

*На правах рукописи*

**КОСТРОМА  
ИВАН ИВАНОВИЧ**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ  
БОЛЬНЫХ НЕБЛАГОПРИЯТНЫМИ ВАРИАНТАМИ  
ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА И  
МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

14.01.21 – гематология и переливание крови

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

Санкт-Петербург  
2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

**Научные руководители:**

**Грицаев Сергей Васильевич**, доктор медицинских наук

**Капустин Сергей Игоревич**, доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Рукавицын Олег Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, начальник гематологического центра ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н.Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, главный гематолог Министерства обороны Российской Федерации;

**Зубаровская Людмила Степановна**, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела детской онкологии, гематологии и трансплантологии НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой государственного бюджетного образовательного учреждения «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного Совета Д 208.074.01 при ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» по адресу: 191024, \_\_\_\_\_ г. Санкт-Петербург, ул. 2-ая Советская, д.16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.  
Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Глазанова Татьяна Валентиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы и степень ее разработанности

Отличительной особенностью миелодиспластического синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) является вариабельность клинических, гематологических, гистологических и молекулярно-генетических показателей [Dohner H. et al., 2010; Грицаев С.В. и соавт., 2011; Савченко В.Г. и соавт., 2014]. Отражением биологической гетерогенности ОМЛ является разный ответ на проводимую терапию, проявляющийся, в частности, резистентностью к стандартным курсам индукции ремиссии (ИР) или рецидивом на фоне проводимой постремиссионной химиотерапии (ХТ) [Weick J.K. et al., 1996; Грицаев С.В. и соавт., 2014; Савченко В.Г. и соавт., 2014].

Лечение рецидивов, особенно ранних, диагностированных во время или непосредственно после высокодозной химиотерапии (ВДХТ), и резистентных вариантов ОМЛ – одна из сложнейших задач современной онкогематологии, т.к. на период поиска HLA-совместимого донора необходимо решить 2 принципиальные задачи: существенно снизить объем патологического клона и при этом сохранить удовлетворительный соматический статус больного. Возможности ВДХТ по преодолению резистентности лейкозных клеток ограничены, а риск возникновения тяжелых, сопряженных с летальным исходом, токсических осложнений от повреждающего воздействия кумулятивных доз химиопрепаратов (ХП) велик. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка комбинированных схем ХТ низкой интенсивности [Савченко В.Г. и соавт., 2014; Liu L. et al., 2014; Freyer C.W. et al., 2015].

Одной из перспективных опций является добавление кладрибина в состав курса с введением низкодозового цитарабина (Ара-Ц) [Wrzesien-Kus A. et al., 2003]. Единичные сообщения в литературе и отсутствие указаний на подобные комбинации в национальных руководствах определяют актуальность клинической апробации схемы “малые дозы Ара-Ц с кладрибином”.

Непосредственное участие эпигенетических механизмов в лейкозогенезе определило показания для включения гипометилирующих препаратов (азануклеозиды) в алгоритмы лечения больных ОМЛ и МДС высокого риска, которым по разным причинам не может быть назначена ВДХТ [Fenaux P. et al., 2009; Грицаев С.В., 2015]. Имеющиеся публикации свидетельствуют об эффективности децитабина (Дако) и 5-азацитина (5-Аза) у части больных миелоидными неоплазиями [Steensma D. P. et al., 2009; Cashen A.F. et al., 2010; Quintas-Cardama A. et al., 2012; Pleyer L. et al., 2014].

Однако, принимая во внимание особенности механизма действия, для сохранности достигнутого ответа рекомендуется проведение постоянной терапии азануклеозидами. В связи с этим особую актуальность представляет выявление клинико-гематологических показателей, ассоциированных с вероятностью достижения ответа, и определение вариантов ответа, сопряженных с улучшением общей выживаемости (ОВ). Решение данной проблемы позволит научно обосновать целесообразность назначения и длительного введения азануклеозидов, а с другой стороны – выделить группу больных, которым оправдано усиление терапии гипометилирующими препаратами посредством их комбинации с цитостатиками.

Кариотип – высокоинформативный прогностический показатель, который с высокой вероятностью стратифицирует больных ОМЛ и МДС на группы риска [Dohner H. et al., 2010; Grimwade D. et al., 2010; Greenberg P.L. et al., 2012]. Многообразие вариантов цитогенетических повреждений, обнаруживаемых у больных миелоидными неоплазиями, является основанием для дальнейшего определения прогностической ценности отдельных хромосомных aberrаций. Одним из новых прогностических вариантов кариотипа, обнаружение которого ассоциировано

со значимым ухудшением ОВ, является моносомный кариотип [Breems D.A. et al., 2008; Medeiros V.C. et al., 2010; Patnaik M.M. et al., 2012; Rogers H.J. et al., 2014].

В то же время нерешенной и весьма актуальной остается проблема вариабельности течения ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом, что представляется важным с точки зрения планирования поиска HLA-совместимого донора и выполнения аллогенной ТГСК (аллоТГСК). Не менее актуальной остается проблема сроков интенсификации противолейкозной ХТ: или на этапе ИР, или в постремиссионном периоде. Тем самым анализ ОВ больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом поможет сформулировать новые положения алгоритма лечения больных миелоидными неоплазиями.

Один из механизмов лечебного действия азануклеозидов обусловлен реэкспрессией генов-супрессоров опухоли в результате ингибирования ДНК-метилтрансфераз [Issa J.P. , 2004, 2010; Baylin S.B., 2005]. В то же время было продемонстрировано, что aberrантное метилирование большого числа генов сопряжено с прогрессией и значимым ухудшением эффективности гипометилирующих препаратов [Aggerholm A. et al., 2006; Grovdal M. et al., 2007; Figueroa M.E. et al., 2010; Abaigar M. et al., 2013]. Не исключено, что этим, отчасти, объясняются низкие показатели ответа и ОВ у больных ОМЛ и МДС с множественными хромосомными aberrациями.

Вместе с тем в литературе практически отсутствуют данные об ассоциации aberrантного статуса метилирования принципиальных генов, принимающих непосредственное участие в лейкозогенезе, с отдельными клинико-гематологическими вариантами ОМЛ и МДС. Тем самым, особую актуальность приобретает проблема изучения статуса метилирования не менее 3-5 принципиальных генов одновременно и поиска корреляции aberrантного статуса генов с отдельными вариантами миелоидных неоплазий. Выделение морфологических и цитогенетических вариантов, при которых обнаруживается гиперметилирование 3-5 генов, может быть основанием для интенсификации терапии путем добавления ХП к азануклеозидам. Решение данной проблемы послужит основанием для инициации новых клинических исследований и предоставит возможность внесения корректив в алгоритм лечения больных ОМЛ и МДС высокого риска в виде ранней модификации терапии больных с гиперметилированием избыточного числа генов. Обнаружение aberrантного метилирования у значительного числа больных МДС низкого риска может рассматриваться как обоснование включения азануклеозидов в схемы лечения больных без избытка бластных клеток.

### **Цель исследования**

Исследовать эффективность отдельных вариантов терапии низкой интенсивности больных неблагоприятными вариантами ОМЛ и МДС и разработать способы дальнейшего улучшения результатов их лечения на основе оценки прогностической значимости моносомного кариотипа, статуса метилирования генов  $p15^{INK4b}$ ,  $SOX7$  и антагонистов сигнального пути Wnt.

### **Задачи исследования**

1. Изучить клиническую эффективность новой схемы комбинированной терапии “малые дозы цитарабина с кладрибином” больных рецидивом и резистентным вариантом ОМЛ.
2. Определить частоту и характер ответа больных ОМЛ и МДС на терапию азануклеозидами (децитабин, 5-азациитидин), а также клинико-гематологические показатели, ассоциированные с улучшением общей выживаемости.
3. Установить особенности клинического течения заболевания у больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом.

4. Изучить статус метилирования генов  $p15^{INK4b}$ ,  $SOX7$  и антагонистов сигнального пути Wnt у больных ОМЛ и МДС и установить ассоциацию aberrантного статуса метилирования с морфологическими вариантами заболеваний и характером цитогенетических поломок.

#### **Научная новизна**

В процессе выполнения исследовательской работы были установлены эффективность и приемлемый профиль токсичности терапии низкой интенсивности “малые дозы цитарабина с кладрибином”, обосновывающие целесообразность включения ее в алгоритм лечения больных рецидивом и резистентным ОМЛ, которым по разным причинам не может быть назначена высокодозная химиотерапия.

При анализе результатов лечения больных ОМЛ и МДС азануклеозидами установлены клиничко-гематологические показатели, ассоциированные с эффективностью терапии, что позволяет оптимизировать условия терапии.

Выявлена гетерогенность групп больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом по клиническим, гематологическим и цитогенетическим показателям, а также по эффективности проводимой терапии. Продемонстрирована крайне низкая выживаемость основной части больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом, что дает основание рекомендовать инициацию лечения с курсов высокодозной химиотерапии.

Впервые обнаружено aberrантное метилирование генов у основной части больных благоприятными вариантами МДС, а также возрастание числа гиперметилированных генов по мере прогрессии МДС в формы с избыточным содержанием бластных клеток.

Впервые выявлено aberrантное метилирование значительного числа генов у больных ОМЛ с множественными хромосомными aberrациями и ОМЛ с миелодисплазией, течение которых характеризуется крайне неблагоприятным прогнозом. Полученные данные свидетельствуют о непосредственном вовлечении aberrантного метилирования островков CpG промотерных областей генов в механизмы лейкозогенеза и позволяют внести коррективы в алгоритм лечения миелоидных неоплазий.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Расширен список противорецидивных схем лечения больных ОМЛ новой схемой терапии низкой интенсивности, посредством которой возможно редуцировать объем лейкозного клона и стабилизировать соматический статус больных на период подготовки к АллоТГСК.

Выявлены факторы, которые ассоциированы с улучшением общей выживаемости больных миелоидными неоплазиями при терапии азануклеозидами.

Продемонстрирована низкая эффективность стандартных индукционных курсов и высокая частота рецидивов у больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом.

Получены данные, которые позволяют рекомендовать модификацию отдельных элементов алгоритма лечения больных ОМЛ и МДС.

Обнаружены особенности статуса метилирования генов  $p15^{INK4b}$ ,  $SOX7$  и антагонистов сигнального пути Wnt у больных ОМЛ и МДС, которые являются основанием для разработки новых подходов в лечении больных неблагоприятными вариантами ОМЛ и МДС.

#### **Методология и методы исследования**

В работе использованы общенаучные методы исследования (проспективный и ретроспективный анализ), а также клинические, гематологические методы исследования, методы математической статистики. Функциональное состояние органов и систем у больных оценивали на основании клиничко-лабораторного и инструментального обследования.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. У больных неблагоприятными вариантами ОМЛ и МДС, которым не показана стандартная или высокодозная химиотерапия, в ряде случаев эффективной может быть терапия низкой интенсивности: малые дозы цитарабина с кладрибином, гипометилирующие препараты.

2. Эффективность терапии низкой интенсивности у больных неблагоприятными вариантами ОМЛ и МДС (частота ответа, длительность общей выживаемости) зависит от совокупности биологических и клинико-гематологических показателей: вида хромосомных aberrаций (внутрихромосомные, межхромосомные или изохромосомные), длительности курса терапии, варианта ответа.

3. Принципиальным условием, определяющим выбор интенсивности индукционных курсов при диагностике ОМЛ и МДС, являются результаты цитогенетических исследований.

4. Одним из механизмов формирования неблагоприятного варианта ОМЛ и МДС являются эпигенетические механизмы, в частности, aberrантное метилирование генов, принимающих участие в лейкозогенезе, что может рассматриваться в качестве принципиального условия при выборе интенсивности лечебного пособия.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов проведенного исследования подтверждается объемом наблюдений, набором и характером оцениваемых показателей, использованием современных статистических программ для обработки полученных данных.

Основные положения, материалы и результаты работы доложены и обсуждены на заседании школы для гематологов – «Миелодиспластический синдром» (Санкт-Петербург, 2013); II и III Конгрессах гематологов России (Москва, 2014, 2016); III Евразийском гематологическом форуме (Новосибирск, 2014); VII съезде российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015); IX Международном гематологическом симпозиуме памяти Р.М. Горбачевой (Сочи, 2015); 13-ом Международном симпозиуме по проблемам МДС (Вашингтон, 2015); 20 и 21 Конгрессах Европейской ассоциации гематологов (Вена, 2015; Копенгаген, 2016); Конференции "Лейкозы и лимфомы. Терапия и Фундаментальные исследования" (Москва, 2015); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Полиморбидность патологии – важнейшая проблема современного скоромощного многопрофильного стационара», посвященная 55-летию СПб ГБУЗ «Городская больница № 15» (Санкт-Петербург, 2015); IV Евразийском гематологическом форуме XXII EAFO Oncopathology Seminar «Clinical Hematology», посвященного памяти профессора А.А. Новика (Санкт-Петербург, 2016); II Евразийском конгрессе «Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства» (Санкт-Петербург, 2016)

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, из которых 8 статей – в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

### **Реализация работы**

Результаты диссертационной работы внедрены в практическую деятельность клинического отделения химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, отделений гематологии СПбГБУЗ «Городская больница № 15» и СПбГБУЗ «Александровская больница» г. Санкт-Петербурга.

### **Личное участие автора**

Автором сформулирована цель и определены задачи исследования, предложены оптимальные пути их решения с использованием оригинальных схем лечения и методов

исследования. Диссертант принимал непосредственное участие в разработке концепции новой схемы терапии низкой интенсивности с применением малых доз цитарабина и кладрибина, самостоятельно проводил заготовку и обработку биологических материалов для последующих лабораторных исследований, выполнил статистический анализ полученных результатов.

### Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики пациентов и методов проведенных исследований, 4 глав результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы, включающего 11 отечественных и 129 зарубежных источников. Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста и содержит в своем составе 17 таблиц и 14 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объект, материалы и методы исследования

Исследования выполнены на базе клинического отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, отделения гематологии СПбГБУЗ «Городская больница № 15» и СПбГБУЗ «Александровская больница» г. Санкт-Петербурга.

### Объект исследования

В работе использованы результаты обследования, лечения и наблюдения 166 больных онкогематологическими заболеваниями: 87 – ОМЛ, 72 – МДС и 7 – хроническими миелопролиферативными неоплазиями (ХМПН). Обследование и лечение инициировалось после подписания больными информированного согласия. Вторичный МДС, как результат ранее проведенной химиотерапии (ХТ) и/или лучевой терапии, имел место у 4 больных МДС и 5 ОМЛ. Распределение больных по нозологическим вариантам и виду проведенного исследования представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Распределение больных по нозологическим вариантам и виду исследования

Исследование	Больные, n			Доноры
	ОМЛ	МДС	ХМПН	
Малые дозы Ара-Ц + кладрибин	9	1		
Дакоген	6	14	7	
5-азациитидин	14	13		
Моносомный кариотип	43	33		
Метилирование генов <i>p15<sup>INK4B</sup></i> и <i>SOX7</i>	17	20		
Метилирование генов <i>p15<sup>INK4B</sup></i> , <i>SOX7</i> и антагонистов Wnt	57	46		40

В исследовании по изучению клинической эффективности разработанной схемы “малые дозы Ара-Ц с кладрибином” было включено 10 больных: 9 ОМЛ и 1 МДС с избытком бластов. При этом у 2 больных ОМЛ был результатом трансформации предшествующего МДС или ХМПН.

Для изучения эффективности Дако был проведен ретроспективный анализ историй болезни и карт амбулаторного наблюдения 27 больных, включая 14 больных МДС, 6 ОМЛ и 7 ХМПН.

Ретроспективная оценка результатов лечения 5-Аза проведена по данным обследования и наблюдения 13 больных МДС, включая 1 вторичным МДС, и 14 больных ОМЛ.

Для анализа влияния моносомного кариотипа на течение заболевания были проанализированы данные 76 больных, из которых 43 ОМЛ и 33 МДС. В данной группе вторичный ОМЛ и вторичный МДС имели место у 5 и 3 больных соответственно.

Статус метилирования генов  $p15^{INK4B}$  и  $SOX7$  был изучен в образцах ДНК 20 больных МДС и 17 больных ОМЛ. Для изучения статуса метилирования 5 генов ( $p15^{INK4B}$ ,  $SOX7$  и антагонистов сигнального пути Wnt) были использованы образцы ДНК 46 больных МДС и 57 больных ОМЛ.

#### **Лабораторные методы исследования**

В диссертационной работе использовалась терминология, принятая в классификации ВОЗ 2008 года. Разграничительный уровень бластных клеток в костном мозге (КМ) между МДС и ОМЛ был 20%. Диагностика миелоидных неоплазий основывалась на результатах комплексного обследования, включая анализ морфологических препаратов периферической крови (ПК) и КМ с дифференцированным подсчетом не менее 200 клеток в мазках ПК и 500 клеток в мазках КМ. Миелоидную и моноцитарную природу бластных клеток устанавливали по результатам окраски на миелопероксидазу, хлорацетатэстеразу, кислую фосфатазу, неспецифическую эстеразу, не ингибируемую фторидом натрия, а также липиды и полисахариды. При первичной диагностике МДС обязательным элементом обследования больных была трепанобиопсия с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием, проводимым при затруднениях в диагностике с использованием стандартных морфологических и гистологических методов. Для иммунофенотипирования бластных клеток использовалась панель моноклональных антител к суМРО, суТdT, CD33, CD13, CD14, CD34 и HLA-DR.

Кариотип изучали стандартным GTG-методом, с анализом не менее 20 метафаз. Мутационный статус генов определяли методом ПЦР, статус метилирования генов изучали посредством метилспецифической ПЦР (methylation-specific PCR, MSP).

#### **Статистические методы исследования**

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel Microsoft и STATISTICA 10.0. Анализ ОБ и БРВ выживаемости проводили с использованием метода Каплана-Майера. Точкой отсчета для вычисления ОБ являлось время диагностики ОМЛ или МДС. Показатели БРВ рассчитывали от даты констатации ПР. Статистически достоверными считали различия при значимости  $p < 0,05$ .

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **Схема «малые дозы Ара-Ц с кладрибином»**

На основании данных литературы и многолетнего опыта, накопленного в клиническом отделе Гематологии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, была разработана схема для лечения больных с рецидивами и резистентными вариантами ОМЛ и МДС, которая включала: Цитарабин по 10-15 мг/м<sup>2</sup> подкожно 2 раза в день в течение 14 последовательных дней и Кладрибин по 5 мг/м<sup>2</sup> внутривенно в виде 2-х часовой инфузии в течение 1-5 дней. Повторный курс планировался в случае снижения содержания бластных клеток в контрольной миелограмме не менее чем на 50% по сравнению с исходным уровнем.

### **Клиническая эффективность применения схемы «малые дозы цитарабина с кладрибином» при лечении больных ОМЛ и МДС**

В исследование было включено 10 больных в возрасте 26-58 лет, с медианой 48 лет после получения положительного заключения Этического совета ФГБУ РосНИИГТ. Распределение по нозологическим вариантам: 7 больных ОМЛ *de novo*, 1 ОМЛ (трансформация из предшествующего МДС), 1 РАИБ-2 и 1 больной с лейкозной трансформацией предшествующего ХМПН. Первично-резистентный ОМЛ был диагностирован у четырех больных. Рецидив ОМЛ имел место у трех больных: у 2 ранних и у 1 поздний. Стандартная противорецидивная терапия была неэффективной. Больной РАИБ-2 не ответил на



индукционную терапию «7+3», а ВДХТ не назначалась из-за тяжелого инфекционного осложнения. Многочисленные курсы ХТ получали больные острым миелоидным лейкозом с миелодисплазией (ОМЛ с МД) и с лейкозной трансформацией ХМПН до включения в исследование.

Нормальный кариотип выявлен у 5 больных. При этом у одной больной при FISH исследовании обнаружен химерный ген *RUNX1-RUNX1T1*, соответствующий транслокации t(8;21). У двух больных обнаружена одиночная хромосомная aberrация в виде делеции длинного плеча 9 хромосомы. Сочетанное повреждение 2 хромосом имело место у 1 больной. У двух больных выявлен комплексный кариотип, соответствующий критериям моносомного. При этом в одном случае множественные хромосомные aberrации обнаружены при рецидиве, тогда как в предшествующий период кариотип был нормальный.

Мутации обнаружены у 2 больных: мутация *FLT3-ITD* у больной ОМЛ с МД и мутация *c-KIT* у больной ОМЛ, у которой методом FISH был выявлен химерный ген *RUNX1-RUNX1T1*.

По статусу ECOG распределение больных было следующим: 1 степень – 1 больной, 2 степень – 6 больных и 3 степень – 3 больных.

Перед началом первого курса концентрация гемоглобина варьировала от 65 до 120 г/л (медиана 85 г/л), содержание лейкоцитов от 1,3 до  $42,0 \times 10^9/\text{л}$  (медиана  $3,0 \times 10^9/\text{л}$ ) и тромбоцитов от 3 до  $290 \times 10^9/\text{л}$  (медиана  $99 \times 10^9/\text{л}$ ).

Количество проведенных курсов комбинированной терапии было от 1 до 2. Во всех случаях доза и длительность введения кладрибина соответствовали утвержденной схеме. Сроки введения Ара-Ц были соблюдены только у 2 больных. Одному из больных с первично-резистентным вариантом ОМЛ введения Ара-Ц были продолжены до 21 дня включительно из-за персистирующей бластемии и относительно благоприятного соматического статуса. Длительность повторного курса у этого больного составила 14 дней. У остальных 7 больных сроки введения Ара-Ц были редуцированы до 7-12 дней из-за тяжелых инфекционных осложнений, развившихся на фоне нейтропении 3-4 степени и/или неблагоприятного соматического статуса.

После первого курса полная ремиссия (ПР) была зафиксирована у 2 больных, у одного из которых одновременно была констатирована и цитогенетическая ремиссия. У 3 больных была достигнута частичная ремиссия (ЧР). Ответа на терапию не было у 5 больных. У одного больного, несмотря на неэффективность проведенного курса, отмечена стабилизация уровня бластных клеток в костномозговом пунктате.

Гематологический эффект был зафиксирован у больных ОМЛ *de novo* с миелоидной и моноцитарной природой бластных клеток как при рецидиве болезни, так и резистентном варианте ОМЛ, независимо от варианта кариотипа. У 2 больных снижение объема лейкозных клеток сопровождалось улучшением соматического статуса, что позволило рассматривать их в качестве потенциальных кандидатов на АллоТГСК. Трем больным была выполнена АллоТГСК.

У больного с множественными хромосомными aberrациями на момент инициации режима кондиционирования (через 2 месяца после достижения ПР) установлено прогрессирование с нарастанием уровня бластных клеток в пунктате КМ. Одному больному в связи с улучшением соматического статуса и значительным снижением объема лейкозных клеток в период поиска HLA-совместимого донора была иницирована терапия 5-Аза. После завершения первого курса зарегистрирована нейтропения и тромбоцитопения 3-4 степени у 10 и 9 больных соответственно.

Фебрильная нейтропения имела место у 2 больных. В одном случае диагностирована пневмония. Сепсис, вызванный эпидермальным стафилококком, был верифицирован у одного

больного. Кроме того в единичных наблюдениях имели место гипоальбуминемия, сиалоаденит, ассоциированный с цитомегаловирусной инфекцией, обострение хронического гастрита, мукозит, токсический гепатит, энтеропатия. Перечисленные осложнения были умеренной степени тяжести. Необходимость в трансфузиях донорских эритроцитов и тромбоконцентрата была у 10 и 9 больных, соответственно. В течение первых 8 недель лечения не было зарегистрировано ни одного случая смерти.

#### Эффективность децитабина и факторы, ассоциированные с ответом

Все больные, кроме одного, получали 5-дневную схему (внутривенное введение Дако 20 мг/м<sup>2</sup> в течение 1 часа однократно в сутки в 1-5 последовательные дни). Суммарная доза Дако на курс составляет 100 мг/м<sup>2</sup>. Курс планировался каждые 28 дней.

Проанализированы данные 27 больных в возрасте 27-76 лет, с медианой 62 года. Распределение больных по нозологическим вариантам было следующим: 14 МДС (2 РАИБ-1 и 12 РАИБ-2), 6 ОМЛ, 4 хроническим миеломоноцитарным лейкозом (ХММОЛ) и 7 ХМПН. Все случаи МДС и ОМЛ были *de novo*. Больные ХММОЛ и ХМПН были объединены в одну группу и представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика больных, получивших терапию дакогеном

Показатели	МДС	ОМЛ	ХМПН
Медиана возраста, лет	60 (37-76)	66,5 (37-75)	59 (38-65)
Кариотип, n (%)			
Нормальный	4 (28,6)	2 (33,3)	5 (71,4) <sup>1</sup>
Комплексный	3 (21,4)	3 (50,0)	
Другие	7 (50,0)		2 (28,6)
НД		1 (16,7)	
Генотип, n (%)			
<i>FLT3<sup>-</sup>/NPM1<sup>-</sup></i>	11 (78,6)	5 (83,3)	2 (50,0)
<i>FLT3<sup>+</sup>/NPM1<sup>+</sup></i>	1 (7,1)		1 (25,0)
НД	2 (14,3)	1 (16,7)	1 (25,0)
Индекс коморбидности, n (%)			
Низкий	2 (14,3)	2 (33,3)	5 (71,4)
Промежуточный	8 (57,1)	2 (33,3)	2 (28,6)
Высокий	4 (28,6)	2 (33,3)	

(Примечание.<sup>1</sup> - больные ХММОЛ)

В качестве первой линии терапии децитабин был назначен 13 больным: 8 МДС, 2 ОМЛ и 3 ХМПН. Выбор децитабина для лечения больных ОМЛ был обусловлен 2 причинами: возрастом и кардиальной коморбидностью. Показания у других 14 больных были следующие. Трансформация МДС в ОМЛ или прогрессия ХМПН с нарастанием на фоне ХТ (6 больных). Неэффективность или резистентность ранее проведенной ХТ (7 больных). Тяжелые токсические осложнения (1 больной) (таблица 3). Общее количество проведенных курсов варьировало от 1 до 16, медиана 6. Из 6 больных ОМЛ только 1 получил 3 курса. В остальных случаях терапия была прервана после первого курса по причине развития инфаркта миокарда (1 больной) или нарастания процента бластных клеток в ПК и КМ (4 больных). Децитабин в дозе 135 мг/м<sup>2</sup>/курс был назначен больному резистентной формой ОМЛ. В остальных случаях была применена схема с курсовой дозой 100 мг/м<sup>2</sup>.

Общий ответ получен у 13 больных (48,1%). Вариантами ответа были ПР, костномозговая ремиссия (к/МР) и стабилизация со снижением потребности в трансфузиях донорских эритроцитов соответственно у 2 (7,4%), 3 (11,1%) и 8 (29,6%) больных. Т.о., снижение количества бластных клеток в КМ ниже уровня 5% было зафиксировано у 5 больных (18,5%).

Таблица 3 – Показания к назначению децитабина, n (%)

Показания	МДС	ОМЛ	ХМПН	Всего
Первая линия	8 (57,1)	2 (33,3)	3 (42,9)	13 (48,1)
Прогрессия/трансформация	4 (28,6)	-	2 (28,6)	6 (22,2)
Неэффективность	2 (14,3)	3 (50,0)	2 (28,6)	7 (26,0)
Токсичность ХТ	-	1 (16,7)	-	1 (3,7)

Распределение больных, ответивших на лечение, по нозологическим вариантам было следующим: 5 из 7 больных ХМПН (71,2%) и 8 из 14 больных МДС (57,1%). Полная ремиссия констатирована у 2 больных МДС, при этом у одного из них одновременно была и цитогенетическая ремиссия (ЦР). К/мР установлена у 1 больного МДС и 2 больных ХММОЛ. Терапия была эффективной у больных с нормальным кариотипом (6 больных), одиночными (5 больных) и множественными (1 больной) хромосомными aberrациями.

Ни у одного из 8 больных, у которых был изучен мутационный статус генов *FLT3* и *NPM1*, не было обнаружено мутации *FLT3-ITD*. В то же время у 2 больных, у одного из которых имелся нормальный кариотип, а у другого – моносомия 7, была выявлена мутация в гене *NPM1*.

Клинико-гематологическое наблюдение за ответившими больными проведено в течение 3-36 месяцев. У 5 (38,5%) больных было выявлено увеличение количества бластных клеток в пунктате КМ, включая 4 больных с трансформацией в ОМЛ. Время до прогрессии заболевания составило от 6,5 до 12 месяцев, медиана 11 месяцев. Во всех случаях прогрессия наступила на фоне продолжающихся курсов децитабином, включая двух больных с ПР и к/мР. У остальных 8 больных сохранялся достигнутый эффект в течение 3-36 месяцев. Одному больному МДС, РАИБ-2 была выполнена АллоТГСК от HLA-совместимого родственного донора. Медиана ОВ больных, ответивших на лечение, составила 12,8 месяцев.

Для определения факторов, ассоциированных с эффективностью терапии Дако проанализированы такие показатели, как возраст, вариант заболевания, кариотип и линия терапии. Выявлены два принципиальных фактора – вариант кариотипа и вариант заболевания. Медиана ОВ больных в группах с нормальным, другим и комплексным кариотипом была 9,8, 8,0 и 2,0 месяца соответственно ( $p=0,044$ ) (Рисунок 1). Значимость различия обеспечивалась преимущественно за счет наихудших показателей, имевших место у больных с множественными хромосомными aberrациями: нормальный + другой кариотип против комплексного ( $p=0,019$ ).

Медиана ОВ больных МДС, ОМЛ и ХМПН была 11,2, 5,9 и 4,5 месяцев соответственно ( $p=0,051$ ) (Рисунок 2). Различие имело пограничное значение. При этом наихудшие показатели установлены у больных из группы ОМЛ по сравнению с больными двух других групп ( $p=0,049$ ).

#### **Эффективность 5-азациитидина и факторы, ассоциированные с ответом**

5-Аза вводился по 75 мг/м<sup>2</sup> подкожно однократно в сутки в течение 7 последовательных дней и длительность курса была 28 дней. Число проведенных курсов варьировало от 2 до 25, медиана 8. ПР была достигнута у 6 больных (22,2%), включая 4 больных ОМЛ и 2 больных МДС. К/мР была констатирована у 1 больного МДС (3,7%). Эритроцитарный ответ, соответствующий критериям гематологического улучшения - эритроцитарного ответа (ГУ-Эр), был зафиксирован у 11 больных (40,7%), из которых 5 больных ОМЛ и 6 больных МДС. Таким образом, общий ответ на терапию 5-Аза был получен у 18 из 27 больных, что составило 66,7 %.

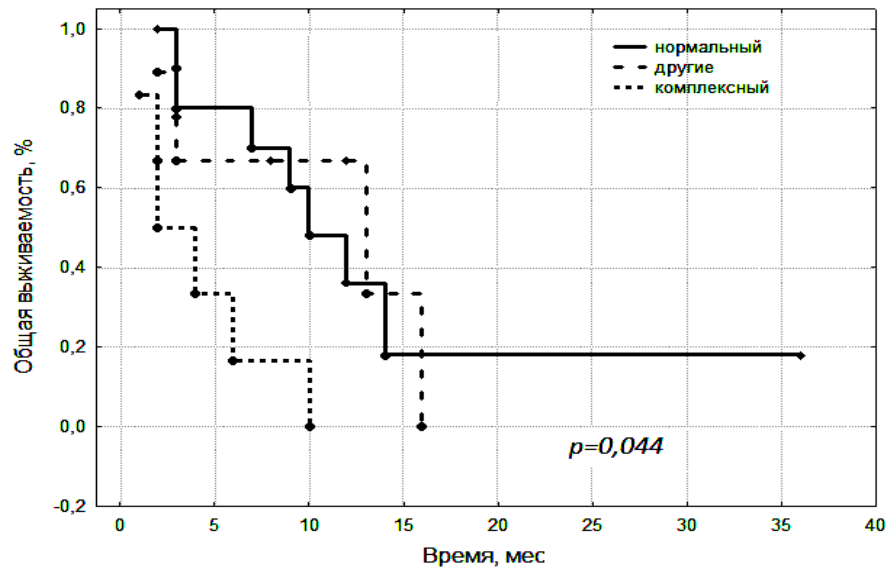


Рисунок 1– Кариотип и общая выживаемость больных

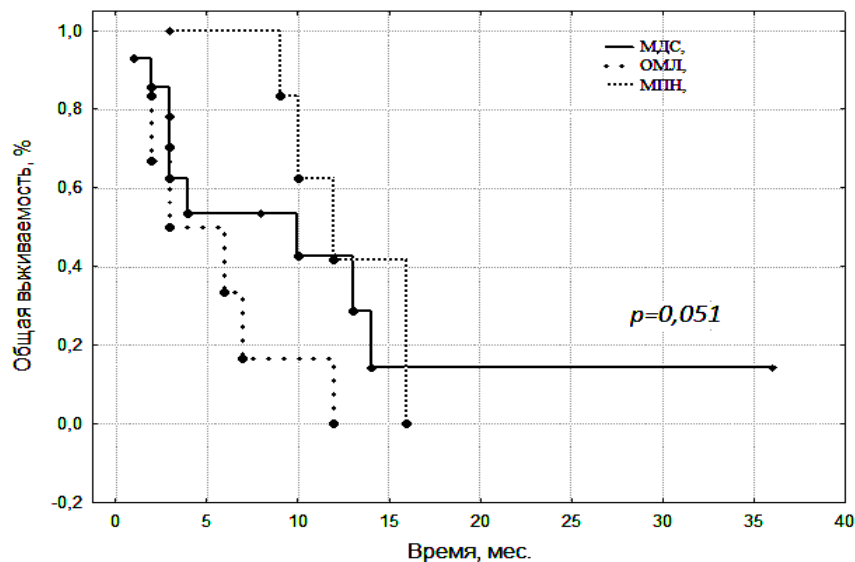


Рисунок 2 – Морфологический вариант и общая выживаемость больных

Клинико-гематологические характеристики больных с ПР и к/МР : возраст 48 – 84 года, медиана 66 лет, длительность периода, предшествующего назначению 5-Аза, не превышала 4 месяцев, за исключением одного больного. Цитостатическую терапию до начала лечения гипометилирующими препаратами получил 1 больной М4 вариантом ОМЛ: два индукционных курса «5+2» без эффекта. Достижение ПР потребовало проведения 4-7 курсов, а к/МР – не менее 6 курсов. Показатели больных, у которых терапия 5-Аза сопровождалась ГУ-Эр: возраст 41 – 81 год, медиана 61 год, период от диагностики до назначения 5-Аза от 1 до 48 месяцев. Уменьшение зависимости от трансфузий донорских эритроцитов или полный отказ от них были констатированы после 2-6 курсов. Корреляционный анализ не выявил ассоциации эффективности терапии с возрастом (моложе или старше 60 лет), видом заболевания (ОМЛ или МДС), длительностью предшествующего периода (меньше или больше 6 месяцев), исходным уровнем гемоглобина (меньше или больше 90 г/л), лейкоцитов (меньше или больше  $3 \times 10^9/\text{л}$ ) и тромбоцитов (меньше или больше  $50 \times 10^9/\text{л}$ ), а также зависимостью от трансфузий донорских эритроцитов и тромбоконцентрата. Во всех случаях значение  $p$  было  $>0,05$ .

У 5 больных (83,3%) ПР сохранялась в течение 1-12 месяцев. Прогрессия констатирована у 2 больных: у больного ОМЛ через 2 месяца после диагностики ПР и у 1 больного РАИБ-2 с комплексным кариотипом через 13 месяцев после достижения к/мР. В группе с ГУ-Эр у 3 больных ОМЛ и 1 больного МДС через 2-19 месяцев после достигнутого клинко-гематологического эффекта выявлено нарастающее ухудшение лабораторных показателей с увеличением уровня бластных клеток в миелограмме, расцененное как прогрессия. Проводимая терапия оказалась неэффективной. Во всех случаях наступил летальный исход.

У 9 больных (33,3 %) терапия была расценена как неэффективная. Так у 4 больных ОМЛ и 3 больных МДС, несмотря на отсутствие нарастания количества бластных клеток в КМ, сохранялась потребность в регулярных трансфузиях донорских эритроцитов и тромбоконцентрата. У двух других больных при морфологическом мониторинге отмечено постепенное увеличение числа бластных клеток. Вместе с тем следует отметить, что 4 из 7 больных со стабилизацией живы в течение 4-11 месяцев. В большинстве случаев прогрессии ОМЛ и МДС больным назначались курсы малых доз Ара-Ц, которые были неэффективными во всех случаях. При наблюдении за больными в течении от 2 до 29 месяцев, медиана ОВ составила 11,5 месяцев (рисунок 3).

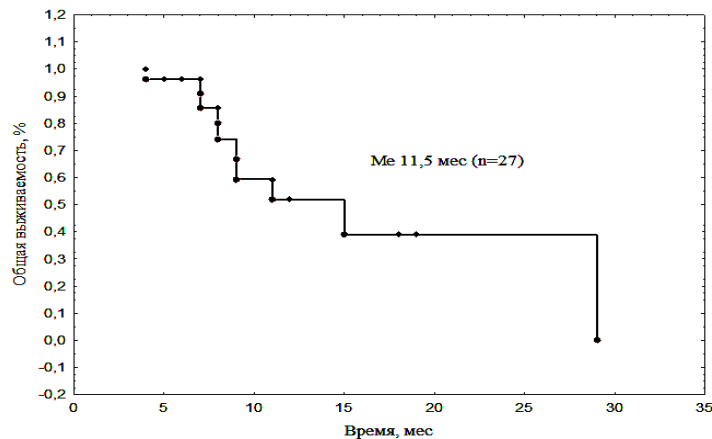


Рисунок 3 – Общая выживаемость больных, получавших 5-азациитидин

Для дальнейшего анализа больные были распределены в 2 группы по эффективности терапии. Группу с ответом сформировали больные с ПР, к/мР и ГУ-Эр (18 больных). Больные со стабилизацией и прогрессией составили вторую группу (9 больных). Медиана ОВ в группах составила 15,9 и 7,4 мес. соответственно ( $p=0,010$ ) (рисунок 4).

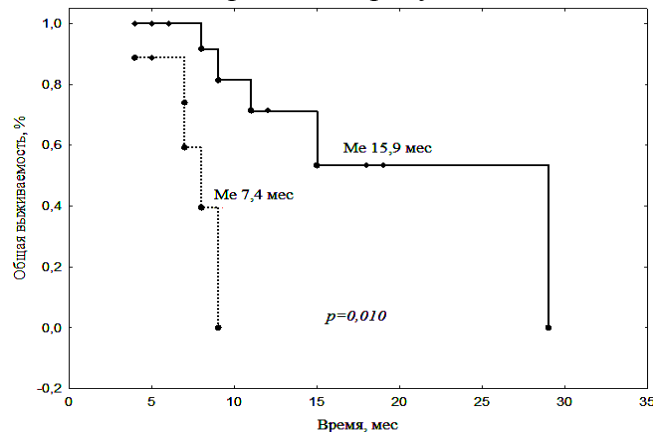


Рисунок 4 – Общая выживаемость и эффективность терапии 5-азациитидином

### Значение моносомного кариотипа у больных ОМЛ и МДС

Перед отбором был определен критерий исключения: транслокации t(8;21) и t(15;17), а также инверсия хромосомы 16. Анализу подвергнуты данные 76 больных, включая 43 больных ОМЛ и 33 больных МДС (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика больных ОМЛ и МДС

Показатели	ОМЛ, n (%)	МДС, n (%)
Медиана возраста (диапазон), лет	64 (17-84)	63 (28-81)
Больные 60 лет и старше	27 (62,8)	22 (66,7)
Вторичный	5 (11,6)	3 (9,1)
Миелоидный ОМЛ	25	
Монобластный ОМЛ	10	
Эритроидный ОМЛ	7	
Мегалобластный ОМЛ	1	
МДС без бластога		3 (9,1)
МДС с избытком бластов		30 (90,9)
Комплексный кариотип	35 (81,4)	29 (87,9)
Моносомия 7	12 (27,9)	5 (15,2)
Моносомия 5	10 (23,2)	10 (30,3)
Моносомия 3	9 (20,9)	
Моносомия 17	9 (20,9)	
Моносомия 18	9 (20,9)	7 (21,2)
Медиана ОВ	6 мес	8 мес
ПР после курса “7+3”	5/21 (23,8)	1/6 (16,7)

#### Моносомный кариотип у больных ОМЛ

Число моносомий у одного больного варьировало от 1 до 7. При этом случаи с 3 и более моносомиями чаще обнаруживались у больных  $\geq 60$  лет: 44,4% против 18,8% среди больных моложе 60 лет ( $p=0,087$ ). Наиболее часто выявлялись моносомия 7 и моносомия 5: у 12 (27,9%) и 10 (23,2%) больных, соответственно. Следующими по частоте были моносомия 3, 17 и 18, каждая из которых имела место у 9 больных (20,9%). Важно отметить, что первые четыре из упомянутых аберраций были более частой находкой в группе больных старше 60 лет. У 35 больных (81,4%) были выявлены множественные хромосомные аберрации. Эффективность терапии и ОВ были оценены по данным наблюдения за 37 больными ОМЛ. Общая выживаемость составила 6 месяцев (рисунок 5)

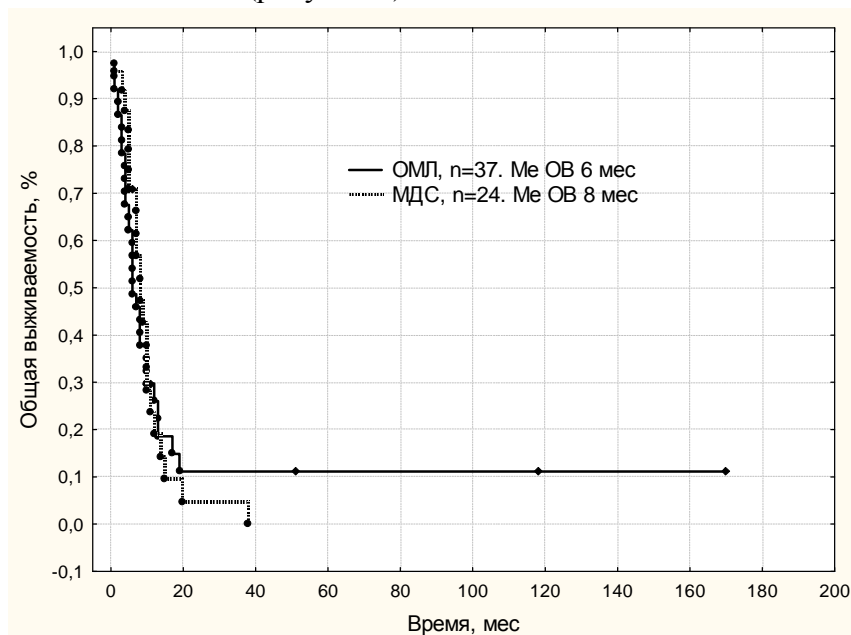


Рисунок 5 – Общая выживаемость больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом

Принимая во внимание ретроспективный характер исследования, необходимо отметить факт назначения разной по интенсивности цитостатической терапии. Так 21 больному с медианой возраста 53 года лечение начинали с индукционных курсов “7+3”. Большинство из них в дальнейшем получали ВДХТ. В этой группе ПР была констатирована у 9 больных, из которых у 4 развился ранний рецидив. Т.е. резистентными к стандартной ХТ были 16 больных (76,2%).

Другим 16 больным назначался один из вариантов терапии низкой интенсивности, включая малые дозы Ара-Ц и гипометилирующие препараты. Медиана возраста этих больных составила 71 год. Ответа на терапию не было ни в одном случае (таблица 5). В то же время у 6 из 37 больных (16,2%) констатировано относительно благоприятное течение ОМЛ с длительностью безрецидивного периода от 10 до 170 месяцев. Эти больные получали стандартные индукционные и консолидирующие курсы ХТ, включая АллоТГСК (1 больная). Число хромосомных aberrаций у них варьировало от 2 до 9. Ни в одном случае не было выявлено неслучайных хромосомных поломок, т.е. повторяющихся от больного к больному. Ни в одном случае не было также обнаружено и aberrаций с вовлечением региона 17p13, являющегося местом локализации гена-супрессора опухоли *TP53*.

Таблица 5 – Эффективность терапии 37 больных ОМЛ с моносомным кариотипом

Вариант терапии	Число больных	Возраст (Ме), лет	Ответ
Стандартная ХТ	21	53	9 (42,9%)
Терапия низкой интенсивности	16	71	0 (0%)

### Моносомный кариотип у больных МДС

Число моносомий у отдельного больного было от 1 до 4. Зависимости количества моносомий от возраста не установлено. Наиболее частыми находками были моносомия 5 (10 больных, 30,3%), 18 (7 больных, 21,2%) и моносомия 7 (5 больных, 15,2%). Не выявлено тенденции к более частому обнаружению отдельных моносомий у больных определенных возрастных групп.

Комплексный кариотип был верифицирован у 29 больных (87,9%). Для вычисления ОВ были использованы данные наблюдения за 24 больными. Медиана ОВ составила 8 месяцев (рисунок 5).

Больные МДС получали разные виды терапевтического пособия, выбор которого зависел от количества бластных клеток в миелограмме, тяжести цитопении, клеточности КМ, возраста и соматического статуса. Стандартная комбинация Ара-Ц с антрациклинами в качестве первой линии терапии была назначена 6 больным. Терапию низкой интенсивности, включая децитабин, малые дозы Ара-Ц и алкеран, получали 12 больных. Остальным 6 больным в качестве первой линии назначались иммуносупрессивные, эритропоэзстимулирующие и антицитокиновые препараты.

Терапия была эффективной только у 2 больных. В одном случае ПР достигнута после первого курса децитабина, а во втором – после индукционного курса 7+3 с введением митоксантрона. У обоих больных при стандартном цитогенетическом исследовании делеция 17p13 не выявлялась, но при этом имела место моносомия 17 хромосомы. Длительность ПР была кратковременной.

### Аберрантный статус метилирования генов *p15<sup>INK4B</sup>*, *SOX7* и антагонистов сигнального пути Wnt у больных ОМЛ и МДС

Изучение статуса метилирования было выполнено в 2 этапа. На первом (пилотном) этапе были проанализированы данные о статусе метилирования генов *p15<sup>INK4B</sup>* и *SOX7*. Полученная в ходе выполнения исследования информация послужила основанием для расширения числа изучаемых генов. Поэтому на втором этапе список изучаемых генов был расширен путем включения в него антагонистов сигнального пути Wnt.

### Статус метилирования генов $p15^{INK4B}$ и $SOX7$ (этап I)

До начала исследования были сформулированы следующие критерии включения: МДС *de novo*. и ОМЛ *de novo*. Отсутствие в анамнезе указания на терапию гипометилирующими препаратами. Ранее не леченные больные ОМЛ. Наблюдение за больными после заготовки биологических образцов в течение  $\geq 6$  мес. Достаточное для исследования количество и качество образца ДНК. Критерием исключения был острый промиелоцитарный лейкоз. Согласно установленным критериям были отобраны данные 37 больных, включая 20 МДС и 17 ОМЛ.

*Характеристика больных МДС.* Возраст от 41 до 79 лет, медиана 63 года. 2 больных РА, 1 РАКС, 3 с изолированной делецией  $del(5q)$ , 5 РЦМД и 9 больных РАИБ, включая 2 РАИБ-1 и 7 РАИБ-2. Нормальный кариотип выявлен у 7 больных. Хромосомные aberrации обнаружены у 12 больных. Кариотип 1 больного на момент заготовки ПК был неизвестным из-за отсутствия роста клеток в культуре.

*Характеристика больных ОМЛ.* Возраст от 34 до 75 лет, медиана 56,5 года. Распределение по морфологическим вариантам было следующим: 3 больных М1 вариантом, 7 М2, 1 М4, 2 М5, 3 М6, 1 больной М7 вариантом. Цитогенетическое исследование выполнено у 16 больных. Нормальный кариотип был у 7 больных. Хромосомные поломки выявлены у 9 больных и представлены одиночными, двойными или множественными aberrациями.

*Результаты исследования образцов ДНК больных МДС.* Метилирование генов обнаружено у 16 больных (80%). Аберрантный статус генов  $p15^{INK4B}$  и  $SOX7$  выявлен у 5 (25%) и 16 (80%) больных соответственно. Во всех случаях метилирование гена  $p15^{INK4B}$  сопровождалось аберрантным статусом гена  $SOX7$ . У 11 больных выявлено метилирование только гена  $SOX7$ . При вариантах без избытка бластных клеток более частой находкой было метилирование гена  $SOX7$  (63,6%), нежели гена  $p15^{INK4B}$  (18,2%) ( $p=0,030$ ).

У больных рефрактерной анемией с избытком бластов (РАИБ) частота аберрантного статуса генов значительно возрастала, при этом метилирование гена  $SOX7$  по-прежнему оставалось доминирующим событием – 100% и 33,3% соответственно ( $p=0,002$ ). Выявлена тенденция к сопряженности метилирования гена  $SOX7$  с избыточным количеством бластных клеток в КМ ( $r=0,452$ ;  $p=0,045$ ).

Метилирование гена  $p15^{INK4B}$  было более частой находкой у больных с нормальным нежели аберрантным кариотипом, хотя различие не было значимым: 42,9% против 8,3% ( $p=0,075$ ). Частота метилирования гена  $SOX7$  была одинаково высокой независимо от варианта кариотипа: 71,4% и 83,3% соответственно. При этом у больных с цитогенетическими поломками чаще обнаруживался аберрантный статус гена  $SOX7$ , чем гена  $p15^{INK4B}$ : 83,% против 8,3% ( $p=0,002$ ) (таблица 6).

*Результаты исследования образцов ДНК больных ОМЛ.* Метилирование генов  $p15^{INK4B}$  и  $SOX7$  обнаружено у 8 из 17 (47,1%) больных. Частота аберрантного статуса гена  $SOX7$  была выше, чем гена  $p15^{INK4B}$  (47,1% против 11,8%) и во всех случаях метилирование гена  $p15^{INK4B}$  сопровождалось метилированием гена  $SOX7$ . Метилирование гена  $SOX7$  с большей частотой выявлялось у больных миелоидными (М1 и М2) вариантами: 60% против 28,6% больных с другими морфологическими вариантами ( $p=0,019$ ). Распределение случаев с аберрантным статусом генов  $p15^{INK4B}$  и  $SOX7$  среди больных с нормальным кариотипом и цитогенетическими поломками было практически одинаковым (таблица 6).

При наблюдении за больным в сроки от 1 до 19 месяцев (медиана 4 месяца) из 10 больных, у которых была достигнута ПР, рецидив развился у 5, включая 1 из 4 (25%) больных без метилирования генов и 4 из 6 (66,7%) больных с метилированием генов. Следует отметить, что



у 2 из 4 больных с aberrантным статусом (метилирование гена *SOX7*) рецидив развился после АллоТГСК.

Таблица 6 – Статус метилирования генов *p15<sup>INK4B</sup>* и *SOX7*

Показатели	Метилирование				<i>p</i>
	Ген <i>p15<sup>INK4B</sup></i>		Ген <i>SOX7</i>		
	п	%	п	%	
МДС, n=20	5	25,0	16	80,0	
без бластога, n=11	2	18,2	7	63,6	0,030
с бластозом, n=9	3	33,3	9	100,0	0,002
нормальный кариотип, n=7	3	42,9	5	71,4	
aberrантный кариотип, n=12	1	8,3	10	83,3	0,002
ОМЛ, n=17	2	11,8	8	47,1	
миелоидный вариант, n=10	1	10,0	6	60,0	0,019
другие варианты, n=7	1	14,3	2	28,6	
нормальный кариотип, n=7	1	14,3	3	42,9	
aberrантный кариотип, n=9	1	11,1	4	44,4	
Доноры, n=40	0	0	1	2,5	

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о вариабельности статуса метилирования генов в зависимости от клиничко-гематологических характеристик МДС и ОМЛ и негативном влиянии aberrантного статуса генов на течение миелоидных неоплазий. В то же время результаты пилотного исследования не позволяют обосновать целесообразность интенсификации терапии гипометилирующими препаратами в отдельных группах больных в случае неудачи монотерапии Дако или 5-аза. В связи с этим спектр изучаемых генов был расширен с 2 до 5 посредством включения в него антагонистов сигнального пути Wnt.

## Статус метилирования генов *p15<sup>INK4B</sup>*, *SOX7* и антагонистов сигнального пути Wnt (этап II)

Статус метилирования генов *p15<sup>INK4B</sup>*, *SOX7* и антагонистов сигнального пути Wnt у больных МДС. Обследовано 46 больных в возрасте 24-88 лет (медиана 67,5 лет), включая 4 больных рефрактерной анемией (РА), 3 с рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами (РАКС), 6 с изолированной del(5q), 10 РЦМД и 23 больных РАИБ, из которых 7 РАИБ-1 и 16 РАИБ-2. Кариотип изучен у 44 больных: у 18 (40,9%) выявлен нормальный кариотип, у 8 (18,2%) изолированная del(5q), у 8 (18,2%) комплексный кариотип и у 10 (22,7%) больных другие варианты цитогенетических поломок. Метилирование одного и более генов обнаружено у 43 больных (93,5%).

Встречаемость aberrантного метилирования была следующей: *SOX7* у 39 больных (84, 8%), *SFRP1* у 33 (71,7%), *p15<sup>INK4b</sup>* у 25 (54,3%), *SFRP4* у 13 (6,5%) и *SFRP5* у 13 больных (6,5%). Таким образом, aberrантное метилирование в генах *SOX7*, *SFRP1* и *p15<sup>INK4b</sup>* было более частой находкой, чем в генах *SFRP4* и *SFRP5* (таблица 7).

Учитывая незначительное число больных с отдельными вариантами МДС, для установления возможной прогностической значимости статуса метилирования генов были сформированы 2 группы в зависимости от процента бластных клеток в КМ: <5% и ≥5%. Число больных с aberrантным метилированием генов *SFRP1*, *SFRP4*, *SOX7* и *p15<sup>INK4b</sup>* в указанных группах не различалось. В то же время, метилирование гена *SFRP5* значимо чаще обнаруживалось у больных РАИБ, чем при других вариантах: 43,5% против 13,0% соответственно (OR=5,1, 95%CI: 1,2-22,3; *p*=0,047). Для установления прогностической значимости числа метилированных генов дополнительно были выделены группы больных с 0-1 и 2-5 метилированными генами (таблица 8).

Таблица 7 – Частота aberrантного метилирования 5 генов у больных МДС

Вариант МДС	Доля лиц с aberrантным метилированием гена, n (%)				
	<i>SFRP1</i>	<i>SFRP4</i>	<i>SFRP5</i>	<i>SOX7</i>	<i>p15<sup>INK4b</sup></i>
РА	3 (75,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	4 (100)	3 (75,0)
del(5q)	5 (83,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (66,7)	2 (33,3)
РАКС	3 (100)	3 (100)	2 (66,7)	3 (100)	3 (100)
РЦМД	7 (70,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	7 (70,0)	2 (20,0)
РАИБ-1	5 (71,4)	1 (14,3)	2 (28,6)	5 (71,4)	4 (57,1)
РАИБ-2	10 (62,5)	6 (37,5)	8 (50,0)	16 (100)	11 (68,8)
<5% бластов в КМ	18 (78,3)	6 (26,1)	3 (13,0)	18 (78,3)	10 (43,5)
≥5% бластов в КМ	15 (65,2)	7 (30,4)	10 (43,5)	21 (91,3)	15 (65,2)

Независимо от морфологических вариантов, преимущественной находкой в обеих группах было метилирование 2 и более генов: у 73,9% больных с <5% бластов и у 91,3% больных с ≥5% бластов. Следует отметить, что случаи с метилированием 0-1 генов в 3 раза чаще встречались в группе больных с благоприятными морфологическими вариантами, нежели у больных РАИБ, хотя различие было не значимым: 26,1% против 8,7% соответственно (OR=3,7 95% CI: 0,7-20,1;  $p=0,24$ ) (таблица 8).

Таблица 8 – Число метилированных генов и варианты МДС

Варианты МДС	Количество метилированных генов, n (%)					
	0	1	2	3	4	5
РА			1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	
del(5q)	1 (16,7)	1 (16,7)	2 (33,3)	2 (33,3)		
РАКС					1 (33,3)	2 (66,7)
РЦМД	2 (20,0)	2 (20,0)	3 (30,0)	2 (20,0)	1 (10,0)	
РАИБ-1			5 (71,4)	1 (14,3)	1 (14,3)	
РАИБ-2		2 (12,5)	2 (12,5)	5 (31,3)	5 (31,3)	2 (12,5)
<5% бластов в КМ	6 (26,1)		17 (73,9)			
≥5% бластов в КМ	2 (8,7)		21 (91,3)			

Обращает внимание тот факт, что у всех больных РАКС число генов с метилированием промотерных областей было ≥4, в отличие от больных другими благоприятными морфологическими вариантами, у которых aberrантное метилирование одновременно в 4 генах было представлено лишь единичными наблюдениями. Интерпретация данной находки невозможна из-за небольшого числа наблюдений. Что касается больных РАИБ, то нарастание бластных клеток сопровождалось тенденцией к увеличению случаев с 3-5 метилированными генами: 75,0% больных РАИБ-2 против 28,5% больных РАИБ-1 (OR=7,5 95% CI: 1,0-55,2;  $p=0,066$ ).

Не установлено ассоциации числа метилированных генов с возрастом больных, количеством бластных клеток (<5% против  $\geq 5\%$ ) и вариантом кариотипа. Увеличение числа метилированных генов с 0-1 до 2-5 также не влияло на ОВ обследованных больных ( $p=0,433$ ).

*Статус метилирования генов  $p15^{INK4B}$ , SOX7 и антагонистов сигнального пути Wnt у больных ОМЛ.* Обследовано 57 больных в возрасте 20-79 лет, медиана 51 год. Распределение по вариантам: 2 больных М0 вариантом, 7 М1, 23 М2, 4 М4, 8 М5, 3 М6 и 10 больных ОМЛ с МД. Восемь больных ОМЛ с МД имели в анамнезе указание на один из вариантов МДС. Кариотип был изучен у 56 больных. По результатам цитогенетического исследования были сформированы три группы: 31 (54,4%) больной с нормальным кариотипом, 8 (14,0%) с комплексным кариотипом и 17 (29,8%) с другими хромосомными aberrациями. Аберрантное метилирование  $\geq 1$  генов выявлено у 52 из 57 больных (91,2%). Наиболее частой находкой было метилирование генов *SFRP1* и  $p15^{INK4b}$ : у 39 (68,4%) и 36 (63,2%) больных соответственно. Следующими по частоте убывания были гены *SOX7*, *SFRP4* и *SFRP5*: 27 (47,4%), 24 (42,1%) и 20 (35,1%) больных соответственно. Метилирование  $\geq 1$  гена семейства *SFRP* выявлено у 48 больных (84,2%).

При анализе распределения больных по числу метилированных генов установлено, что метилирование 1, 2, 3, 4 и 5 генов имело место у 8 (14,0%), 17 (29,8%), 12 (21,1%), 7 (12,3%) и 8 (14,0%) больных соответственно. Т.е. наиболее частой находкой было аберрантное метилирование 2 или 3 генов одновременно. Значимого различия в распределении по числу генов с аберрантным метилированием между больными  $\leq 60$  и старше 60 лет не обнаружено.

При выделении групп по морфологическому варианту установлено, что половина всех случаев с метилированием 5 генов (4 из 8 больных) приходилась на группу ОМЛ с МД. Кроме того среди больных ОМЛ с МД было больше наблюдений с одновременным метилированием 3-5 генов (7 из 10 больных, 70%), чем при любом другом варианте.

При анализе числа метилированных генов в группах с разными вариантами кариотипа выявлено, что у больных с нормальным кариотипом и больных с одной или двумя независимыми хромосомными aberrациями чаще обнаруживалось метилирование 2-х (32,3% и 29,4% соответственно) и 3-х (22,6% и 23,5% соответственно) генов одновременно. Напротив, метилирование 5 генов чаще выявлялось у больных с множественными хромосомными aberrациями. Отражением этого является значимое различие между долями больных с комплексным и нормальным кариотипом, у которых выявлено одновременное метилирование 5 генов: 50,0% против 9,7% соответственно (OR=9,3, 95% CI 1,5-58,0,  $p=0,022$ ). Еще более значимое различие по данному показателю наблюдалось при сравнении группы больных с комплексным кариотипом со всеми остальными пациентами: 50,0% против 8,3% соответственно (OR=11,0, 95% CI 2,0-61,6,  $p=0,01$ ). При изучении влияние числа генов с аберрантным статусом метилирования (0-2 против 3-5) на выживаемость больных с нормальным кариотипом при проведении индукционной терапии 7+3 были проанализированы данные 23 больных без мутаций в генах *FLT3* и *NPM1*.

В группе с 0-2 метилированными генами (13 больных) ПР была достигнута у 9 (69,2%) больных. У 4 больных констатирован первично-резистентный вариант. Рецидив развился у 5 больных. Медиана времени наблюдения составила 24 (7-64) месяца.

В группе с 3-5 метилированными генами (10 больных) ПР диагностирована у 8 (80,0%) больных, из которых у 4 в последующем развился рецидив. Период наблюдения варьировал от 2 до 96 месяцев, медиана 17 месяцев. Медиана ОВ между группами не различалась: не достигнута и 31 месяц соответственно. Также не различалась и медиана безлейкозной выживаемости (БЛВ): 26,7 и 33,5 месяца соответственно.

## ВЫВОДЫ

1. Проведение терапии низкой интенсивности может сопровождаться достижением ответа и улучшением показателей общей выживаемости у больных неблагоприятными вариантами ОМЛ и МДС, которым не может быть назначена стандартная или высокодозная химиотерапия. Условие повышения эффективности – отбор больных по результатам комплексного клинико-лабораторного обследования.

2. Разработана и апробирована новая схема лечения (кладрибин плюс малые дозы цитарабина), которая в виду вероятности достижения ответа у 50% больных и приемлемого профиля токсичности может быть рекомендована как один из вариантов подготовки больных с рецидивом или резистентным ОМЛ к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при невозможности проведения интенсивной терапии.

3. Эффективность гипометилирующих препаратов (децитабин, 5-азациитидин) зависит от характера хромосомных aberrаций и варианта ответа. Наихудшие показатели выживаемости констатированы при комплексном кариотипе и отсутствии одного из вариантов ответа.

4. Одним из условий улучшения общей выживаемости больных ОМЛ и МДС при терапии гипометилирующими препаратами является достижение гематологического улучшения.

5. Моносомный кариотип ассоциирован с крайне низкой выживаемостью больных ОМЛ и МДС. Медиана общей выживаемости больных ОМЛ и МДС с моносомным кариотипом составляет 6 и 8 месяцев соответственно.

6. Прогрессирование МДС в виде нарастания бластных клеток в костном мозге сопряжено с увеличением числа генов с aberrантным метилированием. При этом метилирование гена *SFRP5* является поздним эпигенетическим событием.

7. У больных ОМЛ с наличием комплексного кариотипа отмечается большее число наблюдений с aberrантным метилированием 5 генов по сравнению с больными, у которых выявлены другие варианты кариотипа: 50,0% против 8,3%;  $p=0,01$ . У 70% больных ОМЛ с миелодисплазией обнаружено aberrантное метилирование 3-5 генов, что выше по сравнению с другими морфологическими вариантами ОМЛ.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Больным с рецидивом или резистентным вариантом ОМЛ, которым по разным причинам не может быть назначена стандартная или высокодозная химиотерапия, целесообразно проведение 1-2 курсов комбинированной терапии «малые дозы цитарабина + кладрибин». Вероятность ответа выше при длительности курса не менее 10 дней, а также в случае отсутствия мутаций *FLT3-ITD* и *c-KIT*.

2. В случае выполнения цитогенетического исследования в течение первых 72 часов после диагностики ОМЛ выбор индукционной терапии следует отложить до получения результатов кариотипа. При обнаружении моносомного кариотипа интенсивность индукционного курса должна быть усилена из-за низкой эффективности стандартной схемы «7+3».

3. При достижении гематологического улучшения на фоне терапии гипометилирующими препаратами лечение следует продолжить, так как снижение частоты трансфузий донорских эритроцитов или полный отказ от них сопровождается улучшением выживаемости больных ОМЛ и МДС.

**СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ:**

1. Грицаев, С.В. Децитабин: уроки, извлеченные из опыта лечения больных миелоидными неоплазиями / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, **И.И. Кострома**, В.Ю. Аксенова, Е.В. Петрова, А.Н. Сергеев, С.А. Тиранова, Н.А. Потихонова, К.М. Абдулкадыров // **Клиническая онкогематология**. – 2012. – №3. – С.225–231.
2. Грицаев, С.В. Результаты терапии больных de novo острым миелоидным лейкозом 60 лет и старше / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, **И.И. Кострома**, Е.В. Карягина, А.С. Низамутдинова, Л.С. Мартыненко, Е.В. Петрова, С.А. Тиранова, Н.А. Потихонова, К.М. Абдулкадыров // **Клиническая онкогематология**. – 2012. – №4. – С.355–360.
3. Грицаев, С.В. Азацитидин и миелодиспластический синдром / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, **И.И. Кострома** // **Гематология и трансфузиология**. – 2012. – №1. – С.23–29.
4. Грицаев, С.В. Анализ статуса метилирования генов  $p15^{INK4B}$  и  $SOX7$  у больных миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом / С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, С.И. Капустин, **И.И. Кострома**, Н.А. Потихонова, И.С. Мартынкевич, М.Н. Блинов, К.М. Абдулкадыров // **Гематология и трансфузиология**. – 2015. – Т. 60, №1. – С.12–17.
5. **Кострома, И.И.** Гематологическое улучшение – вариант благоприятного противоопухолевого ответа на лечение азацитидином при острых миелоидных лейкозах и миелодиспластических синдромах / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, Е.В. Карягина, А.С. Низамутдинова, И.С. Мартынкевич, К.М. Абдулкадыров // **Клиническая онкогематология**. – 2015. – Т. 8, №4. – С.413-419
6. Грицаев, С.В. Острые миелоидные лейкозы: собственный опыт применения цитарабина в малых дозах и кладрибина при рецидивах и резистентном течении / С.В. Грицаев, **И.И. Кострома**, А.А. Кузьева, И.М. Запорева, Е.В. Литвинская, Л.В. Стельмашенко, С.А. Тиранова, И.С. Мартынкевич, Н.А. Потихонова, К.М. Абдулкадыров // **Клиническая онкогематология**. – 2016. – Т.9, №1. – С.48-53
7. **Кострома, И.И.** Клинико-гематологическая гетерогенность острого миелоидного лейкоза и миелодиспластического синдрома с моносомным кариотипом / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Ж.В. Чубукина, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, С.А. Тиранова, Н.А. Потихонова, К.М. Абдулкадыров // **Гематология и трансфузиология**. – 2016. – Т. 61, №2. – С.65-72.
8. **Кострома, И.И.** Аберрантное метилирование промоторных областей генов  $SOX 7$ ,  $p15INK4b$  и антагонистов сигнального пути Wnt у больных острыми миелоидными лейкозами / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, С.А. Тиранова, С.П. Свитина, Ю.С. Дрижун, Ж.В. Чубукина, И.С. Мартынкевич, С.И. Капустин, С.С. Бессмельцев // **Терапевтический архив**. – 2016. – №7. – С.31-36.

**РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ДРУГИХ ИЗДАНИЯХ:**

1. Сидорова, Ж.Ю. Оценка статуса аберрантного метилирования у больных миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом методом метилспецифической полимеразной цепной реакции / Ж.Ю. Сидорова, С.В. Грицаев, Ю.С. Дрижун, **И.И. Кострома**, С.И. Капустин, К.М. Абдулкадыров // Вестник гематологии. – 2014. – Т.10, №1. – С. 86-87.
2. **Кострома, И.И.** Малые дозы цитарабина с кладрибином для лечения рецидивов и резистентных острых миелоидных лейкозов: опыт клинического применения / И.И. Кострома, А.А. Кузьева, И.М. Запорева, Е.В. Литвинская, Л.В. Стельмашенко, С.А. Тиранова, И.С. Мартынкевич, Н.А. Потихонова, С.В. Грицаев, К.М. Абдулкадыров // Сборник тезисов Межрегиональной научно-практической конференция с международным участием «Полиморбидность патологии – важнейшая проблема современного скоромощного многопрофильного стационара посвященная 55-летию СПб ГБУЗ «Городская больница № 15». – 2015 г. – С.79-80.

3. **Кострома И.И.**, Характеристика больных острым миелоидным лейкозом и миелодиспластическим синдромом с моносомным кариотипом / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Ж.В. Чубукина, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, К.М. Абдулкадыров // Сборник тезисов Межрегиональной научно-практической конференция с международным участием «Полиморбидность патологии – важнейшая проблема современного скоромощного многопрофильного стационара посвященная 55-летию СПб ГБУЗ «Городская больница № 15». – 2015 г. – С.153-154.

4. **Кострома, И.И.** Изучение роли aberrантного метилирования промоторных областей генов *SOX7*, *P15<sup>INK4B</sup>* и антагонистов сигнального пути WNT у больных миелодиспластическим синдромом / И.И. Кострома, Ж.Ю. Сидорова, С.В. Грицаев, С.А. Тиранова, С.П. Свитина, Ю.С. Дрижун, И.С. Мартынкевич, С.И. Капустин, А.В. Четкин // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №1. – С.24-30.

5. Сидорова, Ж.Ю. Aberrантное метилирование ДНК и полиморфизм генов ферментов метионинового и фолатного циклов у больных миелодиспластическим синдромом / Ж.Ю. Сидорова, **И.И. Кострома**, С.В. Грицаев, Ю.С. Дрижун, С.И. Капустин, А.В. Четкин // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №2. – С.58.

6. Грицаев, С.В. Aberrантное метилирование промоторных областей генов и выживаемость больных острым миелоидным лейкозом с нормальным кариотипом и отсутствием мутаций в генах *FLT3* и *NPM* / С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, **И.И. Кострома**, И.С. Мартынкевич, С.А. Тиранова, С.П. Свитина, Ю.С. Дрижун, С.И. Капустин, С.С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №2. – С.23-24.

7. Грицаев, С.В. Оценка гиперметилирования промоторных областей генов *SOX7*, *P15<sup>INK4B</sup>* и антагонистов сигнального пути WNT у больных острыми миелоидными лейкозами / С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, **И.И. Кострома**, С.А. Тиранова, С.П. Свитина, Ю.С. Дрижун, Ж.В. Чубукина, И.С. Мартынкевич, С.И. Капустин, С.С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2016. – Т. XII, №2. – С.22-23.

8. **Kostroma, I.I.** Aberrant methylation of promoter regions of *sox7*, *p15ink4b* and WNT pathway antagonist genes in patients with myelodysplastic syndrome / I.I. Kostroma, S.V. Gritsaev, Zh.Yu. Sidorova, S.A. Tiranova, S.P. Svitina, Yu.S. Drizhun, K.M. Abdulkadyrov, S.I. Kapustin, A.V. Chechetkin // Cellular Therapy and Transplantation Journal. – 2016. – Vol. 5, № 1. – P.51-52.

9. Gritsaev, S.V. Low-dose cytarabine and cladribine for treatment of relapsed or refractory acute myeloid leukemia: clinical experience / S.V. Gritsaev, **I.I. Kostroma**, A.A. Kuzjaeva, I.M. Zapreeva, E.V. Litvinskaya, L.V. Steljmashenko, S.A. Tiranova, I.S. Martinkevitch, N.A. Potichonova, K.M. Abdulkadyrov // Cellular Therapy and Transplantation Journal. – 2016. – Vol. 5, №1. – P.44-45

10. **Кострома, И.И.** Aberrантное метилирование островков CPG в генах *SOX7*, *P15INK4B* и антагонистах сигнального пути WNT у больных миелодиспластическим синдромом / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, С.А. Тиранова, С.П. Свитина, Ю.С. Дрижун, И.С. Мартынкевич, К.М. Абдулкадыров, С.И. Капустин // **Гематология трансфузиология**. – 2016. – Т. 61, № 1. – С.128

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-Аза	- 5-азацитидин
Ара-Ц	- цитарабин
АллоТГСК	- аллогенная ТГСК
БЛВ	- безлейкозная выживаемость
БРВ	- безрецидивная выживаемость
БСВ	- бессобытийная выживаемость
ВДХТ	- высокодозная химиотерапия
ГУ-Эр	- гематологическое улучшение, эритроцитарный ответ
Дако	- децитабин
ДНМТ	- ДНК-метилтрансфераза
ИР	- индукция ремиссии
КМ	- костный мозг
к/мР	- костно-мозговая ремиссия
МДС	- миелодиспластический синдром
Ме	- медиана
ОВ	- общая выживаемость
ОМЛ	- острый миелоидный лейкоз
ОМЛ с МД	- острый миелоидный лейкоз с миелодисплазией
ПК	- периферическая кровь
ПР	- полная ремиссия
РА	- рефрактерная анемия
РАИБ	- рефрактерная анемия с избытком бластов
ХМЛ	- хронический миелолейкоз
ХММоЛ	- хронический миеломоноцитарный лейкоз
ХМПН	- хроническая миелопролиферативная неоплазия
ХП	- химиопрепараты
ХТ	- химиотерапия
ЦР	- цитогенетическая ремиссия
ЧР	- частичная ремиссия
IPSS	- International Prognostic Scoring system
IPSS- R	- International Prognostic Scoring system, revised