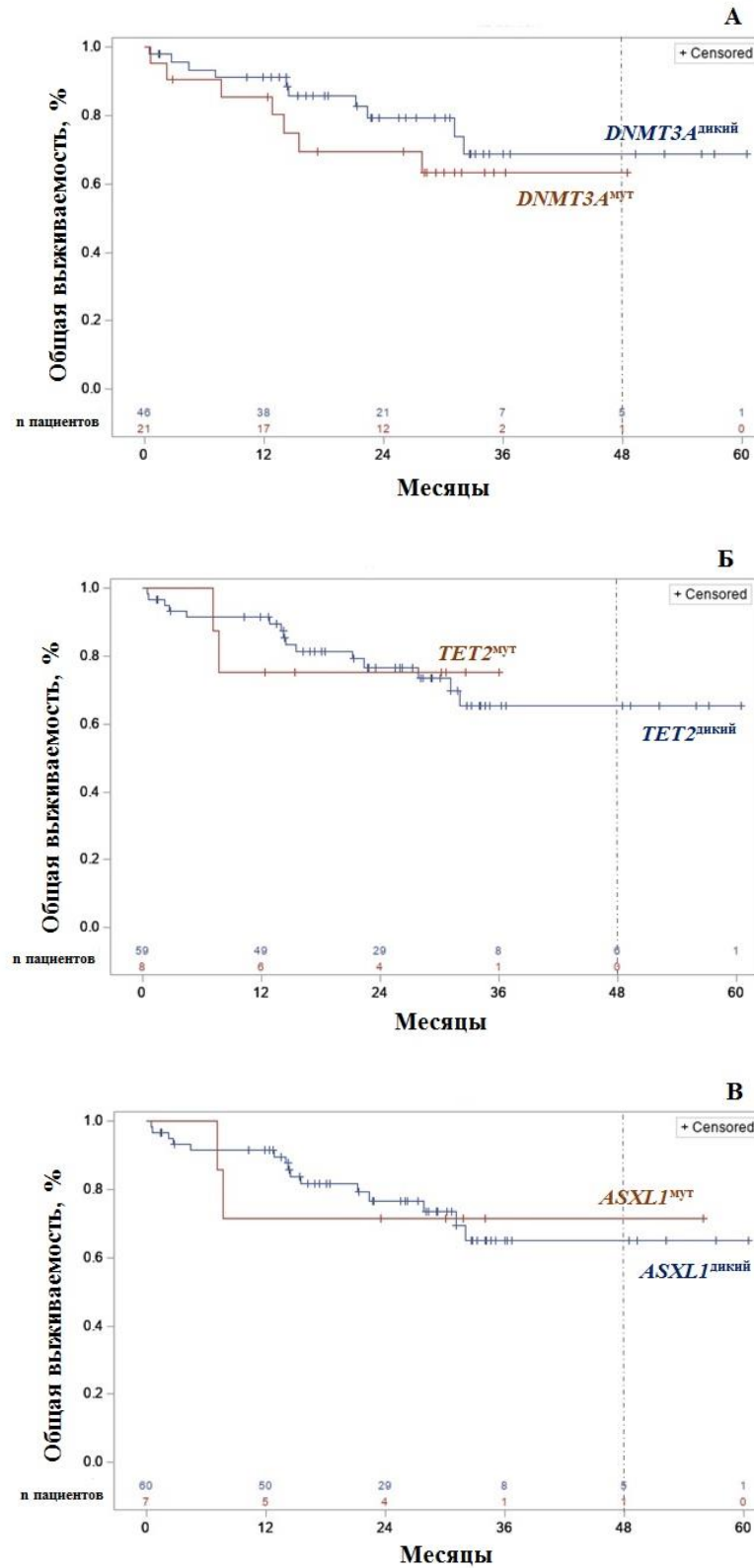


Рисунок 15 – ОВ у пациентов с ОМЛ, в зависимости от наличия мутаций генов, ассоциированных с КК: А – *DNMT3A*, Б – *TET2*, В – *ASXL1*

Двухлетняя ОВ пациентов была сопоставима во всех группах: по результатам однофакторного анализа достоверных различий в ОВ ни по одному из предполагаемых генетических факторов прогноза выявлено не было (Таблица 20).

Таблица 20 – Показатели ОВ у пациентов, в зависимости от исходных генетических характеристик

Генетическое нарушение	2-летняя ОВ, %	4-летняя ОВ, %	<i>p</i>	ОШ
<i>FLT3-ITD</i> ^{мут} / <i>FLT3-ITD</i> ^{дикий}	70,3/78,5	58,5/70	0,53	1,48 (0,55-4,02)
<i>NPM1</i> ^{мут} / <i>NPM1</i> ^{дикий}	78,5/74,8	64,8/68,6	0,95	0,94 (0,36-2,53)
<i>CEBPA</i> (TAD1, TAD1/2) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (TAD1, TAD1/2) ^{дикий}	77,8/75,6	51,9/70,2	0,66	0,66 (0,4-3,96)
<i>CEBPA</i> (bZIP) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (bZIP) ^{дикий}	75/76	50/68,5	0,80	1,2 (0,27-4,41)
<i>DNMT3A</i> ^{мут} / <i>DNMT3A</i> ^{дикий}	69,4/79,3	63,1/68,7	0,33	1,6 (0,6-4,2)
<i>TET2</i> ^{мут} / <i>TET2</i> ^{дикий}	75/76,7	Не было на сроке наблюдения/65,4	0,75	1,04 (0,24-4,56)
<i>ASXL1</i> ^{мут} / <i>ASXL1</i> ^{дикий}	71,4/76,6	71,4/65,1	0,96	1,03 (0,23-4,53)
Гены DTA (есть мутации)/ Гены DTA (нет мутаций)	74,6/76,8	70/62,8	0,85	1,08 (0,4-2,81)
<i>RUNX1::RUNX1T1</i> (+)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> (-)	75/76,8	Не было на сроке наблюдения /66,5	0,81	1,2 (0,27-5,37)
Перестройки <i>KMT2A</i> (+)/ Перестройки <i>KMT2A</i> (-)	83,3/75,5	83,3/64,3	0,57	0,57 (0,07-4,29)

При проведении многофакторного анализа влияния на ОВ клинико-лабораторных параметров и факторов наличия тех или иных генетических мутаций с применением пошаговой регрессионной модели Кокса в результирующую модель не вошел ни один фактор. Идентичные результаты были получены при включении в список кандидатов только мутаций генов.

При анализе БРВ также не было получено достоверных результатов ни по одному из генетических факторов. Графики БРВ у пациентов с мутациями генов КК представлены на Рисунке 16.

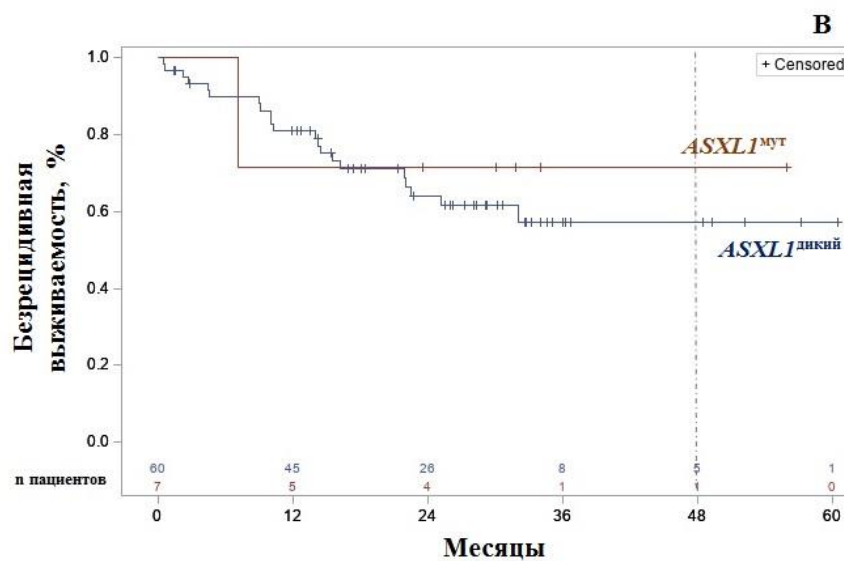
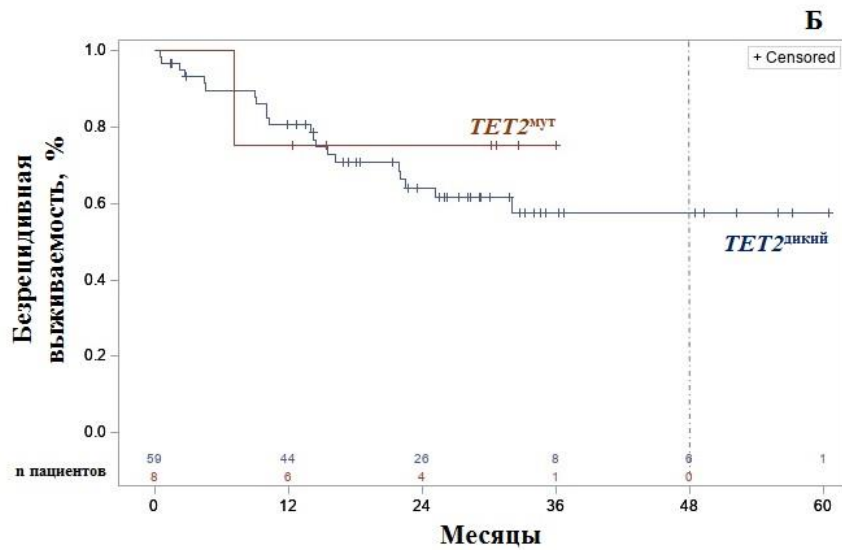
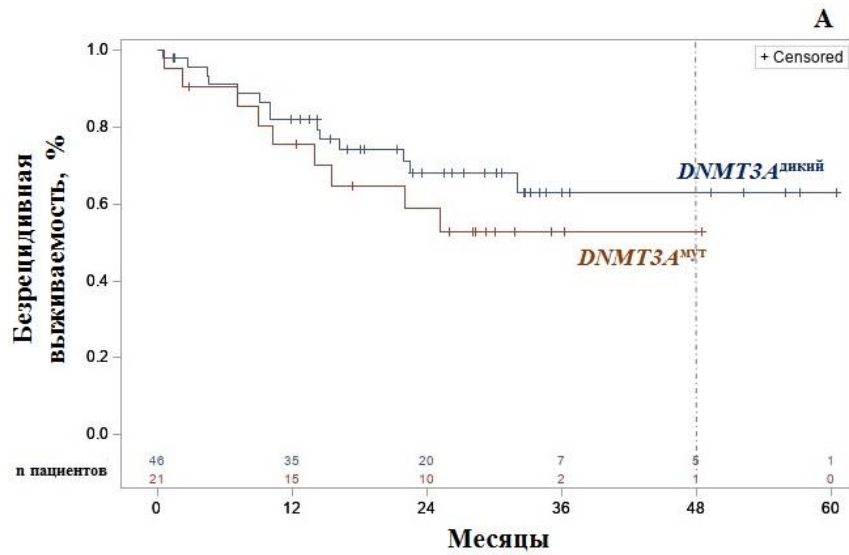


Рисунок 16 – БРВ у пациентов с ОМЛ, в зависимости от исходного мутационного статуса генов, ассоциированных с КК: А – *DNMT3A*, Б – *TET2*, В – *ASXL1*

Показатели БРВ у больных ОМЛ, в зависимости от наличия тех или иных генетических нарушений, представлены в Таблице 21.

Таблица 21 – БРВ пациентов с ОМЛ, в зависимости от исходных генетических характеристик

Генетическое нарушение	2-летняя БРВ, %	4-летняя БРВ, %	<i>p</i>	ОШ
<i>FLT3-ITD</i> ^{мут} / <i>FLT3-ITD</i> ^{дикий}	66,2/64,7	55,2/61,6	0,78	1,13 (0,46-2,76)
<i>NPM1</i> ^{мут} / <i>NPM1</i> ^{дикий}	75,7/58,1	61,8/58,1	0,52	0,75 (0,32-1,78)
<i>CEBPA</i> (TAD1, TAD2) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (TAD1, TAD2) ^{дикий}	58,4/68,1	58,4/60,5	0,94	1,03 (0,35-3,07)
<i>CEBPA</i> (bZIP) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (bZIP) ^{дикий}	55,6/67,4	55,6/60,7	0,99	0,99 (0,23-4,27)
<i>DNMT3A</i> ^{мут} / <i>DNMT3A</i> ^{дикий}	58,8/68	53/63	0,34	1,5 (0,65-3,46)
<i>TET2</i> ^{мут} / <i>TET2</i> ^{дикий}	75/64	Не было на сроке наблюдения/57,4	0,64	0,71 (0,17-3,04)
<i>ASXL1</i> ^{мут} / <i>ASXL1</i> ^{дикий}	71,4/64	71,4/57,3	0,68	0,73 (0,17-3,15)
Гены ДТА (есть мутации)/ Гены ДТА (нет мутаций)	67/63	62,4/56,8	0,9	0,95 (0,41-2,17)
<i>RUNX1::RUNX1T1</i> (+)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> (-)	75/64,1	Не было на сроке наблюдения/58,1	0,69	1,0 (1,0-1,001)
Перестройки <i>KMT2A</i> (+)/ Перестройки <i>KMT2A</i> (-)	50/67	50/60,2	0,53	0,68 (0,2-2,32)

Сопоставимые показатели ОВ и БРВ у пациентов с ОМЛ и отсутствие достоверных различий, вне зависимости от исходного генетического профиля заболевания, вероятно, обусловлены малочисленностью общей выборки, а также использованием единого протокола лечения и своевременностью выполнения алло-ТГСК.

3.2 Изменения мутационного статуса генов в процессе лечения и клиренс минимальной остаточной болезни

3.2.1 Мутационный статус генов различных функциональных классов у пациентов после курсов терапии

Исследование мутационного статуса генов *FLT3-ITD* и *NPM1* после 2-го курса лечения выполняли только тем пациентам, у которых эти мутации присутствовали исходно. Мутации гена *FLT3-ITD* на этом этапе были выявлены только у двух пациентов, у обоих была констатирована первичная рефрактерность. VAF мутации *FLT3-ITD* у первого пациента составила 0,04% (исходно – 43%), у второго – 32,5% (исходно – 46%). Статус гена *NPM1* на этапе после 2-го курса терапии исследовали у 22 пациентов из 27 с исходно мутированным геном. Это связано с тем, что у двух пациентов до начала терапии определяли мутации *NPM1* редких типов, при которых исследование МОБ методом ПЦР-РВ невозможно, у одной пациентки отсутствовал материал для исследования, одна пациентка после 1-го курса ХТ выписалась из стационара по собственному желанию, одна пациентка погибла после 1-го курса ХТ. Из оставшихся 22 человек у 45,5% (n = 10) сохранялись определяемые ранее мутации *NPM1*, у 54,4% (n = 12) VAF исходных мутаций снизилась ниже предела чувствительности метода (т.е. у таких пациентов была констатирована молекулярная ремиссия заболевания). Изменения мутационного статуса гена *CEBPA* в динамике не исследовали, так как, хотя мутации без сдвига рамки считывания в домене bZIP определяют отдельную категорию ОМЛ, их не используют в качестве молекулярного маркера МОБ.

Изменения уровней химерного транскрипта *RUNX1-RUNX1T1* и транскриптов с вовлечением гена *KMT2A* относительно экспрессии контрольных генов в динамике отслеживали только у пациентов с соответствующими хромосомными перестройками в дебюте заболевания.

Динамику мутационного статуса генов, ассоциированных с КК, исследовали у всех пациентов, кроме шестерых: трое погибли после 1-го курса ХТ, одна

пациентка выписалась из стационара по собственному желанию, один пациент был выписан из центра для продолжения лечения по месту жительства, у одной пациентки отсутствовал материал для выполнения исследования. Таким образом, исследования выполнили у 61 пациента из 67. Мутации гена *DNMT3A* выявили у 23% пациентов (n = 14), из них у 11 человек персистировали исходно выявлявшиеся мутации, у 3 человек появились мутации, отсутствовавшие ранее. Мутации гена *TET2* были выявлены у 3,3% пациентов (n = 2): у одного пациента сохранялась определённая ранее мутация, у одного пациента мутация *TET2* появилась в процессе лечения. Мутации гена *ASXL1* при динамическом исследовании обнаружили у 8,2% пациентов (n = 5). У 4 пациентов исходные мутации более не определялись, у 3 – персистировали, у 2 пациентов мутации были выявлены впервые.

В обобщенном виде выявленные молекулярно-генетические нарушения у пациентов, получивших два курса терапии, представлены в Таблице 22.

Таблица 22 – Варианты генетических нарушений у пациентов с ОМЛ после 2-го курса терапии

Генетические нарушения	n пациентов с нарушениями, %	Экзон гена или вариант перестройки, n пациентов
<i>FLT3</i>	2 (3,3)	Экзоны 14-15 (домен ITD), n=20
<i>NPM1</i>	10 (16,4)	Экзон 11 (тип А), n=7
		Экзон 11 (тип В), n=3
<i>CEBPA</i>	Не исследовали	Не исследовали
Перестройка <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	8 (13,1)	–
Перестройки <i>KMT2A</i>	3 (4,9)	<i>AFDN::KMT2A</i> , n=2
		<i>KMT2A::MLLT3</i> , n=1
<i>DNMT3A</i>	14 (23)	Экзоны 8-10, n=2
		Экзон 15, n=1
		Экзон 16-17, n=2
		Экзоны 18-19, n=5
		Экзоны 22-23, n=5
<i>TET2</i>	2 (3,3)	Экзон 3, n=2
<i>ASXL1</i>	5 (8,2)	Экзон 12, n=5

Спектр выявленных мутаций генов КК и динамика изменений этого спектра в процессе терапии приведены в Таблице 23.

Таблица 23 – Динамика мутационного статуса генов КК у пациентов в процессе лечения

Динамика мутаций	Мутации	Тип	Патогенность (каталог АМП)
<i>DNMT3A</i>			
Более не определялись	exon9:c.T1022C:p.V341A	Mc	H3
	exon10:c.G1136A:p.R379HA	Mc	H3
	exon10:c.G1126C:p.A376P	Mc	H3
	exon19:c.C2222T:p.A741V	Mc	H3
	exon19:c.C2245T:p.R749C	Mc	П
	exon22:c.A2500G:p.T834A	Mc	H3
	exon23:c.G2645A:p.R882H	Mc	П
Персистировали	exon8:c.C1010T:p.S337L	Mc	H3
	exon10:c.1238dupG:p.F414Lfs*7	СдР	П
	exon18:c.C2086T:p.Q696X	Нс	П
	exon18:c.G2120A:p.G707D	Mc	П
	exon19:c.2269_2270insGAGA:p.N757Rfs*9	СдР	П
	exon19:c.2193_2195del:p.F732del	Дел	H3
	exon19:c.2174-1G>A	Сп	ВП
	exon23:c.G2645A:p.R882H	Mc	П
Появились впервые	exon15:c.C1671G:p.C557W	Mc	H3
	exon16:c.A1889G:p.K630R	Mc	H3
	exon17:c.C2026T:p.R676W	Mc	H3
	exon20:c.A2401G:p.M801V	Mc	H3
	exon23:c.C2711T:p.P904L	Mc	П
<i>TET 2</i>			
Более не определялись	exon3:c.2346_2347del:p.E783Mfs*5	СдР	П
	exon3:c.C2961A:p.C987X	Нс	П
	exon3:c.T1217C:p.L406P	Mc	H3
	exon6:c.C3781T:p.R1261C	Mc	H3
	exon10:c.4312dupA:p.R1440Tfs*38	СдР	П
	exon11:c.C5680A:p.P1894T	Mc	H3
	exon11:c.5446_5449delinsGTCGGTAGA:p.L1816Vfs*6	СдР	H3
	exon11:c.A4627T:p.R1543X	Нс	П
Персистировали	–		
Появились впервые	exon3:c.A2111G:p.N704S	Mc	H3
	exon3:c.T3347C:p.I1116T	Mc	H3
<i>ASXL1</i>			
Более не определялись	exon12:c.G1958A:p.G653E	Mc	П
	exon12:c.C2309A:p.S770X	Нс	П
	exon12:c.1888_1910del:p.E635Rfs*15	СдР	П
	exon12:c.2287delC:p.L764Yfs*8	СдР	П
Персистировали	exon12:c.G2236A:p.A746T	Mc	П
	exon12:c.T1780C:p.C594R	Mc	П
	exon12:c.1978_1979delinsC:p.G660Pfs*43	СдР	П
Появились впервые	exon12:c.A1853G:p.K618R	Mc	П

Продолжение таблицы 23

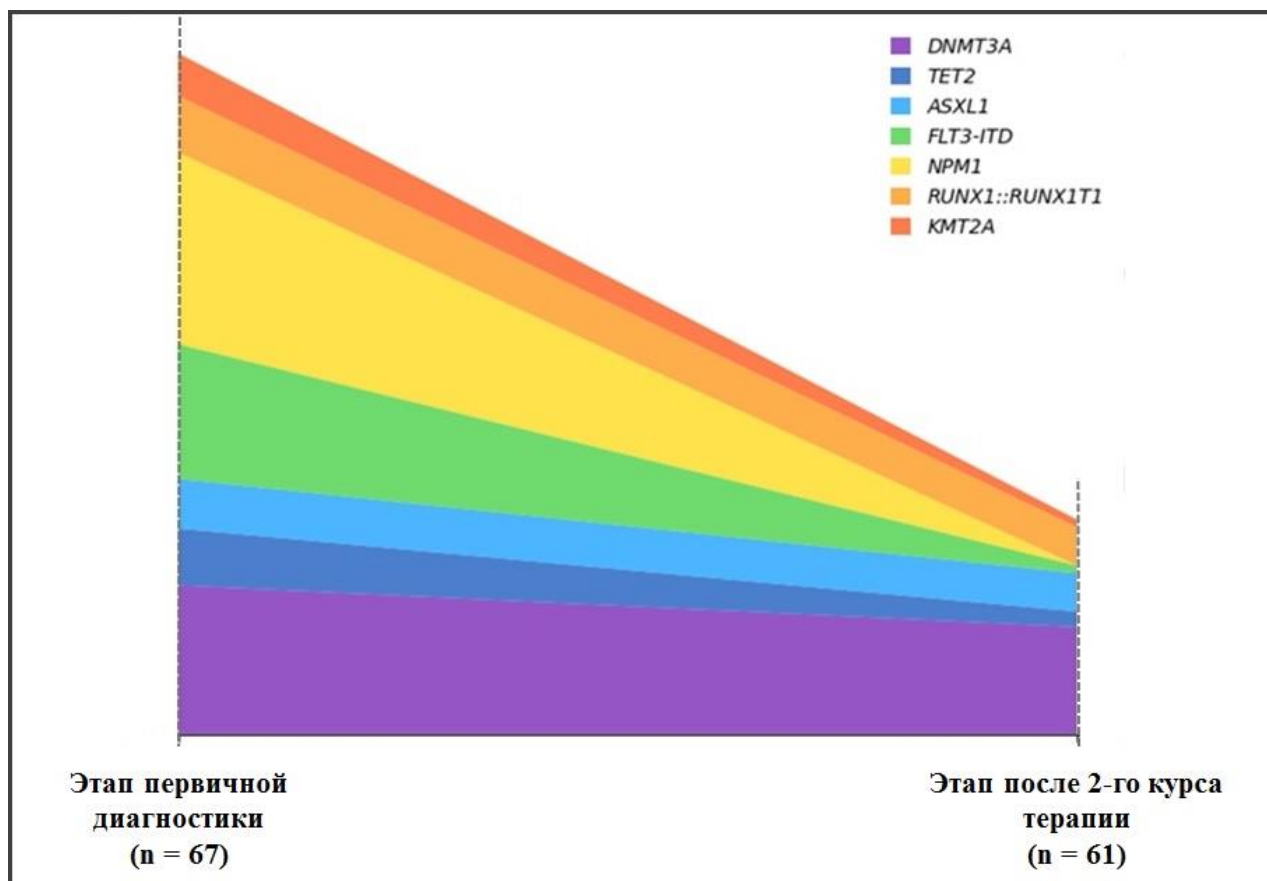
Примечания – Каталог АМП – каталог Ассоциации Молекулярной Патологии; П – патогенные мутации, ВП – вероятно патогенные мутации, НЗ – мутации неопределённого значения; Мс – миссенс-мутации, Сп – мутации сайта сплайсинга, СдР – мутации со сдвигом рамки считывания, Нс – нонсенс-мутации, Дел – делеции без сдвига рамки считывания.

Из всех определявшихся ранее уникальных мутаций гена *DNMT3A* 37,5% (6 из 16) в динамике выявлены не были. Каноничная мутация R882 в 23 экзоне более не определялась у половины пациентов с исходными мутациями (4 из 8); у другой половины она была выявлена с VAF ниже предела чувствительности метода. Персистировали 43,6% уникальных вариантов нуклеотидных последовательностей (7 из 16). Оценить клиренс оставшихся трёх уникальных мутаций не представлялось возможным в связи с отсутствием биоматериала для исследования. У 5 пациентов были выявлены 5 новых миссенс-мутаций в экзонах 15, 16, 17, 20 и 23, ни одна из которых не была обнаружена в общей группе на этапе первичной диагностики. Из 5 новых мутаций 3 были выявлены у пациентов, у которых ранее мутации гена *DNMT3A* не определяли вовсе, 1 – у пациентки, ранее имевшей только мутацию R882, и 1 – у пациента, у которого ранее определяли другую миссенс-мутацию. Большая часть новых генетических мутаций была отнесена к мутациям неопределённого значения (4 из 5), одна – к патогенным.

Ни одна из 8 мутаций гена *TET2*, которые определяли у пациентов до начала лечения, после 2-го курса терапии выявлена не была, однако у двух пациентов появились две новые миссенс-мутации неопределённого значения.

Больше половины вариантов нуклеотидных последовательностей гена *ASXL1* (57,1%, n = 4) в динамике не выявляли. Персистировали две патогенные точечные мутации и одна мутация со сдвигом рамки считывания. У двух человек появилась новая патогенная миссенс-мутация в кодоне 618.

Изменения молекулярно-генетического профиля заболевания у пациентов в процессе лечения представлен на Рисунке 17.



n – число пациентов

Рисунок 17 – Изменения молекулярно-генетических характеристик заболевания у пациентов с ОМЛ после 2-го курса терапии

3.2.2 Анализ динамики аллельной нагрузки мутаций генов и клиренс минимальной остаточной болезни, исследованный методом иммунофенотипирования

Одной из задач исследования было сопоставить исходный генетический ландшафт заболевания, а также изменение аллельной нагрузки мутаций генов в процессе лечения с клиренсом ИФТ МОБ.

Персистенцию ИФТ МОБ констатировали при сохранении ИФТ МОБ позитивного статуса после 2 курсов противоопухолевой терапии. В результате однофакторного анализа было показано, что факторами, достоверно ассоциированными с персистенцией ИФТ МОБ, были наличие мутаций генов, ассоциированных с КК ($p = 0,047$; ОШ = 5 (0,9 – 24,5), в частности, гена *DNMT3A*

($p = 0,03$; ОШ = 5 (1 – 24,1)). Фактор наличия мутаций *NPM1*, напротив, имел обратную связь с персистенцией ИФТ МОБ и был на границе значимости ($p = 0,06$; ОШ = 0,15 (0,18 – 1,3)). В многофакторный анализ были включены как клиничко-демографические (возраст, пол, показатели ПК и бластоз в КМ при диагностике ОМЛ, наличие нейрорлейкемии при диагностике ОМЛ, инициальный гиперлейкоцитоз), так и молекулярно-генетические факторы. В результирующую модель вошли: наличие мутаций генов *DNMT3A* ($p = 0,038$; ОШ = 6,2), *NPM1* ($p = 0,007$; ОШ = 0,06), а также возраст ($p = 0,008$, медиана лет у пациентов с персистенцией ИФТ МОБ – 42,5, медиана лет у пациентов без персистенции ИФТ МОБ – 36). При включении в многофакторный анализ только молекулярно-генетических факторов значимыми оказались мутации уже упомянутых генов: *DNMT3A* ($p = 0,006$) и *NPM1* ($p = 0,017$). Также был проанализирован фактор числа исходно мутированных генов (мутации одного гена, двух, трёх и более). В результате этого анализа фактор наличия большего числа генетических мутаций в дебюте заболевания не продемонстрировал своей прогностической значимости в отношении ИФТ МОБ статуса ($p = 0,43$).

Была также изучена ассоциация исходной аллельной нагрузки мутаций генов с персистенцией ИФТ МОБ. Было показано, что в группе пациентов с персистенцией ИФТ МОБ исходные значения VAF мутаций гена *DNMT3A* были выше, чем в группе пациентов, достигших ИФТ МОБ негативности в контрольной точке ($p = 0,052$, Рисунок 18).

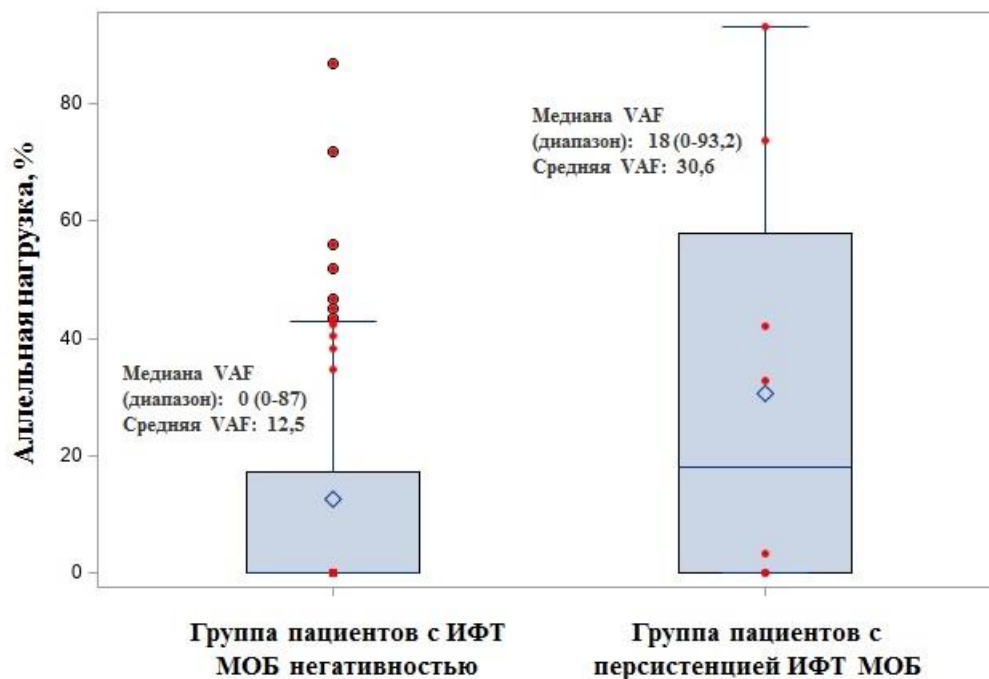


Рисунок 18 – Исходная аллельная нагрузка мутаций гена *DNMT3A* у пациентов с МОБ негативным и МОБ позитивным статусом после 2-го курса терапии

На границе статистической значимости у пациентов с персистенцией ИФТ МОБ также отмечались более высокие, чем у пациентов с ИФТ МОБ негативностью, значения VAF мутаций генов *ASXL1* ($p = 0,089$) и *NPM1* ($p = 0,073$).

ROC-анализ для определения пороговых значений VAF мутаций указанных генов, сопряжённых с повышенной вероятностью персистенции ИФТ МОБ, в рамках этой работы не проводили. Тем не менее, была предпринята попытка соотнести численное значение ИФТ МОБ после 2-го курса терапии с численными значениями VAF персистировавших генетических мутаций. В результате многофакторного регрессионного анализа было показано, что VAF мутаций гена *NPM1* достоверно ассоциирована с численным значением ИФТ МОБ ($p = 0,0482$).

Далее была проанализирована индивидуальная динамика VAF генетических мутаций. Для мутаций гена *FLT3-ITD* было показано, что вне зависимости от достижения либо недостижения ПР после двух курсов терапии, а также статуса ИФТ МОБ в этой точке, VAF мутаций *FLT3-ITD* принимала нулевое значение для всех пациентов, кроме двух ($p = 0,003$) (Рисунок 19).

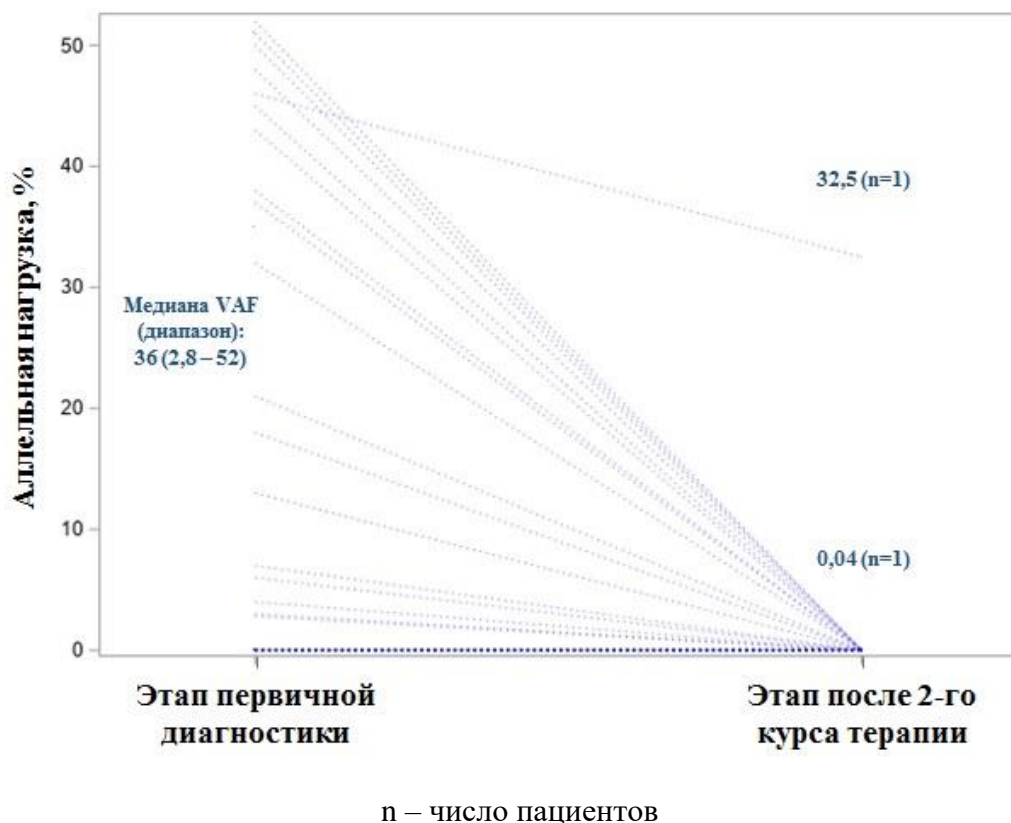


Рисунок 19 – Динамика аллельной нагрузки мутаций *FLT3*-ITD, чувствительность метода (ПЦР-ФА) – 10^{-2}

В группе пациентов с исходными мутациями гена *NPM1* ($n = 27$) наблюдали значимую динамику VAF этих мутаций к моменту завершения 2-го курса терапии ($n = 22$, $p = 0,005$). У всех этих пациентов к моменту контрольного исследования была достигнута ПР, однако в группе пациентов с персистирующими мутациями *NPM1* у одного человека сохранялся ИФТ МОБ позитивный статус (Рисунок 20).

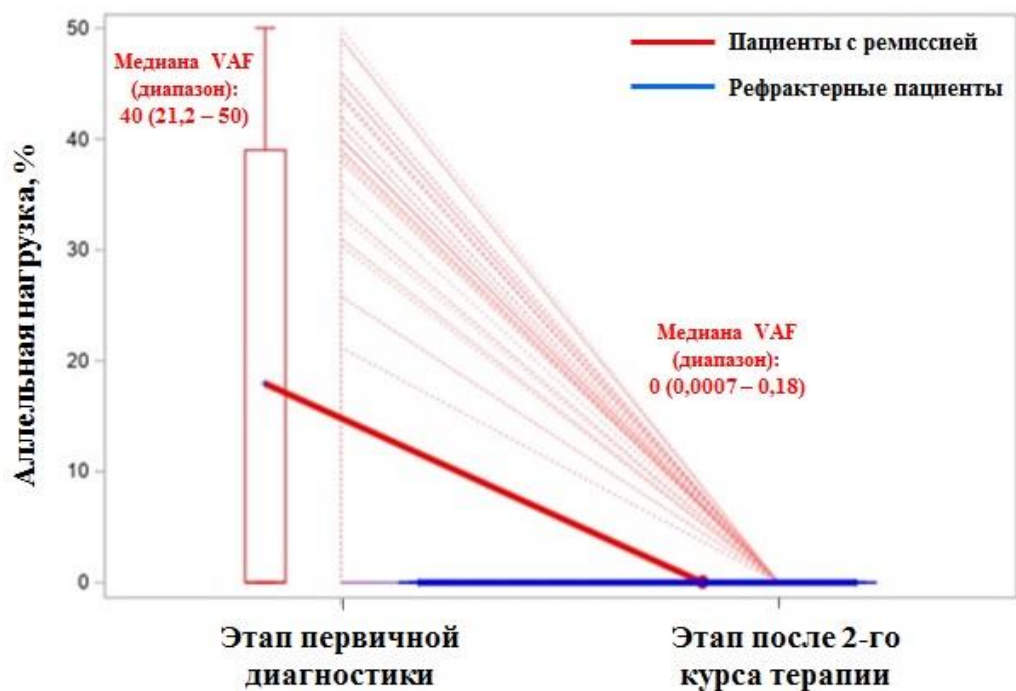


Рисунок 20 – Динамика аллельной нагрузки мутаций *NPM1*, чувствительность метода (аллель-специфичная ПЦР-ФА) – 10^{-4}

Среди пациентов с мутациями генов, ассоциированных с КК, наблюдали значимую динамику VAF мутаций *DNMT3A* ($p < 0,0001$): у подавляющего большинства пациентов с исходно мутированным *DNMT3A* аллельная нагрузка на этапе после 2-го курса терапии стремилась к нулю. Стоит отметить, что у пациентов с ИФТ МОБ негативным статусом аллельная нагрузка выявленных мутаций после двух курсов терапии была несколько выше, чем у пациентов с персистенцией ИФТ МОБ (Рисунок 21). Вероятно, это можно объяснить тем, что мутации генов КК у части пациентов (в том числе у пациентов, достигших ИФТ МОБ негативности) присутствовали не только в опухолевых, но и в здоровых кроветворных клетках. Редукция опухолевого клона, подтверждённая методом ИФТ, таким образом, не обязательно соотносится с динамикой VAF мутаций генов КК.

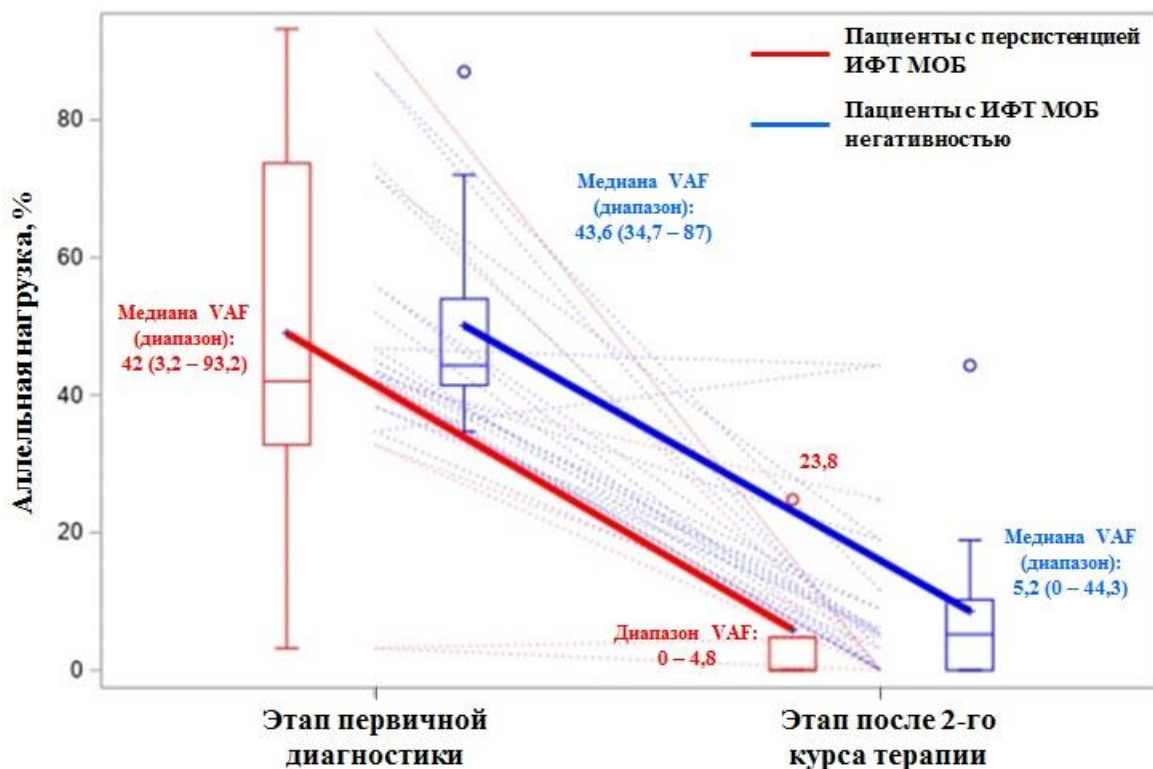
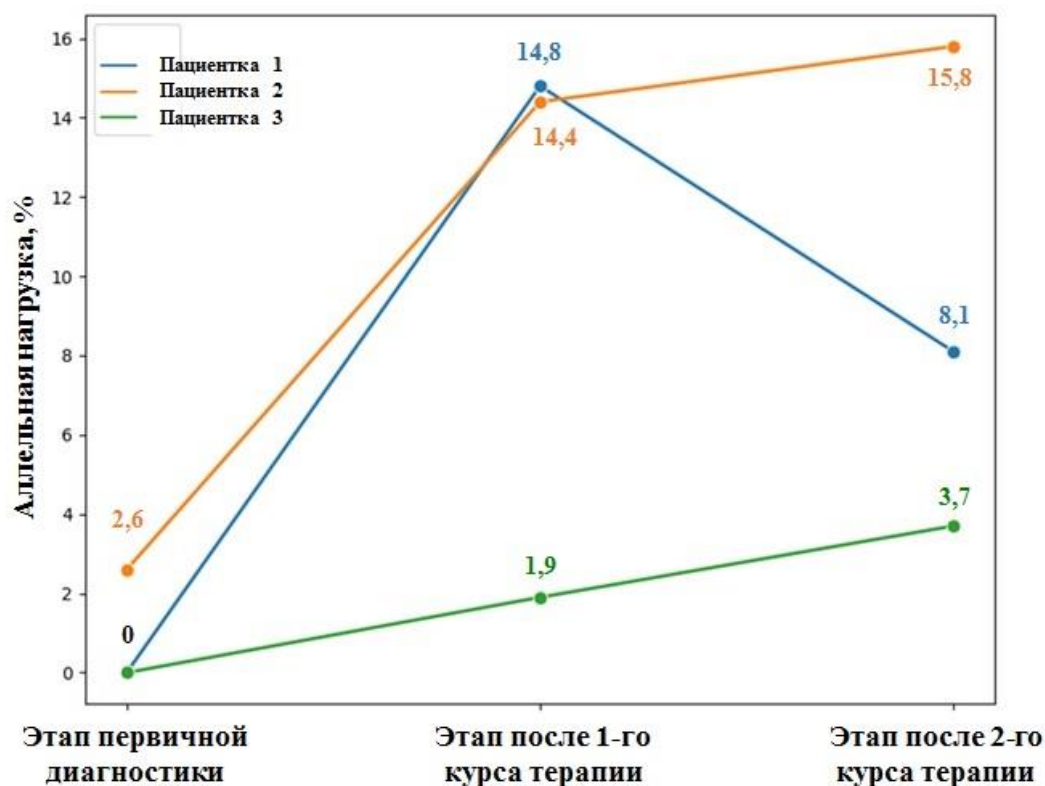


Рисунок 21 – Динамика аллельной нагрузки мутаций *DNMT3A*, чувствительность метода (ВПС) – 10^{-2}

Интересно, что у трёх пациенток в процессе лечения появились мутации, не определявшиеся исходно, с VAF от 3,7 до 15,8%. При более тщательном изучении полученных данных были выявлено, что у двоих из них (пациентки 1 и 3) новые мутации исходно действительно отсутствовали, в то время как у третьей (пациентка 2) новая мутация, VAF которой в контрольной точке составила 15,8%, присутствовала на этапе диагностики ОМЛ в очень маленьком проценте: VAF составляла 2,6%. Здесь необходимо повторно отметить, что мутации генов с VAF менее 3%, которые выявили с помощью ВПС, с учётом желаемой чувствительности метода не учитывались. Все три мутации были точечными миссенс-мутациями; две из них (у пациенток 1 и 2) принадлежали 3-й категории патогенности (неопределённого значения), одна – к 1-й (патогенная). Чтобы избежать неверной интерпретации полученных результатов, всем трём пациенткам с появившимися после 2-го курса терапии мутациями было проведено дополнительное исследование гена *DNMT3A* на материале, полученном после 1-го курса ХТ (все трое к этому моменту были в ИФТ МОБ негативной ремиссии заболевания).

Графики изменения VAF мутаций *DNMT3A* у этих трёх пациенток представлены на Рисунке 22.



Пациентка 1: миссенс-мутация exon15:c.C1671G:p.C557W, 3-я категория патогенности.
 Пациентка 2: миссенс-мутация exon17:c.C2026T:p.R676W, 3-я категория патогенности.
 Пациентка 3: миссенс-мутация exon23:c.C2711T:p.P904L, 1-я категория патогенности.

Рисунок 22 – Динамика аллельной нагрузки мутаций *DNMT3A*, впервые выявленных у пациенток после 2-го курса терапии

3.3 Рецидивы острых миелоидных лейкозов

3.3.1 Мутационный статус генов различных функциональных классов у пациентов в рецидиве заболевания

Рецидив заболевания был констатирован у 19,4% пациентов ($n = 12$), из них у 8,3% пациентов ($n = 1$) констатировали изолированный экстрамедуллярный рецидив заболевания, у 16,7% ($n = 2$) – сочетанный рецидив (экстрамедуллярный и костномозговой), у 50% ($n = 6$) – костномозговой, у 25% ($n = 3$) – ИФТ МОБ

рецидив ОМЛ. В работе был проанализирован материал 8 пациентов: двоих с ИФТ МОБ рецидивом, четырёх с костномозговым рецидивом, по одному пациенту с изолированным экстрамедуллярным и сочетанным рецидивом.

Всем пациентам в рецидиве заболевания повторно определяли статус генов *FLT3-ITD*, *NPM1* и *CEBPA*. У всех трёх пациентов с исходно мутированным *FLT3-ITD* мутации этого гена перестали определяться в процессе лечения, однако вновь появились в рецидиве. Из тех, у кого до начала терапии определяли мутации *NPM1*, и у кого в дальнейшем констатировали рецидив ($n = 5$), лишь у одного пациента после 2 курсов терапии мутация исчезла, у остальных четырёх мутации персистировали. В рецидиве мутации *NPM1* вновь были определены у всех пяти пациентов. Из пациентов с мутированным *CEBPA* рецидив ОМЛ развился у троих, у двоих из них мутации гена *CEBPA* определялись и в рецидиве (в ходе лечения статус гена *CEBPA* не оценивали). Ни у одного пациента с исходным диким типом генов *FLT3-ITD*, *NPM1* или *CEBPA* в рецидиве мутации этих генов не находили.

Также оценивали статус генов, ассоциированных с КК (Таблица 24). У одной пациентки как в процессе лечения, так и в рецидиве заболевания персистировали две мутации гена *DNMT3A* (точечная миссенс-мутация неопределённого значения в экзоне 20 и мутация «горячей точки» в экзоне 23). Интересно, что у неё же в рецидиве ОМЛ была выявлена патогенная мутация гена *TET2*, определявшаяся на этапе первичной диагностики, но не определявшаяся после 2-го курса терапии. VAF этой мутации в рецидиве по сравнению с дебютом заболевания практически не изменилась. Помимо этой пациентки, мутации *DNMT3A* выявили ещё у двух человек.

Мутация гена *ASXL1* была выявлена только у одного пациента, ранее эту мутацию не определяли.

Таблица 24 – Мутационный статус генов КК у пациентов в рецидиве ОМЛ

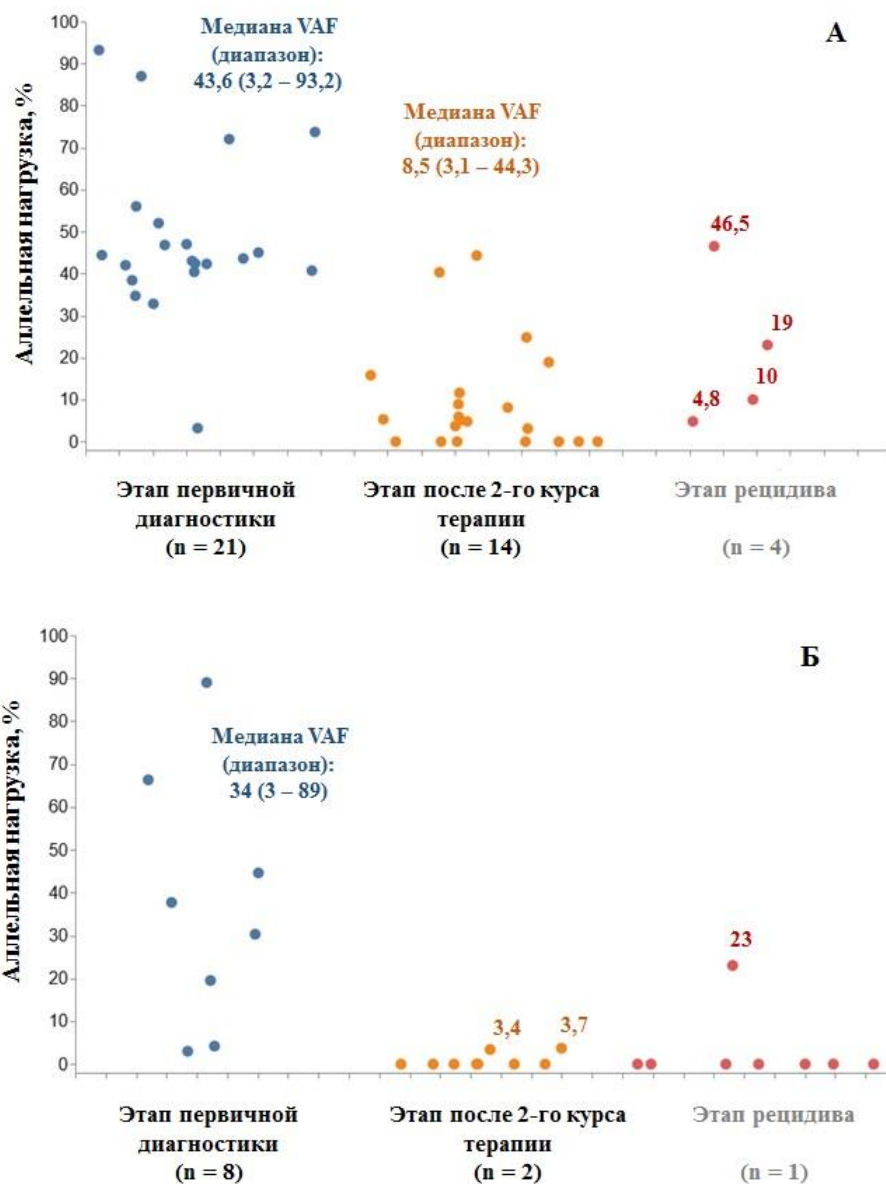
Ген	Экзоны	Генетические варианты	Тип	Патогенность (каталог АМП)
<i>DNMT3A</i>	18	exon18:c.C2086T:p.Q696X	Нс	П

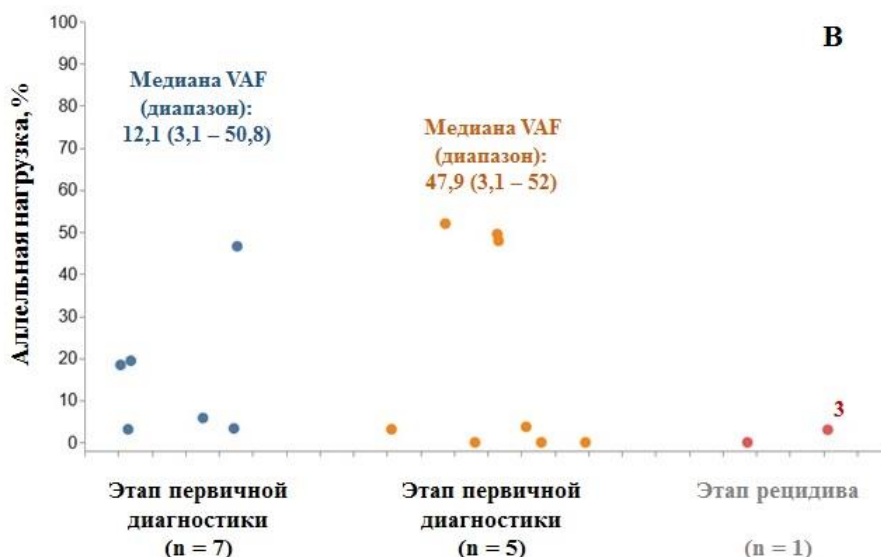
Продолжение таблицы 24

	20	exon20:c.A2401G:p.M801V	Mc	НЗ
	23	exon23:c.G2645A:p.R882H	Mc	П
		exon23:c.C2644T:p.R882C	Mc	П
<i>ASXL1</i>	12	exon12:c.G1955A:p.G652D	Mc	П

Примечания – Каталог АМП – каталог Ассоциации Молекулярной Патологии; П – патогенные мутации, НЗ – мутации неопределённого значения

Для мутаций генов КК была проанализирована динамика аллельной нагрузки во всех трёх точках: на этапе первичной диагностики, после 2-го курса терапии, в рецидиве заболевания. Графики изменения VAF соответствующих мутаций представлены на Рисунке 23.





Каждая точка отображает VAF мутации у отдельного пациента с исходными мутациями генов КК, n по горизонтальной оси отображает число пациентов с ненулевой VAF на соответствующих этапах

Рисунок 23 – Динамика аллельной нагрузки мутаций генов, ассоциированных с КК, у пациентов на разных этапах терапии: А – изменения VAF мутаций *DNMT3A*, Б – изменения VAF мутаций *TET2*, В – изменения VAF мутаций *ASXL1*

В процессе лечения медиана аллельной нагрузки мутаций генов *DNMT3A* и *TET2* уменьшилась, а медиана VAF мутаций *ASXL1* увеличилась, однако наблюдаемый эффект может быть обусловлен небольшим объёмом выборки.

3.3.2 Факторы риска развития рецидива

Для оценки влияния выявленных в дебюте генетических мутаций на ВРР был проведён однофакторный событийный анализ с использованием кривых Каплана-Майера и критерия log-rank. В качестве прогностических факторов рассматривали все генетические маркеры. По результатам однофакторного анализа не было получено различий в ВРР ни по одному из предполагаемых генетических факторов прогноза (Таблица 25).

Таблица 25 – Предполагаемые генетические маркеры, ассоциированные с повышенной ВРР

Генетические нарушения	2-летняя ВРР, %	4-летняя ВРР, %	<i>p</i>	ОШ
<i>FLT3-ITD</i> ^{мут} / <i>FLT3-ITD</i> ^{дикий}	19/23	19/26	0,34	0,91 (0,24-3,38)
<i>NPM1</i> ^{мут} / <i>NPM1</i> ^{дикий}	17/26	22/26	0,39	0,97 (0,3-3,06)
<i>CEBPA</i> (TAD1, TAD1/2) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (TAD1, TAD1/2) ^{дикий}	32/17	32/20	0,47	1,6 (0,43-5,96)
<i>CEBPA</i> (bZIP) ^{мут} / <i>CEBPA</i> (bZIP) ^{дикий}	44/17	44/20	0,45	1,4 (0,3-5,2)
<i>DNMT3A</i> ^{мут} / <i>DNMT3A</i> ^{дикий}	24/20,5	32/20,5	0,43	1,59 (0,5-4,99)
<i>TET2</i> ^{мут} / <i>TET2</i> ^{дикий}	14/23	Не было на сроке наблюдения/ 25,6	0,84	0,68 (0,09-5,28)
<i>ASXL1</i> ^{мут} / <i>ASXL1</i> ^{дикий}	17/23	17/26	0,5	0,69 (0,09-5,36)
Гены ДТА (есть мутации)/ Гены ДТА (нет мутаций)	17/25,6	23/25,6	0,93	0,85 (0,26-2,66)
Перестройки гена <i>KMT2A</i> (+)/ Перестройки гена <i>KMT2A</i> (-)	40/19,5	40/22	0,51	1,95 (0,43-8,95)

При проведении многофакторного анализа при включении в список кандидатов факторов наличия генетических мутаций с применением пошаговой регрессионной модели Кокса в результирующую модель не вошёл ни один фактор.

Поскольку мутации различных генов у пациентов с ОМЛ часто встречались сочетанно, в качестве возможного фактора неблагоприятного прогноза также было рассмотрено наличие одновременно двух и более генетических мутаций. В результате однофакторного анализа не было получено достоверных данных о прогностической значимости наличия нескольких мутаций и их ассоциации с меньшей ОВ ($p = 0,5$), персистенцией ИФТ МОБ ($p = 0,43$) либо рефрактерным течением заболевания ($p = 0,87$), а также большей ВРР ($p = 0,94$). Однако, помимо самого факта наличия нескольких генетических мутаций, была также проанализирована прогностическая значимость появления либо исчезновения мутаций генов в процессе лечения (Рисунок 24). Для этого был сформирован агрегированный признак – появление либо исчезновение хотя бы одной мутации из исследуемого списка. В результате выполненного анализа было показано, что у пациентов, у которых в процессе лечения перестала определяться одна и более из

исходные мутаций, результирующая ВРР на сроке 2 года была меньше ($p = 0,057$; $OR = 0,3$).

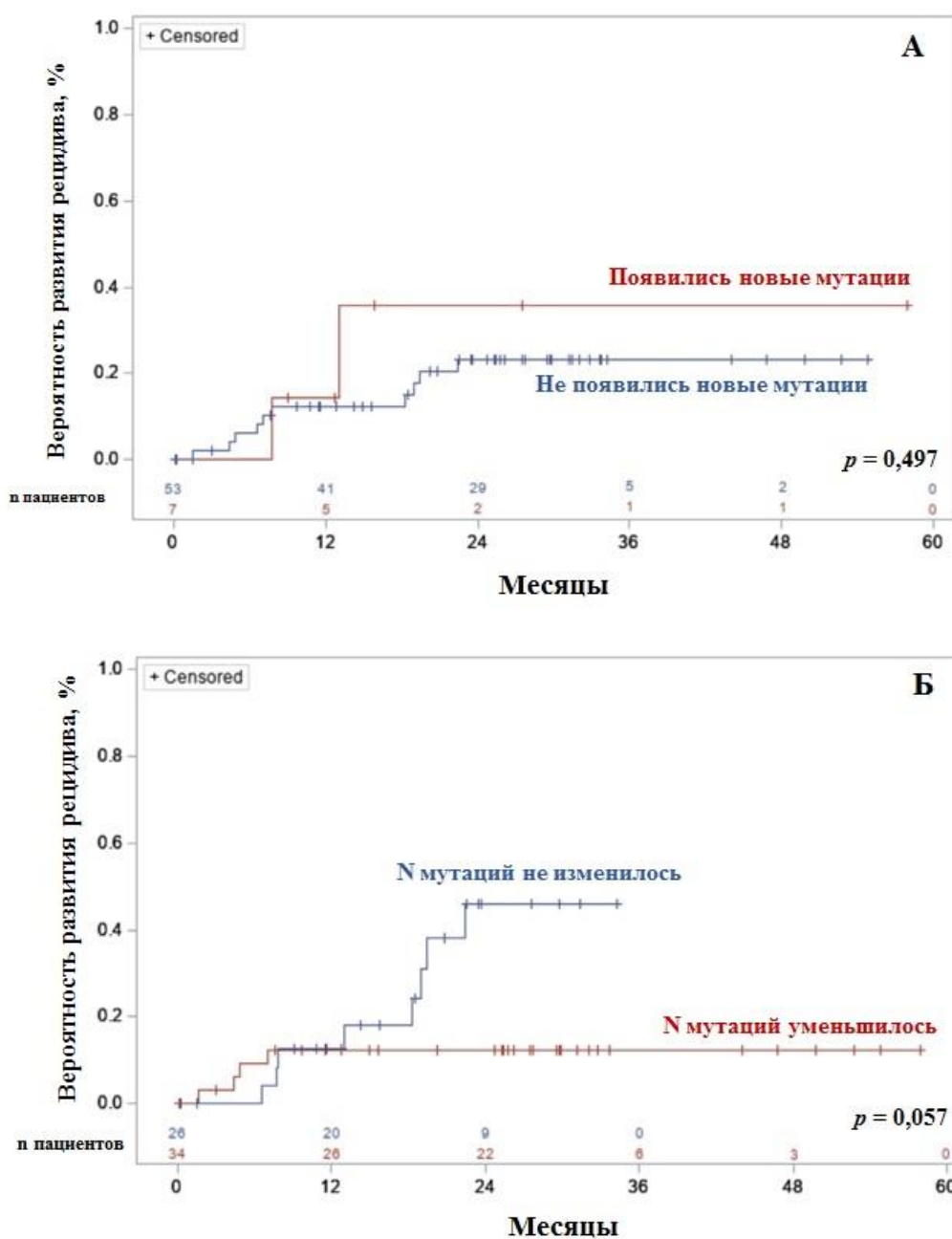


Рисунок 24 – ВРР при изменении числа мутаций в процессе терапии (агрегированный признак с включением мутаций *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*): А – при появлении новых мутаций, Б – при уменьшении числа мутаций

Аналогичная тенденция наблюдалась и при формировании агрегированного признака с включением только мутаций генов КК (Рисунок 25). Уменьшение в процессе лечения числа мутаций соответствующих генов было ассоциировано с меньшей ВРР на сроке наблюдения 2 года ($p = 0,18$; $OR = 0,27$).

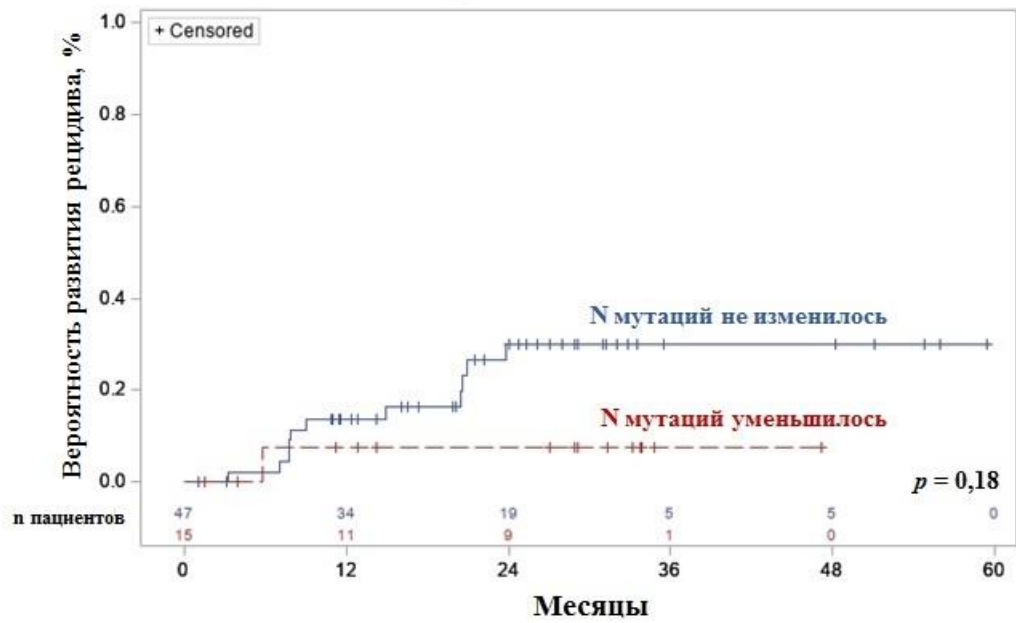


Рисунок 25 – ВРР при уменьшении числа мутаций в процессе терапии (агрегированный признак с включением мутаций *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Парадоксальным образом более глубокое понимание механизмов развития ОМЛ приводит к появлению всё новых вопросов, с которыми приходится сталкиваться в рутинной клинической практике [98]. При стратификации пациентов по группам прогноза учитываются не морфологические характеристики опухоли, а молекулярно-генетические. Появление различных высокочувствительных методов исследования, безусловно, позволяет выполнить комплексную оценку генетического профиля заболевания. Однако интерпретация полученных результатов, учитывая частую сочетанность генетических нарушений у пациентов с ОМЛ, может подчас представлять собой неразрешимую задачу. Это дополнительно осложняется отсутствием единого мнения по поводу прогностической значимости тех или иных генетических нарушений и несовпадением существующих классификаций. Так, например, в классификации ВОЗ 2022 г. к цитогенетическим аномалиям, связанным с миелодисплазией, относят моносомию 13 либо делецию длинного плеча 13-й хромосомы и делецию длинного плеча 11-й хромосомы. В классификации ICC 2022 г. перечисленные аномалии отсутствуют, однако включены делеция длинного плеча 20-й хромосомы и трисомия 8. Кроме того, классификация ICC 2022 г. учитывает мутации гена *RUNX1*, а классификация ELN 2022 г. – нет [50, 113]. Лечение пациентов с ОМЛ-МД, тем временем, может принципиально отличаться от лечения пациентов с ОМЛ из других групп. Другой важной проблемой является выбор оптимальной терапевтической стратегии у пациентов с сочетанными генетическими нарушениями, относящимися к разным прогностическим группам. Рекомендации ELN 2022 г. дают некоторые пояснения на этот счёт: при выявлении мутаций гена *NPM1* одновременно с неблагоприятными хромосомными aberrациями пациентов стратифицируют в группу неблагоприятного прогноза, при выявлении мутаций генов, связанных с миелодисплазией (*ASXL1*, *BCOR*, *RUNX1*, *SRSF2*, *EZH2*, *SF3B1*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2*), у пациентов с благоприятными хромосомными aberrациями их стратифицируют в группу благоприятного прогноза. Таким

образом, превалирующее значение, согласно текущим рекомендациям, имеют именно хромосомные aberrации, а не мутации генов. Выявление генетических мутаций имеет принципиальное значение, в случае если для этих мутаций существуют таргетные препараты (*FLT3*, *IDH1*, *IDH2*). Тем не менее, приблизительно у 50% пациентов с ОМЛ в дебюте заболевания определяют НК. В нашем исследовании НК был выявлен у 35% пациентов. В этом случае требуются иные подходы к определению прогноза. Детальное изучение мутационного ландшафта заболевания в этом случае может стать хорошим подспорьем для выстраивания терапевтической стратегии, в частности, решения вопроса о необходимости выполнения алло-ТГСК.

Другим мощным диагностическим инструментом, помимо исходных генетических характеристик опухоли, является оценка клиренса МОБ. Классическими методами исследования МОБ являются ИФТ МПЦ и ПЦР (в случае если исходно были выявлены соответствующие генетические маркеры). Главное преимущество метода ИФТ МПЦ – возможность его применения у всех пациентов с ОМЛ, вне зависимости от молекулярно-генетического профиля заболевания. Главное преимущество метода ПЦР – высокая чувствительность, однако применимость этого метода ограничена крайне узким перечнем подходящих генетических маркеров. В нашей работе мы сопоставили полученные данные об изменении молекулярно-генетического профиля заболевания в процессе лечения с клиренсом ИФТ МОБ. В качестве потенциальных генетических факторов были выбраны гены, ассоциированные с КК, поскольку появление в них мутаций является основой для последующего развития ОМЛ, и распространённость этих мутаций в популяции пациентов с ОМЛ сравнительно велика. Кроме того, представлялось интересным исследовать мутационный профиль этих генов при помощи метода ВПС, поскольку этот метод позволяет получить больше информации о типе мутаций и их координатах в исследуемом гене. При анализе полученных результатов (однофакторный анализ) было показано, что наличие исходных мутаций генов КК ассоциировано с персистенцией ИФТ МОБ ($p = 0,047$; ОШ = 5 (0,9 – 24,5), в частности, наличие мутаций гена *DNMT3A* ($p = 0,03$; ОШ = 5

(1 – 24,1). При анализе результатов терапии у пациентов, в зависимости от наличия мутаций генов КК (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*), было показано, что фактор наличия двух и более мутаций генов КК ассоциирован с большей вероятностью рефрактерного течения заболевания ($p = 0,09$), а наличие исходных мутаций гена *ASXL1* было достоверно ассоциировано с первичной рефрактерностью ($p = 0,03$; ОШ = 7,2).

Вопрос о том, присутствовали ли выявленные мутации генов, ассоциированных с КК, именно в клетках опухоли или в здоровых кроветворных клетках, остаётся открытым. Ответить на него можно было бы только при условии выполнения молекулярно-генетических исследований на популяции бластных клеток, выделенной с помощью технологий клеточного сортирования, что не входило в задачи настоящего исследования. Известно, что наличие КК не является непосредственным пусковым механизмом при развитии злокачественных миелоидных новообразований, однако сопряжено с повышенным риском этого события. Некоторые исследования показывают, что КК может развиваться в раннем детстве или даже внутриутробно [24, 28, 40, 55]. Приобретение клоном преимуществ перед другими клонами и, соответственно, его экспансия – результат действия множества факторов, таких как потенциал самообновления материнской клетки, состояние стромального микроокружения, взаимодействие с соседними клеточными клонами [37]. Причины, по которым стохастическое приобретение кроветворными клетками мутаций генов приводит к развитию клональной экспансии, являются предметом дальнейшего изучения. Также недостаточно изучен вопрос, почему развитие миелоидных новообразований (в частности, ОМЛ) сопряжено с наличием клонов, несущих мутации ограниченного перечня генов.

В нашей работе не было получено достоверных различий в показателях выживаемости у пациентов с ОМЛ, в зависимости от наличия тех или иных генетических маркеров, в частности, мутаций генов КК. Показатели ОВ и БРВ у пациентов с мутациями генов КК были сопоставимы с показателями в общей группе. Показатели динамической редукции клонов, несущих мутации генов КК, также не продемонстрировали прогностической значимости; в то же время было

показано, что уменьшение в процессе лечения числа мутаций генов КК было сопряжено с меньшей результирующей ВРР на сроке наблюдения 2 года ($p = 0,18$; $OR = 0,27$). Мы полагаем, что полученные результаты свидетельствуют об адекватности выбранного терапевтического подхода, ориентированного на комплексную оценку опухолевого клиренса в процессе лечения и предусматривающего высокую трансплантационную активность.

ВЫВОДЫ

1. У 94% пациентов с острыми миелоидными лейкозами, отдельно либо в сочетаниях, были выявлены те или иные генетические нарушения: драйверные генетические мутации (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*) у 62,7% пациентов и мутации генов, ассоциированных с клональным кроветворением (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) у 44,8%. Они определялись у 90,7% пациентов с нормальным кариотипом и у 62,5% пациентов с устойчивыми и неклассифицируемыми хромосомными aberrациями.

2. Наличие мутаций гена *ASXL1* было ассоциировано с первичной рефрактерностью ($p = 0,03$, ОШ = 7,2), а наличие мутаций гена *DNMT3A* – с персистенцией минимальной остаточной болезни, исследованной методом иммунофенотипирования ($p = 0,03$, ОШ = 5). Мутации гена *NPM1* имели обратную связь с первичной рефрактерностью ($p = 0,046$). Достоверных различий в вероятности развития рецидива ни по одному из предполагаемых генетических факторов прогноза выявлено не было.

3. Персистенция мутаций генов клонального кроветворения определялась у 53% пациентов. Было показано, что у пациентов, у которых в процессе лечения перестала определяться одна и более мутация указанных генов, результирующая вероятность развития рецидива на сроке наблюдения 2 года была меньше ($p = 0,18$; ОР = 0,27).

4. С учётом высокой трансплантационной активности (трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток выполнена 65,6% пациентов), предусмотренной протоколом ОМЛ-21, 4-летняя общая выживаемость в общей группе составила 66,3%, 4-летняя безрецидивная выживаемость – 59,2%. Достоверных различий в показателях выживаемости у пациентов, в зависимости от наличия тех или иных генетических маркеров, обнаружено не было.

5. В рецидиве заболевания не было зафиксировано появления драйверных генетических мутаций (*FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*), однако у всех пациентов с исходно мутированными генами те же мутации определялись и в рецидиве. Динамика мутационного статуса генов клонального кроветворения (*DNMT3A*,

TET2, ASXL1) была разнонаправленной: наблюдали персистирование и исчезновение исходных мутаций, а также появление новых.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

алло-ТГСК	трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток
БРВ	безрецидивная выживаемость
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВПС	высокопроизводительное секвенирование
ВРР	вероятность развития рецидива
ГО	гемтузумаб озогамицин
ГСК	гемопоэтические стволовые клетки
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФТ	иммунофенотипирование
ИФТ МОБ	минимальная остаточная болезнь, определённая методом иммунофенотипирования
ИФТ МПЦ	иммунофенотипирование методом проточной цитометрии
КК	клональное кроветворение
ККНП	клональное кроветворение неопределённого потенциала
ККОП	клональное кроветворение онкогенного потенциала
КМ	костный мозг
кПЦР	количественная полимеразная цепная реакция
ЛАИФ	лейкоз-ассоциированный иммунофенотип
ЛСКК	лейкемическая стволовая клетка крови
МДС	миелодиспластический синдром
МОБ	минимальная остаточная болезнь
МПЗ	миелопролиферативное заболевание
МТА	миелотоксический агранулоцитоз
НК	нормальный кариотип
нпПР	полная ремиссия с неполным гематологическим восстановлением
ОВ	общая выживаемость

ОМЛ	острый миелоидный лейкоз
ОМЛ-МД	острый миелоидный лейкоз, связанный с миелодисплазией
ОР	отношение рисков
ОШ	отношение шансов
ПК	периферическая кровь
ПР	полная ремиссия
Пре-ЛСКК	прелейкемическая стволовая клетка крови
ПЦР-РВ	полимеразная цепная реакция в реальном времени
ПЦР-ФА	полимеразная цепная реакция с последующим фрагментным анализом
СКК	стволовые клетки крови
СО	стандартное отклонение
ХТ	химиотерапия
цПЦР	цифровая полимеразная цепная реакция
ЭДТА	этилендиаминтетраацетат
CBF	core-binding factor
CGC	The Cancer Gene Census
DTA	гены <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>ASXL1</i>
ELN	European LeukemiaNet
<i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> internal tandem duplications
<i>FLT3</i> -TKD	<i>FLT3</i> tyrosine kinase domain
ICC	International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGS	Next Generation Sequencing
ROC	receiver operating characteristic
TCGA	The Cancer Genome Atlas
Tier	категория патогенности мутаций генов
VAF	variant allele frequency

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation / R. M. Stone, S. J. Mandrekar, B. L. Sanford [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Vol. 377. – № 5. – P. 454-464. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359
2. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party / M. Heuser, S. D. Freeman, G. J. Ossenkoppele [et al.] // *Blood*. – 2021. – Vol. 138. – № 26. – P. 2753-2767. DOI: 10.1182/blood.2021013626
3. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value / M. Pratcorona, S. Abbas, M. A. Sanders [et al.] // *Haematologica*. – 2012. – Vol. 97. – № 3. – P. 388-392. DOI: 10.3324/haematol.2011.051532
4. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value / S. Abbas, S. Lugthart, F. G. Kavelaars [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 12. – P. 2122-2126. DOI: 10.1182/blood-2009-11-250878
5. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes / S. Jaiswal, P. Fontanillas, J. Flannick [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 371. – № 26. – P. 2488-2498. DOI: 10.1056/NEJMoa1408617
6. Aloia, L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development / L. Aloia, B. Di Stefano, L. Di Croce // *Development (Cambridge)*. – 2013. – Vol. 140. – № 12. – P. 2525-2534. DOI: 10.1242/dev.091553
7. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment / T. Grafone, M. Palmisano, C. Nicci, S. Storti // *Oncology Reviews*. – 2012. – Vol. 6. – № 1. – P. 64-74. DOI: 10.4081/oncol.2012.e8
8. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML / A. Ivey, R. K. Hills, M. A. Simpson [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 374. – № 5. – P. 422-433. DOI: 10.1056/NEJMc1603847
9. Association between mutation clearance after induction therapy and outcomes in acute myeloid leukemia / J. M. Klco, C. A. Miller, M. Griffith [et al.] //

JAMA - Journal of the American Medical Association. – 2015. – Vol. 314. – № 8. – P. 811-822. DOI: 10.1001/jama.2015.9643

10. Association of Measurable Residual Disease with Survival Outcomes in Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis / N. J. Short, S. Zhou, C. Fu [et al.] // JAMA Oncology. – 2020. – Vol. 6. – № 12. – P. 1890-1899. DOI: 10.1001/jamaoncol.2020.4600

11. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome / S. Schnittger, C. Eder, S. Jeromin [et al.] // Leukemia. – 2013. – Vol. 27. – № 1. – P. 82-91. DOI: 10.1038/leu.2012.262

12. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category / K. H. Metzeler, H. Becker, K. Maharry [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118. – № 26. – P. 6920-6929. DOI: 10.1182/blood-2011-08-368225

13. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: A study by the German-Austrian acute myeloid leukemia study group / P. Paschka, R. F. Schlenk, V. I. Gaidzik [et al.] // Haematologica. – 2015. – Vol. 100. – № 3. – P. 324-330. DOI: 10.3324/haematol.2014.114157

14. Bolger, A. M. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30. – № 15. – P. 2114-2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170

15. Borthakur, G. Core binding factor acute myelogenous leukemia-2021 treatment algorithm / G. Borthakur, H. Kantarjian // Blood Cancer Journal. – 2021. – Vol. 11. – № 6. DOI: 10.1038/s41408-021-00503-6

16. Bullinger, L. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways / L. Bullinger, K. Döhner, H. Dohner // Journal of Clinical Oncology. – 2017. – Vol. 35. – № 9. – P. 934-946. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.2208

17. Characteristics and prognostic significance of genetic mutations in acute myeloid leukemia based on a targeted next-generation sequencing technique / R. Q. Wang, C. J. Chen, Y. Jing [et al.] // Cancer Medicine. – 2020. – № August. – P. 1-11.

DOI: 10.1002/cam4.3467

18. Chromosomal abnormalities and prognosis in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: A pooled analysis of individual patient data from nine international cohorts / L. Angenendt, C. Röllig, P. Montesinos [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2019. – Vol. 37. – № 29. – P. 2632-2642. DOI: 10.1200/JCO.19.00416

19. Clearance of somatic mutations at remission and the risk of relapse in acute myeloid leukemia / K. Morita, H. M. Kantarjian, F. Wang [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 36. – № 18. – P. 1788-1797. DOI: 10.1200/JCO.2017.77.6757

20. Clonal dynamics and clinical implications of postremission clonal hematopoiesis in acute myeloid leukemia / T. Tanaka, K. Morita, S. Loghavi [et al.] // *Blood*. – 2021. – Vol. 138. – № 18. – P. 1733-1739. DOI: 10.1182/blood.2020010483

21. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia / M. Jan, T. M. Snyder, M. R. Corces-Zimmerman [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 4. – № 149. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004315

22. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults / A. L. Young, G. A. Challen, B. M. Birmann, T. E. Druley // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. DOI: 10.1038/ncomms12484

23. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence / G. Genovese, A. K. Kähler, R. E. Handsaker [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 371. – № 26. – P. 2477-2487. DOI: 10.1056/NEJMoa1409405

24. Clonal hematopoiesis in elderly twins: concordance, discordance, and mortality / J. W. Hansen, D. A. Pedersen, L. A. Larsen [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 135. – № 4. – P. 261-268. DOI: 10.1182/blood.2019001793

25. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes / D. P. Steensma, R. Bejar, S. Jaiswal [et al.] // *Blood*. – 2015. – Vol. 126. – № 1. – P. 9-16. DOI: 10.1182/blood-2015-03-631747

26. Clonal hematopoiesis with oncogenic potential (CHOP): Separation from CHIP and roads to AML / P. Valent, W. Kern, G. Hoermann [et al.] // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Vol. 20. – № 3. DOI: 10.3390/ijms20030789

27. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 β DNA probe / M. F. Fey, S. Liechti-Gallati, A. Von Rohr [et al.] // *Blood*. – 1994. – Vol. 83. – № 4. – P. 931-938.

28. Concordance for clonal hematopoiesis is limited in elderly twins / M. A. Fabre, T. McKerrell, M. Zwiebel [et al.] // *Blood*. – 2020. – Vol. 135. – № 4. – P. 269-273. DOI: 10.1182/blood.2019001807

29. Cytarabine dose of 36 g/m² compared with 12 g/m² within first consolidation in acute myeloid leukemia: Results of patients enrolled onto the prospective randomized AML96 study / M. Schaich, C. Röllig, S. Soucek [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. – № 19. – P. 2696-2702. DOI: 10.1200/JCO.2010.33.7303

30. Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia in a multicenter setting / N. Feller, V. H. J. Van Der Velden, R. A. Brooimans [et al.] // *Blood Cancer Journal*. – 2013. – Vol. 3. – № 8. DOI: 10.1038/bcj.2013.27

31. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies / Z. Li, X. Cai, C. L. Cai [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – № 17. – P. 4509-4518. DOI: 10.1182/blood-2010-12-325241

32. Desai, P. Clonal Hematopoiesis and risk of Acute Myeloid Leukemia / P. Desai, D. Hassane, G. J. Roboz // *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. – 2019. – Vol. 32. – № 2. – P. 177-185. DOI: 10.1016/j.beha.2019.05.007

33. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Vol. 129 / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade [et al.]. – 2017. – 424-447 p. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196

34. DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia / V. I. Gaidzik, D. Weber, P. Paschka [et al.] // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. 30-37. DOI: 10.1038/leu.2017.200

35. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / T. J. Ley, L. Ding, M. J. Walter [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol. 363. – № 25. –

P. 2424-2433. DOI: 10.1056/NEJMoa1005143

36. Döhner, H. Acute myeloid leukemia / H. Döhner, D. J. Weisdorf, C. D. Bloomfield // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Vol. 373. – № 12. – P. 1136-1152. DOI: 10.1056/NEJMra1406184

37. Fabre, M. A. The lifelong natural history of clonal hematopoiesis and its links to myeloid neoplasia / M. A. Fabre, G. S. Vassiliou // *Blood*. – 2024. – Vol. 143. – № 7. – P. 573-581. DOI: 10.1182/blood.2023019964

38. Gary Gilliland, D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / D. Gary Gilliland, J. D. Griffin // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – № 5. – P. 1532-1542. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0492

39. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia / T. J. Ley, C. Miller, L. Ding [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2013. – Vol. 368. – № 22. – P. 2059-2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689

40. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia / E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Bullinger [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2016. – Vol. 374. – № 23. – P. 2209-2221. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192

41. Guillaumot, M. The Impact of DNA Methylation in Hematopoietic Malignancies / M. Guillaumot, L. Cimmino, I. Aifantis // *Trends in Cancer*. – 2016. – Vol. 2. – № 2. – P. 70-83. DOI: 10.1016/j.trecan.2015.12.006

42. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: Data from the HOVON/SAKK AML 42A study / M. Terwijn, A. Kelder, P. C. Huijgens [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 31. – № 31. – P. 3889-3897. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.9628

43. Hourigan, C. S. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia / C. S. Hourigan, J. E. Karp // *Nature Reviews Clinical Oncology*. – 2013. – Vol. 10. – № 8. – P. 460-471. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.100

44. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication / P. Paschka, R. F. Schlenk, V. I. Gaidzik [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – № 22.

– P. 3636-3643. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.3762

45. Illumina, I. MiSeq – System Guide © 2019 Illumina, Inc. / I. Illumina. – 2019.

46. Illumina, I. Nextera XT DNA Library Prep – Reference Guide © 2019 Illumina, Inc. / I. Illumina. – 2019.

47. Impact of PTPN11 mutations on clinical outcome analyzed in 1529 patients with acute myeloid leukemia / S. Stasik, J. N. Eckardt, M. Kramer [et al.] // Blood Advances. – 2021. – Vol. 5. – № 17. – P. 3279-3289. DOI: 10.1182/bloodadvances.2021004631

48. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / F. Thol, F. Damm, A. Lüdeking [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29. – № 21. – P. 2889-2896. DOI: 10.1200/JCO.2011.35.4894

49. Indeterminate and oncogenic potential: CHIP vs CHOP mutations in AML with NPM1 alteration / L. V. Cappelli, M. Meggendorfer, C. Baer [et al.] // Leukemia. – 2022. – Vol. 36. – № 2. – P. 394-402. DOI: 10.1038/s41375-021-01368-1

50. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data / D. A. Arber, A. Orazi, R. P. Hasserjian [et al.] // Blood. – 2022. – Vol. 140. – № 11. – P. 1200-1228. DOI: 10.1182/blood.2022015850

51. Issa, G. C. Acute myeloid leukemia with IDH1 and IDH2 mutations: 2021 treatment algorithm / G. C. Issa, C. D. DiNardo // Blood Cancer Journal. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. 1-7. DOI: 10.1038/s41408-021-00497-1

52. Jan, M. Clonal evolution of acute leukemia genomes / M. Jan, R. Majeti // Oncogene. – 2013. – Vol. 32. – № 2. – P. 135-140. DOI: 10.1038/onc.2012.48

53. Kennedy, V. E. FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: Key Concepts and Emerging Controversies / V. E. Kennedy, C. C. Smith // Frontiers in Oncology. – 2020. – Vol. 10. – № December. – P. 1-20. DOI: 10.3389/fonc.2020.612880

54. Kiyoi, H. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development / H. Kiyoi, N. Kawashima, Y. Ishikawa // Cancer Science. – 2020. – Vol. 111. – № 2. – P. 312-322. DOI: 10.1111/cas.14274

55. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies / N. Williams, J. Lee, E. Mitchell [et al.] // *Nature*. – 2022. – Vol. 602. – № 7895. – P. 162-168. DOI: 10.1038/s41586-021-04312-6
56. Measurable residual disease as a biomarker in acute myeloid leukemia: theoretical and practical considerations / R. B. Walter, Y. Ofran, A. Wierzbowska [et al.] // *Leukemia*. – 2021. – Vol. 35. – № 6. – P. 1529-1538. DOI: 10.1038/s41375-021-01230-4
57. Measurable residual disease at induction redefines partial response in acute myeloid leukemia and stratifies outcomes in patients at standard risk without NPM1 mutations / S. D. Freeman, R. K. Hills, P. Virgo [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 36. – № 15. – P. 1486-1497. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.3425
58. Measurable residual disease of canonical versus non-canonical DNMT3A , TET2 , or ASXL1 mutations in AML at stem cell transplantation / M. Jentzsch, J. Grimm, M. Bill [et al.] // *Bone Marrow Transplantation*. – 2021. – P. 30-32. DOI: 10.1038/s41409-021-01407-6
59. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: Results of the United Kingdom MRC AML-15 trial / J. A. Liu Yin, M. A. O'Brien, R. K. Hills [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 120. – № 14. – P. 2826-2835. DOI: 10.1182/blood-2012-06-435669
60. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia / M. Jongen-Lavrencic, T. Grob, D. Hanekamp [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 378. – № 13. – P. 1189-1199. DOI: 10.1056/NEJMoa1716863
61. Montalban-Bravo, G. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia / G. Montalban-Bravo, C. D. DiNardo // *Future Oncology*. – 2018. – Vol. 14. – № 10. – P. 979-993. DOI: 10.2217/fon-2017-0523
62. Mutant DNMT3A: A marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia / A. F. T. Ribeiro, M. Pratcorona, C. Erpelinck-Verschueren [et al.] // *Blood*. – 2012. – Vol. 119. – № 24. – P. 5824-5831. DOI: 10.1182/blood-2011-07-367961
63. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases / V. Gelsi-Boyer, M. Brecqueville, R. Devillier [et al.] //

Journal of Hematology and Oncology. – 2012. – Vol. 5. – P. 1-6. DOI: 10.1186/1756-8722-5-12

64. Nardo, C. D. Di. Mutations in AML: Prognostic and therapeutic implications / C. D. Di Nardo, J. E. Cortes // Hematology. – 2016. – Vol. 2016. – № 1. – P. 348-355. DOI: 10.1182/asheducation-2016.1.348

65. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: Lyonization ratios vary with age / L. Busque, R. Mio, J. Mattioli [et al.] // Blood. – 1996. – Vol. 88. – № 1. – P. 59-65.

66. Ommen, H. B. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies / H. B. Ommen // Therapeutic Advances in Hematology. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 3-16. DOI: 10.1177/2040620715614529

67. Persistence of DNMT3A R882 mutations during remission does not adversely affect outcomes of patients with acute myeloid leukaemia / B. Bhatnagar, A. K. Einfeld, D. Nicolet [et al.] // British Journal of Haematology. – 2016. – Vol. 175. – № 2. – P. 226-236. DOI: 10.1111/bjh.14254

68. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia / M. Rothenberg-Thurley, S. Amler, D. Goerlich [et al.] // Leukemia. – 2018. – Vol. 32. – № 7. – P. 1598-1608. DOI: 10.1038/s41375-018-0034-z

69. Pollyea, D. A. Acute Myeloid Leukemia Version 2.2025, 01/27/25 © 2025 ® (NCCN Guidelines®) / D. A. Pollyea, [et al.] // National Cancer Comprehensive Network. – 2025.

70. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals / S. Abelson, G. Collord, S. W. K. Ng [et al.] // Nature. – 2018. – Vol. 559. – № 7714. – P. 400-404. DOI: 10.1038/s41586-018-0317-6

71. Predictors of outcomes in adults with acute myeloid leukemia and KMT2A rearrangements / G. C. Issa, J. Zarka, K. Sasaki [et al.] // Blood Cancer Journal. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 1-10. DOI: 10.1038/s41408-021-00557-6

72. Prevalence and Clinical Effect of IDH1 and IDH2 Mutations Among Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Patients / S. Aref, E. S. Kamel Areida,

M. F. Abdel Aal [et al.] // *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. – 2015. – Vol. 15. – № 9. – P. 550-555. DOI: 10.1016/j.clml.2015.05.009

73. Prognostic Importance of C-KIT Mutations in Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review / H. Ayatollahi, A. Shajiei, M. H. Sadeghian [et al.] // *Hematology/ Oncology and Stem Cell Therapy*. – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-7. DOI: 10.1016/j.hemonc.2016.08.005

74. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia / E. Jourdan, N. Boissel, S. Chevret [et al.]. – 2013. – Vol. 121. – № 12. – P. 2213-2223. DOI: 10.1182/blood-2012-10-462879

75. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: Determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials / D. Grimwade, R. K. Hills, A. V. Moorman [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 3. – P. 354-365. DOI: 10.1182/blood-2009-11-254441

76. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: Results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group / V. I. Gaidzik, L. Bullinger, R. F. Schlenk [et al.] // *Journal of Clinical Oncology*. – 2011. – Vol. 29. – № 10. – P. 1364-1372. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7926

77. Shlush, L. I. Age-related clonal hematopoiesis / L. I. Shlush // *Blood*. – 2018. – Vol. 131. – № 5. – P. 496-504. DOI: 10.1182/blood-2017-07-746453

78. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis / P. Desai, N. Mencia-Trinchant, O. Savenkov [et al.] // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24. – № 7. – P. 1015-1023. DOI: 10.1038/s41591-018-0081-z

79. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists / M. M. Li, M. Datto, E. J. Duncavage [et al.] // *Journal of Molecular Diagnostics*. – 2017. – Vol. 19. – № 1. – P. 4-23.

80. Steensma, D. P. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of

indeterminate potential / D. P. Steensma // Hematology (United States). – 2018. – Vol. 2018. – № 1. – P. 264-269. DOI: 10.1182/asheducation-2018.1.264

81. Sun, Y. Epigenetic regulators in the development, maintenance, and therapeutic targeting of acute myeloid leukemia / Y. Sun, B. R. Chen, A. Deshpande // Frontiers in Oncology. – 2018. – Vol. 8. – № FEB. – P. 1-16. DOI: 10.3389/fonc.2018.00041

82. Targeted therapy in NPM1-mutated AML: Knowns and unknowns / R. Wang, P. Xu, L.-L. Chang [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – № September. – P. 1-10. DOI: 10.3389/fonc.2022.972606

83. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis / C. Quivoron, L. Couronné, V. Della Valle [et al.] // Cancer Cell. – 2011. – Vol. 20. – № 1. – P. 25-38. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.003

84. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation / K. Moran-Crusio, L. Reavie, A. Shih [et al.] // Cancer Cell. – 2011. – Vol. 20. – № 1. – P. 11-24. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.06.001

85. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics / W. C. Chou, S. C. Chou, C. Y. Liu [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118. – № 14. – P. 3803-3810. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339747

86. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study / K. H. Metzeler, K. Maharry, M. D. Radmacher [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29. – № 10. – P. 1373-1381. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.7742

87. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms / J. D. Khoury, E. Solary, O. Abla [et al.] // Leukemia. – 2022. – Vol. 36. – № 7. – P. 1703-1719. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1

88. The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases / J. Liang, Y. L. Wu, B. J. Chen [et al.] // International Journal of Biological Sciences. –

2013. – Vol. 9. – № 5. – P. 435-443. DOI: 10.7150/ijbs.6087

89. The challenges of sequencing by synthesis / C. W. Fuller, L. R. Middendorf, S. A. Benner [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2009. – Vol. 27. – № 11. – P. 1013-1023. DOI: 10.1038/nbt.1585

90. The Clinical impact of PTPN11 mutations in adults with acute myeloid leukemia / M. Alfayez, G. C. Issa, K. P. Patel [et al.] // *Leukemia*. – 2020. DOI: 10.1038/s41375-020-0920-z

91. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers / Z. Sondka, S. Bamford, C. G. Cole [et al.] // *Nature Reviews Cancer*. – 2018. – Vol. 18. – № 11. – P. 696-705. DOI: 10.1038/s41568-018-0060-1

92. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial / D. Grimwade, H. Walker, F. Oliver [et al.] // *Blood*. – 1998. – Vol. 92. – № 7. – P. 2322-2333.

93. The potential equivalents of tet2 mutations / S. Pasca, A. Jurj, M. Zdrengeha, C. Tomuleasa // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13. – № 7. – P. 1-12. DOI: 10.3390/cancers13071499

94. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies / A. H. Shih, O. Abdel-Wahab, J. P. Patel, R. L. Levine // *Nature Reviews Cancer*. – 2012. – Vol. 12. – № 9. – P. 599-612. DOI: 10.1038/nrc3343

95. Wang, R. The prognostic impact of tet oncogene family member 2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: A systematic-review and meta-analysis / R. Wang, X. Gao, L. Yu // *BMC Cancer*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-11. DOI: 10.1186/s12885-019-5602-8

96. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues - Revised 4th edition / S. H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris [et al.]. – Lyon, 2017.

97. Демидова И.А. Мутации гена нуклеофозмина при острых лейкозах / Демидова И.А. // *Клиническая онкогематология*. – 2018. – Vol. 1. – № 4. – P. 297-302.

98. Кашлакова А.И. Клональное кроветворение и острые миелоидные лейкозы / Кашлакова А.И., Бидерман Б.В., Паровичникова Е.Н. // *Онкогематология*.

– 2023. – Vol. 18. – № 3. – P. 92-101. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-3-92-101

99. Определение молекулярно-генетического профиля у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами методом секвенирования нового поколения / Кашлакова А.И. Паровичникова Е.Н., Бидерман Б.В., Сидорова Ю.В. [et al.] // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Vol. 65. – № 4. – P. 444-459. DOI: 10.35754/0234-5730-2020-65-4-444-459

100. Паровичникова, Е. Н. Клинические рекомендации: Острые миелоидные лейкозы / Е. Н. Паровичникова. – Москва, 2024.

101. Сидорова Ю.В. Тест-система и способ выявления А, В, D мутаций гена NPM1 для количественного определения минимальной остаточной болезни / Сидорова Ю.В., Северина Н.А., Судариков А.Б. – Российская Федерация, 2024.

102. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. Vol. 20 / L.-I. Lin, T.-C. Lin, W.-C. Chou [et al.]. – England, 2006. DOI: 10.1038/sj.leu.2404331

103. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. / S. P. Whitman, K. J. Archer, L. Feng [et al.] // Cancer research. – 2001. – Vol. 61. – № 19. – P. 7233-7239

104. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. / Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano [et al.] // Blood. – 2001. – Vol. 97. – № 8. – P. 2434-2439. DOI: 10.1182/blood.v97.8.2434

105. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. / M. Xie, C. Lu, J. Wang [et al.] // Nature medicine. – 2014. – Vol. 20. – № 12. – P. 1472-1478. DOI: 10.1038/nm.3733

106. Brownstein, M. J. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. / M. J. Brownstein, J. D. Carpten, J. R. Smith // BioTechniques. – 1996. – Vol. 20. – № 6. – P. 1004-1006,1008-1010. DOI: 10.2144/96206st01

107. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. / L. Dang,

D. W. White, S. Gross [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 462. – № 7274. – P. 739-744.
DOI: 10.1038/nature09132

108. CEBPA mutations in 4708 patients with acute myeloid leukemia: differential impact of bZIP and TAD mutations on outcome. / F. Taube, J. A. Georgi, M. Kramer [et al.] // *Blood*. – 2022. – Vol. 139. – № 1. – P. 87-103. DOI: 10.1182/blood.2020009680

109. Clonal origin for individual Burkitt tumours. / P. J. Fialkow, G. Klein, S. M. Gartler, P. Clifford // *Lancet (London, England)*. – 1970. – Vol. 1. – № 7643. – P. 384-386. DOI: 10.1016/s0140-6736(70)91517-5

110. Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis. Vol. 135 / M. F. Bezerra, A. S. Lima, M.-R. Piqué-Borràs [et al.]. – United States, 2020. DOI: 10.1182/blood.2019003339

111. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. / R. Kihara, Y. Nagata, H. Kiyoi [et al.] // *Leukemia*. – 2014. – Vol. 28. – № 8. – P. 1586-1595. DOI: 10.1038/leu.2014.55

112. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. / K. M. Murphy, M. Levis, M. J. Hafez [et al.] // *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. – 2003. – Vol. 5. – № 2. – P. 96-102. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60458-8

113. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. / H. Döhner, A. H. Wei, F. R. Appelbaum [et al.] // *Blood*. – 2022. – Vol. 140. – № 12. – P. 1345-1377. DOI: 10.1182/blood.2022016867

114. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. / S. Castaigne, C. Pautas, C. Terré [et al.] // *Lancet (London, England)*. – 2012. – Vol. 379. – № 9825. – P. 1508-1516. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60485-1

115. Fialkow, P. J. The origin and development of human tumors studied with cell markers. / P. J. Fialkow // *The New England journal of medicine*. – 1974. – Vol. 291. – № 1. – P. 26-35. DOI: 10.1056/NEJM197407042910109

116. Fialkow, P. J. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. / P. J.

Fialkow, S. M. Gartler, A. Yoshida // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1967. – Vol. 58. – № 4. – P. 1468-1471. DOI: 10.1073/pnas.58.4.1468

117. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. / S. P. Whitman, A. S. Ruppert, M. D. Radmacher [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 3. – P. 1552-1559. DOI: 10.1182/blood-2007-08-107946

118. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. / S. P. Whitman, K. Maharry, M. D. Radmacher [et al.] // *Blood*. – 2010. – Vol. 116. – № 18. – P. 3622-3626. DOI: 10.1182/blood-2010-05-283648

119. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. / A. J. Mead, D. C. Linch, R. K. Hills [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – № 4. – P. 1262-1270. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015826

120. Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia: final efficacy and safety updates from the open-label, phase III ALFA-0701 trial. / J. Lambert, C. Pautas, C. Terré [et al.] // *Haematologica*. – 2019. – Vol. 104. – № 1. – P. 113-119. DOI: 10.3324/haematol.2018.188888

121. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. / O. Rosnet, H. J. Bühring, S. Marchetto [et al.] // *Leukemia*. – 1996. – Vol. 10. – № 2. – P. 238-248.

122. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. / C. Lu, P. S. Ward, G. S. Kapoor [et al.] // *Nature*. – 2012. – Vol. 483. – № 7390. – P. 474-478. DOI: 10.1038/nature10860

123. Katoh, M. Functional and cancer genomics of ASXL family members. / M. Katoh // *British journal of cancer*. – 2013. – Vol. 109. – № 2. – P. 299-306. DOI: 10.1038/bjc.2013.281

124. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. / M. E. Figueroa, O. Abdel-Wahab, C. Lu [et al.] // *Cancer cell*. – 2010. – Vol. 18. – № 6. – P. 553-567. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.11.015

125. Li, H. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. / H. Li, R. Durbin // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2010. – Vol. 26. – № 5. – P. 589-595. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698

126. Linder, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. / D. Linder, S. M. Gartler // *Science (New York, N.Y.)*. – 1965. – Vol. 150. – № 3692. – P. 67-69. DOI: 10.1126/science.150.3692.67

127. López, D. J. Nucleophosmin, a multifunctional nucleolar organizer with a role in DNA repair. / D. J. López, J. A. Rodríguez, S. Bañuelos // *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*. – 2020. – Vol. 1868. – № 12. – P. 140532. DOI: 10.1016/j.bbapap.2020.140532

128. LYON, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). / M. F. LYON // *Nature*. – 1961. – Vol. 190. – P. 372-373. DOI: 10.1038/190372a0

129. Measurable residual disease monitoring provides insufficient lead-time to prevent morphologic relapse in the majority of patients with core-binding factor acute myeloid leukemia. / R. Puckrin, E. G. Atenafu, J. O. Claudio [et al.] // *Haematologica*. – 2021. – Vol. 106. – № 1. – P. 56-63. DOI: 10.3324/haematol.2019.235721

130. Miettinen, M. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. / M. Miettinen, J. Lasota // *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*. – 2005. – Vol. 13. – № 3. – P. 205-220. DOI: 10.1097/01.pai.0000173054.83414.22

131. Miller, S. A. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. / S. A. Miller, D. D. Dykes, H. F. Polesky // *Nucleic acids research*. – 1988. – Vol. 16. – № 3. – P. 1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215

132. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. / R. F. Schlenk, K. Döhner, J. Krauter [et al.] // *The New England journal of*

- medicine. – 2008. – Vol. 358. – № 18. – P. 1909-1918. DOI: 10.1056/NEJMoa074306
133. Nucleolar proteome dynamics. / J. S. Andersen, Y. W. Lam, A. K. L. Leung [et al.] // *Nature*. – 2005. – Vol. 433. – № 7021. – P. 77-83. DOI: 10.1038/nature03207
134. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. / Y. Yu, L. B. J. Maggi, S. N. Brady [et al.] // *Molecular and cellular biology*. – 2006. – Vol. 26. – № 10. – P. 3798-3809. DOI: 10.1128/MCB.26.10.3798-3809.2006
135. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. / E. Colombo, J.-C. Marine, D. Danovi [et al.] // *Nature cell biology*. – 2002. – Vol. 4. – № 7. – P. 529-533. DOI: 10.1038/ncb814
136. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. / W. Xu, H. Yang, Y. Liu [et al.] // *Cancer cell*. – 2011. – Vol. 19. – № 1. – P. 17-30. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.12.014
137. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. / M. R. Corces-Zimmerman, W.-J. Hong, I. L. Weissman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111. – № 7. – P. 2548-2553. DOI: 10.1073/pnas.1324297111
138. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. / U. Bacher, C. Haferlach, W. Kern [et al.] // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – № 5. – P. 2527-2537. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091215
139. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. / J. P. Patel, M. Gönen, M. E. Figueroa [et al.] // *The New England journal of medicine*. – 2012. – Vol. 366. – № 12. – P. 1079-1089. DOI: 10.1056/NEJMoa1112304
140. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. / S. Fröhling, R. F. Schlenk, J. Breitruck [et al.] // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – № 13. – P. 4372-4380. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1440
141. Prognostic value of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: A meta-analysis. / A. Zhang, S. Wang, Q. Ren [et al.] // *Asia-Pacific journal of clinical oncology*. – 2022. DOI: 10.1111/ajco.13897
142. Prognostic value of FLT3 mutations among different cytogenetic subgroups

in acute myeloid leukemia. / F. P. S. Santos, D. Jones, W. Qiao [et al.] // *Cancer*. – 2011. – Vol. 117. – № 10. – P. 2145-2155. DOI: 10.1002/cncr.25670

143. Rapid screening and sensitive detection of NPM1 (nucleophosmin) exon 12 mutations in acute myeloid leukaemia. / S. Scholl, L.-O. Mügge, O. Landt [et al.] // *Leukemia research*. – 2007. – Vol. 31. – № 9. – P. 1205-1211. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.12.011

144. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. / L. Busque, J. P. Patel, M. E. Figueroa [et al.] // *Nature genetics*. – 2012. – Vol. 44. – № 11. – P. 1179-1181. DOI: 10.1038/ng.2413

145. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. / M. Bienz, M. Ludwig, E. O. Leibundgut [et al.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2005. – Vol. 11. – № 4. – P. 1416-1424. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1552

146. Stein, E. M. Molecular Pathways: IDH2 Mutations-Co-opting Cellular Metabolism for Malignant Transformation. / E. M. Stein // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2016. – Vol. 22. – № 1. – P. 16-19. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0362

147. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. / P. S. Ward, J. Patel, D. R. Wise [et al.] // *Cancer cell*. – 2010. – Vol. 17. – № 3. – P. 225-234. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.01.020

148. The flt3/flk-2 ligand: receptor distribution and action on murine haemopoietic cell survival and proliferation. / J. E. Rasko, D. Metcalf, M. T. Rossner [et al.] // *Leukemia*. – 1995. – Vol. 9. – № 12. – P. 2058-2066.

149. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kin / P. D. Kottaridis, R. E. Gale, M. E. Frew [et al.] // *Blood*. – 2001. – Vol. 98. – № 6. – P. 1752-1759. DOI: 10.1182/blood.v98.6.1752

150. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. / H. Li, B. Handsaker,

A. Wysoker [et al.] // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2009. – Vol. 25. – № 16. – P. 2078-2079. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352

151. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. / Z. Lai, A. Markovets, M. Ahdesmaki [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44. – № 11. – P. e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227

152. Variable prognostic value of FLT3 internal tandem duplications in patients with de novo AML and a normal karyotype, t(15;17), t(8;21) or inv(16). / B. Kainz, D. Heintel, R. Marculescu [et al.] // *The hematology journal: the official journal of the European Haematology Association*. – 2002. – Vol. 3. – № 6. – P. 283-289. DOI: 10.1038/sj.thj.6200196

153. Wang, K. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. / K. Wang, M. Li, H. Hakonarson // *Nucleic acids research*. – 2010. – Vol. 38. – № 16. – P. e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603

154. Weissman, I. Stem cell research: paths to cancer therapies and regenerative medicine. / I. Weissman // *JAMA*. – 2005. – Vol. 294. – № 11. – P. 1359-1366. DOI: 10.1001/jama.294.11.1359

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Классификация острых миелоидных лейкозов и связанных новообразований (Всемирная организация здравоохранения, 2022 г.)**1. ОМЛ, определяемые генетическими аномалиями**ОМЛ с химерным геном *RUNX1::RUNX1T1*ОМЛ с химерным геном *CBFB::MYH11*ОПЛ с химерным геном *PML::RARA*ОМЛ с перестройками *KMT2A*ОМЛ с химерным геном *DEK::NUP214*ОМЛ с перестройками *MESOM*ОМЛ с химерным геном *RBM15::MRTFA*ОМЛ с химерным геном *BCR::ABL1*ОМЛ с перестройками *NUP98*ОМЛ с мутациями гена *NPM1*ОМЛ с мутациями гена *CEBPA*

ОМЛ, связанные с миелодисплазией

ОМЛ с другими генетическими нарушениями

2. ОМЛ, определяемые дифференцировкой

ОМЛ с минимальной дифференцировкой

ОМЛ без созревания

ОМЛ с созреванием

Острый миеломоноцитарный лейкоз

Острый моноцитарный лейкоз

Острый эритромиелоз

Острый мегакариобластный лейкоз

Острый базофильный лейкоз

3. Миелоидная саркома

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(справочное)

Классификация острых миелоидных лейкозов и связанных новообразований (Всемирная организация здравоохранения, 2016 г.)

1. ОМЛ с устойчивыми генетическими аномалиями

ОМЛ со сбалансированными транслокациями/инверсиями

ОМЛ с t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*

ОМЛ с inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*

Острый промиелоцитарный лейкоз с *PML-RARA*

ОМЛ с t(9;11)(p21.3;q23.3); *KMT2A-MLL3*

ОМЛ с t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*

ОМЛ с inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2, MECOM*

ОМЛ (мегакариобластный) с t(1;22)(p13.3;q13.1); *RBM15-MKLI*

ОМЛ с *BCR/ABL1*

ОМЛ с мутациями генов:

ОМЛ с мутациями гена *NPM1*

ОМЛ с биаллельной мутацией гена *CEBPA*

ОМЛ с мутациями гена *RUNX1*

2. ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией

3. Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей химиотерапией

4. ОМЛ, по-другому не специфицированные

ОМЛ с минимальной дифференцировкой

ОМЛ без созревания

ОМЛ с созреванием

Острый миеломоноцитарный лейкоз

Острый монобластный/моноцитарный лейкоз

Острый эритробластный лейкоз

Острый мегакариобластный лейкоз

Острый базофильный лейкоз

Острый панмиелоз с миелофиброзом

5. Миелоидная саркома

6. Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна

Транзиторный аномальный миелопоэз, связанный с синдромом Дауна

Миелоидный лейкоз, связанный с синдромом Дауна

ПРИЛОЖЕНИЕ В

(справочное)

Классификация острых миелоидных лейкозов (International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias) с указанием процентного содержания бластных клеток в костном мозге, необходимых для установления диагноза

Таблица В.1 – Классификация острых миелоидных лейкозов (International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias) с указанием процентного содержания бластных клеток в костном мозге, необходимых для установления диагноза

ОПЛ с t(15;17)(q24.1;q21.2)/ <i>PML::RARA</i> $\geq 10\%$
ОПЛ с другими перестройками <i>RARA</i> ¹ $\geq 10\%$
ОМЛ с t(8;21)(q22;q22.1)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с inv(16)(p13.1;q22) или t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с t(9;11)(p21.3;q23.3)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с другими перестройками <i>KMT2A</i> ² $\geq 10\%$
ОМЛ с t(6;9)(p22.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с inv(3)(q21.3;q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2; MECOM (EVII)</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с другими перестройками <i>MECOM</i> ³ $\geq 10\%$
ОМЛ с другими редкими рекуррентными транслокациями $\geq 10\%$
ОМЛ с t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> $\geq 20\%$
ОМЛ с мутациями гена <i>NPM1</i> $\geq 10\%$
ОМЛ с ин-фрейм мутациями bZIP <i>CEBPA</i> $\geq 10\%$
ОМЛ и МДС/ОМЛ с мутациями гена <i>TP53</i> 10-19% (ОМЛ/МДС) и $\geq 20\%$ (ОМЛ)
ОМЛ и МДС/ОМЛ с мутациями генов, связанными с миелодисплазией ⁴ 10-19% (ОМЛ/МДС) и $\geq 20\%$ (ОМЛ)
ОМЛ и МДС/ОМЛ с цитогенетическими аномалиями, связанными с миелодисплазией ⁵ 10-19% (ОМЛ/МДС) и $\geq 20\%$ (ОМЛ)
ОМЛ и МДС/ОМЛ, по-другому не специфицированные (NOS) 10-19% (ОМЛ/МДС) и $\geq 20\%$ (ОМЛ)
Миелоидная саркома
<p>Примечания:</p> <p>1) – ОМЛ с t(1;17)(q42.3;q21.2)/<i>IRF2BP2::RARA</i>; t(5;17)(q35.1;q21.2)/<i>NPM1::RARA</i>; t(11;17)(q23.2;q21.2)/<i>ZBTB16::RARA</i>; криптоическая inv(17q) или del(17)(q21.2q21.2)/<i>STAT5B::RARA</i>, <i>STAT3::RARA</i>; другие редкие гены - <i>TBL1XR1</i> (3q26.3), <i>FIP1L1</i> (4q12), <i>BCOR</i> (Xp11.4);</p> <p>2) – ОМЛ с t(4;11)(q21.3;q23.3)/<i>AFF1::KMT2A</i>; t(6;11)(q27;q23.3)/<i>AFDN::KMT2A</i>; t(10;11)(p12.3;q23.3)/<i>MLLT10::KMT2A</i>; t(10;11)(q21.3;q23.3)/<i>TET1::KMT2A</i>; t(11;19)(q23.3;p13.1)/<i>KMT2A::ELL</i>; t(11;19)(q23.3;p13.3)/<i>KMT2A::MLLT1</i>;</p> <p>3) – ОМЛ с t(2;3)(p11~23;q26.2)/<i>MECOM</i>::?; t(3;8)(q26.2;q24.2)/<i>MYC, MECOM</i>; t(3;12)(q26.2;p13.2)/<i>ETV6::MECOM</i>; t(3;21)(q26.2;q22.1)/<i>MECOM::RUNX1</i>;</p> <p>4) – ОМЛ с мутациями генов <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2</i>;</p> <p>5) – ОМЛ с комплексным кариотипом (≥ 3 не связанных клональных хромосомных aberrаций в отсутствие других группообразующих устойчивых перестроек), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) или del(17p), del(20q), и/или idic(X)(q13) (клональные aberrации)</p>

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(справочное)

Хромосомные aberrации, позволяющие стратифицировать пациентов с острыми миелоидными лейкозами в группу «С» (ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией) в рамках протокола «ОМЛ-21»

Таблица Г.1 – Хромосомные aberrации, позволяющие стратифицировать пациентов с острыми миелоидными лейкозами в группу «С» (ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией) в рамках протокола «ОМЛ-21»

1. Комплексный кариотип (≥ 3 хромосомных аномалий в отсутствие устойчивых генетических аномалий)
2. Несбалансированные аномалии кариотипа
-7 или del(7q)
del(5q) или t(5q)
i(17q) или t(17p)
-13 или del(13q)
del(11q)
del(12p) или t(12p)
idic(X)(13q)
3. Сбалансированные аномалии кариотипа
t(11;16)(q23.3;p13.3)
t(3;21)(q26.2;q22.1)
t(1;3)(p36.3;q21.2)
t(2;11)(p21;q23.3)
t(5;12)(q32;p13.2)
t(5;7)(q32;q11.2)
t(5;17)(q32;p13.2)
t(5;10)(q32;q21.2)
t(3;5)(q25.3;q35.1)

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

(справочное)

Дизайн протокола «ОМЛ-21» и схемы предусмотренных протоколом курсов лечения

Протокол многоцентрового исследования «ОМЛ-21» (лечение больных *de novo* острыми миелоидными лейкозами в возрасте 18-59 лет)



clinicaltrials.gov NCT05339204

Рисунок Д.1 – Дизайн протокола «ОМЛ-21»

Курс «7+3»

- Цитарабин 200 мг/м²/сут. в/в в виде постоянной инфузии, дни 1-7
- Даунорубин 60 мг/м²/сут. в/в в течение 10 мин, дни 1-3 (у пациентов с гиперлейкоцитозом дни введения даунорубина могут быть перенесены на дни 5-7)

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 8-21
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14

Курс «FLAG»

- Флударабин 25 мг/м²/сут. в/в в течение 30 минут за 4 часа до введения цитарабина, дни 1-5
- Цитарабин 1500 мг/м²/сут. в/в в течение 3 часов через 4 часа после завершения инфузии цитарабина, дни 1-5
- Г-КСФ – 5 мкг/кг/сут. п/к, начиная с 8 дня до выхода из цитопении

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 6-19
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-28

Курс «5+5»

- Цитарабин 50 мг/м² каждые 12 часов п/к, дни 1-5
- Меркаптопурин 30 мг/м² каждые 12 часов внутрь, дни 1-5

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 6-19
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-28

Курс «Aza-Ida-Ara-C»

- Азацитидин 75 мг/м²/сут. п/к с ежедневным чередованием мест инъекций, дни 1-3
- Идарубицин 3 мг/м²/сут. в/в в течение 10 минут, дни 4-10
- Цитарабин 15 мг/м² каждые 12 часов п/к, дни 4-17

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 11-24
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14

Курс «Dac+Ven»

- Децитабин 20 мг/м²/сут. в/в в течение часа, дни 1-5
- Венетоклакс 400 мг/сут. внутрь, дни 3-28 дни (дни 1-2 – эскалация дозы по схеме: день 1 – 100 мг, день 2 – 200 мг)

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14

Курс «Aza+Ven»

- Азацитидин 75 мг/м²/сут. п/к с ежедневным чередованием мест инъекций, дни 1-7
- Венетоклакс 400 мг/сут. внутрь, дни 3-28 дни (дни 1-2 – эскалация дозы по схеме: день 1 – 100 мг, день 2 – 200 мг)

При выявлении мутаций гена *FLT3* могут быть назначены ингибиторы тирозинкиназ:

- Мидостаурин 50 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14
- Сорафениб 400 мг 2 р/сут. внутрь, дни 1-14