

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»**

ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ

THE BULLETIN OF HEMATOLOGY

Том XIII № 2 2017

Ежеквартальный научно-практический журнал
Основан в сентябре 2004 года

Главный редактор

Доктор медицинских наук
профессор
С. С. Бессмельцев

Санкт-Петербург
2017

Редакционная коллегия:

С. С. Бессмельцев (главный редактор)
А. Н. Богданов; Л. Н. Бубнова; Т. В. Глазанова (ответственный секретарь);
С. А. Гусева; А. Ю. Зарицкий; Н. М. Калинина; Л. П. Папаян; В. Г. Радченко;
В. И. Ругаль; О. А. Рукавицын; В. Н. Чеботкевич, С. В. Грицаев.

Редакционный совет:

Б. В. Афанасьев (Санкт-Петербург); *В. В. Базарный* (Екатеринбург);
М. Л. Гершанович (Санкт-Петербург); *К. Г. Дуткевич* (Санкт-Петербург); *Г. А. Зайцева* (Киров);
Ю. М. Захаров (Челябинск); *Л. Г. Ковалева* (Москва); *А. В. Литвинов* (Смоленск);
В. И. Мазуров (Санкт-Петербург); *И. В. Поддубная* (Москва); *Т. Н. Поспелова* (Новосибирск);
А. Г. Румянцев (Москва); *В. Г. Савченко* (Москва); *Н. Н. Третьяк* (Киев); *Н. П. Шабалов* (Санкт-Петербург).

Зав. редакцией — *Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — *Т. В. Глазанова*, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

Адрес редакции:

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

E-mail: bloodscience@mail.ru

Сайт: www.bloodscience.ru

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

Обложка и художественное оформление *О. С. Дмитриева*
Компьютерная верстка *О. С. Дмитриева*

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 20.03.2017 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 101.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Агентство «ВиТ-принт»», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

18+

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ:

Воропаева Е. Н., Пospelова Т. И., Воевода М. И., Максимов В. Н.
ЗНАЧЕНИЕ АНОМАЛИЙ ГЕНА TP53 В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ДИФФУЗНОЙ
В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ4

Ремизова М. И., Гришина Г. В., Гербут К. А.
КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ
L-АРГИНИНОМ В СОЧЕТАНИИ С СОЛЕВЫМ РАСТВОРОМ..... 21

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:

Гусейнов Г. Г., Шамов И. А., Ахмедов И. Г.
КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН 26

**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ГЕНЕТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ»
(Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2017 г.) 35**

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

Voropaeva E. N., Pospelova T. I., Voevoda M. I., Maximov V. N.
THE IMPORTANCE OF THE TP53 GENE ANOMALIES
IN THE TUMOR PROGRESSION OF DIFFUSIVE LARGE B-CELL LYMPHOMA4

Remizova M. I., Grishina G. V., Gerbout K. A.
CORRECTION OF DISORDERS OF BLOOD CIRCULATION IN HEMORRHAGIC SHOCK
BY REGULATOR OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS L-ARGININE WITH SALINE SOLUTION 21

REVIEW OF LITERATURE:

Huseynov G., Shamov I., Achmedov I.
CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS
OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN 26

Воропаева Е. Н.¹, Поспелова Т. И.², Воевода М. И.¹, Максимов В. Н.¹

¹ ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины, г. Новосибирск

² ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Новосибирск

ЗНАЧЕНИЕ АНОМАЛИЙ ГЕНА TP53 В ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

Voropaeva E. N.¹, Pospelova T. I.², Voevoda M. I.¹, Maximov V. N.¹

¹ FGBNU Institute of Internal and Preventive Medicine, Novosibirsk

² Novosibirsk State Medical University of Health Ministry of Russia, Novosibirsk

THE IMPORTANCE OF THE TP53 GENE ANOMALIES IN THE TUMOR PROGRESSION OF DIFFUSIVE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Резюме. До настоящего времени знания о механизмах формирования и значении нарушения функции гена TP53 при ДВККЛ в значительной степени носили ограниченный характер. В ходе настоящего исследования получены данные об особенностях структуры и спектра мутаций в гене TP53 при ДВККЛ, присущих популяции Сибирского региона России. Показана существующая в настоящее время недооценка частоты aberrаций в TP53 при ДВККЛ вследствие игнорирования синонимичных мутаций и изменений в некодирующих участках гена, а также отсутствия комплексного анализа возможных молекулярно-генетических нарушений. Результаты работы не только доказывают вовлеченность TP53 в процессы предрасположенности к развитию, инициализации, опухолевой прогрессии ДВККЛ, но и демонстрируют конкретные механизмы его инактивации, а также «двухударность» нарушений в гене, возникающих на различных этапах формирования лимфомы.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома, опухолевая прогрессия, ген TP53, aberrации.

Введение. Глубокая вовлеченность аномалий гена TP53 в развитие разных типов опухолей обусловлена выполнением им широкого спектра функций, предотвращающих и/или ингибирующих опухолевый рост [6, 9, 15].

В отличие от других клеток организма, подверженных в условиях стресса остановке клеточного цикла, p53-независимому апоптозу или некрозу, В-лимфоциты склонны к p53-опосредованному апоптозу. По этой причине

Abstract. Up to now, knowledge of the mechanisms of development and significance of the defects of the TP53 gene function in DLBCL has been largely limited. In the course of this study, data were obtained on the structural features and the spectrum of mutations in the TP53 gene in DLBCL which are characteristic of the population of the Siberian region of Russia. The current underestimation of the frequency of aberrations in TP53 in DLBCL is shown which leads to the exclusion of synonymous mutations and changes in non-coding regions of the gene, as well as the absence of a comprehensive analysis of possible molecular genetic disorders. The results of the work prove the involvement of TP53 in processes of predisposition to development, initialization, tumor progression of DLBCL, and demonstrate specific mechanisms of its inactivation, as well as “two-hit” disorders in the gene that occur at various stages of lymphoma formation.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma, tumor progression, TP53 gene, aberrations.

нарушение процессов программированной клеточной смерти в результате нарушения функции TP53 является основополагающим для развития и прогрессии лимфопролиферативных заболеваний [20]. Так у мышей при выключении функции TP53 злокачественные лимфомы являются доминирующей формой неоплазий [35].

Кроме того, инактивация TP53 в В-лимфоцитах приводит к менее эффективному

функционированию внутриклеточных сигнальных систем, останавливающих при повреждении клеточный цикл в фазах G1 и G2, нарушению репарации ДНК, более эффективной адаптации клеток к гипоксии и стимуляции ангиогенеза, ослаблению контроля над структурой теломер и ингибированию дифференцировки. Поскольку TP53 играет центральную роль в медиации действия алкилирующих агентов и других химиопрепаратов, дефицит его функции неминуемо приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной резистентности лимфомных клеток [26].

Ген TP53 (OMIM No. 191117) расположен на 17p13.1 и состоит из 19 144 пар нуклеотидов (п. н.). Доминантный транскрипт мРНК имеет длину 2586 п. н., включает 11 экзонов, 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности (НТП). Кодирующими являются экзоны 2–11 [6].

Аберрации гена TP53 играют ключевую роль в патогенезе многих онкологических заболеваний человека [35], в том числе, в возникновении, развитии и прогрессировании ДВККЛ, однако до настоящего времени знания о конкретных механизмах формирования и значении нарушений в гене TP53 при данном варианте неходжкинских лимфом (НХЛ)

носят ограниченный характер. Учитывая то, что результирующее действие аномалий TP53 во многом зависит от тканеспецифического контекста и конкретного вида клеток, в которых проявляется его активность, невозможен механический перенос общих знаний об участии TP53 в онкогенезе на ДВККЛ [15].

Описаны различные молекулярные механизмы формирования недостаточности функции гена TP53 на уровне ДНК (табл. 1).

Наиболее изученным аспектом изменчивости TP53 на уровне ДНК при ДВККЛ являются мутационные события в гене [17, 34, 41]. Являющаяся наиболее полной базой мутаций в гене TP53 при опухолях человека, IARC TP53 mutation database предназначена для сбора, структурирования и аннотирования данных, которые в последующем могут позволить точно интерпретировать значимость мутации TP53 при конкретной патологии и использовать их в стандартной клинической практике [31]. Информация о российской популяции в текущей версии IARC TP53 mutation database не представлена. Вместе с тем, частота и спектр мутаций в данном гене при одном и том же типе онкологической патологии может значительно меняться в зависимости от популяционной принадлежности изучаемой выборки.

Таблица 1

Возможные молекулярные механизмы формирования недостаточности функции гена TP53

Тип нарушения	Эффект
На уровне ДНК	
Мутации в кодирующей последовательности гена	Потеря опухоль-супрессорных функций или приобретение проонкогенных свойств
Мутации в интронных последовательностях гена	Нарушение альтернативного сплайсинга м-РНК
Мутации в 5'- и 3'-НТП гена	Снижение эффективности трансляции белка, нарушение пост-трансляционных модификаций
Потеря гетерозиготности	Создание аллельного дисбаланса, фенотипическая манифестация рецессивных мутаций гена
Метилирование промотора	Снижение экспрессии, вплоть до «выключения» гена
Генетический полиморфизм	Дефицит функции или стабильности белка

До настоящего времени при секвенировании TP53 в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ практически все исследования были сосредоточены на поиске мутаций в 5–8-м экзонах. Однако, по мнению Li et al. (2013), с учетом мутаций в нетранслируемых участках и интронах гена, TP53 является одним

из самых часто мутирующих при ДВККЛ, что может свидетельствовать о недооценке частоты и функционального эффекта аберраций в TP53 при данном заболевании [25].

Такие варианты повреждения гена TP53 при ДВККЛ, как аллельный дисбаланс и аномальное метилирование промотора менее

освещены в литературе. Немногочисленные опубликованные исследования, посвященные изучению полиморфизмов зародышевой линии TP53 при ДВККЛ, ограничивались анализом отдельных маркеров [17], однако с учетом современных представлений о структурной организации TP53, очевидно, что для уточнения влияния маркеров данного гена на его функцию необходимы знания о гаплотипе [31].

Изменения в 3'-НТП также могут иметь прямое биологическое действие на созревание В-лимфоцитов и активизировать лимфогенез. В исследовании Li et al. [25] на примере ДНК больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) впервые показано, что мутации в 3'-НТП гена TP53 — распространенное явление в опухоли: их имели большинство пациентов с ДВККЛ, почти все выявленные замены были расположены в подтвержденных ранее или предполагаемых по данным анализа *in silico* сайтах связывания микроРНК.

В этой связи целью настоящего исследования было на основе комплексного изучения изменчивости гена TP53, обусловленной соматическими мутациями, метилированием промотора, аллельным дисбалансом, функционально значимыми полиморфизмами и гаплотипной структурой, определить его роль в опухолевой прогрессии ДВККЛ.

Материал и методы. Группу обследованных составили 202 пациента с впервые установленным диагнозом ДВККЛ, из них 77 человек (38,1 %) — мужчины, 125 (61,9 %) — женщины. Средний возраст больных был равен $53,2 \pm 18,5$ годам (18–82 лет). Согласно классификации Ann Arbor, пациенты распределялись следующим образом: 63,4 % имели IV, 21,3 % — III, 12,4 % — II и 2,9 % — I стадию лимфомы. К группе низкого риска, согласно МПИ, были отнесены 12,4 % пациентов, низкого / промежуточного — 25,7 %, промежуточного / высокого — 27,7 % и высокого риска — 34,2 %.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты подписали информированное согласие до включения в исследование. Контрольная группа состояла из относительно здоровых лиц, жителей г. Новосибирска, была сопоставима по полу и возрасту, тип выборки — случайная.

Выделение ДНК из цельной венозной крови больных ДВККЛ и лиц контрольной груп-

пы выполнялось с использованием протеиназы К с последующей фенольно-хлороформной экстракцией и осаждением этанолом. Геномную ДНК из опухолевой ткани выделяли методом фенольно-хлороформной экстракции с применением гуанидина. Для исследования брались срезы ткани из парафиновых блоков биоптатов лимфоузлов и экстранодальных очагов поражения, содержащие не менее 80–90 % лимфомных клеток.

Выявление мутаций в кодирующей последовательности 5–10-го экзона и примыкающих участков интронов гена TP53 проводилось методом прямого секвенирования по Сэнгеру в соответствии с IARC protocol методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ результатов секвенирования и выравнивание фрагментов осуществляли в программах Chromas, SeqScape v.2.7, Sequence Scanner. В качестве референсной использовалась последовательность гена TP53 NG_017013.

Анализ биологической значимости обнаруженных мутаций выполнялся по данным литературы, с помощью баз данных и инструментов IARC TP53 mutation Database, The TP53 UMD mutation database in human cancer и Human Gene Mutation Database. Дополнительно был произведен биоинформатический анализ миссенс мутаций с помощью online программы Polyphen-2.

Оценка метилирования промотора гена TP53 требовала предварительного проведения бисульфитной конверсии 300–500 нг ДНК каждого образца с применением наборов EZ DNA Methylation Kit ("Zymo research", США), согласно протоколу производителя. Далее выполнялась метил-специфическая ПЦР в двух пробирках [4] с праймерами, специфичными к метилированному и неметилированному аллелю.

Потеря гетерозиготности в гене TP53 оценивалась по микросателлитному локусу D17S796 [5] методом ПЦР в парных образцах ДНК опухолевой и здоровой ткани пациентов с ДВККЛ.

Генотипирование rs78378222, rs1042522, rs17878362, rs1625895 и гаплотипирование rs17878362-rs1042522 проводилось методами ПЦР и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [14, 15]. Гаплотипирование rs1042522-rs1625895 и rs1625895-rs17878362 выполнялось мето-

дом гнездовой ПЦР с аллель-специфичным праймером [14], обеспечивающим наработку одного из редких аллелей в анализируемой паре маркеров. В последующем выполнялся анализ ПДРФ для выяснения сцепленного с ним аллеля второго маркера.

Для всех изученных полиморфных вариантов генов в выборках популяционного контроля распределение аллелей и генотипов проверялось на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга ($p^2AA + 2pqAa + q^2aa = 1$).

Для оценки ассоциации между изучаемыми параметрами и риском развития анализируемого события рассчитывалось отношение шансов (ОШ) с 95 % доверительным интервалом (ДИ). При сравнении частот признаков использовался стандартный критерий χ^2 Пирсона и точный критерий Фишера.

Анализ структуры неравновесия по сцеплению с определением коэффициентов D' и r^2 между rs1042522, rs1625895 и rs17878362 проводился с применением программы MIDAS и онлайн-калькулятора CubeX.

Результаты исследования. Значение rs1042522, rs17878362 и rs1625895 гена TP53 в определении предрасположенности к развитию ДВККЛ.

Согласно базе dbSNP, в гене TP53 известно около 750 полиморфизмов, 50 из которых цитируются в базе Pubmed. Большинство из них редко встречается в популяции, около двух десятков однонуклеотидных полиморфизмов имеют частоту встречаемости редкого аллеля в популяции более 5 %, а три — rs1042522, rs17878362 и rs1625895 — наиболее хорошо изучены в плане функциональных характеристик, распространенности в популяции и ассоциации с риском опухолей [28, 33, 39].

В течение последних 15 лет ассоциация rs1042522, rs17878362 и rs1625895 с пред-

расположенностью к различным опухолям человека была широко изучена, однако данные расходятся и не являются окончательными [18]. Комбинации генетических особенностей (межгенных взаимодействий) и эндо-экзогенных факторов различаются у лиц в популяциях с разным этническим происхождением, что может объяснять различия в предрасположенности [30]. Крайне важно также учитывать, что конечный эффект полиморфизма на функцию p53 может меняться в зависимости от типа опухолевых клеток [13], что свидетельствует об актуальности дальнейших исследований и необходимости новых сведений, расширяющих представления о роли генетического полиморфизма TP53 в предрасположенности к онкологическим заболеваниям.

На первом этапе данной работы было рассчитано распределение частот аллелей и генотипов трех изученных полиморфизмов гена TP53 в группе больных ДВККЛ и контрольной выборке. Статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов rs1042522, rs1625895 и rs17878362 в группе больных ДВККЛ и контрольных выборках, как и данных об ассоциации изучаемых маркеров с риском развития ДВККЛ, получено не было (табл. 2).

Однако, поскольку предрасположенность или устойчивость к мультифакториальным заболеваниям определяется сочетанием большого числа малых эффектов отдельных факторов, потенциально наиболее продуктивной стратегией выявления генетических вариантов, лежащих в основе предрасположенности к ДВККЛ, является анализ структуры неравновесия по сцеплению маркеров гена TP53 и обнаружение связанных с болезнью гаплотипов [11].

Таблица 2

Распределение частот аллелей и генотипов маркеров гена TP53 в группе больных ДВККЛ и контрольной выборке

Полиморфизм		Частота (n, %)		Риск ДВККЛ*			
		ДВККЛ	контроль	χ^2	p	OR (95% ДИ)	
rs1042522	генотип	Arg/Arg	74 (46,0)	170 (45,5)	4,44	0,11	1,02 (0,70–1,48)
		Arg/Pro	77 (47,8)	159 (42,5)			1,24 (0,86–1,80)
		Pro/Pro	10 (6,2)	45 (12,0)			0,48 (0,24–0,99)
	аллель	Arg	225 (69,9)	499 (66,7)	1,03	0,31	1,16 (0,87–1,54)
		Pro	97 (30,1)	249 (33,3)			0,86 (0,65–1,15)

Продолжение таблицы 2

Полиморфизм			Частота (n, %)		Риск ДВККЛ*		
			ДВККЛ	контроль	χ^2	p	OR (95% ДИ)
rs17878362	генотип	w/w	123 (76,4)	283 (75,7)	0,08	0,96	1,04 (0,67–1,61)
		w/dup	36 (22,4)	87 (23,3)			0,95 (0,61–1,48)
		dup/dup	2 (1,2)	4 (1,1)			1,16 (0,21–6,42)
	аллель	w	282 (87,6)	653 (87,3)	0,02	0,90	1,03 (0,69–1,52)
		dup	40 (12,4)	95 (12,7)			0,97 (0,66–1,45)
	rs1625895	генотип	G/G	120 (74,5)	294 (78,6)	0,76	0,68
G/A			39 (24,2)	76 (20,3)	1,15 (0,68–1,93)		
A/A			2 (1,3)	4 (1,1)	1,78 (0,32–9,85)		
аллель		G	279 (86,6)	644 (88,8)	0,97	0,32	0,82 (0,55–1,22)
		A	43 (13,4)	84 (11,2)			1,22 (0,82–1,81)

Примечание: * χ^2 , p, и ДИ — приведены для общей модели наследования.

Оценка неравновесия по сцеплению между rs1042522, rs1625895 и rs17878362 у 106 пациентов и 374 лиц контрольной группы показала, что сцепление между rs17878362 и rs1042522, а также rs1625895 и rs17878362 в группе больных ДВККЛ имеет умеренную силу, а между rs1625895 и rs1042522 — сцепление выраженное. Вместе с тем, значения коэффициентов D' и r2 свидетельствуют о значительно меньшей силе сцепления между тремя изучаемыми полиморфизмами

в контрольной выборке, в сравнении с группой исследования (таблица 3).

Понятие «гаплотип» отражает аллельную структуру нескольких сцепленных локусов в пределах одной хромосомы. Анализ гаплотипных последовательностей дает возможность на более глубоком уровне оценить функциональное взаимодействие полиморфных локусов (по аддитивному, потенцирующему, антагонистическому типу и их результирующее влияние на биологические функции белка).

Таблица 3

Степень структурного сцепления между rs17878362, rs1042522 и rs1625895 в группе больных ДВККЛ и контрольной выборке*

	Больные ДВККЛ		Контрольная группа	
	rs1042522	rs1625895	rs1042522	rs1625895
rs17878362	0,73 (0,15) ≤0,0001	0,71 (0,41) ≤0,000001	0,57 (0,09) ≤0,000001	0,47 (0,19) ≤0,000001
rs1042522	—	0,82 (0,22) ≤0,00001	—	0,42 (0,04) ≤0,0001

Примечание: * — в таблице приведены значения коэффициентов неравновесия по сцеплению D', (r2) между изучаемыми полиморфизмами и уровень значимости p

Распределение частот гаплотипов и диплотипов по трем изученным биаллельным полиморфизмам гена TP53 в обследованной группе больных ДВККЛ и контрольной выборке приведено в табл. 4. Получены значимые различия в частоте трех гаплотипов: повышение частоты гаплотипа wArgG (p = 0,025), а также снижение частот гаплотипов wProG (p = 0,025) и dupProG (p = 0,041) в группе больных ДВККЛ в сравнении с контрольной выборкой.

При этом протективное значение гаплотипов wProG или dupProG отмечалось в сочета-

нии с любыми другими гаплотипами в составе диплотипа (ОШ = 0,55; 95 % ДИ (0,34–0,90) и ОШ = 0,21; 95 % ДИ (0,05–0,90), соответственно), тогда как для гаплотипа wArgG отмечено повышение риска развития ДВККЛ только в гомозиготном состоянии (ОШ = 1,66; 95 % ДИ (1,07–2,57)) (табл. 4). Ранее другими авторами также отмечалось различие в эффектах изучаемого тройного гаплотипа гена TP53 в зависимости от гомозиготного или гетерозиготного состояния [10].

Распределение частот гаплотипов и диплотипов трех исследованных полиморфизмов гена TP53 в группе больных ДВККЛ и контрольной выборке

Частота (%)		Риск ДВККЛ		Диплотип#	Частота		Риск ДВККЛ	
ДВККЛ	контроль	Значение р	ОШ (95% ДИ)		ДВККЛ	контроль	Значение р	ОШ (95% ДИ)
148 (69,8)	457 (61,1)	0,025	1,47 (1,06–2,03)	wArgG/любой	97	323	0,212	1,70 (0,81–3,58)
3 (1,4)	21 (2,8)	0,370	0,50 (0,18–1,77)	wArgG/wArgG	51	134	0,029	1,66 (1,07–2,57)
30 (14,2)	160 (21,4)	0,025	0,61 (0,40–0,93)	wArgG/любой*	46	189	0,235	0,75 (0,49–1,16)
4 (1,9)	16 (2,1)	0,964	0,88 (0,33–2,75)	wArgA/любой	3	21	0,363	0,49 (0,14–1,67)
19 (9,0)	44 (5,9)	0,149	1,58 (0,92–2,78)	wProG/любой	27	143	0,021	0,55 (0,34–0,90)
6 (2,8)	14 (1,9)	0,555	1,53 (0,62–4,07)	dupArgG/любой	4	16	0,963	0,88 (0,29–2,68)
2 (0,9)	31 (4,1)	0,041	0,22 (0,07–0,99)	dupProA/любой	18	43	0,189	1,57 (0,87–2,86)
0 (0)	5 (0,7)	-	-	wProA/любой	6	14	0,094	1,54 (0,58–4,12)
212 (100)	748 (100)			dupProG/любой	2	31	0,031	0,21 (0,05–0,90)
				dupArgA/любой	-	5	-	-

Примечание: # аллели в составе гаплотипа и диплотипа указаны в порядке rs17878362-rs1042522-rs1625895; * любой гаплотип, кроме wArgG

Мутации в кодирующей и интронных последовательностях гена TP53.

В ходе анализа опухолевого материала от 74 больных ДВККЛ были выявлены 33 мутации: 21 в кодирующей, 12 в интронных последовательностях гена TP53 (рис. 1). Распределение мутаций было следующим: 1 (3%)

мутация, приводящая к нарушению сплайсинга молекулы РНК, 11 (33%) — интронных с неизвестным эффектом, 12 (37%) — миссенс, 6 (18%) — сеймсенс, 2 (6%) — нонсенс типа, 1 (3%) — мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене TP53.

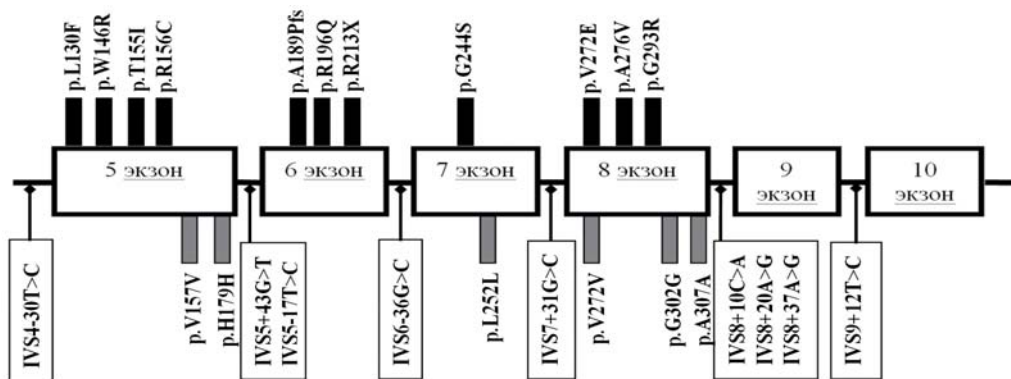


Рис. 1. Распределение мутаций в интронных и кодирующих участках гена TP53: горизонтальные рамки соответствуют эксонам; черные столбики — миссенс, нонсенс мутации и мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания; серые столбики — сеймсенс мутации; в вертикальных рамках — интронные мутации.

Все находки, за исключением A189Pfs (96,9%), представляли собой однонуклеотидные замены, 5 (15,6%) из которых были мутации типа GC>AT в CpG островках. Замены GC>AT составили 34,4%, GC>CG — 3,1%, GC>TA — 9,4%, AT>GC — 12,5%, AT>CG — 12,5%, AT>TA — 12,5%, что значительно не отличается от данных, представленных в IARC TP53 mutation database, вместе с тем наблюдались различия в локализации горячих точек мутаций (табл. 5).

Все выявленные нами в исследуемой вы-

борке больных ДВККЛ мутации в кодирующей последовательности гена TP53 описаны ранее в IARC TP53 mutation database при других онкологических заболеваниях и были расположены в 5–8 экзонах гена (рис. 1).

В обследованной выборке 4 (6,8%) больных имели множественные мутации, а ряд находок встречался неоднократно (в 2 случаях каждая): в кодирующей последовательности — p.W146R, p.T155I, p.V272E, p.R213X, в интронных областях IVS7+31G>C, IVS9+12T>C и IVS8+10C>A.

Таблица 5

Результаты сравнения спектра выявленных мутаций с данными IARC TP53 mutation database

«Hot-spot» мутации в группе больных ДВККЛ г. Новосибирска	«Hot-spot» кодоны IARC TP53 mutation database в порядке убывания частоты мутаций при ДВККЛ
p.W146R, p.T155I, p.V272E, p.R213X	248, 273, 175, 245, 281, 244, 305, 249, 297

Анализ биологической значимости всех выявленных нами в исследуемой выборке больных ДВККЛ миссенс мутаций в гене TP53 показал следующие данные (табл. 6). Мутации p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E, p.A276V, приводящие к появлению белка, утрачивающего функциональную активность, всеми тремя прогностическими

программами были отнесены к повреждающим, вредным или с высокой/средней степенью опасности заменам.

Биологическая значимость мутаций p.R213X и p.A189Pfs не вызывает сомнений, поскольку обе они приводят к появлению усеченного белка p53 с нулевой активностью.

Таблица 6

Результаты функционального анализа миссенс мутаций гена TP53

Мутация	Функциональный прогноз			Активность белка p53 в экспериментах <i>in vitro</i>
	PolyPhen-2 (характер мутации)	SIFT (характер мутации)	Mut_ass (степень патогенности)	
p.L130F	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен
p.W146R	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Незначительно снижена
p.T155I	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен
p.R156C	Не патогенная	Нейтральная	Низкая	Гиперактивен
p.R196Q	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен
p.G244S	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен
p.V272E	Возможно патогенная	Опасная	Высокая	Не активен
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена
p.A276V	Возможно патогенная	Опасная	Средняя	Не активен
p.G293R	Не патогенная	Нейтральная	Средняя	Незначительно снижена

Сложнее было оценить эффект сеймсенс-мутаций, выявленных в исследуемой выборке, поскольку они являются синонимическими заменами нуклеотидов, которые характеризуются сохранением смысла кодирующего кодона. Согласно прогнозу

TP53 Mutant assessor, из сеймсенс-мутаций наибольшего внимания заслуживает замена p.A307A ввиду того, что 307 кодон близок к концу экзона и потенциально может находиться в сайте сплайсинга молекулы РНК.

Функциональный эффект большинства

интронных мутаций, выявленных в группе больных ДВККЛ, точно не известен. Одна из биологически значимых мутаций гена TP53 (IVS6-36G>C) расположена в 6-м интроне гена. Она относится к изменениям, влияющим на сплайсинг, согласно The TP53 UMD mutation database in human cancer. В эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что данная замена, в отсутствие изменений в кодирующей последовательности гена, приводит к выживанию клеток в условиях химиотерапии и длительно ингибирует апоптоз [24].

Анализ аллельного дисбаланса и статуса метилирования гена TP53

Частота метилирования промотора гена TP53 в обследованной выборке из 69 больных ДВККЛ составила 4 (5,8 %) и значимо не различалась ($p = 0,5663$) в подгруппах с мутантной (4,2 %) и нормальной структурой гена (6,7 %).

Анализ потери гетерозиготности (ПГ) в гене TP53 по микросателлитному маркеру D17S796 был выполнен у 24 больных ДВККЛ группы исследования, из них у 13 человек обнаружены мутации, у 11 — отсутствовали изменения в последовательности гена TP53. Были выявлены 6 (25 %) случаев ПГ, из них 5 (83,3 %) случаев ПГ приходились на больных, у которых в ходе секвенирования были выявлены мутации в последовательности 5–8-го экзонов и прилегающих участков интронов TP53.

Изменения в 3'-НТП гена TP53 в опухолевой ткани больных ДВККЛ

Маркер 3'-НТП гена TP53 — rs78378222 по данным dbSNP — описан в полногеном-

ных исследованиях в контексте ассоциации с риском развития рака простаты, глиомы, базальноклеточной карциномы кожи, рака пищевода и колоректальной аденомы [36]. На крупной выборке пациентов (244 человека) показано наличие rs78378222 при ДВККЛ [25]. Данный маркер представляет собой одонуклеотидную замену в 3'-НТП гена TP53, приводящую к изменению последовательности ААТААА, которая является сигналом к полиаденилированию на ААТАСА, что приводит к нарушению процессинга 3'-конца мРНК гена TP53. Экспериментальные данные показывают, что редкий аллель С rs78378222, в сравнении с аллелем А, обеспечивает значительно меньший уровень экспрессии TP53, что приводит к снижению индукции апоптоза в клетках под действием генотоксических факторов [25].

Обращает на себя внимание следующий факт. Ни в одном из опубликованных в настоящее время исследований редкий аллель С rs78378222 в здоровой ткани не встречался в гомозиготном состоянии. Считается, что данный маркер находится под действием отрицательного естественного отбора, механизмом которого, по всей видимости, являются злокачественные новообразования [24].

Генотипирование 92 образцов ДНК, выделенной из опухолевой ткани больных ДВККЛ, проведенное в рамках данной работы, показало, что частота выявления rs78378222 составила 9/92 (9,8 %). У ряда пациентов выявлен минорный аллель С в гомозиготном состоянии (рис. 2).

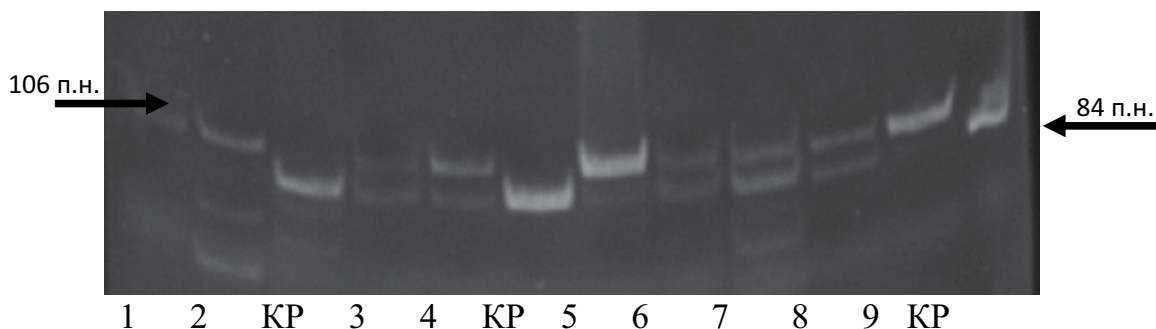


Рис. 2. Результаты генотипирования rs78378222 методом ПЦР с анализом ПДРФ образцов опухолевой ткани больных ДВККЛ, имеющих редкий аллель С: 1–9 номера случаев; КР — контроль рестрикции; 106+84 п. н. (генотип А/С); 84 п. н. (генотип А/А); 106 п. н. (генотип С/С).

С целью подтверждения результатов генотипирования было выполнено прямое секвенирование по Сенгеру фрагмента 3'-НТП гена

TP53, содержащей rs78378222, всех 9 образцов ДНК из опухолевой ткани ДВККЛ, имеющих, согласно результатам ПЦР с анализом

ПДРФ, минорный аллель С. Дополнительно было выполнено секвенирование образца ДНК из опухолевой ткани, имеющего гомозиготный нормальный генотип А/А, а также образцов ДНК из не контактирующей с формалином периферической крови лиц, имеющих частый гомозиготный генотип А/А и гетерозиготный генотип А/С. Результаты секвенирования приведены в *таблице 7*.

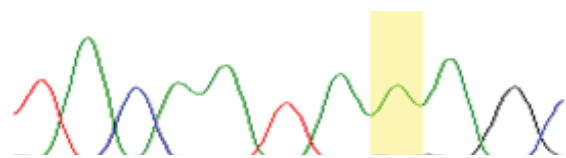
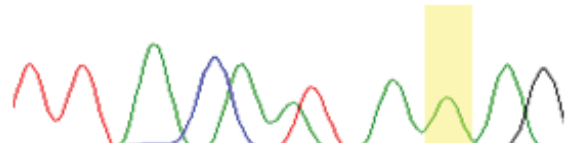
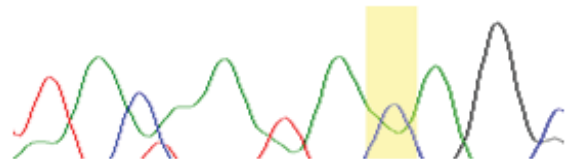
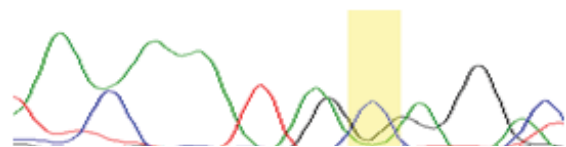
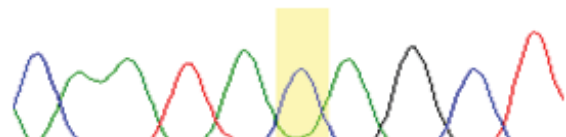
Поскольку случаи обнаружения редкого гомозиготного генотипа С/С rs78378222 в нормальной ткани не описаны, а выделение ДНК из парафинизированных блоков проводилось из срезов с содержанием опухолевой ткани не менее 70–80 %, полученные результаты свидетельствуют о потере гетерозиготности в локусе расположения rs78378222 в опухолевой ткани больных ДВККЛ, гетерозиготных по rs78378222 (случаи под номерами 1, 2, 4, 5 и 9 на *рис. 2* и в *табл. 7*).

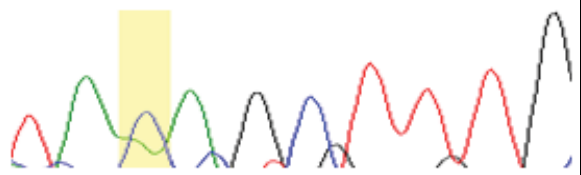
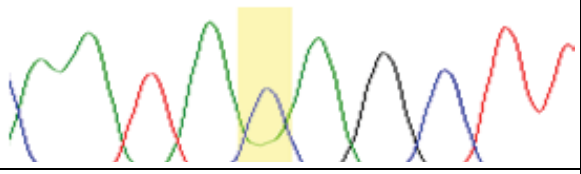
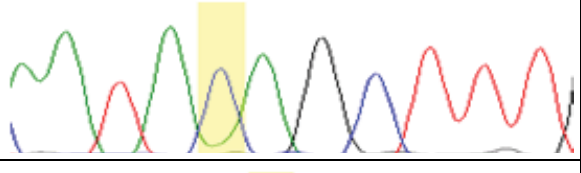
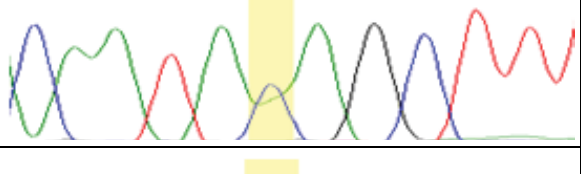
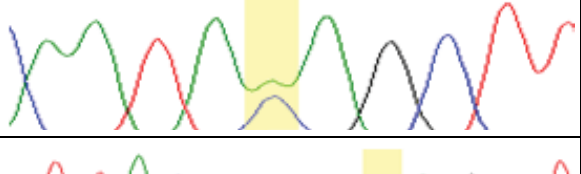
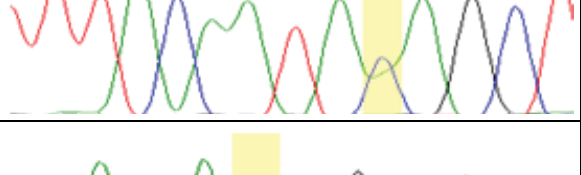
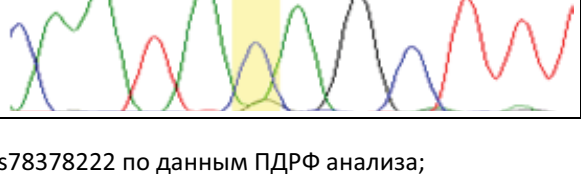
Комплексный анализ аномалий гена TP53 при ДВККЛ

Анализ мировой литературы показывает, что вопросы частоты мутационных событий в кодирующей последовательности TP53 и его аллельного дисбаланса являются наиболее изученными аспектами статуса данного гена при ДВККЛ. Работы, анализирующие метилирование промотора и 3'-НТП TP53, представлены единичными сообщениями. Интронные последовательности, потенциально несущие сайты сплайсинга мРНК, не изучены вовсе. Анализ всего перечисленного спектра функционально-значимых изменений в гене TP53 на единой выборке пациентов с ДВККЛ ранее не проводился. В связи с этим нами был проведен комплексный анализ молекулярно-генетических нарушений, затрагивающих ген TP53 в опухолевой ткани ДВККЛ, результаты которого представлены в *таблице 8*.

Таблица 7

Результаты секвенирования сиквенса 3'-НТП гена TP53, содержащей rs78378222

Проба	Генотип		Фрагмент сиквенса
	по данным метода ПЦР с анализом ПДРФ	по данным секвенирования по Сенгеру	
К1	А/А	А/А	
К2	А/А	А/А	
К3	А/С	А/С	
С1	С/С	С/С	
С2	С/С	С/С	

Проба	Генотип		Фрагмент сиквенса
	по данным метода ПЦР с анализом ПДРФ	по данным секвенирования по Сенгеру	
C3	A/C	A/C	
C4	A/C с преобладанием аллеля С	A/C с преобладанием аллеля С	
C5	A/C с преобладанием аллеля С	C/C	
C6	A/C	A/C	
C7	A/C	A/C	
C8	A/C	A/C	
C9	A/C с преобладанием аллеля С	C/C	

Примечание: K1 — ДНК опухолевой ткани с частым генотипом A/A rs78378222 по данным ПДРФ анализа;
 K2 — ДНК крови контрольной группы с генотипом A/A rs78378222 по данным ПДРФ анализа;
 K3 — ДНК крови контрольной группы с гетерозиготным генотипом A/C rs78378222 по данным ПДРФ анализа;
 C1-C9 — случаи выявления редкого аллеля rs78378222.

Таблица 8

Данные о сочетанных нарушениях в гене TP53 в опухолевой ткани больных ДВККЛ

Номер пациента	Мутация	D17S796	Генотип rs78378222	Метилирование
1.	p.L130F	ПГ	A/A	Норма
	p.R156C			
2.	p.W146R	—	A/A	Метилирование
3.	p.W146R	—	A/A	Норма
4.	p.T155I	ПГ	A/A	Норма
	p.A189Pfs			
	IVS5 + 43G > T			
5.	IVS4 – 30T > C	Норма	A/A	Норма
6.	p.T155I	—	A/C	Норма
	p.A307A			
	p.V157V			
	IVS4–30T > C			
	IVS8 + 20A > G			
7.	p.H179H	—	A/C	Норма
8.	p.R196Q	ПГ	C/C	Норма
9.	p.R213X	Норма	A/A	Норма
10.	p.R213X	Норма	A/A	Норма
11.	p.G244S	Норма	A/A	Норма
12.	p.L252L	—	C/C	Норма
	IVS6 – 36G > C			
13.	p.V272E	Норма	A/A	Норма
14.	p.V272E	Норма	A/A	Норма
15.	p.V272V	Норма	A/A	Норма
16.	p.A276V	—	A/A	Норма
17.	p.G293R	ПГ	A/A	Норма
18.	p.G302G	—	A/A	Норма
	IVS8 + 10C > A			
19.	IVS5 – 17T > C	—	A/A	Норма
	IVS7 + 31G > C			
20.	IVS8 + 37A > G	ПГ	A/A	Норма
21.	IVS9 + 12T > C	Норма	A/A	Норма
22.	IVS9 + 12T > C	—	A/A	Норма
23.	IVS8 + 10C > A	—	A/A	Норма
24.	IVS7 + 31G > C	—	A/A	Норма
25.	Норма	Норма	A/A	Норма
26.	Норма	Норма	A/A	Метилирование
29.	Норма	ПГ	A/A	Метилирование
32.	Норма	Норма	A/C	Норма
36.	Норма	—	A/A	Метилирование
50.	Норма	—	A/C	Норма
51.	Норма	—	C/C	Норма
64.	Норма	—	C/C	Норма
67.	Норма	—	C/C	Норма

Примечание: Красный цвет — доказанный патогенный эффект, зеленый — непатогенные изменения, голубой — не приводят к потере функции белка p53, желтый — функциональный эффект не возможно оценить.

Было показано, что как минимум треть (32,4%) больных ДВККЛ имеют нарушения в гене с доказанным онкогенным потенциалом, которые в половине случаев носят сочетанный характер. Множественные мутации имеют 6,8% больных. Частота ПГ в гене с учетом микросателлитного маркера D17S796 и полиморфизма rs78378222 составила 13,5%, что соответствует данным, полученным в крупном многоцентровом исследовании Международного консорциума по изучению ДВККЛ [42]. Наконец, все случаи ПГ сочетались с соматическими мутациями, метилированием промотора TP53 либо маркером 3-НТП, эффект которого равен эффекту мутации с выключением функции p53.

Обсуждение результатов. Анализ данных мировой литературы показывает, что вопрос о значении полиморфизма гена TP53 в предрасположенности к неходжкинским лимфомам (НХЛ) в настоящее время остается не решенным. Weng et al. (2012) в проведенном мета-анализе литературы попытались суммировать данные относительно связи rs1042522 гена TP53 с предрасположенностью к НХЛ [38]. Его данные вполне согласуются с полученными нами в пилотном исследовании результатами на группе из 100 пациентов с НХЛ о том, что именно аллель Pro данного маркера может являться «рисковым» в отношении лимфом [7, 8]. Однако, помимо того, что в отличие от rs1042522, ассоциация rs17878362 и rs1625895 с риском НХЛ практически не изучена [1, 8], высокое разнообразие НХЛ требует анализа данных маркеров при отдельных гистологических вариантах заболевания, а малый эффект каждого из полиморфизмов в отдельности на риск развития заболевания — оценки их в составе гаплотипных групп.

Нами проводился анализ частоты rs1042522, rs1625895 и rs17878362, их тройного гаплотипа и неравновесия по сцеплению у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лиц контрольной группы — жителей г. Новосибирска и Новосибирской области.

Были получены результаты об отсутствии статистически значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов rs1042522, rs1625895 и rs17878362 в группе больных ДВККЛ и контрольной выборке.

Также был изучен характер неравновесия по сцеплению (LD) между изучаемыми по-

лиморфизмами в группе пациентов с ДВККЛ и контрольной выборке. Полученные результаты, во-первых, свидетельствуют об умеренной силе сцепления между тремя изучаемыми полиморфизмами в контрольной выборке.

Хотя ранее рядом зарубежных авторов и была отмечена высокая степень структурного сцепления между rs17878362, rs1042522 и rs1625895 [32], при сравнении частот гаплотипов TP53 у лиц различной этнической принадлежности было показано, что не только сила LD между полиморфизмами, но и состав блоков сцепления в гене TP53 может значительно варьировать в различных популяциях [16]. Полученные нами результаты об отсутствии жесткого сцепления между rs1042522, rs1625895 и rs17878362 в популяции Сибирского региона России подтверждаются данными Cherdyntseva N. V. et al. о наличии LD лишь умеренной силы между изучаемыми полиморфизмами у жителей Томской области [14].

Во-вторых, коэффициенты D' и r^2 свидетельствуют, что сила неравновесия по сцеплению между изучаемыми полиморфизмами в группе больных ДВККЛ выше, чем в группе контроля и имеет умеренную силу между rs17878362 и rs1042522, а также rs1625895 и rs17878362, а между rs1625895 и rs1042522 — неравновесие по сцеплению выраженное. Более выраженная структура неравновесия по сцеплению (LD) у больных по сравнению с контрольными или популяционными выборками подтверждает, что ген-кандидат играет определенную роль в подверженности болезни.

Полученные нами данные о наибольшей частоте встречаемости гаплотипа wArgG как в контрольной выборке, так и группе больных ДВККЛ согласуются с результатами работы Khrunin A. V. et al. [22]. Частота гаплотипа dupProA в нашем исследовании составила 9% и 5,9% в группах больных ДВККЛ и контрольной выборке, соответственно. Khrunin A. V. et al. изучали тройные гаплотипы TP53 у жителей различных регионов России и Белоруссии, и гаплотип wArgG был наиболее частым во всех исследованных популяциях. Частота гаплотипа dupProA снижалась с запада на восток (от 17,9% у белорусов до 0,7% в Якутске и Верхоянске) и коррелировала с долготой.

В проведенном нами исследовании было показано, что для гаплотипа wArgG отмечена ассоциация с риском развития ДВККЛ только

в гомозиготном состоянии (OR1,66; 95 % CI (1,07–2,57)), в отличие от гаплотипов wProG или dupProG, имеющих протективный эффект в сочетании с любыми другими гаплотипами в составе диплотипа (OR0,55; 95 % CI (0,34–0,90) и OR0,21; 95 % CI (0,05–0,90), соответственно). Ранее другими авторами также отмечалось различие в эффектах изучаемого тройного гаплотипа TP53 в зависимости от гомозиготного или гетерозиготного состояния [10].

Таким образом, эффект полиморфизмов гена TP53 на формирование предрасположенности к опухолям, по всей видимости, обладает влиянием, результат которого определяется как этнической принадлежностью, взаимодействиями со средой и другими генетическими факторами, гистологической принадлежностью опухоли, так и уровнем гетерозиготности по изучаемым полиморфизмам и гаплотипной структурой гена TP53.

Спектр однонуклеотидных замен, выявленных в ходе секвенирования гена TP53 в опухолевой ткани больных ДВККЛ группы обследования, значимо не различался с данными, представленными в IARC TP53 mutation database. Локализация «горячих точек» мутаций, в отличие от спектра однонуклеотидных замен, в обследованной выборке больных диффузной В-ККЛ отличается от данных, представленных в IARC TP53 mutation database. В ходе исследования, за исключением 244-го кодона, не выявлено мутаций в большей части кодонов (248, 273, 175, 245, 281, 305, 249 и 297), для которых в IARC TP53 mutation database описано наибольшее количество мутаций в гене TP53 при ДВККЛ. В анализируемой выборке больных кодоны 275, 155, 272 и 212 являлись «горячими точками» мутаций.

Преобладали (95 %) мутации в участках гена TP53, кодирующих ДНК-связывающий регион. Мутация p.G293R — единственная из выявленных миссенс-замен, которая не затрагивает функционально-значимого ДНК-связывающего домена p53.

Анализ базы данных IARC TP53 mutation database показал, что все функционально значимые мутации, выявленные нами в группе обследования, были описаны ранее при широком круге новообразований человека. Кодоны 196 и 213 при всех опухолях и кодон 244 при гемобластозах вообще и ДВККЛ в частности являются «горячими точками» мутаций

в гене TP53 [21]. Более того, описаны случаи синдрома Li-Fraumeni [21], для которого характерно развитие первично-множественных злокачественных новообразований, вызванных герминогенными мутациями p.R213X, p.G244S, p.L130F и p.T155I, аналогичными описанным нами.

Каждая из мутантных форм белка является уникальным продуктом мутации и может сочетать в себе как усиление или снижение определенных видов активности p53, так и нарушение его структуры или приобретение белком новых свойств. К появлению функционально неактивного белка p53 в обследованной выборке больных ДВККЛ приводили миссенс-мутации p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E и p.A276V наряду с мутацией p.A189Pfs, приводящей к сдвигу рамки считывания, нонсенс заменой p.R213X и сплайс-мутацией IVS6–36G>C. Все описанные выше события в кодирующей части гена приходятся на регионы, несущие информацию о высоко консервативных участках ДНК-связывающего домена белка, закрепленных эволюционно в филогенезе, и встречающихся в большинстве изоформ p53, а также структуре белков-гомологов p63 и p73.

Мутации p.R213X и p.G244S, а также p.V272E ранее уже были описаны при ДВККЛ [21], а выявленная нами p.T155I ранее была зарегистрирована у нескольких больных ХЛЛ и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и низкой эффективностью его терапии [21]. Среди случаев с гемобластомами p.V272E ранее была описана при лимфоме Беркитта, болезни Ходжкина и В-клеточных НХЛ [21].

Все эти данные свидетельствуют о селективности p.L130F, p.T155I, p.R196Q, p.G244S, p.V272E, p.A276V, p.R213X и p.A189Pfs на этапах опухолевой прогрессии и не случайном их обнаружении у больных ДВККЛ.

В ходе исследования впервые было показано наличие при ДВККЛ патогенетически значимых интронных и сеймсенс-замен, что свидетельствует о важности как анализа прилегающих к экзонам некодирующих участков гена, так и биоинформационного анализа выявленных синонимичных замен. Из выявленных нами в группе больных ДВККЛ мутаций две могут влиять на сплайсинг молекулы РНК. К ним относятся сеймсенс-замена p.A307A и IVS6–36G>C. Функциональная значимость IVS6–36G>C была доказана в эксперименте *in vitro* [24]. Согласно прогнозу TP53 Mutant

assessor (release 1.00, 2012), p.A307A также находится в сайте сплайсинга молекулы РНК. Несмотря на то, что при сеймсенс-мутациях вновь образующийся кодон продолжает кодировать ту же аминокислоту, что обусловлено вырожденностью генетического кода, считается, что мутации данного типа могут менять сплайсинг, транскрипцию и стабильность РНК.

Функциональный эффект незатронутых в обсуждении интронных и сеймсенс-мутаций, выявленных в группе больных ДВККЛ, остается неизвестным. Вместе с тем, они потенциально могут влиять не только на сплайсинг мРНК, но и на экспрессию гена, нарушая авторегуляцию процессинга.

Имеющиеся в литературе единичные сообщения о низкой частоте метилирования промотора гена TP53 при ДВККЛ [12] были проверены на исследуемой группе больных г. Новосибирска. Частота метилирования промотора гена TP53 в обследованной выборке больных ДВККЛ составила 5,8 % и значимо не различалась в подгруппах с мутантной (4,2 %) и нормальной (6,7 %) структурой гена, а также с результатами К. Amara и соавт. [12] (3,7 %).

Анализ ПГ в гене TP53 был выполнен у 24 больных ДВККЛ группы исследования, из них 13 человек имели мутации и 11 — отсутствие изменений в последовательности гена TP53. По данным анализа микросателлитного маркера D17S796, расположенного рядом с TP53, выявлены 6 (25 %) случаев ПГ, что соответствовало данным литературы [40].

В 2011 г. в ходе проекта по полногеномному секвенированию впервые был описан наследуемый полиморфизм rs78378222 3'-НТП TP53, приводящий к нарушению процессинга 3'-конца м-РНК [19]. Он затрагивает сигнал полиаденилирования TP53, приводя к изменению канонической последовательности ААТААА на ААТАСА. Данный сигнал необходим для распознавания аппаратом полиаденилирования, последующего расщепления, полиаденилирования, и экспорта зрелых мРНК в цитоплазму [25]. Функциональный анализ показал, что rs78378222 приводит к снижению как экспрессии p53, так и уровня апоптоза в клетках [27].

Строгое эволюционное закрепление сигнала полиаденилирования гена TP53 было показано при исследовании генома 63 видов млекопитающих, а также древней ДНК

неандертальцев и образцов Денисова [27]. Ни один из исследованных образцов ДНК не имел изменений в локусе rs78378222.

Однако в 2013 году Li et al. впервые сообщили о прогностическом значении aberrаций в 3'-НТП гена TP53 при ДВККЛ, а также об обнаружении rs78378222 в опухолевой ткани больных ДВККЛ [25]. Учитывая наличие таких данных, нами был выполнен анализ распространенности данного маркера в опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ г. Новосибирска.

Генотипирование 92 образцов ДНК показало, что 9 (9,8 %) из них имели rs78378222. Наличие редкого аллеля С данного маркера подтверждалось методом секвенирования по Сэнгеру.

Wang et al. (2016) провели первый мета-анализ ассоциации маркера с риском развития опухолей. В исследование были включены 34 работы с общей численностью 36 599 случаев и 91 272 контролей. Результаты показали, что rs78378222 гена TP53 был значимо связан с повышенным риском развития онкологических заболеваний в целом (AC vs. AA: OR = 1,5, 95 % CI = 1,3–1,8). Таким образом, было доказано, что аллель С rs78378222 является важным фактором риска развития опухолей у человека [36]. Из миллионов полиморфизмов в геноме человека rs78378222 имеет самую сильную ассоциацию с базальноклеточной карциномой.

Обращает на себя внимание следующий факт. Ни в одном из опубликованных в настоящее время исследований, описанных в литературе, редкий аллель С rs78378222 в здоровой ткани не встречался в гомозиготном состоянии [25]. Вместе с тем, часть проанализированных нами образцов опухолевой ткани ДВККЛ имели генотип С/С rs78378222. Все они представляют собой случаи потери гетерозиготности в гене TP53 у носителей гетерозиготного генотипа А/С rs78378222 в опухолевой ткани ДВККЛ.

Биологический смысл потери гетерозиготности в гене TP53, имеющем редкий аллель С rs78378222, при ДВККЛ может быть в следующем. В клетках, имеющих rs78378222, было подтверждено снижение уровня м-РНК в сравнении с клетками без данного полиморфизма и наличием другого рядом расположенного маркера rs114831472. В случае обнаружения редкого аллеля С данного маркера уровень клеточного апоптоза был ниже, в сравнении с клетками с диким типом гена

TP53. Эти данные показывают, что TP53 полиморфизм rs78378222 нарушает экспрессию p53 и угнетает апоптоз [36].

Также предполагается, что rs78378222 может нарушать связывание miR-545 с 3'-НТП TP53 [43]. Поскольку сайты связывания микро-РНК расположены преимущественно на 3'-НТП генов, наследуемые варианты 3'-НТП TP53 могут значительно влиять на экспрессию гена путем отмены, ослабления или создания нового сайта связывания.

Таким образом, rs78378222 представляет собой уникальный аллельный вариант TP53 со снижением функции p53. Потеря нормального аллеля А способствует значительному приросту злокачественного потенциала клеток [25,32]. Интересно, что описанное в настоящем исследовании наблюдение не является уникальным. В работе Li et al. было показано, что 1/7 случаев выявления rs78378222 в опухолевой ткани ДВККЛ также имел гомозиготный генотип С/С [25].

Еще одна исследовательская группа Wang et al. (2015) провела интегративный анализ данных Cancer Genome Atlas для двух опухолевых нозологий: глиобластомы и аденокарциномы легкого [37]. Используя данные секвенирования мРНК TP53, авторы установили, что транскрипты гена, имеющие редкий аллель С rs78378222, на ~ 3 kb длиннее, чем транскрипты гена с аллелем А, что препятствовало трансляции полноценного белка p53 [37].

Биоинформационный анализ данных секвенирования экзона опухолевой ткани показал, что при глиобластомах, в отличие от аденокарциномы легкого, происходит потеря гаплотипа, несущего защитный аллель

А. Авторы предположили, что потеря области генома, несущего частый защитный аллель А, происходит во время инициации опухоли или прогрессии глиомы [37].

Таким образом, эффект rs78378222 на процессинг 3'-конца представляет собой еще один механизм онкогенеза, подтвержденный на опухолях различного происхождения, который способствует формированию дефицита TP53 при опухолевой прогрессии ДВККЛ.

Комплексный анализ изменчивости гена показывает, что недостаточность функции TP53 при ДВККЛ может формироваться по «двух-ударному» принципу. Согласно ему, для перехода нормальной В-клетки в опухолевую при возникновении, по меньшей мере, части случаев ДВККЛ могут быть необходимы два последовательных события (рис. 4). Первое событие — это мутация или метилирование промотора TP53, приводящие к образованию клетки с повышенным риском злокачественной трансформации. Для реализации опухолевого потенциала в клетке должно случиться второе событие — потеря неповрежденного аллеля гена.

Явление потери гетерозиготности в гене TP53 у носителей гетерозиготного генотипа А/С rs78378222 в опухолевой ткани ДВККЛ также является ни чем иным, как примером классического «двух-ударного» механизма канцерогенеза, описанного А. Кнудсоном в 1971 г. [23]. Согласно ему, для развития опухоли необходимы последовательные изменения обоих аллелей антионкогена, одного в зародышевой линии, а второго — за счет соматических aberrаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воропаева Е. Н., Воевода М. И., Поспелова Т. И., Максимов В. Н. Интронные полиморфизмы антионкогена TP53 у пациентов старшей возрастной группы с индолентными вариантами неходжкинских злокачественных лимфом. Успехи геронтологии 2013; 26(2): 258–262.
2. Воропаева Е. Н., Воевода М. И., Поспелова Т. И., Максимов В. Н. Неравновесие по сцеплению полиморфных маркеров rs1042522, rs1625895 и rs17878362 и гаплотипы гена TP53 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Молекулярная биология 2014; 48(5): 763–770.
3. Воропаева Е. Н., Поспелова Т. И., Воевода М. И., Максимов В. Н. Обнаружение полиморфизма rs78378222 гена TP53 в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Сибирский научный медицинский журнал 2016; 36(5): 20–27.

4. Воропаева Е. Н., Поспелова Т. И., Воевода М. И., Максимов В. Н. Результаты комплексного анализа статуса гена TP53 у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. Гематология и трансфузиология 2016; 61(3): 138–143.
5. Воропаева Е. Н., Поспелова Т. И., Воевода М. И., Максимов В. Н. Сравнительный анализ мутаций в гене TP53 у больных ДВККЛ г. Новосибирска с данными, представленными в IARC TP53 mutation database. Медицинская генетика 2016; 15(4): 17–20.
6. Копнин Б. П., Копнин П. Б., Хромова Н. В., Агапова Л. С. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей. Клиническая онкогематология 2008; 1(1): 2–9.
7. Поспелова Т. И., Воевода М. И., Воропаева Е. Н., Белявская В. А. и др. Функциональный полиморфизм гена p53 у больных неходжкинскими лимфомами. Вестник гематологии 2008; 4(4): 23–28.
8. Поспелова Т. И., Воропаева Е. Н., Воевода М. И., Березина О. В. Полиморфизм гена p53 как потенциальный маркер предрасположенности к развитию неходжкинских злокачественных лимфом. Гематология и трансфузиология 2010; 55(1): 11–17.
9. Поспелова Т. И., Лосева М. И., Ковынев И. Б., Агеева Т. А. и др. Основы опухолевой прогрессии гемобластозов. Сибирский научный медицинский журнал 2004; 24(2): 71–73.
10. Сметанникова Н. А., Максимов В. Н., Устинов С. Н., Степанова Т. В. и др. Генотипы и гаплотипы гена-онкосупрессора p53: ассоциация с продолжительностью жизни у русских Новосибирской области. Сибирский онкологический журнал 2006; 2: 37–41.
11. Трифнова Е. А., Спиридонова М. Г., Габидулина Т. В., Урнов Ф. Д. и др. Анализ структуры неравновесия по сцеплению и ассоциации полиморфных вариантов гена MTHFR с коронарным атеросклерозом. Генетика 2012; 48(10): 1207–1220.
12. Amara K., Trimeche M., Ziadi S., Laatiri A. et al. Presence of simian virus 40 DNA sequences in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with aberrant promoter hypermethylation of multiple tumor suppressor genes. Int J Cancer 2007; 121(12): 2693–702.
13. Azzam G. A., Frank A. K., Hollstein M., Murphy M. E. Tissue-specific apoptotic effects of the p53 codon 72 polymorphism in a mouse model. Cell Cycle 2011; 10(9): 1352–1355.
14. Cherdyntseva N. V., Denisov E. V., Litviakov N. V., Maksimov V. N., et al. Crosstalk between the FGFR2 and TP53 genes in breast cancer: data from an association study and epistatic interaction analysis. DNA and cell biology 2011; 00(00): 1–12.
15. Chumakov P. M. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. // Biochemistry 2007; 72(13): 1399–1421.
16. Conrad D. F., Jakobsson M., Coop G., Wen X. et al. A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome. Nat Genet 2006; 38: 1251–1260.
17. Diederichs S., Bartsch L., Berkmann J. C., Fröse K. et al. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. EMBO Mol. Med. 2016; 8(5): 442–457.
18. Economopoulos K. P., Sergentanis T. N. Methodological remarks concerning the recent meta-analysis on p53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer risk. Eur J Surg Oncol 2010; 36(12): 1225–1226.
19. Enciso-Mora V., Hosking F. J., Di Stefano A. L., Zelenika D. et al. Low penetrance susceptibility to glioma is caused by the TP53 variant rs78378222. // Br J Cancer. 2013; 108: 2178–2185.
20. Gudkov A. V., Komarova E. A. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. Nat Rev Cancer 2003; 3(2): 117–129.
21. <http://p53.iarc.fr/DownloadDataset.aspx>
22. Khrunin A. V., Tarskaia L. A., Spitsyn V. A., Lylova O. I., Bebyakova N. A., Mikulich A. I., Limborska S. A. 2005. p53 polymorphisms in Russia and Belarus: correlation of the 2–1–1 haplotype frequency with longitude. Mol Genet Genomics. 272(6), 666–72.
23. Knudson A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1971. 68. 820–823.
24. Lehman T. A., Haffty B. G., Carbone C. J., Bishop L. R. et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. Cancer Res 2000; 60(4): 1062–9.

25. Li Y., Gordon M. W., Xu-Monette Z.Y., Visco C. et al. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013; 121(22): 4529–40.
26. Liang Y., Lin S. Y., Brunicardi F. C.. DNA damage response pathways in tumor suppression and cancer treatment. *World J Surg* 2009; 33: 661–666.
27. Macedo G. S., Araujo Vieira I., Brandalize A. P., Giacomazzi J et al. Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3'UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics* 2016; 209: 97–106.
28. Ozeki C., Sawai Y., Shibata T., Kohno T. et al. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem* 2011; 286(20): 18251–18260.
29. Paskulin D. D., Cunha-Filho J.S.L., Souza C. A. B., Bortolini M. C. et al. TP53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death and Disease* 2012; 3: e392.
30. Perez-Losada J., Castellanos-Martin A., Mao J. H. Cancer evolution and individual susceptibility. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3(4): 316–328.
31. Petitjean A., Achatz M. I., Borresen-Dale A.L., Hainaut P. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; 26: 2157–2165.
32. Stacey S. N., Sulem P., Jonasdottir A., Masson G. et al. A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet* 2011; 43(11): 1098–1103.
33. Sun Y., Keshava C., Sharp D. S., Weston A. et al. DNA Sequence Variants of p53: Cancer and Aging. *Am J Hum Genet* 1999; 65(6): 1779–1782.
34. Tamimi Y., Al-Harthy S., Al-Haddabi I., Al-Kindi M. et al. The p53 mutation/deletion profile in a small cohort of the Omani population with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Sultan Qaboos University Med J* 2014; 14(1): 50–58.
35. Ventura A., Kirsch D. G., McLaughlin M. E. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007; 445(7128): 661–665.
36. Wang Y., Wu X. S., He J., Ma T., et al. A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancersusceptibility: Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget* 2016. doi: 10.18632/oncotarget.9056. [Epub ahead of print]
37. Wang Z., Rajaraman P., Melin B. S., Chung C. C., Zhang W., McKean-Cowdin R., Michaud D., Yeager M., Ahlbom A., Albanes D. et al. Further Confirmation of Germline Glioma Risk Variant rs78378222 in TP53 and Its Implication in Tumor Tissues via Integrative Analysis of TCGA Data. // *Hum Mutat.* 2015. 36(7). 684–688.
38. Weng Y., Lu L., Yuan G., Guo J. et al. p53 codon 72 polymorphism and hematological cancer risk: an update meta-analysis. *PLoS One.* 7(9), e45820.
39. Wu X., Zhao H., Amos C. I., Shete S., Maman N., Hong W. K., Kadlubar F. F., Spitz M. R. 2002. P53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Nat Cancer Inst* 2012; 94: 681–690.
40. Xu-Monette Z.Y., Wu L., Visco C., Tai Y. C. et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012; 120(19): 3986–96.
41. Xu-Monette Z.Y., Medeiros L. J., Li Y., Orlowski R. Z. et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 2012; 119(16): 3668–3683.
42. Young K. H. Clinical Impact of TP53 gene mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): an international DLBCL Rituxan-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2009; 114: 399–400.

Ремизова М. И., Гришина Г. В., Гербут К. А.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»

**КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОМ ШОКЕ
L-АРГИНИНОМ В СОЧЕТАНИИ С СОЛЕВЫМ РАСТВОРОМ**

Remizova M. I., Grishina G. V., Gerbout K. A.

FSBI «Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion FMBA of Russia», St. Petersburg

**CORRECTION OF DISORDERS OF BLOOD CIRCULATION IN HEMORRHAGIC SHOCK
BY REGULATOR OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS L-ARGININE WITH SALINE SOLUTION**

Резюме. На модели геморрагического шока у кроликов исследована возможность коррекции нарушений кровообращения донором оксида азота — L-аргинином, вводимым в составе инфузионной среды — изотонического раствора натрия хлорида (в объеме, превышающем в 2 раза эксфузированную кровь). Показано, что L-аргинин (200 мг/кг), введенный животным после тяжелой кровопотери, повышает эффективность инфузионной терапии: восстанавливает системную гемодинамику и микрогемодинамику. Введение регулятора синтеза оксида азота — L-аргинина увеличивает продолжительность жизни животных до 91 % (в контроле 44 %).

Ключевые слова: геморрагический шок, инфузионная терапия, оксид азота, L-аргинин.

Введение. Гематологические заболевания в большинстве случаев сопровождаются постепенным уменьшением количества циркулирующих эритроцитов, приводящим зачастую к анемии [1]. Причины анемии можно разделить на 3 группы: кровопотеря, снижение генерации эритроцитов и усиление их разрушения. В основе патогенеза острой постгеморрагической анемии лежит уменьшение объема циркулирующей крови (ОЦК), что вызывает сосудистую недостаточность и снижение оксигенации тканей организма. Неблагоприятный гематологический фон при уменьшении ОЦК при острой кровопотере ведет к развитию шока, так как к гемической гипоксии присоединяется и циркуляторная гипоксия органов и тканей.

Развивающаяся вследствие кровопотери гиповолемия приводит к уменьшению ве-

Abstract. On the model of hemorrhagic shock in rabbits we have investigated the possibility of correction of disorders of blood circulation by nitric oxide donor- L-arginine (200 mg/kg bolus) with of twice volume isotonic 0,9 % solution of NaCl comparative with shed blood volume (the second series). In the first control series, the animals were treated with an equal volume of saline. It is suggested that infusion of L-arginine animals after hemorrhagic shock improve efficiency infusion therapy, restore systemic and microvascular hemodynamics. Treatment of nitric oxide synthesis regulator of L-arginine increases survival of animals to 91 % (50 % control).

Key words: hemorrhagic shock, infusion therapy, nitric oxide, L-arginine

нозного возврата крови к сердцу, падению минутного объема кровообращения (МОК), снижению артериального давления (АД). Вследствие этих изменений гемодинамики развиваются нарушения периферического кровообращения (микроциркуляции, МЦ) в органах и тканях, которые характеризуются замедлением скорости кровотока в капиллярах, образованием в просветах микрососудов агрегатов клеток крови. В итоге страдает газотранспортная функция крови, возникает гипоксия и как следствие расстройств тканевого обмена нарушается кислотно-основное равновесие крови с развитием метаболического ацидоза.

С целью коррекции этих нарушений при шоке применяются различные трансфузионные средства, направленные, прежде всего, на устранение гиповолемии. Однако даже до-

статочная по объему инфузионная терапия при тяжелых шоковых состояниях не всегда приводит к ожидаемым результатам, поскольку не обеспечивает нормализацию функции органов и систем. Поэтому терапия шока дополняется введением фармакологических средств, которые включают в схемы его лечения. Трансфузиологическая помощь проводится в сочетании с лекарственными препаратами, поддерживающими деятельность сердца и микрокровооток в капиллярах, антигипоксантами, антиоксидантами.

Важным регулятором сосудистого тонуса в организме является оксид азота (NO). Участие NO в патогенезе геморрагического шока (ГШ) на сегодняшний день не вызывает сомнений. Влиять на кровоток в сосудах возможно, направленно воздействуя на синтез оксида азота, который непрерывно продуцируется ферментативным путем из аминокислоты L-аргинина [2, 3]. Показано, что тяжелая массивная кровопотеря вызывает сосудистую декомпенсацию из-за низкого содержания NO на ранней стадии кровопотери [4, 5, 6]. Известно, что организму, находящемуся в состоянии геморрагического шока, необходимо поддерживать так называемый базальный уровень NO для сохранения нормального кровотока [2]. В связи с этим представлялось целесообразным для эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса использовать в схемах лечения геморрагического шока L-аргинин.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности повышения эффективности инфузионной терапии экспериментального геморрагического шока с помощью L-аргинина в сочетании с изотоническим раствором натрия хлорида (ФР).

Материалы и методы. Работа согласована с этическим комитетом ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. Эксперименты поставлены на наркотизированных тиопенталом натрия (15 мг/кг) кроликах (самках) массой 2500–3500 г. Препаровку сосудов производили под местной анестезией 1%-ным раствором новокаина. Катетеризировали сонную артерию и яремную вену для определения минутного объема кровообращения методом термодилуции [7], бедренную артерию для регистрации АД и взятия проб артериальной крови и бедренную вену — для взятия проб смешанной венозной крови. Тяжесть и эффективность инфузионной терапии оценивали

и по другим показателям системной гемодинамики: частоте сердечных сокращений (ЧСС, по электрокардиограмме), ударному объему сердца (УО), рабочему индексу левого желудочка (РИЛЖ), общему периферическому сосудистому сопротивлению кровотоку (ОПС). Состояние животных оценивали до кровопотери, перед инфузией и через 10 и 60 мин. после завершения введения кровезаменителя.

Микроциркуляцию исследовали в серозной оболочке тонкой кишки крыс методом прижизненной контактной микроскопии [8]. О состоянии МЦ судили по замедлению скорости кровотока, агрегации эритроцитов и количеству функционирующих капилляров (КФК) по шкале, разработанной в лаборатории. За ноль принимали кровоток до начала кровопотери. Изменения оценивали в баллах по отношению к исходному уровню, который принимали за ноль. Отсутствие агрегатов в сосудах также принимали за ноль.

Кровопотерю ($18,7 \pm 0,6$ мл/кг массы кролика) осуществляли дробно из бедренной артерии, снижая АД до 45–50 мм рт. ст. Время кровопускания колебалось от 60 до 65 мин. Животные до начала лечения находились в состоянии гипотензии 30–35 минут. Объем инфузионной среды превышал в два раза объем кровопотери. В эксперименте принято считать выжившими животных, которые прожили более 24-х часов.

Поставлены 2 серии экспериментов. В первой серии (контроль) животным после окончания кровопотери вводили 0,9% изотонический раствор натрия хлорида (ФР). Во 2-й серии в состав инфузионной среды включали L-аргинин в дозе 200 мг/кг массы кролика.

Наличие связи между изучаемыми показателями проводили с применением корреляционного анализа. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Полученные результаты обрабатывали методом вариационной статистики в программе Statistica 7.0.

Результаты и обсуждение. Геморрагический шок характеризовался почти двукратным снижением АД. Более чем в 1,5 раза падал минутный объем кровообращения и уменьшался ударный объем сердца. Повышалось общее периферическое сосудистое сопротивление кровотоку. Резко снижался рабочий индекс левого желудочка (таблица 1). Инфузионную терапию начинали проводить с различиями между сериями (хотя они недо-

стоверны) по АД, МОК и РИЛЖ. В первой серии эти показатели были ниже.

Введение изотонического раствора натрия хлорида (1-я серия) способствовало повышению АД по сравнению с окончанием кровопотери, но оно не достигало исходных величин и через 1 час после окончания инфузии оставалось на тех же значениях (таблица 1). МОК возрастал, не достигая исходного уровня (55–65%). ФР также способствовал росту ударного объема сердца. Достоверно выше, чем к концу кровопотери, был рабочий индекс левого желудочка, и к окончанию наблюдения он продолжал возрастать, не достигая исходного уровня (46%). Следовательно, лечение геморрагического шока только солевым раствором способствовало частичной коррекции системной гемодинамики.

По сравнению с окончанием кровопотери во 2-й серии АД возрастало в той же мере, что и в контроле (через 60 мин АД увеличилось на 19 мм рт. ст. в контрольной серии и на 20 мм рт. ст. в опытной). Добавление в инфузионную среду L-аргинина вызвало увеличение МОК, который через 10 мин. по окончании инфузии составлял 84 % по отношению к исходному, в то время как в контроле — лишь 55 % (таблица 1). Изменялся и УО, который имел тенденцию к увеличению. Под влиянием L-аргинина значительно возрастал РИЛЖ, несмотря на его выраженное снижение, вызванное кровопотерей (таблица 1). Изменение рабочего индекса левого желудочка происходило не за счет увеличения ЧСС, а в результате восстановления МОК. Через 10 и 60 мин. после окончания инфузии РИЛЖ был достоверно выше, чем в 1-й серии.

Таблица 1

**Изменения системной гемодинамики кроликов при геморрагическом шоке и инфузии:
1-я серия — изотонический раствор натрия хлорида (n = 6),
2-я серия — изотонический раствор натрия хлорида с L-аргинином (n = 11), M ± m**

Показатели	Серии	До кровопотери	После кровопотери	Время после окончания инфузии (мин.)	
				10 ^л	60
АД, мм.рт.ст.	1	114,0±6,5	60,0±7,2*	81,0±6,5 ⁺	80,0±11,3 ⁺
	2	116,0±1,0	73,0±5,0*	88,0±6,0 ⁺	92,0±3,0 ⁺
МОК, мл/мин × кг в % к исх.	1	167,0±15,0 (100%)	64,0±5,8* (39%)	92,0±8,0* ⁺ (55%)	110,0±18,0* (65%)
	2	190,0±13,0 (100%)	83,0±13,0* (43%)	159,0±12,0* ^{##} (84%)	143,0±12,0* ⁺ (75%)
УО, мл/мин/кг	1	1,0±0,1	0,40±0,10*	0,50±0,10 ⁺	0,50±0,10 ⁺
	2	0,7±0,1	0,42±0,05*	0,56±0,04 ⁺⁺	0,67±0,04 ⁺⁺
ОПС, дин × сек × см ⁻⁵ /кг × 10 ⁻⁴	1	6,3±0,9	7,3±0,9	7,6±0,9	7,0±0,9
	2	5,1±0,3	6,8±0,4	4,3±0,5	5,4±0,6
РИЛЖ, кгм/кг × мин в % к исх.	1	259±17 (100%)	53±12* (21%)	99±17* (40%)	114±19* ⁺ (46%)
	2	296±24 (100%)	73±18* (24%)	174±17* ^{##} (59%)	167±18* ^{##} (56%)
ЧСС, в мин	1	291±9	231±9	262±29	282±9
	2	299±21	226±17*	269±17	294±8

Примечание: — здесь и в следующей таблице статистически значимые различия (p < 0,05) отмечены: по сравнению с исходными данными — *, с данными после окончания кровопотери —⁺, между данными 1-й и 2-й серий — #.

Следовательно, при введении L-аргинина с инфузионной средой системная гемодинамика восстанавливалась в большей степени (кроме АД), чем при инфузии только ФР (таблица 1). Вероятно, активация продукции NO благодаря поступлению субстрата оказывала кардиопротекторный эффект, обусловленный преимущественно активностью эндотелиальной синтазы оксида азота — eNOS и ре-

ализующийся в значительной степени за счет вазодилататорных реакций коронарных и периферических сосудов [9, 10].

Продуцент оксида азота, увеличивая почти в 2 раза по сравнению с окончанием кровопотери МОК, способствовал восстановлению МЦ в большей степени, чем ФР.

L-аргинин вызывал лучшее, чем в контроле восстановление скорости кровотока

(таблица 2) и обладал бóльшим дезагрегирующим действием. Вероятно, основной эффект L-аргинина состоит в обеспечении адекватного количества субстрата для генерации NO, поддерживая базальный уровень NO, и как следствие — нормальную перфузию жизненно важных органов [2, 5]. Подтверждением этого является то, что, несмотря на снижение ОПС, вызываемого оксидом азота, нормализуется периферическое кровообращение. Эти данные позволяют понять, почему при геморрагическом шоке для сохранения перфузии ряда органов и тканей организму необходима стабилизация эндогенного NO [10–12]. Нормализация МЦ, вероятно, происходит за счет вазодилатации, антиагрегантного и антикоагулянтного действия NO [4, 11].

Таким образом, эффект L-аргинина связан с улучшением гемодинамики: увеличением сердечного выброса, уменьшением общего периферического сосудистого сопротивления, что приводит к восстановлению периферического кровообращения, а следовательно, увеличению скорости кровотока и проходимости микроциркуляторного русла [13, 14].

Применение L-аргинина позволило увеличить продолжительность жизни кроликов (по сравнению с контролем). Выживаемость животных составляла 50 % в контроле, в то время как при введении в инфузионную среду L-аргинина она возрастала до 91 %.

Таблица 2

Микроциркуляция в стенке тонкого кишечника у кроликов при кровопотере и инфузии изотонического раствора натрия хлорида (серия 1, n = 6), и в сочетании с L-аргинином (серия 2, n = 11), M ± m

Показатели	Серии	Исх.	Окончание кровопотери	Время после инфузии (мин.)	
				10	60
Количество функционирующих капилляров (% от исх.)	1	100±0	56±4*	89±5 ⁺	90±3 ⁺
	2	100±0	53±5*	96±4 ⁺	99±4 ⁺
Скорость движения клеток крови в капиллярах (баллы)	1	0±0	2,44±0,11*	0,56±0,11 ⁺	0,33±0,11 ⁺
	2	0±0	2,23±0,12*	0,38±0,12 ⁺	0,23±0,12 ⁺
Агрегация эритроцитов (баллы)	1	0±0	2,00±0*	0,98±0,11 ⁺	0,64±0,11 ⁺
	2	0±0	2,00±0*	0,50±0,12 [#]	0,38±0,12 ⁺

В последние годы большое внимание в медицинской практике уделяется аминокислотам, обладающим лечебным действием. Известно, что аргинин через орнитин может превращаться в глютаминовую кислоту, обладающую антиоксидантной активностью, кроме того L-аргинин стимулирует выделение гистамина из клеток крови, снижает активность норадреналина и способствует действию эндогенных вазодилататоров [4, 6]. Существуют зарубежные препараты, содержащие L-аргинин, которые приводят к усилению образования оксида азота в организме, что сопровождается увеличением образования NO в ткани печени [1, 4–6]. В 2009 году

за рубежом зарегистрирован и успешно применяется в клинической практике при заболеваниях периферических сосудов препарат тивортин, содержащий L-аргинин [6].

Полученные в данной работе результаты открывают новые терапевтические возможности повышения эффективности инфузионной терапии шока донорами оксида азота. При геморрагическом шоке одновременно с массивными трансфузиями возможно использовать регуляторы синтеза оксида азота, которые способствовали бы восстановлению периферического кровообращения и увеличивали продолжительность жизни животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рукавицын О. А. Анемии / под ред. О. А. Рукавицын, А. Д. Павлов// СП.: Издательство «Д. — П.», 2011. — 278 с.
2. Ремизова М. И., Гербут К. А., Гришина Г. В. Фармакологическое воздействие на синтез оксида азота при геморрагическом шоке в эксперименте// Биомедицинский журнал Medline.ru. — 2015. — Т. 16, № 2. — С. 568–576.
3. Зинчук В. В., Глуткина Н. В. Кислородсвязывающие свойства гемоглобина и монооксида азота // Российский физиологический журнал. — 2013. — № 5. — С. 537–554.
4. Ignarro L. J. Nitric oxide: Biology and Pathobiology// Academic Press. — 2009. — P. 139–154.
5. Гришина Г. В., Гербут К. А., Ремизова М. И., Селиванов Е. А. Применение продуцента оксида азота — L-аргинина при инфузионной терапии геморрагического шока в эксперименте// Бюлл. exper. биол. и мед. — 2012. — Т. 154, № 9. — С. 290–293.
6. Бабушкина А. В. L-аргинин с точки зрения доказательной медицины // Укр. Мед. Журнал. — 2009. — № 6(74). — С. 43–48.
7. Определение сердечного выброса методом терморазведения / М. И. Гуревич, С. А. Берштейн, Д. А. Голов и др. // Физиол. журнал СССР. — 1967. — Т. 53. — С. 50–54.
8. Кочетыгов Н. И., Куликов А. М. Системная гемодинамика и микроциркуляция при лечении ожогового шока кровезамещающими растворами// Пробл. гематол. перелив. крови. — 1982. — № 6. — С. 24–30.
9. Villela N. R., Cabrales P., Tsai A. G., Intaglietta M. Microcirculatory effects of changing blood hemoglobin oxygen affinity during hemorrhagic shock resuscitation in an experimental model// Shock. — 2009. — 31. — P. 645–652.
10. Arora T. K. L-Arginine infusion during resuscitation for hemorrhagic shock: impact and mechanism/ T. K. Arora, A. K. Malhotra, R. Ivatury et al. // The Journal of Trauma and Acute Care Surgery. — 2012. — V. 72, № 2. — P. 397–402.
11. Seungkwan Cho, Bumseok Namgung, Han Sung Kim, e. a. Effect of erythrocyte aggregation at pathological levels on NO/O₂ transport in small arterioles //Clinical Hemorheology and Microcirculation. — 2015. — 59. — P. 163–175.
12. Nachuraju P, Friedman AJ, Friedman JM, Cabrales P. Exogenous nitric oxide prevents cardiovascular collapse during hemorrhagic shock// Resuscitation. — 2011. — 82(5). — P. 607–613.
13. Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Exogenous nitric oxide induces protection during hemorrhagic shock// Resuscitation. — 2009. — V. 80 (6). — P. 707–712.
14. Preissler G., Löhe F., Ebersberger U., e. a. Recipient treatment with L-Arginine attenuates donor lung injury associated with hemorrhagic shock// Transplantation. — 2009 — V. 87 (11). — P. 1602–1608.

Гусейнов Г. Г.¹, Шамов И. А.², Ахмедов И. Г.²¹ Гематологическое отделение Республиканской клинической больницы МЗ Республики Дагестан, Махачкала² ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет МЗ РФ», Махачкала

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН

Huseynov G., Shamov I., Achmedov I.

Hematology Department of Republican Clinical Hospital of Ministry of health of the Republic of Dagestan. Makhachkala

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA IN THE REPUBLIC OF DAGESTAN

Резюме. Изучена распространённость и выживаемость больных хроническими миелоидными лейкозами в Республике Дагестан (РД). Выявлено, что распространённость соответствует средним показателям в Российской Федерации (РФ) и несколько превышает показатели других регионов Северного Кавказа. Распространённость выше в высокогорной части Дагестана. Среди этнических групп различия в распространённости не выявлены. Пяти- и 10-ти летняя выживаемость больных ХМЛ в Дагестане ниже, чем среднестатистические показатели по РФ.

Ключевые слова: хронический миелоидный лейкоз, распространённость, выживаемость, Республика Дагестан.

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ, код по МКБ10 С92.1, хронический миелолейкоз) — опухоль из клеток предшественниц миелопоэза, поражающая гранулоцитарный, моноцитарно- макрофагальный, тромбоцитарный и эритроцитарные ростки костного мозга. В последующем процесс распространяется на лимфатические узлы, печень, селезенку, кожу и другие органы. Основным проявлением ХМЛ является пролиферация зрелых гранулоцитов (нейтрофилов, эозинофилов, базофилов) и их предшественников с накоплением этих клеток в крови.

Этиология. Причины хромосомного нарушения, приводящего к ХМЛ, до сих пор изучены недостаточно. Считается, что имеет место влияние различных факторов (иони-

Summary. We have examined the prevalence and survival of patients with chronic myeloid leukaemia in the Republic of Dagestan (RD). It is shown that the prevalence corresponds to average in the Russian Federation (RF), and slightly higher than the other regions of the North Caucasus. Prevalence is higher in the Highlands of Dagestan. Among ethnic groups differences in prevalence were not identified. 5-and 10-year survival of patients with CML in Dagestan is lower than the figures for the middle statistic results of the RF.

Keywords: chronic myeloid leukemia, prevalence, survival, Republic of Dagestan.

зирующее излучение, токсины и инфекции), ни один из которых не получил значимого подтверждения в возникновении заболевания [10].

Патогенез. Данное миелопролиферативное заболевание ассоциировано с характерной хромосомной транслокацией (филадельфийской хромосомой). ХМЛ — первое злокачественное заболевание, для которого была показана связь с конкретной генетической аномалией, в данном случае хромосомной транслокацией. При этой транслокации фрагмент гена 9-й и фрагмент гена 22-й хромосомы меняются местами, образуя новую, так называемую филадельфийскую хромосому (рис. 1).

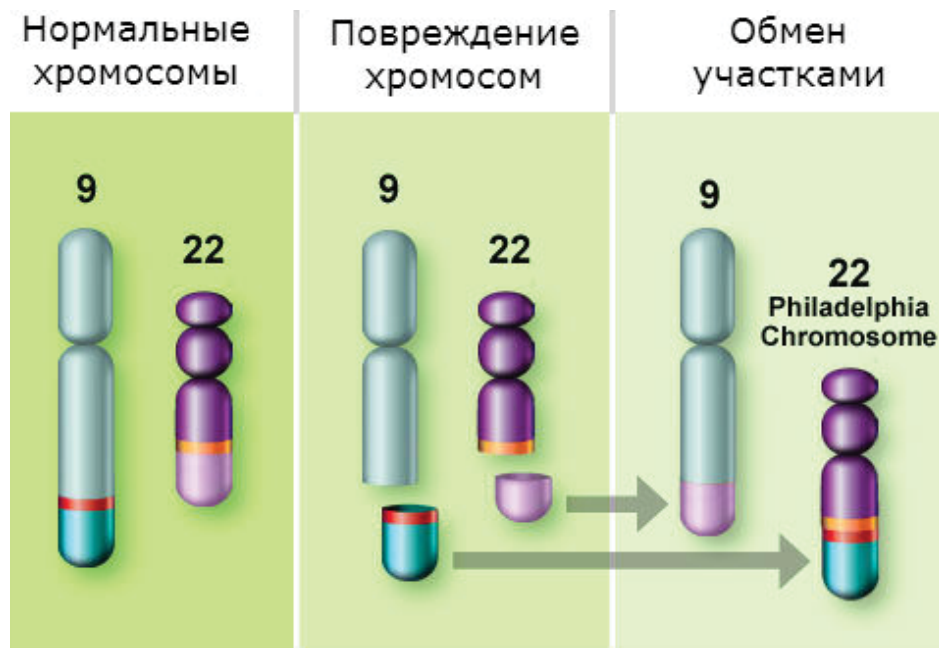


Рис. 1. Хромосомная транслокация (Infouk.ru)

Эта мутантная хромосома получила свое название по месту её обнаружения первооткрывателями, P. Nowell (Пенсильванский университет) и D. Hungerford (Онкологический центр Фокса Чейза), которые впервые описали её в 1960 году в Филадельфии (штат Пенсильвания, США [10]. Продуктом этого аномального слитного гена может быть белок BCR-ABL. Активность данного патологического белка и приводит к следующим изменениям в клетке: увеличивается ее пролиферативная активность, снижается адгезия к белкам стромы костного мозга, нарушается межклеточное взаимодействие, ингибируется апоптоз. На основе данных, полученных при изучении белка BCR-ABL и его тирозинкиназной активности, была разработана таргетная (целевая) терапия ингибиторами тирозинкиназ [4], которые могут способствовать полной ремиссии ХМЛ.

Распространенность. По данным литературы ежегодная заболеваемость ХМЛ составляет 0,9–1,5 на 100 тыс. населения [1, 2, 5]. Наибольшее число больных регистрируется в интервале 30–50 лет. На детский возраст приходится 2–5 % от всех заболевших. В общей структуре лейкозов ХМЛ составляет 20 % [1, 2].

Цель данного исследования: оценка структуры заболеваемости и распространенности ХМЛ в Республике Дагестан (РД).

Материал. Как правило, пациенты с ХМЛ проходили обследование и лечение в отде-

лении гематологии Республиканской клинической больницы (РКБ) МЗ РД. База данных пациентов — жителей РД, страдающих ХМЛ, была создана и ведется с 2007 года, она регулярно обновляется. Всего в базе по состоянию на 1 января 2016 года оказалось 148 человек. Медиана ежегодного числа заболевших ХМЛ составила 7 человек в год. Первичное выявление заболевших осуществлялось по обращаемости.

Методы исследования: рутинные клинико-лабораторные и специальные методы (цитохимический, биохимический, ультразвуковой, цитогенетический) исследований. Для получения костного мозга применяли стерильную пункцию, и (реже), пункцию крыльев подвздошной и пяточной костей. Всем больным, включенным в базу данных, диагноз подтверждался цитогенетически.

Численность населения РД, включая численность населения в административных образованиях, а также данные по возрастному, гендерному и национальному составу взяты из результатов переписи населения за 2010 год.

Статистическая обработка материала проведена с использованием программы Statistica-6.0 (StatSoft Inc. 2001). Примененный статистический критерий указан по ходу изложения материала. Критическим считался уровень значимости $p = 0,05$. При описании медианы в скобках указаны квартили.

Результаты и обсуждение. Из 148 пациентов с ХМЛ во всех статусах, включенных в базу данных, к настоящему времени живы 106 (71,6 %) и умерло 42 (38,4 %) пациента.

Среди заболевших мужчин было 67 (45,3 %), женщин 81 (54,7 %), что принципиально не отличалось от ситуации в целом по РФ ($\chi^2 = 0,01$ $p = 0,9$) (схема 1).

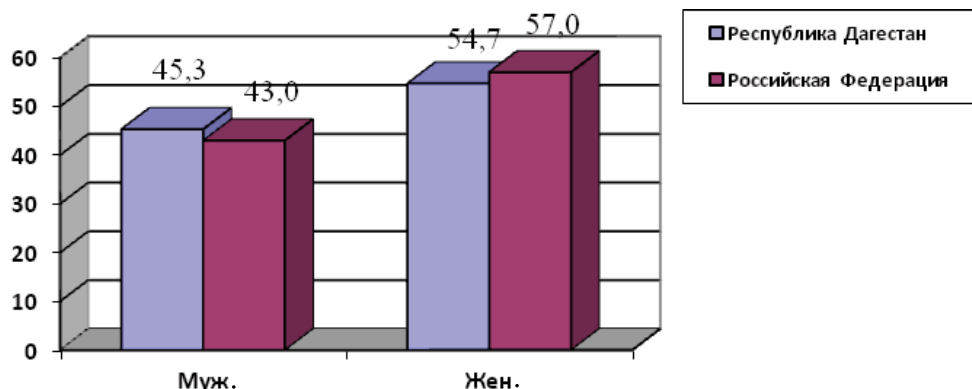


Схема 1. Соотношение заболевших пациентов по полу в РД и РФ.

Среди заболевших преимущественно наблюдались лица трудоспособного возраста (схема 2). Медиана возраста пациентов на момент установления диагноза составля-

ла 49 лет (разброс 18–80) лет. Существенных различий числа заболевших в различных возрастных группах в РД по сравнению с РФ мы не отметили (табл. 1).

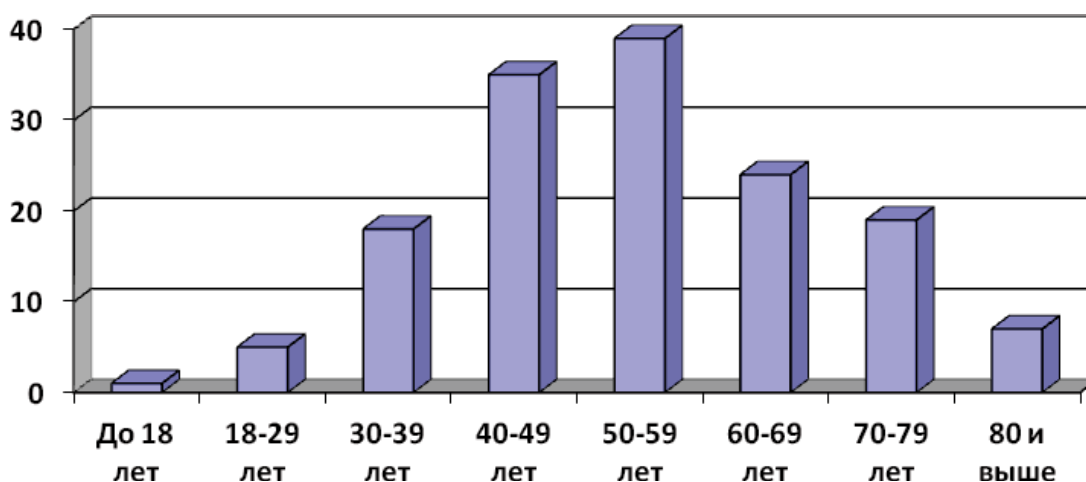


Схема 2. Распределение пациентов с ХМЛ по возрасту.

Таблица 1.

Распределение больных по возрасту на момент выявления ХМЛ

Возрастной интервал	РД		РФ	p (по χ^2)
До 18 лет	1	0,7%	0,8%	p = 0,92
18–29 лет	5	3,4%	7%	p = 0,00
30–39 лет	18	12,2%	13%	p = 0,84
40–49 лет	35	23,6%	15,3%	p = 0,07
50–59 лет	39	26,4%	25,8%	p = 0,91
60–69 лет	24	16,2%	24,2%	p = 0,088
70–79 лет	19	12,8%	13,8%	p = 0,38
80 и выше лет	7	4,7%		

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

За последние 9 лет число ежегодно зарегистрированных случаев ХМЛ составило от 9 до 19 (медиана — 13) (схема 3).

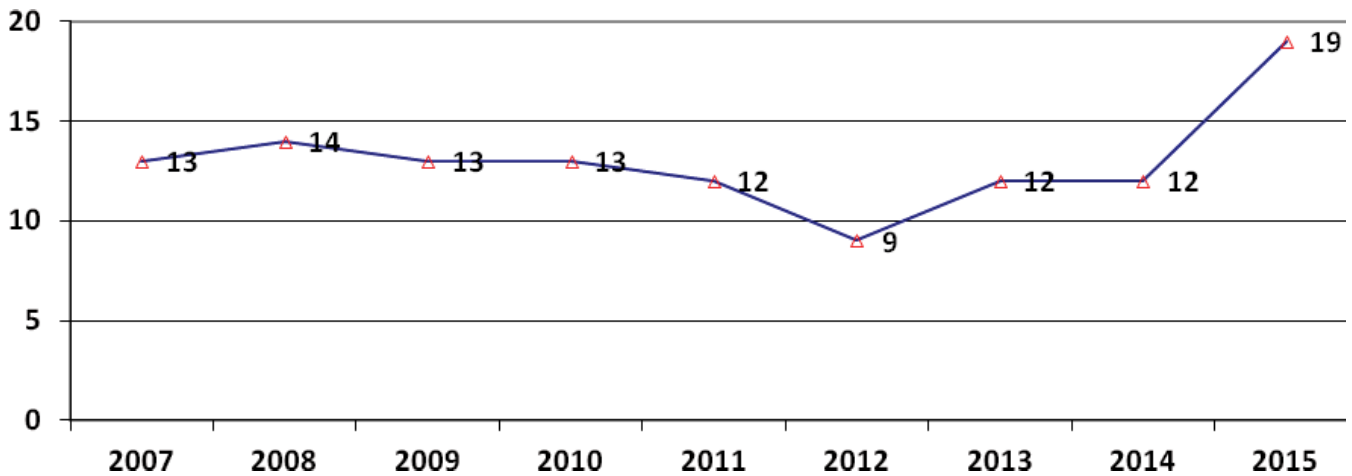


Схема 3. Ежегодная заболеваемость ХМЛ в РД

Медиана ежегодной заболеваемости составила 0,4 на 100 000 населения, что меньше показателя по РФ [6]. Небольшая тенденция к росту заболеваемости, на наш взгляд, обусловлена улучшением диагностики, в частности появлением возможности цитогенетического и молекулярного подтверждения заболевания.

Эпидемиология лейкозов в СССР в своё время была тщательно изучена в трудах

М. П. Хохловой [8], в Дагестане — И. А. Шамова и соавт. [9]. Распространённость ХМЛ в регионах РФ изучена А. Г. Туркиной с соавт. [6] с составлением регистра. Региональная эпидемиология представлена в таблице 2. В Северокавказском федеральном округе (ФО) распространённость, в сравнении с показателями в других регионах РФ, оказалась выше (табл. 2).

Таблица 2.

Распространенность ХМЛ по регионам РФ

Федеральный округ (ФО)	Количество больных	Количество населения	Показатель на 100 тыс. населения
1. Дальневосточный ФО	261	6 211 384	4.2
2. Приволжский ФО	1377	29 717 813	4.6
3. Республика Дагестан	148	3 015 639	4.9 (p 0,1**)
4. Российская Федерация	6466	146 519 759	4.4
5. Северокавказский ФО	197	9 659 070	2.0 (p < 0,001*)
6. Северо-Западный ФО	671	13 847 170	4.8
7. Сибирский ФО	947	19 313 880	4.9
8. Уральский ФО	505	12 276 228	4.1
9. Центральный ФО	1597	38 944 837	4.1

Примечание: * — показатель $p < 0,001$ в сравнении с остальными регионами РФ;

** — показатель $p > 0,1$ в сравнении с остальными регионами, кроме Северокавказского ФО

По сравнению с другими республиками Северокавказского (СК) ФО распространённость ХМЛ в РД оказалась выше (табл. 3).

Таблица 3.

Распространенность ХМЛ в республиках СК

Республики СК	Количество больных	Количество населения	Показатель на 100 тыс. населения
1. Кабардино-Балкария	34	860 709	3,9
2. Республика Ингушетия	12	453 000	2,6
3. Республика Дагестан	148	3 015 639	4,9
4. Северная Осетия	36	703 470	5,1
5. Чеченская Республика	27	1 370 268	1,2

Условно РД делится на 4 климато-географические зоны: высокогорная, горная, предгорная, низменная. Распространённость ХМЛ по этим зонам представлена в табл. 4. Как видно, по таблице прослеживается тенденция к существенному снижению показателя

по мере снижения высоты зоны проживания. На наш взгляд, это может быть объяснено круглогодичной высокой инсоляцией и интенсивностью облучения космическими лучами высокой энергии, наблюдающейся в высокогорной зоне.

Таблица 4.

Распространенность ХМЛ по географическим зонам РД

Географическая зона	Количество больных	Количество населения	Показатель на 100 тыс. населения
Высокогорная	10	247 753	9,6
Горная	26	355 587	7,3
Предгорная	21	338 635	6,2
Низменная	24	667 266	3,5

Показатель распространенности ХМЛ среди сельского населения составил 5,7 на 100 000 населения, а городского — 4, что не имеет статистически достоверного различия.

РД уникальна по этническому разнообразию. Среди заболевших ХМЛ оказались пред-

ставители 13 национальностей и народностей, проживающих в республике (табл. 5). Показатель распространенности среди различного этноса составил от 3,8 до 8,6 на 100 000 населения (р 0,05).

Таблица 5.

Распространенность ХМЛ в основных дагестанских этносах

Этническая группа	Количество больных	Количество населения	Показатель на 100 тыс. населения
Аварцы	43	850011	5,0
Даргинцы	23	490384	4,6
Кумыки	27	431736	6,2
Лезгины	21	385240	5,4
Лакцы	9	161276	5,5
Русские	9	104020	8,6
Табасаранцы	5	118846	4,2
Азербайджанцы	5	130919	3,8
Рутульцы	2	27849	7,1

Примечание: по одному заболевшему было среди агульцев, чеченцев, армян и грузин.

На момент выявления заболевания хроническую фазу (ХФ) имели 108 пациентов — 72,9 % (в среднем по РФ эта категория больных составляет 93,6 %), что говорит о позд-

ней обращаемости и выявлении заболевания в РД. В фазе акселерации было выявлено заболевание у 34 (22,9 %) больных, в фазе бластного криза — у 6 (4 %) больных.

Целью проводимой терапии является поэтапное получение полного гематологического ответа (ПГО), большого цитогенетического ответа (БЦО), большого молекулярного ответа (БМО) и полного молекулярного ответа (ПМО) (3, 7).

Из выживших к настоящему времени пациентов для лечения ХМЛ получали: иматиниб — 98 пациентов, нилотиниб — 5, дазатиниб — 1, гидроксимочевину — 2. Иматиниб в дозе 600 мг в сутки получают 37 (37,7 %) пациентов, 400 мг в сутки — 61 (62,3 %).

В результате проводимой терапии из всех больных, внесенных в базу заболевших ХМЛ в РД, выжили к настоящему времени 106 (71,6 %) человек. ПГО из них имеют 82 (77,3 %) пациентов. В 2015 году удалось провести молекулярное исследование крови 77 пациентам.

При этом ПМО был выявлен у 5 (4,7 %), БМО — у 23 (21,6 %) больных. В переводе на вторую линию терапии нуждаются 15 пациентов.

Медиана длительности заболевания составила 63,4 месяца. Умерло всего 42 пациента, преимущественно через 5–10 лет после установления диагноза (схема 4). 40 пациентов (95 %) умерли от прогрессирования болезни, 1 больной при автоаварии, у 1 больного было ОНМК. Среди умерших мужчин было 22 (52,3 %), женщин — 20 (47,7 %). По возрасту умершие пациенты распределились следующим образом: до 18 лет не умер никто, 18–29 лет — 4 пациента, 30–39 лет — 6, 40–49 лет — 7, 50–59 лет — 7, 60–69 лет — 11 и 70–79 лет — 7.

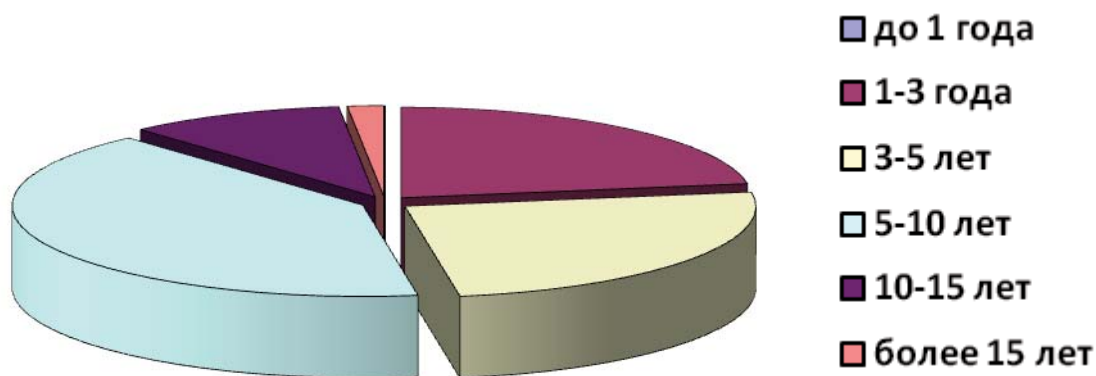


Схема 4. Длительность течения ХМЛ до летального исхода.

Наиболее адекватное представление о выживаемости формируется по анализу Каплан-Мейера (схема 5). Как видно из результатов,

представленных в графике, в целом пятилетняя выживаемость составляет $74,3 \pm 4,4 \%$, а десятилетняя — $56,7 \pm 7,4 \%$.

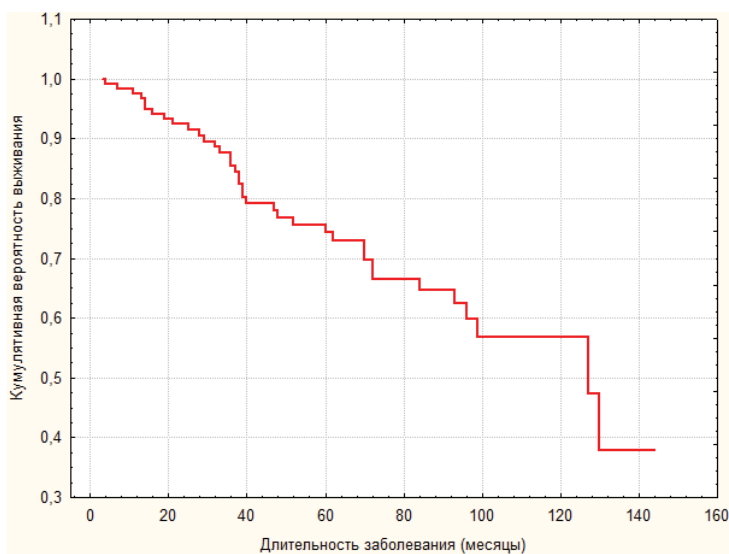


Схема 5. Анализ выживаемости пациентов с ХМЛ.

Сравнительная оценка выживаемости при различной тактике лечения (схема 6) не выявила статистически достоверного различия (критерий Гехана = 0,998; $p = 0,32$). При проведении лечения только ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) пятилетняя выживаемость

составляет $74,6 \pm 5,5\%$, а десятилетняя выживаемость — $59,8 \pm 9,9\%$. При подключении ИТК после предварительного лечения без ИТК пятилетняя выживаемость составляет $79,1 \pm 7,0\%$, а десятилетняя выживаемость — $56,1 \pm 9,5\%$.

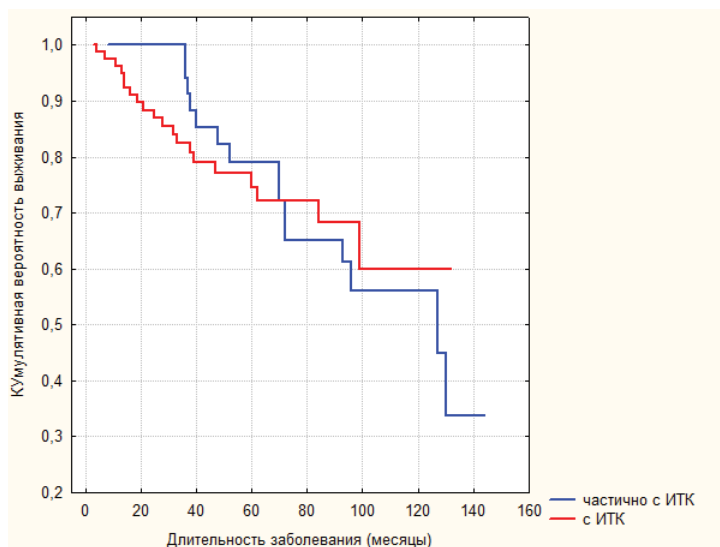


Схема. 6. Анализ методом Каплан-Мейера:

сравнительная оценка выживаемости пациентов с ХМЛ при различной тактике лечения.

Таким образом, распространенность ХМЛ в РД соответствует среднероссийским показателям, несколько превышая показатели в регионах СК. За последние 5 лет намечена тенденция к увеличению выявляемости и снижению смертности от ХМЛ. Распространенность ХМЛ по географическим зонам показала, что она выше в популяции, проживающей в высокогорной зоне. Статистически значимых различий в распространенности ХМЛ в основных

этнических группах РД не отмечено. Пятилетняя и 10-летняя выживаемость больных в РД ниже среднестатистических показателей, что возможно связано с отсутствием достаточной материально-технической базы для мониторинга больных, наличие чего дало бы возможность своевременного перевода больных на 2-ю или 3-ю линию лечения и адекватного дозирования препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К. М. Клиническая гематология. СПб.: ПИТЕР, 2006. 171 с.
2. Абдулкадыров К. М. Заболеваемость и распространенность хроническим миелолейкозом за 2006–2011 в Санкт-Петербурге и Ленинградской области // Вестн. гематол. 2013. Выпуск Т. 9, N2. С. 7–8.
3. Куцев С. И. Эволюция мониторинга лечения хронического миелоидного лейкоза // Гематол. и трансфузиол. 2009. Т. 54, N4. С. 37–43.
4. Куцев С. И., Вельченко М. В. Значение анализа мутаций гена BCR-ABL в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза // Клиническая онкогематол. 2008, Т. 1, N3. С. 190–99.
5. Руководство по гематологии. / Под редакцией академика А. И. Воробьева. М.: НЬЮДИА-МЕД, 2007. 257 с.
6. Туркина А. Г., Голенков А. К., Напсо Л. И., Крылова И. В., Клиточенко Т. Ю., Сендерова О. М., Ким Н. П. Российский регистр по лечению хронического миелоидного лейкоза в рутинной клинической практике: итоги многолетней работы // Эффективная фармакотерапия. Онколог., гематол. и радиол. 2015, N1 (10). С. 8–13.
7. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и терапии хронического миелолейкоза / К. М. Абдулкадыров, Абдуллаев А. О., Авдеева Л. Б. и др. // Вестн. гематол. — Т. 9, N3. С. 4–40.
8. Хохлова М. П. Эпидемиология лейкозов // Пробл. гематол., 1976. Т. 2. С. 92–97.
9. Шамов И. А., Закарияев Ш. М., Шамов Р. И. Лейкозы взрослых в Дагестане. Махачкала: Дагкнигоиздат, 1993. 110 с.
10. Nowell H. C. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective // Journal of Clinical Investigation. 2007. Vol. 117, N8. P. 2033–2035.

**ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ
«ГЕНЕТИКА ОПУХОЛЕЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ»**

(Санкт-Петербург, 13–14 апреля 2017 г.)

СОСТАВ ОРГАНИЗАЦИОННОГО КОМИТЕТА

Председатель оргкомитета:

- Середа А. П.** — заместитель руководителя ФМБА России, доктор медицинских наук;
- Чечеткин А. В.** — директор ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, доктор медицинских наук, профессор;
- Бессмельцев С. С.** — заместитель директора ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России по научной работе, доктор медицинских наук, профессор;
- Мартынкевич И. С.** — руководитель лаборатории молекулярной генетики ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, доктор биологических наук.

Члены оргкомитета:

- Эйхлер О. В.** — начальник Управления организации службы крови ФМБА России;
- Вареник В. И.** — начальник Управления организации научных исследований ФМБА России, кандидат химических наук;
- Волошин С. В.** — руководитель клинического отделения химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, кандидат медицинских наук;
- Капустин С. И.** — руководитель лаборатории биохимии ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, доктор биологических наук;
- Ругаль В. И.** — руководитель лаборатории по изучению лейкозов ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, доктор медицинских наук, профессор;
- Грицаев С. В.** — руководитель Республиканского центра трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, доктор медицинских наук;
- Шуваев В. А.** — старший научный сотрудник клинического отделения химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, кандидат медицинских наук.

Абдуллаев А. О., Трезлазова С. А., Степанова Е. А., Никулина Е. Е., Гусарова Г. А.,
Козьмина М. Н., Обухова Т. Н., Ковригина А. М., Двирнык В. Н., Туркина А. Г., Судариков А. Б.

ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва

ЧАСТОТА И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ 9 ЭКЗОНА ГЕНА *CALR* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Мутации 9 экзона гена *CALR* (*Calreticulin*) встречаются при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и первичном миелофиброзе (ПМФ) в 19 % и 22 % случаях, соответственно. Также, по литературным данным, мутация *CALR* выявляется до 8 % при миелодиспластическом синдроме, 3 % при хроническом миеломоноцитарном лейкозе, но не обнаруживается при *BCR-ABL*⁺ хроническом миелоидном лейкозе (ХМЛ). Однако в последнее время появились два сообщения о возможности выявления клонов, несущих мутации *CALR*, у пациентов с *BCR-ABL*⁺ ХМЛ.

Цель. Проанализировать частоту и прогностическую значимость мутаций 9 экзона гена *CALR* у российских пациентов с *BCR-ABL*⁺ ХМЛ.

Методы. Для анализа отобраны ДНК клеток периферической крови 120 (67 мужчин и 53 женщин) пациентов ХМЛ с уровнем транскрипта *BCR-ABL* p210 (*BCR-ABL/ABL* × 100 % × IS) от 1 % до 95 %. Учитывая, что 80 % мутаций гена *CALR* состоит из p.L367fs × 46 (делеция 52 нуклеотида) и p.K385fs × 47 (TTGTC инсерция) мы использовали метод фрагментного анализа. Для подтверждения результатов использовали метод прямого секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Фрагментным анализом мутации 9 экзона гена *CALR* удалось выявить только в одном образце из 120-ти (частота 0,83 %) с аллельной нагрузкой 46 %. Мужчина 66 лет, в июле 2015 года обратился в поликлиническое отделение ФГБУ ГНЦ МЗ РФ с жалобами на частые простудные заболевания и высокий лейкоцитоз в крови. Объективно: увеличены размеры печени (+1 см) и селезенки (+2 см). Анализ крови: гемоглобин 130 г/л, эритроциты $4,4 \times 10^{12}$ /л, тромбоциты 334×10^9 /л, лейкоциты $40,3 \times 10^9$ /л, бласты 3 %. При морфологическом исследовании костный мозг гиперклеточный, расширение гранулоцитарного ряда с большим количеством зрелых форм. Мегакариоциты

полиморфны и формируют отдельные рыхлые кластеры, также отмечается очаговое расширение эритроидного ростка. При окраске по Гомори степень ретикулинового фиброза MF-2. При цитогенетическом (FISH) исследовании 55 % ядер содержат транслокацию t(9;22)(q34; q11). Уровень транскрипта *BCR-ABL* составил 78,15 %. На основании клинико-лабораторных данных был установлен диагноз ХМЛ, хроническая фаза и назначен иматиниб в дозе 400 мг. За 4 месяца терапии иматинибом количество лейкоцитов в крови снизилось до $6,8 \times 10^9$ /л, а уровень транскрипта *BCR-ABL* p210 до 2,79 %, количество тромбоцитов в крови увеличилось до 1279×10^9 /л. Далее терапия продолжена дазатинибом в комбинации с гидроксимочевинной и интерфероном альфа 2. Через 17 месяцев после начала терапии количество лейкоцитов в крови снизилось до $2,92 \times 10^9$ /л, уровень транскрипта *BCR-ABL* p210 с 78 % до 0,001 %. Однако за все время терапии аллельная нагрузка мутации *CALR* c.1099_1150del. p.L367fs46 остается стабильной в пределах 44–50 %

Заключение. Таким образом, частота мутаций у больных с хроническим миелоидным лейкозом по нашим данным составляет 0,83 %. По данным литературы, сочетание мутаций *BCR-ABL* p210 и 9 экзона гена *CALR*, в основном происходит при трансформации *CALR*⁺ ЭТ и ПМФ в ХМЛ. При этом всегда t(9;22)(q34; q11) *BCR-ABL* приобретает вторично, возможно исходным *CALR*⁺ клоном. В нашем случае пациент был с первичным ХМЛ и элиминация *BCR-ABL* p210 клона до уровня транскрипта 0,001 % не влияла на аллельную нагрузку *CALR* c.1099_1150del. p.L367fs46 клона. Нельзя исключить также наличие третьего клона, несущего одновременно мутации *CALR* c.1099_1150del. p.L367fs46 и t(9;22)(q34; q11) *BCR-ABL*. В описанном случае наличие клона *CALR* c.1099_1150del. p.L367fs46 не влияло на достижение глубокого молекулярного ответа у больного ХМЛ.

Абрамова Т. В.¹, Обухова Т. Н.¹, Менделеева Л. П.¹, Покровская О. С.¹, Грибанова Е. О.¹,
Гребенюк Л. А.¹, Нарейко М. В.¹, Соловьев М. В., Вотякова О. М.², Куликов С. М.¹,
Русинов М. А.¹, Савченко В. Г.¹

¹ ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

² ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, г. Москва

ВЛИЯНИЕ ХРОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. Внедрение в клиническую практику новых лекарственных средств (иммуномодулирующих препаратов и ингибиторов протеасом), а также трансплантации аутологичных стволовых клеток (ауто-ТСК) позволило добиться полной ремиссии не менее чем у половины больных множественной миеломой (ММ), что повлияло на общую выживаемость (ОВ) больных. Вместе с тем у трети больных в течение первого года развиваются рецидивы, и сегодня нет достоверных критериев прогнозирования ответа на терапию.

Цель. Определить частоту встречаемости хромосомных аномалий при ММ, а также их влияние на течение заболевания.

Материалы и методы. С декабря 2009 г. по март 2016 г. 134 пациентам (67 мужчин и 67 женщин), в возрасте 30–81 (медиана 57) лет, до начала лечения выполнено FISH-исследование аспирата костного мозга с центромерными и локус-специфичными ДНК-зондами для выявления транслокаций с вовлечением локуса гена *IgH/14q32* (*IgH/14q32*), таких как *t(11;14)(q13; q32)*, *t(4;14)(p16; q32)*, *t(14;16)(q32; q23)*, *t(14;20)(q32; q12)*, *(6;14)(p21; q32)*, трисомией хромосом 5, 9, 15, делеции 13q14/моносомии хромосомы 13 (*del13q14*), делеции 17p13/*TP53* (*del17p13*), амплификации 1q21 (*amp1q21*), транслокаций с вовлечением локуса гена *cMYC/8q24* (*tcMYC/8q24*). Стадия заболевания по системе D-S: I стадия — у 8 (6%), II — у 41 (30,6%), III — у 85 (63,4%) больных. У 41 (30,6%) больного диагностирована подстадия В. Преобладающим иммунохимическим вариантом болезни был тип G — 70 (52,3%), парапротеин А выявлен у 25 пациентов (18,7%), в 3-х (2,2%) случаях — биклональная секреция, М-протеин выявлен у 1 пациента (0,7%). Секреция свободных легких цепей определена у 34 (25,4%) больных. Несекретирующая миелома диагностирована у 1 пациента (0,7%). По шкале ISS: I стадия — у 27 (20,1%), II — у 38 (28,4%), III — у 68 (50,8%) больных, у одного (0,7%) нет данных. Индукционная терапия выполнялась бортезомиб-

содержащими курсами. Ауто-ТСК выполнена 48 больным. Медиана наблюдения за больными составила 19,3 мес. (3,2–77,4).

Результаты. Хромосомные аномалии выявлены у 133 больных (99%). Транслокации *IgH* выявлены у 57 (42,5%), трисомии — у 77 (57,5%) больных, у 15 больных (11,2%) они сочетались между собой, у 3 (2,4%) выявлена гипоплоидия. Частота встречаемости отдельных *tIgH/14q32* составила: *t(11;14)* — 16,4%; *t(4;14)* — 12,7%; *t(14;16)* — 3,7%; *t(14;20)* — 2,2%; *t(6;14)* выявлена у одного больного (0,7%), хромосомный партнер не установлен в 6,7% случаев. *Del13q14* обнаружена у 54 (40,3%), *tcMYC/8q24* — у 23 (17,2%), *del17p13* — у 17 (12,7%). *Amp1q21* выявлена у 53 (39,6%) больных: в 32 случаях (60,4%) выявлена 1 дополнительная копия локуса 1q21, в 21 (39,6%) — 2 и более дополнительные копии 1q21 (от 4 до 7 копий). Из-за малого количества больных в группах с *t(14;20)* (*n* = 3), *t(6;14)* (*n* = 1) и гипоплоидией (*n* = 3) оценка ОВ не выполнялась.

Статистически значимые различия ОВ получены в группах больных с *del17p13* и *tcMYC/8q24*. 3-х летняя ОВ в группе больных с *del17p13* достоверно ниже, чем в группе без неё — 35,5% и 75%, соответственно (*p* = 0,02). 3-х летняя ОВ в группе больных с *t8q24/cMYC* в сравнении с группой без данного хромосомного нарушения составила 50,8% и 71%, соответственно (*p* = 0,001). 5-летняя ОВ в группе больных без *amp1q21*, с 1 дополнительной копией 1q21 (всего 3 копии) и с 2 и более дополнительными копиями (всего 4–7 копий) составила 79,4%, 67,3%, 20,9%, соответственно (*p* = 0,0016).

Выводы. Полученные результаты характеризуют частоту встречаемости хромосомных нарушений при ММ. *Del17p13* и *tcMYC/8q24* являются факторами неблагоприятного прогноза при ММ. *Amp1q21* достоверно влияет на ОВ только при наличии более, чем 1 дополнительной копии локуса 1q21.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 15-04-02568).

Асауленко З. П.¹, Полушкина Л. Б.², Криволапов Ю. А.¹

¹ ФГБОУВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург

² ФГБУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург

РАЗЛИЧИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ МЕГАКАРИОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ МУТАЦИИ JAK2 ИЛИ CALR1

Введение. Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) относится к группе «Ph-» хронических миелопролиферативных опухолей. У 61,7 % больных ЭТ можно обнаружить мутацию *JAK2*, частота встречаемости мутации *CALR* — 21 %, в 3,9 % случаев удается выявить мутацию *MPL*, остальные случаи заболевания в настоящее время считают «трипл-негативными». Наибольший интерес представляет изучение *JAK2* или *CALR*-позитивных случаев ЭТ, так как эти исключают друг друга мутации встречаются более чем у 80 % больных. Работы, посвященные влиянию мутационного статуса на гистологическое строение костного мозга и на морфологию мегакариоцитов при ЭТ, в современной научной литературе единичны. Объективным инструментом для оценки изменения размеров и строения мегакариоцитов является морфометрический метод исследования, что позволяет считать актуальной тему представленной работы.

Цель исследования. Изучить морфометрические параметры мегакариоцитов в трепанобиоптатах костного мозга при эссенциальной тромбоцитемии у пациентов с выявленной мутацией гена *JAK2* или *CALR*.

Материалы и методы. Исследовано 30 биопсий костного мозга больных ЭТ, которые разделены на две группы: больные с мутацией *JAK2* (N = 15) и больные с мутацией *CALR* (N = 15). С помощью сканера Panoramic 250 Flash III гистологические срезы костного мозга, окрашенные гематоксилин-эозином, переводились в цифровой формат. Морфометрический анализ осуществлялся с использованием программы Panoramic Viewer (3DHISTECH). В каждом биоптате костного мозга в зависимости от его размера случайным образом выбиралось до 100 мегакариоцитов для определения площади клетки (Sm), площади ядра (Sя) и ядерно-цитоплаз-

матического индекса (ЯЦИ = Sя/Sm). Для выявления статистически значимых различий между группами применялся дисперсионный анализ с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Морфометрические характеристики мегакариоцитов у больных ЭТ с мутацией *JAK2*: средняя площадь мегакариоцита = $603,3 \pm 284,5$ мкм², средняя площадь ядра = $156,0 \pm 83,9$ мкм², среднее значение ЯЦИ = $0,26 \pm 0,09$. Морфометрические характеристики мегакариоцитов у больных ЭТ с мутацией *CALR*: средняя площадь мегакариоцита = $671,5 \pm 319,2$ мкм², средняя площадь ядра = $184,6 \pm 91,7$ мкм², среднее значение ЯЦИ = $0,28 \pm 0,10$. У пациентов с ЭТ и мутацией *CALR* мегакариоциты были крупнее и ядра в них были больше, чем у больных ЭТ с мутацией *JAK2*. Средняя площадь мегакариоцита при *CALR*-позитивной ЭТ на 10,2 % (95 % ДИ 5,8–14,4 %) больше средней площади мегакариоцита при *JAK2*-позитивной ЭТ (различия статистически достоверны при $p < 0,05$). Средняя площадь ядра при *CALR*-позитивной ЭТ на 16,1 % (95 % ДИ 11,6–20,4 %) больше средней площади ядра при *JAK2*-позитивной ЭТ (различия статистически достоверны при $p < 0,05$). Среднее значение ЯЦИ при *CALR*-позитивной ЭТ было на 7,7 % (95 % ДИ 4,3–11,0 %) больше среднего значения ЯЦИ при обнаруженной мутации *JAK2* (различия статистически достоверны при $p < 0,05$), т. е. при мутации *CALR* мегакариоциты имеют более скудную цитоплазму, чем в случаях с мутацией *JAK2*.

Выводы. Обнаруженные различия морфометрических параметров мегакариоцитов позволяют предположить наличие патогенетического влияния мутационного статуса на фенотип опухолевого клона.

**Бархатов И. М., Ершов Д. Е., Цветков Н. Ю., Николаева М. Ю.,
Шакирова А. И., Зубаровская Л. С., Афанасьев Б. В.**

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ*

ЗНАЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА РЕЦИПИЕНТА В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ГЕМОПОЭЗА

Введение. Наблюдаемая в ряде случаев гиподифференциация трансплантата обуславливает необходимость разработки функциональных тестов исследования клеток стромы с целью обоснования показаний к совместной трансплантации гемопоэтических и стромальных клеток костного мозга (СККМ).

Целью данного исследования является изучение роли стромальных клеток костного мозга в процессе приживления донорского костного мозга и их значения в развитии осложнений после ТГСК.

Материалы и методы. В исследовании проводился анализ течения посттрансплантационного периода у 38 пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и 20 здоровых доноров. За две недели до проведения ТКМ проводился анализ гемостимулирующей активности колоний фибробласт-подобных клеток (КОЕ-Ф), способности к дифференцировке, а также относительной экспрессии генов Selectin, Pecam, VCAM и CXCR4.

Результаты. При анализе функциональных характеристик стромальных клеток у 38 реципиентов аллогенного трансплантата гемопоэтических стволовых клеток было показано увеличение пролиферативной активности, а также количества остеогенных и адипогенных предшественников ($p < 0,05$)

у пациентов с острыми лейкозами. При этом на фоне более выраженной остеогенной дифференцировки стромальных предшественников наблюдается укорочение сроков восстановления кроветворения ($p < 0,05$), а адипогенной — снижения вероятности гиподифференциации трансплантата ($p < 0,05$).

При исследовании гемостимулирующей активности стромальных клеток реципиента были отмечены факты, указывающие на преимущественное влияние короткодистантных ростовых факторов на посттрансплантационную реконституцию гемопоэза, на что указывают данные разнонаправленной корреляционной зависимости сроков восстановления гемопоэза и колониеобразования в метилцеллюлозе и мягком агаре. При этом более выраженная экспрессия молекул Selectin, Pecam, VCAM и CXCR4, опосредующих хоуминг ГСК в стромальных клетках реципиента перед трансплантацией, ассоциирована с более ранним восстановлением гемопоэза после трансплантации ($p < 0,05$).

Выводы. Изменения в функциональной активности СККМ у пациентов с острыми лейкозами ассоциированы с изменением кинетики посттрансплантационной реконституции гемопоэза.

**Басхаева Г. А., Бидерман Б. В., Гаврилина О. А., Зарубина К. И., Степанова Е. А.,
Донскова И. А., Троицкая В. В., Судариков А. Б., Паровичникова Е. Н., Савченко В. Г.**

ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА *IKZF1* У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ Rh-ПОЗИТИВНЫМ И Rh-НЕГАТИВНЫМ В-КЛЕТОЧНЫМ ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ НА ПРОТОКОЛАХ ОЛЛ-2009 И ОЛЛ-2012

Введение. Частота встречаемости внутригенных делеций гена *IKZF1* составляет около 20 % среди взрослых больных с *BCR-ABL1*-негативным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и 70–80 % у больных с *BCR-ABL1*-позитивным ОЛЛ. Данная мутация имеет неблагоприятное прогностическое значение в группе *BCR-ABL1*-негативных В-клеточных ОЛЛ в отличие от *BCR-ABL1*-позитивных ОЛЛ, при которых корреляции с общей и безрецидивной выживаемостью не было выявлено, что свидетельствует о прогностической ценности именно для Rh-негативных ОЛЛ.

Цель. Оценить частоту встречаемости и прогностическое значение мутаций гена *IKZF1* среди взрослых больных Rh-позитивным и Rh-негативным В-клеточным острым лимфобластным лейкозом на протоколах ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2012.

Материалы и методы. В исследование включен 51 пациент, из них 36 с Rh-негативным ОЛЛ (медиана возраста 27 лет (17–56), соотношение мужчины: женщины — 15:21), 15 с Rh-позитивным ОЛЛ (медиана возраста 34 года (22–68), м: ж — 6:9). Пациентам проводилась терапия по программам ОЛЛ — 2009 для больных с Rh-негативным ОЛЛ с февраля 2010 по сентябрь 2016, по ОЛЛ-2012 — при Rh-позитивном ОЛЛ с августа 2009 по февраль 2017. Молекулярный анализ внутригенных делеций *IKZF1* проводился методом мультиплексной флуоресцентной ПЦР, специфичной к «горячим точкам» внутригенных делеций, согласно методике, приведенной в статье [Aurelie Caye et al, Haematologica, 2013]. ДНК была выделена из лейкоцитарных клеток замороженных образцов костного мозга.

Результаты. Делеции *IKZF1* были обнаружены у 7 (47%) пациентов из 15 с Rh-позитивным ОЛЛ (3 случая с del 4–7 (43%), 2 — del 2–7 (28%), 1 — del 2a-8 и 1 — del

4–8 (14%)). Медиана наблюдения составила 18 месяцев (4–79 месяцев). Пять пациентов (33%) умерли в результате рецидива или прогрессии заболевания, 10 больных живы. Общая выживаемость (ОВ) у больных с мутацией составила 37,5%, у больных без мутации — 57,1%, безрецидивная выживаемость — 25% и 33,3% соответственно ($p = 0,77$).

Среди больных с Rh-негативным ОЛЛ делеции *IKZF1* выявлены в 8 (22%) случаях из 36 (в 4 случаях del 4–7 (50%), 2 — del 2–7 (25%), 1 — del 2–8 (12,5%)), у 1 пациента были определены все типы мутаций (del 4–7, del 4–8, del 2–7, del 2–8)). Медиана наблюдения составила 22 месяца (0,5–84 месяца). 4 пациента умерли от причин, связанных с заболеванием, 2 пациента — в результате инфекционных осложнений, 30 пациентов живы. ОВ среди больных с мутацией составила 100%, у больных без мутаций — 60,2%, БРВ — 75% и 40,2%, соответственно ($p = 0,77$).

Вывод. Частота встречаемости мутаций гена *IKZF1* среди больных с Rh-позитивным и Rh-негативным ОЛЛ составила 47% и 22%, соответственно. Наблюдалась тенденция к корреляции между обнаружением мутаций *IKZF1* и плохим прогнозом при Rh-позитивном ОЛЛ и, напротив, более благоприятное влияние на течение Rh-негативного ОЛЛ при наличии мутации, однако все различия не были статистически достоверны. Независимо от обнаружения мутаций гена *IKZF1*, всем больным с Rh-позитивным ОЛЛ показана алло-ТКМ. Исследуемая группа пациентов с Rh-негативным ОЛЛ мала, и мы можем лишь предположить, что мутации гена *IKZF1* не влияют на выживаемость из-за различий в применяемой программе лечения по протоколу ALL-2009, основанной на принципе неинтенсивности, но непрерывности лечения с малым числом алло-ТКМ.

Березина О. В., Поспелова Т. И., Филипенко М. Л., Воропаева Е. Н.

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Новосибирск² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины», г. Новосибирск

ПОЛИМОРФНЫЕ ЛОКУСЫ G1958A *MTHFD1* И A2756G *MTR* — ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ НЕХОДЖКИНСКИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОМ

Введение. Фолатный цикл играет важную роль в поддержании структуры и целостности генома и эпигенетической регуляции экспрессии генов. Нарушения в системе метаболизма фолатов, опосредованные полиморфными вариантами генов ключевых ферментов системы, могут опосредовать генетическую предрасположенность к развитию неоплазий, в том числе неходжкинских злокачественных лимфом (НХЗЛ). Необходимо отметить, что эффекты генетических локусов варьируют в зависимости от популяции, поэтому представляется актуальным исследовать гены фолатного пути у больных НХЗЛ в Новосибирской области.

Цель работы. Оценить влияние однонуклеотидных замен в генах фолатного цикла C677T и A1298C гена *MTHFR*, A2756G гена *MTR*, A66G гена *MTRR*, G1958A гена *MTHFD1*, C1420T гена *SHMT1*, T833C/844ins68 гена *CBS* на предрасположенность к развитию неходжкинских злокачественных лимфом (НХЗЛ).

Материал и методы. Обследовано 146 больных неходжкинскими злокачественными лимфомами. Средний возраст больных — 52,4 ± 15 лет (18–72 лет), по полу больные распределились поровну. Агрессивные лимфомы выявлены у 89 пациентов (61 %), индолентные — у 57 человек (39 %). Контрольную группу составили 549 доноров Новосибирского центра крови. Определение полиморфных вариантов генов *MTHFD1* и *CBS* проводилось методом ПЦР-ПДРФ; генов *MTHFR*, *MTRR*, *MTR* и *SHMT1* — методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной последовательности ДНК. Поиск публикаций для мета-анализа проводился с помощью базы данных PubMed (www.pubmed.gov), обработка данных осуществлялась с использованием пакета GenABEL; rmeta для языка R (версия 2.6.0).

Результаты. В обеих группах распределение генотипов для всех исследуемых полиморфных локусов соответствовало распределению Харди-Вайнберга. Не выявлено статистически значимых различий в частотах встречаемости аллелей и генотипов по-

лиморфных локусов генов *MTHFR*, *MTRR*, *CBS*, *SHMT1* между больными НХЗЛ и контролем. В общей группе неходжкинских злокачественных лимфом выявлена ассоциация редкого 1958A-аллеля полиморфного локуса G1258A гена *MTHFD1* с уменьшением риска развития заболевания (OR = 0,747, С.И. [0.579–0.963], $p < 0,017$). Данная ассоциация сохраняется и в группе больных агрессивными вариантами заболевания (OR = 0,578, С.И. [0.415–0.805], $p < 0,001$), в то время как связи с предрасположенностью к индолентным лимфомам не обнаружено. Фермент *MTHFD1* участвует в синтезе пуринов и метилировании ДНК. Согласно данным нескольких исследований, однонуклеотидная замена G1958A увеличивает активность фермента, что, соответственно, может препятствовать злокачественной трансформации. Необходимо отметить, что ген *MTHFD1* находится в блоке неравновесия по сцеплению, куда входят и другие гены, эффект которых он может маркировать. При проведении мета-анализа в большинстве исследований отмечена ассоциация мутантного 2756G-аллеля гена *MTR* со сниженным риском развития НХЗЛ, и при расчете объединенного отношения шансов данная ассоциация оказалась статистически значимой (OR = 0,902; С.И. [0.821–0.991], $p = 0,03$). В исследовании Шадринной А. С. (г. Новосибирск, 2013) было показано, что носители генотипа *MTR*2756GG имеют более высокий уровень метилирования генома, чем носители дикого генотипа, что может свидетельствовать о том, что замена A2756G в гене *MTR* активирует фермент, что опосредует протективный эффект редкого аллеля в отношении развития неоплазий.

Выводы. Полиморфные локусы G1958A гена *MTHFD1* и A2756G гена *MTR* вносят вклад в предрасположенность к развитию НХЗЛ, при этом мутантные аллели и генотипы данных полиморфизмов обуславливают протективный эффект в отношении НХЗЛ. Необходимо продолжить исследования на выборках более крупного размера и с изучением биохимических процессов, через которые опосредуются эффекты данных локусов.

Бидерман Б. В.¹, Бутылин П. А.², Румянцев А. М.¹, Стадник Е. А.²,
Никитин Е. А.³, Судариков А. Б.¹

¹ ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва

² ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург

³ ГБУЗ Городская клиническая больница им. С. П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы

ГЕНЫ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ И СТЕРЕОТИПНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ПРИ В-КЛЕТОЧНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ У ПАЦИЕНТОВ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ РОССИИ.

Введение. В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) — самая часто встречающаяся лимфатическая опухоль у взрослых. Мутационный статус генов варибельного региона тяжелой цепи иммуноглобулинов (*IGHV*) давно известен как важный фактор долгосрочного прогноза при В-ХЛЛ. Многообразие V, D и J локусов, из которых собираются перестроенные гены иммуноглобулинов (ИГ) в процессе дифференцировки В-клеток, и последующая соматическая гипермутация обеспечивают пренебрежимо малую теоретическую возможность получить две независимые В-клетки с одинаковыми рецепторами. Однако, начиная с 1990-х гг. начали появляться данные о значительном сужении репертуара генов ИГ при ХЛЛ по сравнению с нормальными В-лимфоцитами. Показано, что в разных странах различается частота использования тех или иных *IGHV*-генов. Также показано, что около 30 % всех случаев ХЛЛ имеют рецепторы ИГ с очень схожими нуклеотидными последовательностями. Такие квази-идентичные рецепторы называют стереотипными.

Цель. Сравнить последовательности генов ИГ у пациентов с В-ХЛЛ из различных регионов России, определить частоту встречаемости различных *IGHV* и стереотипных антигенных рецепторов (САР).

Материалы и методы. В исследование включено 680 пациентов с В-ХЛЛ. 397 пациентов постоянно проживали в Москве или Московской области, 56 в СПб., 38 в Иркутске, 20 в Кемерово, 46 в Центральном округе, 22 в Северо-Западном, 32 в Приволжском и Южном округах, 8 в Уральском и Дальневосточном округах, 3 в Северо-Кавказском округе. Мутационный статус генов ИГ 495 пациентов был исследован в ФГБУ ГНЦ МЗ РФ с 2006 по 2017 гг., 185 — в ФГБУ СЗФМИЦ им.В.А. Алмазова с 2012 по 2016 г.г. Нуклеотидные последовательности генов ИГ определяли со-

гласно методике, описанной в статье [Бидерман и др., 2012].

Результаты. Полученные нами данные подтвердили и расширили представления о существующих закономерностях репертуара IgVH при В-ХЛЛ. В общероссийской выборке наблюдалось 465 пациентов с немутированными генами *IGHV* (68,3 %) и 215 — с мутированными (31,7 %). Похожие соотношения были характерны для Москвы и МО (66 % и 34 %), СПб (70 % и 30 %) и Южного округа (69 % и 31 %). Большее преобладание немутированных *IGHV*-генов наблюдалось в Иркутске (76 % и 24 %), Центральном (74 % и 26 %), Северо-Западном (73 % и 27 %) и Приволжском (75 % и 25 %) округах. В Кемерово, наоборот, было больше пациентов с мутированными *IGHV*-генами, чем в среднем по стране (57 % и 43 %).

9 наиболее распространенных в России *IGHV* генов встречаются в 58 % от всех случаев В-ХЛЛ. В зависимости от региона эта величина варьирует от 53 % до 63 %. Наиболее часто встречающийся *IGHV1–69* составляет 18 % от всех случаев В-ХЛЛ (в европейских странах его встречаемость не превышает 14 %). В СПб. и Иркутске его частота встречаемости возрастает до 21 %, в Кемерово и Северо-Западном округе, наоборот существенно ниже, 14 % и 5 % соответственно. Часто встречающийся (до 9 %) в европейских странах ген *IGHV3–21*, ассоциированный с плохим прогнозом, в России наблюдается реже (4,7 %). Однако по регионам это значение также сильно различается — в Москве 3 %, в Кемерово 9,5 %, в Иркутске — 13,2 %.

Из частоты встречаемости *IGHV*-генов напрямую следует и распространенность подгрупп САР. Наиболее часто у российских пациентов встречаются подгруппы САР *CLL#1*, *CLL#2*, *CLL#3*, *CLL#6*, *CLL#7* (в Европе чаще встречаются *CLL#2*, *CLL#1*, *CLL#4*, *CLL#6*, *CLL#5*).

Выводы. Сужение репертуара ИГ при В-ХЛЛ показывает, что в возникновении и развитии данного заболевания существенную роль могут играть антигены, стимулирующие В-клетки с соответствующими *САР*. Можно предположить, что на развитие В-ХЛЛ оказывают влияние какие-то специфические факторы географического микроокружения. Генетический бэкграунд популяции также может сдвигать в ту либо иную сторону ре-

пертуар *САР* при В-ХЛЛ. К сожалению, наша выборка пациентов количественно сильно различается по регионам, и, возможно, часть обнаруженных нами различий является, например, следствием лучшего доступа к медицинской помощи в больших городах. Поэтому мы считаем, что данные исследования требуют увеличения выборки пациентов из различных регионов России.

Богданов К. В.^{1,2}, Никулина Т. С.¹, Ломаева Е. Г.¹, Сляднев М. Н.², Зарицкий А. Ю.¹

¹ НИИ Гематологии, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский Центр им. В. А. Алмазова, С.-Петербург;

² Группа компаний "Люмэкс", С.-Петербург

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОНКОГЕННЫХ МУТАЦИЙ У БОЛЬНЫХ ГЕМОБЛАСТОЗАМИ НА ОСНОВЕ МИКРОЧИПОВОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Введение. В настоящее время для обнаружения мутаций онкогенов при лейкозах используется несколько разных методов диагностики, включая цитогенетические и молекулярно-биологические исследования, последние из которых основаны на ПЦР. Как правило, классическая постановка ПЦР с использованием микропробирок, содержащих реакционную смесь объемом 25 или 50 мкл, требует расхода большого количества реактивов, кДНК и времени для тестирования мутаций. Кроме того, применение классической ПЦР может быть затруднено или невозможно при определении нескольких онкогенных мутаций, например, в случаях, когда в периферической крови и/или костном мозге пациента обнаруживается небольшое количество ядродержащих клеток, приводящее к низкому выходу РНК.

Цель исследования. Провести модификацию и оптимизацию условий ПЦР для обнаружения наиболее распространенных вариантов онкогенов: *BCR-ABL* (*p190*, *p210*), *AML1-ETO*, *TEL-AML1*, *SIL-TAL1*, *MLL-AF4* (*A*, *B*), *PML-RARA* (*BCR1*, *BCR2*, *BCR3*), *E2A-PBX1*, *RBM15-MKL1*, *CBFB-MYH11* (*A*, *D*, *E*), включая контрольный ген *abl*, у больных лейкозом с использованием отечественных реактивов и микрочипов в режиме реального времени (мПЦР-РВ). Оценить аналитическую чувствительность метода мПЦР-РВ и возможность его применения для диагностики мутаций у больных лейкозом.

Материалы и методы. Среди исследуемых больных гемобластозами ($n = 70$) у 32 паци-

ентов был диагностирован хронический миелолейкоз (ХМЛ), у 19 пациентов — острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), у 14 пациентов — острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) и у 5 пациентов — острый промиелоцитарный лейкоз (ОПМЛ). Определение хромосомных aberrаций и онкогенных мутаций было выполнено с использованием цитогенетического анализа метафазных пластинок и молекулярного анализа на основе микрочиповой ПЦР. Перед применением ПЦР у исследуемых пациентов проводили модификацию и оптимизацию условий амплификации. Для экстракции РНК из периферической крови (костного мозга) пациентов применяли набор реактивов QIAamp RNA Blood mini kit (Qiagen, Германия). Для синтеза кДНК использовали набор реактивов RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Образец кДНК амплифицировали с использованием микрочипов и отечественных реактивов (Евроген, Россия). Анализ результатов ПЦР выполняли по каналу FAM с помощью прилагаемого программного обеспечения к микрочиповому анализатору AriaDNA (Lumex, Россия).

Результаты. Первоначально была выполнена модификация и оптимизация условий амплификации с использованием микрочипов и контрольных позитивных образцов. Это позволило сократить используемые количества кДНК и реактивов ПЦР, включая Taq-полимеразу, в 10 раз, а также уменьшить время тестирования мутаций в 2 раза,

по сравнению с классическим вариантом ПЦР. При этом чувствительность анализа составила не менее 5 копий гена-мишени на реакцию. В дальнейшем, скрининг мутаций у исследуемых больных лейкозом был выполнен с использованием цитогенетического исследования и микрочиповой ПЦР. Цитогенетический анализ позволил обнаружить патологический кариотип у 69 из 70 пациентов. Только у 1 больного ОЛЛ не удалось провести кариотипирование из-за получения некачественных препаратов метафазных пластинок. Тестирование мутаций с использованием микрочиповой ПЦР позволило выявить изменения в онкогенах у всех исследуемых пациентов. Так, у 16 больных ОЛЛ, включая пациента, у которого не удалось провести цитогенетический анализ, был обнаружен вариант онкогена *BCR-ABL (p190)*. У 2 пациентов с В-клеточным ОЛЛ (В-ОЛЛ) и 1 пациента с пре-В-ОЛЛ были выявлены варианты онкогенов: *TEL-AML1* и *E2A-PBX1*, соответственно. Что касается 14 больных ОМЛ, то у 13 из них был обнаружен вариант онкогена *AML1-ETO*,

тогда как у 1 пациента был выявлен редко встречаемый онкоген *CBFB-MYH11*. У 5 пациентов с ОПМЛ был обнаружен вариант онкогена *PML-RARA (bcr3)*. У 32 больных ХМЛ был выявлен вариант онкогена *BCR-ABL (p210)*. Причем, у 8 из них (25 %) была выявлена коэкспрессия обоих вариантов онкогена *BCR-ABL (p210 и p190)*, что является одной из причин возникновения устойчивости к терапии тирозинкиназными ингибиторами, в частности, иматинибом.

Выводы. Анализ наиболее распространенных мутаций онкогенов (n = 15) при лейкозе с использованием обратной транскрипции и микрочиповой ПЦР в режиме реального времени позволяет определить не менее 5 копий гена-мишени. Это тестирование выполняется при минимальном количестве кДНК и в течение короткого времени. Представленный метод микрочиповой ПЦР с высокой эффективностью и чувствительностью позволяет определять мутации онкогенов у больных лейкозом и может быть рекомендован для клинической лабораторной диагностики.

Бондарчук С. В., Поляков А. С., Гончарова Е. В., Колубаева С. Н., Петрова О. Р.

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *ITGB3* В1565 Т>С: ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ПРИ ЭДТА АССОЦИИРОВАННОЙ ПСЕВДОТРОМБОЦИТОПЕНИИ

Введение. ЭДТА-ассоциированная псевдотромбоцитопения является следствием иммуноопосредованного образования тромбоцитарных агрегатов или, реже, лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов и адгезии тромбоцитов на поверхности эритроцитов, в пробах крови пациентов, стабилизированных ЭДТА (этилендиаминтетраацетат). Принято считать, что выявление ЭДТА-ассоциированной тромбоцитопении не может рассматриваться как симптом или предиктор развития тех или иных заболеваний или патологических состояний, а его клиническое значение ограничено лишь высокой распространенностью и, тем самым, большим числом лабораторных ошибок. Считается, что основным механизмом агрегации тромбоцитов является взаимодействие некоторых антител со скрытым в физиологических условиях эпителием рецептора тромбоцитов к фибриноге-

ну комплекса гликопротеина IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), кодируемого геном *ITGB3-b*. За счет способности ЭДТА к связыванию ионов Ca²⁺ целостность комплекса GP IIb/IIIa нарушается, и становится возможным взаимодействие антител с антигеном, находящимся на поверхности гликопротеина IIb, что способствует агрегации тромбоцитов. Сведений о наличии наследственной предрасположенности или выявлении цитогенетических маркеров ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопении в опубликованной литературе нет. Вместе с тем, техническая возможность определения некоторых вариантов полиморфизма гена тромбоцитарного рецептора (интегрин) к фибриногену во многих лабораториях существует. Методика выявления таких наследственных точечных мутаций, которые называются также ОНП (однонуклеотидные полиморфизмы) используется при скринин-

говых генетических обследованиях пациентов из групп риска тромботических и тромбоэмболических осложнений. По сложившейся практике, выявление полиморфизма A1/A2(1565T>C) в гене интегрин рассматривается как предиктор повышенной способности тромбоцитов к агрегации. Считается, что у носителей этой гаметической мутации в различной степени повышен риск развития ранней ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, понижена чувствительность к лечению антиагрегантными препаратами.

Цель работы. Определить взаимосвязь ЭДТА-псевдотромбоцитопении с наличием гаметической мутации в гене тромбоцитарного рецептора к фибриногену (*ITGB3-b 1565 T>C*).

Материалы и методы. Обследовано 19 пациентов с ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопенией. Выполнено молекулярно-генетическое исследование для выявления полиморфизмов в гене тромбоцитарного рецептора к фибриногену.

Результаты. У 12 пациентов с ЭДТА-ассоци-

ированной псевдотромбоцитопений (63,2 %) был выявлен полиморфизм TC в гене интегрин *ITGB3-b*, кодирующего бета-3 субъединицу интегрин-комплекса поверхностного рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa.

Обсуждение. Представленные наблюдения о выявлении полиморфизма TC в гене тромбоцитарного рецептора к фибриногену (*ITGB3-b 1565 T>C*) у 63,2 % пациентов из ограниченной группы пациентов с ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопенией (n = 19) пока не дают возможности сделать окончательные выводы, но должны послужить сигналом к продолжению работы в данном направлении. Для увеличения количества наблюдений целесообразно выполнение генетического исследования всем пациентам с псевдотромбоцитопенией. Определение роли наследственной мутации в генезе ЭДТА-ассоциированной псевдотромбоцитопении может послужить основой к пересмотру существующих представлений о клиническом значении этого феномена.

Бондарчук С. В., Поляков А. С., Колюбаева С. Н., Мерзликина О. В.

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург

РАДИАЦИОННО-СПЕЦИФИЧНЫЕ ПОЛОМКИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Введение. Известно, что хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — гематологическое заболевание, при котором не установлено достоверной связи между ионизирующим облучением и развитием заболевания.

Цель работы. Изучить цитогенетические повреждения периферической крови у больных ХЛЛ для выявления радиационно-специфичных повреждений.

Материалы и методы. Оценивались цитогенетические повреждения в лимфоцитах периферической крови через 52 часа от начала культивирования с ФГА митогеном для выявления радиационно-специфичных повреждений и через 72 часа с поуквид митогеном для выявления специфичных для ХЛЛ повреждений. Исследованные больные в анамнезе имели длительный контакт с источниками ионизирующих излучений. Средний возраст больных составлял $64,1 \pm 2,8$ г. Для выявления радиационно-специфичных и специфич-

ных для ХЛЛ цитогенетических повреждений использовали метод дифференциальной окраски хромосом, в ряде случаев для выявления специфичных для ХЛЛ аббераций использовали метод флуоресцентной *in situ* гибридизации. Использовались ДНК-зонды фирмы АВВОТТ, направленные на детекцию характерных для ХЛЛ повреждений, таких как делеция генов *ATM*, *P53*, делеция в q плече хромосомы 13 и трисомия по хромосоме 12. Для определения иммунофенотипа клеток использовалась проточная цитометрия.

Результаты. У 6 из 21 обследованного пациента выявлены дицентрические хромосомы (dc), при этом у 2-х пациентов в комплексе с транслокациями. Процентное содержание dc колебалось от 0,67 до 2,9, при этом у одного пациента при количестве dc 1 %, количество транслокаций достигало 5 на 100 метафаз. Как правило, как в образовании dc, так и транслокаций, вовлекались

разные хромосомы с разрывами в разных локусах. Это является подтверждением вклада радиационного воздействия на лимфоидные клетки в механизм формирования ХЛЛ. У 15 из изученных пациентов с ХЛЛ были выявлены только транслокации. Содержание их колеблется у разных пациентов от 46 % до 67 %. Ни у одного из больных не было обнаружено вовлечения в транслокационный обмен одних и тех же локусов хромосом. Кроме отмеченных повреждений, исследованная группа отличалась от остальных пациентов с ХЛЛ высоким содержанием аберрантных

клеток (АК): $7,11 \pm 1,00$ % против $3,70,1 \pm 1,20$ в группе здоровых доноров. При проточном цитометрическом анализе также отмечены отклонения иммунофенотипа больных ХЛЛ, у которых выявлены *dc*, от классического фенотипа, характерного для этого заболевания в виде положительной экспрессии антигена *CD79b* с интенсивностью *dim to mod* и экспрессией антигена *CD38* на поверхности 70–90 % опухолевых клеток. Полученные нами данные демонстрируют возможность связи ионизирующего излучения и развитием ХЛЛ.

Колюбаева С. Н., Бондарчук С. В., Поляков А. С., Сухина И. А., Исакова Т. В.

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ МЕТАБОЛИЗМА ВАРФАРИНА И ФОЛАТОВ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Введение. В последние годы получены данные в пользу того, что одним из важных факторов развития и прогрессирования злокачественных опухолей, в том числе и хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), является функционально значимый полиморфизм генов, кодирующих ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков. К ним относится около 90 % всех лекарственных препаратов. 1-я фаза биотрансформации (окислительная) обеспечивается, в основном, семейством генов цитохрома P450. Основной функцией 2-й фазы биотрансформации ксенобиотиков является детоксикация за счет действия гидролаз и трансфераз. И, наконец, 3-я фаза биотрансформации связана с выведением из организма лекарственных форм. Кроме генов, отвечающих за экспрессию энзимов с широкой субстратной специфичностью, в организме имеются гены, обеспечивающие функции энзимов с узкой направленностью действия. К ним относится ген *MTHFR*, который кодирует энзим метилентетрагидрофолат редуктазу, участвующий в метаболизме фолатов и препаратов, близких по структуре к фолиевой кислоте.

Цель. Исследование цитогенетических повреждений методом флуоресцентной *in situ* гибридизации у больных ХЛЛ.

Материалы и методы. Применяли ДНК-зонды фирмы *ABBOT*, направленные на детекцию характерных для ХЛЛ повреждений:

делеция генов *ATM* и *P53*, делеция в q плече хромосомы 13, трисомия по хромосоме 12. Исследование полиморфизма генов проводили только в группе больных ХЛЛ с цитогенетическими повреждениями, предсказывающих хороший прогноз течения заболевания: *del (13)(q14.3)*, *del (13)(q34)*, *del (13)(q14.3–34)*. Таким образом, у одних и тех же больных исследовали полиморфизмы генов, ассоциированные с метаболизмом варфарина и фолатного цикла (фирма ДНК-технология), амплификацию проводили на приборе ДТ-прайм (ДНК-технология). В варфариновый цикл входит определение вариантов генов *CYP2C9: C>T*; *CYP2C9 A>C*; *VKORC1: 1639 G>A*; *CYP4F2 C>T*, *CYP2C9*. В фолатный цикл входит определение вариантов генов *MTR:2756 A>G*, *MTHFR:1298 A>C*, *MTHFR: 677 C>T*, *MTRR:66 A>G*.

Результаты. При исследовании больных ХЛЛ с более сложными хромосомными перестройками в кариотипе чаще выявляются аллельные различия по сравнению с контрольным генотипом. Так, например, у больного с клональной транслокацией между 11 и 13 хромосомами, делецией в локусе *(13)(q14–34)* выявлены аллельные различия от контроля в трех генах, в отличие от тех случаев, когда при одном хромосомном повреждении (например, *del(13)(q14.3)*) аллельные различия выявляются реже и в меньшем количестве генов.

Власова Ю. Ю., Морозова Е. В., Моисеев И. С., Алянский А. Л., Гиндина Т. Л., Афанасьев Б. В.

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

РОЛЬ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С МУТАЦИЕЙ T315I ХМЛ В ЭРУ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗ

Введение. Лечение ХМЛ основано на применении ингибиторов тирозинкиназ (ИТК). Несмотря на высокую эффективность ИТК, некоторые пациенты в ХФ и значительно большее количество пациентов в ФА и БК оказываются к нему резистентными. Наиболее важный из обсуждаемых механизмов резистентности к ИТК — возникновение точечных мутаций в киназном домене *ABL*-тирозинкиназы. На сегодня *T315I* считается единственной мутацией, вызывающей резистентность лейкозных клеток ко всем известным ИТК I и II поколения.

Материалы и методы. Приведены результаты 18 аллогенных трансплантаций костного мозга (алло-ТГСК), выполненных 16 пациентам ХМЛ с мутацией *T315I*, и данные результатов фармакологической терапии 37 пациентов, предоставленные гематологическими центрами РФ.

Результаты. К моменту алло-ТГСК 4 пациента находились в ХФ1, 7 — в ХФ \geq 2, в ФА-5, в БК — 2 пациента. В 7 случаях донорами были *HLA*-идентичные сиблинги, в 11 — неродственные доноры. 14 пациентов были мужчины, 2 — женщины, возраст составил 17–55 лет (медиана — 34 года). Терапия до аллоТГСК: 1-я линия терапии — 2 пациента, \geq 2-й линий терапии — 3 пациента, \geq 3-й линий терапии — 11. Время от установления диагноза до алло-ТГСК: 14–139 (мес.), медиана 39 месяцев. Время от выявления мутации до алло-ТГСК — 2–38 (мес.), медиана 10 месяцев. Количество баллов по шкале ЕВМТ: 3–4 балла — 12 пациентов, 5–7 баллов — 4 пациента. Режим кондиционирования: в 5 случаях — МАК, в 13 — РКСИД. В живых остаются 7 пациентов из 16. На момент алло-ТГСК из них

2 пациента находились в ХФ1, 4 — в ХФ2, 1 — в ФА. Все находятся в полной молекулярной ремиссии: 3 пациента в 1-й и 4 — в достигнутой после профилактического назначения ИТК. Длительность наблюдения за живущими пациентами составляет к настоящему времени 8–79 месяцев, медиана 48 месяцев. ОВ пациентов, которым была выполнена алло-ТГСК, составила 42,9% при медиане наблюдения 18 месяцев. Из пациентов, получавших фармакологическую терапию, в живых остаются 18 пациентов из 37. 25 пациентов — мужчины, 12 — женщины, возраст составил 17–77 лет (медиана 49 лет). На момент диагностики заболевания 29 пациентов находились в ХФ, 8 — в ФА. На момент обнаружения мутации 23 пациента находились в ХФ, 11 — ФА, 3 — БК. До момента выявления мутации 5 пациентов получили 1 линию терапии ИТК, 22 — 2 линии ИТК, 10 — 3 линии ИТК. После выявления мутации проводилась терапия: понатиниб — 3, 1–2 поколение ИТК — 8, ХТ+ИТК/гидреа + ИФ — 17. В настоящее время 6 пациентов находится в ХФ \geq 1, 9 пациентов — ПГО, ПЦГО/ЧЦГО. Длительность наблюдения за живущими пациентами составляет к настоящему времени 53–250 месяцев, медиана 81 месяцев. ОВ пациентов, получавших фармакологическую терапию, составила 48,4% при медиане наблюдения 81 месяц.

Выводы. Имеет значение не только выявление мутации *T315I*, но и фаза заболевания, в которой она обнаружена. В ХФ1 возможно продолжение терапии ИТК. Алло-ТГСК остается потенциальной терапевтической опцией для пациентов в ФА и БК ХМЛ, имеющих мутацию *T315I*, особенно для пациентов в ХФ \geq 2.

**Гарифуллин А. Д., Мартынкевич И. С., Волошин С. В., Шуваев В. А., Клеина Е. В.,
Кувшинов А. Ю., Шмидт А. В., Зенина М. Н., Бессмельцев С. С., Четчин А. В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ И РИСК-СТРАТИФИКАЦИИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВЫЖИВАЕМОСТИ

Введение. У 70 % больных множественной миеломой (ММ) выявляются хромосомные aberrации, часть из которых имеет прогностическое значение, что позволяет стратифицировать больных в отдельные группы риска.

Цель. Сравнить общую выживаемость больных с разным генетическим профилем клональных плазматических клеток (ПлК).

Методы. Проведен анализ клинико-лабораторных и инструментальных данных 177 больных ММ (26–86 лет, медиана — 61 год, соотношение мужчины/женщины — 1:1.35). Генетические аномалии (ГА) выявлялись при рутинном цитогенетическом и FISH исследованиях. Стратификация по группам риска проводилась согласно модифицированной системе mSMART 2.0.

Результаты. Карิโอтип ПлК при стандартном цитогенетическом исследовании был определен у 137 из 177 (77,4 %) больных ММ. Низкий уровень митотической активности ПлК определил и частоту встречаемости ГА при метафазном цитогенетическом анализе, которая составила 8,7 % (12/137). Интерфазный анализ FISH-методом проведен у 176 пациентов. У 71/176 (40,3 %) aberrации при FISH-исследовании выявлялись достоверно чаще ($p=0,0005$ в сравнении с метафазной цитогенетикой). У 3,6 % (5/137) пациентов ГА были обнаружены обоими методами генетического (метафазный и интерфазный) анализа. Группу стандартного риска ($n=131$) составили пациенты с отсутствием ГА, гипердиплоидией, $t(11;14)$ и все остальные аномалии неопределенного прогностического значения, промежуточного риска ($n=35$) — с гиподиплоидией, $t(4;14)$, $del(13)(q14)$ и аномалиями 1 хромосомы, высокого риска ($n=11$) — с $del(17)(p13.1)$, в том числе при сочетании с другими ГА, комплексным карิโอотипом. Пациенты, имеющие $t(4;14)$, $del(13)(q14)$, аномалии 1 хромосомы при сочетании с одной другой аномалией (исключая с $del(17)(p13.1)$), были отнесены в группу промежуточного риска («сочетанные» ГА).

При сравнении частоты встречаемости специфических генетических нарушений было выявлено увеличение вторичных неблагоприятных ГА. Так делеция $del(17)(p13.1)$ выявлена у 1,8 % (2/111) при первичной диагностике и у 12,1 % (6/48) при рецидиве/прогрессировании ММ ($p=0,015$). Вовлечение тяжелых цепей иммуноглобулинов ($t(11;14)$, $t(4;14)$ и перестройка IgH без локус-партнера) встречалось в 25,0 % (11/44) случаев ММ при первичной диагностике и 32,3 % (41/127) при прогрессировании/рецидиве заболевания ($p=0,018$). С целью определения прогностической значимости была исследована беспрогрессивная (БПВ) и общая (ОВ) выживаемость для отдельных вариантов генетических нарушений. Анализ БПВ показал, что медиана в группе без ГА была равна 30,4 мес., с $t(11;14)$ — 25,2 мес., с $t(4;14)$ — 30,4 мес., $del(13)(q14)$ — 22,9 мес., с комплексным карิโอотипом — 11,4 мес. ($p=0,0008$), с «сочетанным» карิโอотипом — 21,8 мес. ($p>0,05$ для всех остальных групп сравнения). Медиана ОВ в группе без ГА составила 107,2 мес.; с изолированными $t(11;14)$ — 76,8 мес. ($p=0,304$ при сравнении с группой без ГА); с $t(4;14)$ — 47,9 мес. ($p=0,54$); с $del(13)(q14)$ — 48,6 мес. ($p=0,028$), с сочетанным карิโอотипом — 51,6 мес. ($p=0,16$). Для выявления прогностической значимости комплексного карิโอотипа без $del(17)(p13.1)$ проведен сравнительный анализ ОВ пациентов с комплексным карิโอотипом без $del(17)(p13.1)$ ($n=3$) с группой пациентов, имеющих $del(17)(p13.1)$ ($n=8$), и группой без ГА ($n=101$). Медиана ОВ составила 14,8 мес., 45,1 мес. и 107,2 мес., соответственно ($p=0,006$). Медиана БПВ в группе стандартного риска составила ($n=131$) 30,6 мес., промежуточного ($n=35$) — 29,5 мес., высокого ($n=11$) — 11,4 мес. и показала значимые различия продолжительности ($p=0,014$). Медиана ОВ в группе стандартного риска ($n=130$) составила 107,4 мес., промежуточного ($n=37$) — 76 мес., высокого ($n=11$) — 45,2 мес. ($p=0,02$).

Выводы. Проведение цитогенетических исследований плазматических клеток костного мозга позволяет определить генетические аномалии, являющиеся независимым сильным прогностическим фактором, у более 50 % больных множественной миеломой. Наличие делеции del(17)(p13.1) и комплексного кариотипа имеет негативное влияние на длительность беспрогрессивной и общей

выживаемости, что определяет группу пациентов высокого риска с рекомендацией использования в лечении комбинации основных противомиеломных препаратов. Пациенты стандартной группы риска нуждаются в дополнительном мониторинге, особенно при прогрессировании заболевания, в связи с возможностью появления вторичных неблагоприятных генетических аномалий.

Гиндина Т. Л., Мамаев Н. Н.

НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачёвой, ФГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России

ОСТРЫЙ ЛИМФОБЛАСТНЫЙ ЛЕЙКОЗ С ТРАНСЛОКАЦИЕЙ t(4;11)(q21; q23)/KMT2A-AFF1: ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ И РЕЗУЛЬТАТЫ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Цель. Оценить результаты аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) при остром лимфобластном лейкозе с транслокацией t(4;11)(q21; q23)/KMT2A-AFF1 у больных с разными цитогенетическими, клиническими и трансплантационными характеристиками.

Методы. Обследован 21 больной (12 женщин и 9 мужчин в возрасте от 3 месяцев до 48 лет, медиана 18,9 лет). Проведен анализ факторов прогноза общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) после алло-ТГСК у больных с выделением возрастных групп: до 1 года, от 1 года до 18 лет и старше 18 лет. В итоге, алло-ТГСК от HLA-совместимых родственных и неродственных доноров, а также гаплоидентичные алло-ТГСК были выполнены у 4, 9 и 8 больных, соответственно. При этом у 10 больных (48 %) алло-ТГСК была выполнена в первой ремиссии, у 2 (10 %) — во второй ремиссии, а у 9 (43 %) в рецидиве заболевания.

Результаты. У 8 (38 %) больных единственным хромосомным нарушением была транслокация t(4;11)(q21; q23). Дополнительные изменения хромосом имели место у 11 (52 %), в том числе три и более хромосом-

ные аномалии в кариотипе у 8 (38 %) пациентов. Однофакторный анализ показал, что ОВ и БСВ после алло-ТГСК статистически различались у больных в зависимости от того проводилась алло-ТГСК в первой ремиссии или нет ($p = < 0,001$; $p = < 0,001$), наличия или отсутствия трех и более цитогенетических нарушений в кариотипе ($p = 0,04$; $p = 0,04$). При многофакторном анализе было установлено, что единственным независимым фактором прогноза у больных ОЛЛ с транслокацией t(4;11) для ОВ и БСВ было выполнение алло-ТГСК, включая гаплоидентичную, в состоянии первой полной клинико-гематологической ремиссии ($p = 0,002$; $p = 0,0004$).

Выводы. ОЛЛ с транслокацией t(4;11)/KMT2A-AFF1 является строгим показанием для срочного проведения алло-ТГСК на этапе первой ремиссии, в том числе у детей до 1 года. При этом полноценные результаты алло-ТГСК могут быть получены при использовании гаплоидентичной трансплантации от родителей, что снимает вопрос о поиске в регистрах полностью HLA-совместимого донора и, отсюда, значительно упрощает саму лечебную процедуру.

Горева О. Б., Горбаченко Е. А., Гришанова А. Ю.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА
КСЕНОБИОТИКОВ И ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ: РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ
УСТОЙЧИВОСТИ К ХИМИОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ
ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

Введение. В биотрансформации препаратов, входящих в стандартные протоколы химиотерапии, применяемые при лечении хронических лимфопролиферативных заболеваний (ХЛПЗ), участвуют ферменты метаболизма ксенобиотиков цитохромы P450 (*CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*), глутатион-S-трансфераза (*GSTP1*), а также АТФ-зависимые транспортные белки Р-гликопротеин и *MRP*. Полиморфизм в кодирующих эти белки генах (*CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *GSTP1*, *MDR1* и *MRP1*) может приводить к синтезу белков с измененной активностью и, как следствие, к ускорению или замедлению скорости метаболизма или выведения лекарственных препаратов и их метаболитов из клеток, и в конечном итоге влиять на их эффективность и токсичность.

Цель. Оценка ассоциации полиморфизмов генов *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *GSTP1*, *MDR1* и *MRP1* с клиническим ответом на химиотерапию у больных хроническими лимфопролиферативными заболеваниями.

Материалы и методы. Материалом для исследования были 123 образца периферической крови пациентов с ХЛПЗ (средний возраст $55 \pm 8,3$ лет), получавших лечение по стандартным протоколам химиотерапии (СОР, СНОР) в отделении гематологии ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница». Эффективность химиотерапии оценивалась через 6 месяцев после установления диагноза и начала лечения. По эффекту лечения пациенты были разделены на 2 группы: в случае стабилизации, частичной или полной ремиссии ответ считали положительным, при прогрессировании заболевания — отрицательным. Генетические полиморфизмы *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP3A5*, *GSTP1*, *MDR1* и *MRP1* определяли методом ПДРФ-анализа. Об ассоциации генотипов с устойчивостью к лечению судили по величине отношения шансов (ОШ). Для оценки достоверности различий между

выборками использовался критерий χ^2 с поправкой Йетса или двусторонний точный критерий Фишера (для $n < 5$) с использованием программы EpiInfo 6.

Результаты. Частоты встречаемости мутантных аллелей в исследованной нами выборке больных ХЛПЗ составляют для цитохромов P450: *CYP2C8* × 2 — 0.00, *CYP2C8* × 3 — 0.14, *CYP2C9* × 2 — 0.11, *CYP2C9* × 3 — 0.05, *CYP2C19* × 2 — 0.13, *CYP2C19* × 3 — 0.00, *CYP3A5* × 3 — 0.93; для *GSTP1*: А313G — 0.21, *GSTP1* С341Т — 0.12; для *MDR1*: 6+139Т — 0.39, 1236Т — 0.34, 2677Т — 0.43, 3435Т — 0.52; для *MRP1*: 1684С — 0.86, 1218+8G — 0.38, 2461–30G — 0.80 и согласуются с данными литературы для популяции европеоидов. Анализ ассоциаций полиморфных вариантов *CYP2C8**3 с эффектом лечения показал, что у больных, имеющих один или оба мутантных аллеля, вероятность устойчивости к химиотерапии в 4,23 раза достоверно выше (ОШ = 4.23, $p = 0.01$) в сравнении с больными, имеющими генотип дикого типа. Аналогичная связь прослеживается для полиморфизма *CYP2C9**2: вероятность получить отрицательный ответ при химиотерапии у больных ХЛПЗ, имеющих в генотипе хотя бы один мутантный аллель, в 4,1 раза достоверно (ОШ = 4.1, $p = 0.03$) выше, чем у больных, являющихся гомозиготами дикого типа. Что касается генов транспортных белков, в частности *MDR1*, риск устойчивости к химиотерапии повышен для больных, имеющих полиморфные варианты *T2677T* (ОШ = 6.8, $p = 0.008$) и *T3435T* (ОШ = 10.08, $p = 0.002$), а если больной имеет гаплотип *T2677T T3435T*, то риск устойчивости к лечению в 17 раз выше чем у больных с другими комбинациями генотипов (ОШ = 17.73, $p = 0.00045$). Что касается генов транспортных белков, в частности *MDR1*, риск устойчивости к химиотерапии повышен для больных, имеющих полиморфные варианты *T2677T* (ОШ = 6.8, $p = 0.008$) и *T3435T* (ОШ = 10.08, $p = 0.002$), а если боль-

ной имеет гаплотип *T2677T T3435T*, то риск устойчивости к лечению в 17 раз выше чем у больных с другими комбинациями генотипов (ОШ = 17.73, $p = 0.00045$). Для других исследуемых полиморфизмов не выявлено достоверно значимых ассоциаций присутствия мутантного аллеля в генотипе больных ХЛПЗ с отрицательным ответом на химиотерапию: для *CYP2C9* × 3 ОШ = 0.85 ($p = 0.99$), *CYP2C19* × 2 ОШ = 0.88 ($p = 0.99$), *CYP3A5* × 3 ОШ = 1.58 ($p = 0.72$); для *GSTP1 A313G* ОШ = 1.38 ($p = 0.74$), *C341T* ОШ = 1.21 ($p = 0.97$), для *MDR1: C6+139T*

и *C1236T* ОШ = 0.28 ($p = 0.18$), для *MRP1: T1684C* ОШ = 0.42 ($p = 0.51$), *A1218+8G* и *C2461-30G* ОШ = 0.50 ($p = 0.99$). Отношение шансов для полиморфных вариантов *CYP2C8* × 2 и *CYP2C19* × 3 не определяли, так как все образцы являлись гомозиготами дикого типа.

Выводы. Результаты исследования показали, что у больных ХЛПЗ полиморфные варианты генов *CYP2C8* × 3, *CYP2C9* × 2, *MDR1 T2677T* и *MDR1 T3435T* ассоциированы с формированием устойчивости к проводимой химиотерапии.

Жернякова А. А., Мартынкевич И. С., Шуваев В. А., Полушкина Л. Б., Фоминых М. С., Удальева В. Ю., Зотова И. И., Шихбабаева Д. И., Зенина М. Н., Потихонова Н. А., Волошин С. В., Бессмельцев С. С., Четчин А. В., Абдулкадыров К. М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России»

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МАРКЕРАМИ КЛОНАЛЬНОСТИ

Введение. Наличие различных молекулярно-генетических маркеров клональности (соматические мутации генов *JAK2*, *MPL*, *CALR*) или отсутствие всех трех маркеров (тройной-негативный статус (ТН)) при эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) свидетельствует о биологической гетерогенности заболевания и может определять особенности клинического течения ЭТ. Представляет интерес изучение вопроса гетерогенности клинических проявлений ЭТ в зависимости от мутационного статуса (наличие/отсутствие одного из маркеров: *JAK2V617F*, *MPL*, *CALR* или ТН-статус). Выявление ассоциаций между носительством патогенетических мутаций либо их отсутствием (ТН) и особенностями клинического течения, рисками осложнений и прогнозом позволит уже на этапе диагностики отнести пациента к группе благоприятного/неблагоприятного прогноза, что призвано оптимизировать выбор индивидуальной тактики терапии ЭТ.

Цель. Оценить влияние молекулярно-генетического статуса на особенности клинического течения и прогноз у больных ЭТ.

Материалы и методы. Проанализированы данные 240 пациентов с диагнозом ЭТ (критерии ВОЗ 2008 г.). Оценивались показатели клинического анализа крови (гемоглобин, лейкоциты, тромбоциты), данные морфоло-

гического и цитогенетического исследований костного мозга, результаты молекулярно-генетических методов исследования: полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), используемого для определения *JAK2V617F*, а при *JAK2V617F*-отрицательном статусе — ПЦР-ПДРФ (детектирование мутации в 515 кодоне гена *MPL*) и прямого секвенирования (выявление мутации 9 экзона гена *CALR*). Произведен анализ наличия симптомов заболевания, частоты и вариантов тромбгеморрагических осложнений, показателей общей выживаемости (ОВ) в группах пациентов с различными молекулярно-генетическими маркерами.

Результаты. Распределение пациентов по мутационному статусу: *JAK2V617F*(*JAK2+*) выявлена у 182/240 пациентов (75,9%); мутации гена *CALR* (*CALR+*) — у 30/240 (12,5%): тип 1 (*CALR1+*) — у 13/30 (43,3%), тип 2 (*CALR2+*) — у 17/30 (56,7%); *MPL*-мутации (*MPL+*) — у 2/240 (0,8%), тройной-негативный статус (ТН) — у 26/240 (10,8%) пациентов. При сравнении средних показателей клинического анализа крови в *CALR1+* и *CALR2+* подгруппах отмечены значимо более высокие показатели уровня тромбоцитов на этапе диагностики в сравнении с *JAK2+* и ТН-подгруппами. Средние значения уровня тромбоцитов составили: $1252 \times 10^9/\text{л}$ при *CALR2+*

и $1079 \times 10^9/\text{л}$ при *CALR1+* против $841 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,001$ и $p = 0,06$) и $775 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,001$ и $p = 0,04$) при *JAK2+* и ТН-статусах, соответственно. Статистически значимых различий по уровню гемоглобина и лейкоцитов не отмечено ($p < 0,05$). Пациенты всех подгрупп наиболее часто испытывали симптомы: слабость (*JAK2+* — 25,3 % (46/182), *CALR2+* — 29,4 % (5/17), *CALR1+* — 15,4 % (2/13) и ТН — 11,5 % (3/26), головная боль и головокружение (*JAK2+* — 13,2 % (24/182), *CALR2+* — 7,1 % (2/17) и ТН — 11,5 % (3/26)). Статистически значимых различий по частоте симптомов между подгруппами не получено ($p > 0,05$ для всех групп сравнения). Геморрагические осложнения не были зарегистрированы у *MPL+* пациентов, в отличие от пациентов других подгрупп ($p = 0,28$). Тромботические осложнения в *JAK2+* подгруппе наблюдались у 50/182 пациентов (27,4 %), в ТН — у 8/26 пациентов (30,7 %), *CALR1+* — у 2/11 (18,2 %). В подгруппах *CALR2+* и *MPL+* не отмечено тромботических осложнений ($p < 0,001$). При сравнении динамики ОВ выявлены статистически значимые различия между анализируемыми

подгруппами ($p = 0,015$). *CALR1+* статус можно охарактеризовать как прогностически наиболее благоприятный, несмотря на высокий исходный уровень тромбоцитов (5-летняя ОВ составила 100 %), а ТН — как наименее благоприятный (5-летняя ОВ — 85 %).

Заключение. Носительство мутаций в гене *CALR* характеризуется более благоприятным прогнозом, в сравнении с *JAK2+* и ТН-статусами, ассоциировано со снижением риска и частоты развития тромботических осложнений, несмотря на более высокий уровень тромбоцитов у данной группы пациентов. ОВ достоверно выше у *CALR1+* пациентов, наименее благоприятный прогноз при ТН-статусе. Учитывая частоту встречаемости и важную патогенетическую значимость молекулярно-генетических маркеров в возникновении ЭТ, актуальным представляется дальнейшее изучение влияния соматических мутаций на особенности развития и течения ЭТ, потенцирование рисков развития осложнений и прогноз заболевания, что обуславливает необходимость продолжения исследований.

**Зеркаленкова Е. А.¹, Казакова А. Н.¹, Мейер К.², Панферова А. В.¹, Тимофеева Н. М.¹,
Апрелова Е. В.¹, Солдаткина О. И.¹, Барышев П. Б.¹, Чекменева Ю. Ю.¹, Цаур Г. А.³,
Маршалек Р.², Масчан М. А., Масчан А. А.¹, Ольшанская Ю. В.¹**

¹ ННПЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

² Institut Pharmazeutische Biologie & DCAL, Frankfurt/Main

³ Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург

ОСТРЫЕ ЛЕЙКОЗЫ С ПЕРЕСТРОЙКОЙ ГЕНА *KMT2A* У ДЕТЕЙ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕДКИХ ВАРИАНТОВ ПЕРЕСТРОЕК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Введение. Ген лизин-специфической метилтрансферазы 2A (lysine (K)-specific methyltransferase 2A — *KMT2A*, ранее *MLL*), расположенный в хромосомном регионе 11q23, вовлечен в большое количество хромосомных транслокаций при острых лейкозах. К настоящему моменту охарактеризовано более 80 генов-партнеров *KMT2A*. При этом именно характером гена-партнера определяется различный прогноз при ОЛ с перестройкой *KMT2A* — от благоприятного при $t(1;11)(1p32.3; q23)/KMT2A-ESP15$ и промежуточного при $t(9;11)(9p21.3; q23)/KMT2A-MLLT3$ до крайне неблагоприятного при $t(4;11)(q21.3; q23)/KMT2A-AFF1$ и других. Поэтому

представляется важной детекция различных типов химерных генов при ОЛ с перестройками *KMT2A*, включая редкие варианты.

Цель. Охарактеризовать группу пациентов с перестройками гена *KMT2A*. Определить спектр наблюдаемых в данной группе вариантов перестроек, найти редкие гены-партнеры.

Материалы и методы. Стандартное карiotипирование проводилось методом G-banding на культурах костного мозга либо периферической крови с достаточным количеством бластных клеток после суточного культивирования без митогенной стимуляции. Перестройка *KMT2A* определялась методом FISH

с помощью зонда на разрыв хромосомного региона 11q23. Наиболее распространенные хромосомные перестройки с участием *KMT2A* определялись методом FISH с помощью транслокационных ДНК-зондов; экспрессия соответствующего транскрипта подтверждалась методом ПЦР в режиме реального времени. Структура химерного гена в случае редких и нестандартных перестроек определялась методом длинной инвертированной ПЦР (long-distance inverse PCR — LDI-PCR) с последующим секвенированием продукта либо по методу Сэнгера, либо с использованием высокопроизводительного секвенирования на приборе IlluminaMiSeq после подготовки библиотек с реагентами NEBNextUltraII(NEB).

Результаты. Всего нами зафиксировано 312 случаев пациентов с перестройкой гена *KMT2A* (возраст от 1 мес. до 63 лет, медиана возраста 3 года), из них 289 случаев до 18 лет. Больше половины случаев в нашей группе приходится на острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — 172 случая (55 %). Наибольшее число ОЛ (как ОЛЛ, так и ОМЛ) с перестройкой гена *KMT2A* приходится на пациентов в возрасте от 1 до 2 лет (55 случаев) и в возрасте от 9 до 15 лет (51 случай). Самой распространенной транслокацией в данной группе явилась перестройка $t(9;11)(p21.3; q23)/KMT2A-MLLT3$ (88 случаев, 28 %), что несколько отличается от данных мировой литературы, по которым наиболее распространенной перестройкой считается $t(4;11)(q21.3; q23)/KMT2A-AFF1$ (в нашей группе 55 случаев, 17,5 %). По-видимому, это связано с относительно маленьким количе-

ством детей в возрасте до 1 года в данной группе. Среди других вариантов перестроек из десяти наиболее распространенных по данным мировой литературы в наблюдаемой группе встречались: $t(10;11)(p12; q23)/KMT2A-MLLT10$ (36 случаев, 11,5 %), $t(11;19)(q23; p13.3)/KMT2A-MLLT1$ (22 случая, 7 %), $t(11;19)(q23; p13.1)/KMT2A-ELL$ (11 случаев, 3,5 %), $t(6;11)(q27; q23)/KMT2A-MLLT4$ (10 случаев, 3,5 %). Кроме того, нами были проанализированы редкие варианты перестроек гена *KMT2A*. Мы охарактеризовали следующие редкие перестройки: $t(10;11)(p12; q23)/KMT2A-NEBL$ (2 случая), $t(10;11)(p12; q23)/KMT2A-ABI1$, $t(2;11)(q34; q23)/KMT2A-ABI2$, $t(5;11)(q31; q23)/KMT2A-ARHGAP26$, $ins(X;11)(q28; q23q23)/KMT2A-FLNA$, $t(11;15)(q23; q15)/KMT2A-CASC5$, $t(11;22)(q23; q11)/KMT2A-SEPT5$ (по одному случаю).

Выводы. В ходе настоящей работы была проанализирована группа пациентов с перестройкой гена *KMT2A*, и было найдено несколько редких генов-партнеров, для некоторых из которых в мировой литературе встречаются только единичные описания. Полученные молекулярно-генетические данные позволяют проводить пациент-специфический мониторинг минимальной остаточной болезни, а также расширить данные о всём спектре возможных перестроек гена *KMT2A* («MLL-recombinome») с целью дальнейшей классификации и функциональной характеристики генов-партнеров, выяснения механизмов трансформации и потенциального применения таргетных препаратов.

Ковалева Н. В.

Академия молекулярной медицины, Санкт-Петербург

ПРОБЛЕМА МЕДИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНСУЛЬТИРОВАНИЯ НОСИТЕЛЕЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО МАРКЕРА ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА — РОБЕРТСОНОВСКОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ ROB(15;21)

Введение. Сбалансированные робертсоновские транслокации относятся к наиболее часто обнаруживаемым перестройкам хромосом у человека. Известно, что вовлечение акроцентрических хромосом в робертсоновские транслокации исключительно неравномерно. Причиной этого принято считать особенность генетической структуры коротких

плеч акроцентриков. Однако данные научных статей свидетельствуют об отрицательном отборе против транслокации rob(15;21). В этих источниках сообщается об обнаружении трех носителей rob(15;21) среди 95 детей с острым лимфобластным лейкозом. Было показано, что механизмом запуска неопластического процесса является хромотриписис.

Высокая частота ассоциации этой перестройки с лейкозом не может рассматриваться как случайная, поскольку авторы имеют информацию от своих коллег о 9 случаях $\text{rob}(15;21)$ среди пациентов с таким же заболеванием. Авторы приходят к заключению, что у носителей этой перестройки риск заболевания выше в 2700 раз по сравнению с популяцией. Эти данные имеют большое значение для медико-генетического консультирования такой перестройки при пренатальной диагностике. В то же время способ расчета риска, основанный на приблизительных и косвенных данных, не кажется корректным. Чтобы уточнить этот риск, надо произвести расчет, используя конкретные данные. Анализ 49 публикаций показал, что эта перестройка, действительно, очень редкая: она не обнаружена среди 63 робертсоновских транслокаций, выявленных при обследовании 64 189 новорожденных. Также она не обнаружена среди 126 робертсоновских транслокаций, выявленных при пренатальной диагностике, проведенной по показаниям иным, чем семейное носительство хромосомных аномалий. Однако три носителя $\text{rob}(15;21)$ были обнаружены среди 314 носителей робертсоновских транслокаций,

выявленных среди 76 282 пациентов с проблемами репродукции. Учитывая, что частота робертсоновских транслокаций среди пациентов с нарушениями репродукции в 4 раза больше, чем в популяции (4,1 промилле и 0,98 промилле соответственно, различие статистически значимо при $1,4 \cdot 10^{-28}$), а проблемы репродукции, по оценкам ВОЗ, имеют 15 % супружеских пар, популяционная частота этой перестройки может составлять 1 на 700 000. Таким образом, риск детского лимфобластного лейкоза у носителей этой перестройки представляется почти в 10 раз более высоким, чем предполагают авторы обсуждаемой статьи. Для медико-генетического консультирования носителей $\text{rob}(15;21)$ необходимо понимание, различается ли риск заболевания раком крови в зависимости от того, унаследована эта перестройка или возникла *de novo*. При контакте с авторами обсуждаемой публикации для выяснения родительского происхождения $\text{rob}(15;21)$ у обследованных ими пациентов, оказалось, что этот вопрос не в их компетенции, но они хотели бы исследовать дополнительные случаи носительства этих перестроек, в том числе семейные случаи.

Колюбаева С. Н., Поляков А. С., Бондарчук С. В., Киссель А. В., Мякошина Л. А., Викторова Н. А., Ушанов С. С., Титова А. А., Носков Я. А., Голубцов О. Ю.

Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург

СОПОСТАВЛЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ГРУППАХ БОЛЬНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ МУТАЦИИ *V617F* В ГЕНЕ *JAK2*

Введение. Миелопролиферативные неоплазии (МПН) характеризуются клональной пролиферацией миелоидного ростка костного мозга. В настоящее время достаточно широко изучены молекулярно-генетические основы патогенеза этой группы заболеваний, наиболее частым маркером которых является мутация *V617F* в гене *JAK2*. Природа же и характеристика цитогенетических нарушений в клетках предшественницах миелоидного ряда полностью не изучена.

Цель. Сравнительный анализ цитогенетических поломок у пациентов с миелопролиферативными неоплазиями в зависимости от наличия мутации *JAK2v617f*.

Материалы и методы. Цитогенетические повреждения анализировали в 24-часовой культуре костного мозга в метафазных хромосомах с использованием метода дифференциальной окраски хромосом, анализ хромосомных повреждений проводили с помощью микроскопа 90i компании Nikon (Япония) при увеличении 100×10 . Для идентификации нарушений кариотипа использовали международную номенклатуру. Аллельную нагрузку *Jak2* в 14 экзоне выявляли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, используя наборы АОО «Генотехнология», Россия. Амплификацию проводили на амплификаторе ДТ-лайт, АОО «ДНК-технология»,

Россия. Первая группа: 35 пациентов с МПН (средний возраст 41 год), у которых не была выявлена мутация *Jak2*. Вторая группа: 20 пациентов с МПН (средний возраст 59 лет) с выявленной мутацией *Jak2v617F* (аллельная нагрузка составила 44 %, при этом диапазон ее колебался от 19,1 % до 80 %).

Результаты. Для обеих групп оказалось характерным количество полиплоидных клеток, превышающее значение в нормальной популяции. Кроме того, количество пациентов, у которых выявлены клоны, статистически не отличалось в обеих группах ($p > 0,05$). Так, в группе с отсутствием соматической мутации *JAK2* процент пациентов, у которых выявлены клональные клетки, составил 17,1 %. В спектр выявленных изменений вошли два случая с трисомией по X-хромосоме, два случая с делецией (6)(q23), и по одному случаю с делецией q-плеча хромосомы 20 и делецией (13)(q34). У остальных пациентов встречались клетки с различными неклональными повреждениями, среди которых выявлены делеции, транслокации, моносомии и трисомии по различным хромосомам. В 10 % случаев из общего числа пациентов выявлен нормальный кариотип. У остальных — высокий процент поврежденных клеток, составляющий от 3 до 10 %. В группе пациентов, положительных по *Jak2*, цитогенетические клональные повреждения составили 17,6 %, в которые вошли: трисомии по X хромосоме, делеции (6)(q23). Процент клеток с повреждениями неклонального характера, как

и в группе с отсутствием мутации *Jak2*, колебался в пределах 10 процентов. Кроме того, в обеих исследованных группах встречались метафазные клетки, содержащие эндомитозы и различные неклональные транслокации, что является вероятным свидетельством радиационного воздействия, которое наблюдалось до начала формирования заболевания и, возможно, явилось пусковым механизмом его развития. Таким образом, по цитогенетическим показателям обе группы практически не отличались. Кроме того, клональные повреждения встречались крайне редко, при этом процент метафазных клеток колебался в пределах 3–10 %.

Выводы. Частота выявления цитогенетических повреждений при цитогенетическом обследовании пациентов с миелопролиферативными неоплазиями (МПН) невысока, клональные изменения были выявлены в 17 % всех случаев. Высокий уровень аллельной нагрузки мутации *V617f* в гене *JAK2*, составивший 44 %, демонстрирует потенциально высокую значимость количественного исследования не только для диагностики, но и для оценки прогрессирования и ответа на терапию. Значимых различий в выявлении признаков радиационного повреждения в обеих группах больных не обнаружено. По совокупности полученных данных можно подтвердить, что анализ цитогенетических повреждений при МПН по-прежнему не имеет высокого диагностического и прогностического значения.

Кувшинов А. Ю., Волошин С. В., Мартынкевич И. С., Шуваев В. А., Мартыненко Л. С., Гарифуллин А. Д., Клеина Е. В., Зенина М. Н., Чететкин А. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ: РЕЗУЛЬТАТЫ РИСК-СТРАТИФИКАЦИИ ПАЦИЕНТОВ И ВОЗМОЖНОСТЬ ОЦЕНКИ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ

Введение. Известно, что генетические аномалии (ГА), выявляемые при хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ), оказывают различное влияние на характер течения заболевания. Кроме того, они могут определять программу лечения (при del17p наиболее эффективно использование ибрутиниба). Также продемонстрировано, что отсутствие мини-

мальной остаточной болезни (МОБ) является благоприятным прогностическим фактором течения хронического лимфолейкоза.

Цель. Оценить значимость прогностической стратификации пациентов, основанной на выявленных ГА, и возможность использования цитогенетических методов исследования в оценке МОБ при ХЛЛ.

Материалы и методы. В исследование было включено 198 больных ХЛЛ. Соотношение мужчины/женщины — 1,3:1. Возраст больных составил от 31 до 80 лет (медиана 61 год). Диагностика ХЛЛ, показания к началу терапии и ее эффективность определялись в соответствии с международными критериями IWCLL (2008 г.) Цитогенетические исследования были выполнены на образцах костного мозга и периферической крови с помощью стандартного GTG-метода. FISH-анализ выполнялся с использованием ДНК-зондов: LSI 13(RB1)13q14, LSI ATM (11q22), CEP12, LSI TP53 (17p13.1) (Abbott). Иммунофенотип опухолевых клеток оценивался с помощью 5- и 8-цветной проточной цитометрии (ПЦ) костного мозга.

Результаты. Частота выявления ГА составила 47,5 % (94/198): с помощью GTG-метода — 13,1 % (26/198); с помощью FISH-исследования — 44,4 % (88/198). В зависимости от выявленных ГА проведена стратификация больных на прогностические группы: неблагоприятный прогноз — 28 (14,1 %) (del11q (n=12), del17p (n=6), сочетанная аномалия del11q и 13q (n=10)); нейтральный прогноз — 136 (68,7 %) (нормальный кариотип (n=104), трисомия 12 хромосомы (n=26), другие генетические аномалии неопределенного прогностического значения (n=6)); благоприятный прогноз (del13q) — 34 (17,2 %).

Анализ беспрогрессивной выживаемости (БПВ) показал достоверные различия между прогностическими группами ($p = 0,034$) и отдельными ГА ($p = 0,025$). Медиана БПВ в группе нейтрального прогноза составила 44,0 мес. (при нормальном кариотипе — 48 мес., при трисомии 12 хромосомы — 37,5 мес.), неблагоприятного прогноза — 43,6 мес. (с делецией 11q — 43,6 мес., с делецией 17p — не достигнута в связи с малым количеством

случаев), благоприятного прогноза (делеция 13q) — не достигнута. После индукционной программы терапии МОБ-негативный статус по данным цитогенетических методов исследования достигнут у 72,3 % (68/94): при достижении полной ремиссии (ПР) — в 100 % (18/18), а при частичной ремиссии (ЧР) — в 65,8 % (50/76) случаях ($p = 0,0035$). Статистически значимые различия БПВ в зависимости от достигнутого МОБ-статуса выявлены не были ($p > 0,05$). Оценка МОБ с помощью ПЦ проведена всем больным. МОБ-негативный статус достигнут у 41,4 % (82/198) больного. Частота достижения МОБ-негативного статуса, в группе больных с ранее выявленными ГА, составила 36,2 % (34/94): ПР — 66,7 % (12/18) (66,7 %), ЧР — 28,9 % (22/76) ($p = 0,0027$). Среди пациентов, достигших МОБ-негативного статуса по данным ПЦ, у 6/34 (17,6 %) определялись ранее выявленные ГА. В то время как среди пациентов с МОБ-негативным статусом по данным цитогенетических методов исследований, опухолевый клон выявлен у 40/68 (58,8 %) при ПЦ ($p = 0,0001$).

Выводы. Использование цитогенетических методов исследования является обязательным этапом обследования больного с хроническим лимфолейкозом до начала лечения, так как позволяет прогнозировать характер течения заболевания. Ограничения в их применении для оценки минимальной остаточной болезни связаны с частотой встречаемости генетических аномалий (до 80 %), недостаточной чувствительностью самих методов и затратами на проведение исследований. Тем не менее, выявление генетических аномалий у пациентов с МОБ-негативным статусом (по данным проточной цитометрии), позволяет сделать вывод о необходимости комплексной оценки минимальной остаточной болезни с использованием всех доступных методов исследований.

Лаеров А. В.^{1,2}, Куцев С. И.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Россия, 115478, Москва, Москворечье

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Москва

NGS В НАУЧНОЙ И ПРАКТИЧЕСКОЙ ОНКОГЕМАТОЛОГИИ

Технологии массового параллельного секвенирования (NGS) совершили переворот в науке и медицине и уже стали рутинными методами не только в научных, но и во многих клинических центрах. Онкогематология является одной из областей науки и медицины, где доступность новых методов анализа сотен генов и тысяч мутаций в них, была востребована в наибольшей степени и принесла очевидные плоды. В докладе рассмотрены примеры использования NGS в научных исследованиях, которые позволили лучше по-

нять патогенетические механизмы развития онкогематологических заболеваний и найти новые диагностические и прогностические факторы. Представлен обзор новых диагностических возможностей и подходов к таргетной персонализированной терапии онкологических заболеваний с использованием генных панелей для таргетного секвенирования. Также освещены ограничения использования NGS в поиске причин и маркеров онкогематологических заболеваний.

Лисина Е. Г., Сиordia Н. Т., Бутылин П. А., Ломаца Э. Г., Матюхина Н. М., Силютин А. А., Сендерова О. М., Фокина Е. С., Зарицкий А. Ю.

ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

ВЛИЯНИЕ ТИПА МУТАЦИИ *CALR* НА КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭССЕНЦИАЛЬНОГО ТРОМБОЦИТОЗА И ПЕРВИЧНОГО МИЕЛОФИБРОЗА

Введение. В 2013 году у большинства *JAK2V617F* негативных пациентов с эссенциальным тромбоцитозом (ЭТ) и первичным миелофиброзом (ПМФ) были выявлены мутации в 9 экзоне гена *CALR*. Описано более 30 различных мутаций, подразделяющихся на 2 подтипа: делеции (тип I) и инсерции (тип II). Опубликованы данные о фенотипических эффектах в зависимости от варианта мутации *CALR*. Однако прогностическая значимость мутаций *CALR* остается недостаточно ясной.

Цель. Оценить влияние мутации *CALR* I и II типа на клинико-лабораторные особенности ЭТ и ПМФ.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное исследование с включением пациентов, наблюдавшихся в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова», г. Санкт-Петербург, БУ «РКБ» МЗ СР ЧР, г. Чебоксары, ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница» МЗ Иркутской области, г. Иркутск, ФГБУ «НИИ-ГиПК», г. Киров. Образцы периферической

венозной крови получены от 149 пациентов с ЭТ (n = 76) и ПМФ (n = 73). Мутация в гене *CALR* определялась методом прямого секвенирования 9 экзона по Сэнгеру среди *JAK2* негативных пациентов. Гистологическое подтверждение диагнозов проводилось в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова». Мутации *CALR* выявлены у 34 пациентов с ЭТ (10 — мужчины; 24 — женщины) и 25 пациентов с ПМФ (13 — мужчины; 12 — женщины). Статистическая обработка данных проводилась в программе STATISTICA for Windows 6.0. Для сравнения средних использовали критерии Стьюдента, Колмогорова-Смирнова и Манна-Уитни.

Результаты. Частота встречаемости всех мутаций *CALR* была сопоставима у пациентов с ЭТ и ПМФ (44,7 % и 35,6 %). При этом мутации II типа в 2 раза чаще встречались при ЭТ чем при ПМФ: 17,1 % против 9,6 % (p = 0,178). Мутации I типа детектированы в 21 случае при ЭТ и 18 — при ПМФ, типа II в 13 — при

ЭТ, и в 7 — при ПМФ. Медиана периода наблюдения пациентов с ЭТ с I типом мутации составила 36 мес. (3–87), с типом II — 22 мес. (2–90), а у пациентов с ПМФ этот показатель в группе с I типом мутации составил 46 мес. (3–133), с типом II — 77 мес. (4–115). Анализ гематологических показателей у пациентов с ЭТ выявил более высокий уровень лейкоцитов (WBC) у пациентов с I типом мутации ($p = 0,043$), уровень гемоглобина (Hb) при данном варианте оказался ниже ($p = 0,009$). При ПМФ показатели уровня Hb были сопоставимыми в исследованных группах. Тип мутации не оказал значимого влияния на количество WBC среди пациентов с ПМФ. Однако уровень тромбоцитов (PLT) оказался более высоким у пациентов ПМФ с мутациями CALR тип II ($p = 0,014$). Размеры селезенки при ЭТ по данным УЗИ на момент диагностики составили при типе I — 106,5 мм, тип II — 119,6 мм ($p = 0,076$). Тип мутации в нашем исследовании не оказал влияние на распределение пациентов по степени риска по шкале IPSET, также не получены значимые отличия при оценке эффективности терапии. Размеры селезенки при ПМФ по данным УЗИ на мо-

мент диагностики при типе I оказались несколько большими (180,9 мм и 169,9 мм). Выявлены более выраженные фибротические изменения костного мозга (КМ) у пациентов с I типом мутации CALR ($p < 0,005$). Тип мутации CALR не оказал влияние на распределение пациентов с ПМФ в зависимости от групп риска по шкалам IPSS и DIPSS.

Выводы. Выявлено влияние типа мутации CALR на клинико-лабораторные особенности течения ЭТ и ПМФ. При этом тип мутации CALR в нашем исследовании не влиял на количество PLT при ЭТ, но имел значение для данного показателя при ПМФ. Мутации I типа при ЭТ сопровождалась более высоким уровнем WBC и более низким уровнем Hb. Тогда как в опубликованных исследованиях не было показано влияния типа мутации на уровень Hb и количество WBC при ЭТ. Одним из важных наблюдений стало обнаружение влияния мутаций типа I на фибротические изменения КМ при ПМФ. Наши данные соответствуют опубликованным ранее исследованиям, показавшим отсутствие влияния на стратификацию пациентов в соответствии со шкалой по IPSS.

**Ломаца Е. Г.¹, Зарицкий А. Ю.^{1,3}, Шуваев В. А.², Овсянникова Е. Г.¹, Лазорко Н. С.¹,
Матюхина Н. В.¹, Мачюлайтене Е. Р.³, Фоминых М. С.², Зотова И. И.²,
Мартынкевич И. С.², Абдулкадыров К. М.¹**

¹ ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России

² ФГБУ «Российский научный-исследовательский центр гематологии и трансфузиологии»

Федерального медико-биологического агентства

³ ФГБУ «Санкт-Петербургский первый медицинский университет им И. П. Павлова», Минздрава России

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ В ТРЕТЬЕЙ ЛИНИИ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ФАЗОЙ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

Введение. Ингибиторы тирозинкиназ (ИТК) высокоэффективны в терапии пациентов в хронической фазе (ХФ) хронического миелолейкоза (ХМЛ) в первой и во второй линии терапии. Частота достижения ответов при применении ИТК в третьей линии терапии ХМЛ значимо ниже. Целью данной работы является изучение факторов прогноза эффективности ИТК в третьей линии терапии у пациентов с ХФ ХМЛ.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование было включено 53 пациента (20 мужчин и 33 женщины) с ХФ ХМЛ, получавших терапию ИТК в третьей линии (ИТК3). Медиана возраста составила 46,8 лет

(23–88 лет). Все пациенты в качестве первой линии терапии получали иматиниб. В качестве ИТК3 использовались нилотиниб (18/53; 34 %), дазатиниб (30/53; 57 %) и бозутиниб (5/53; 9 %). Медиана времени от постановки диагноза до назначения ИТК3 составила 56 месяцев, от начала терапии иматинибом — 47 месяцев.

Результаты. Медиана продолжительности терапии ИТК3 составила 17 месяцев (2–68 месяцев). До начала приема ИТК3 у 7 пациентов имелись полные цитогенетические ответы (ПЦО). В этой группе большой молекулярный ответ (БМО) впоследствии был достигнут у 4/7 (57 %) пациентов. Количество

вновь достигнутых ПЦО на терапии ИТКЗ составило 11/46 (24 %) пациентов. При этом в группе больных с частичным цитогенетическим ответом на момент начала терапии ИТКЗ ПЦО был достигнут у 7/8 (87,5 %) больных, а БМО — у 4/8 (50 %) пациентов. В группе больных с отсутствием цитогенетического ответа перед началом приема ИТКЗ ПЦО был достигнут всего у 3/14 (23 %) пациентов. В подгруппе из 16 пациентов, имевших гематологическую резистентность к предшествующей терапии, никто не достиг ПЦО на фоне ИТКЗ. Мутационный статус гена *BCR-ABL* известен у 37/53 (70 %) пациентов. Мутации были выявлены у 8/26 (31 %) пациентов перед началом ИТК2 и у 12/30 (40 %) больных перед началом ИТК3. В общей группе пациентов в любой момент времени перед началом приема ИТК3 мутации были выявлены у 17/37 (46 %) больных. Результаты терапии у пациентов с наличием мутаций гена *BCR-ABL* были крайне низкими — только 1/17 (6 %) пациент достиг ПЦО и БМО. При медиане наблюдения 21 месяцев (3–98 месяцев) от начала ИТК3 прогрессия в фазу акселерации (ФА) и бластный криз (БК) зарегистри-

рована у 8/17 (47 %) больных с мутациями и у 7/36 (19 %) пациентов без мутаций или с неизвестным мутационным статусом гена *BCR-ABL*. Прогрессия в ФА/БК также достоверно чаще отмечена у пациентов без полного гематологического ответа (ПГО) (9/16; 56 %) по сравнению с пациентами с наличием ПГО (6/37; 16 %). При этом в группе пациентов с наличием любого вида цитогенетического ответа перед началом терапии ИТК3 ни одного случая прогрессирования зарегистрировано не было.

Выводы. При анализе нашей группы больных ХМЛ в ХФ, получавших ингибиторы тирозинкиназы в качестве третьей линии терапии, частота достижения ответов и вероятность свободы от прогрессирования были наиболее низкими у пациентов с отсутствием полного гематологического ответа или наличием мутаций гена *BCR-ABL* перед началом терапии третьей линии. Наиболее высокой частота достигнутых ответов была у больных, имевших полный или частичный цитогенетические ответы перед началом третьей линии лечения ингибиторами тирозинкиназы.

Малков Н. Н., Партьолова Е. А., Константинова Т. С.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург

АНАЛИЗ КОЭКСПРЕССИИ *BCR-ABL* И *JAK2 V617F* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ: ВОЗМОЖНОЕ ВЛИЯНИЕ НА ТЕЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИСХОДЫ

Введение. Хронический миелоидный лейкоз — это клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся реципрокной перестройкой и слиянием генов *BCR*, находящегося на 22 хромосоме, и *ABL*, находящегося на 9 хромосоме. Данная мутация ведет к продукции онкопротеина *bcr-abl* — тирозинкиназы с повышенной активностью, которая является основным движущим фактором для прогрессирования заболевания. Янус-киназы (JanusKinases, JAK) — группа белков, участвующих в передаче сигнала в нормальных клетках. Известно, что соматическая мутация гена *JAK2 V617F* нередко выявляется при некоторых Ph-негативных миелоидных заболеваниях, таких как эссенциальная тромбоцитемия и истинная

полицитемия. Однако в научной литературе все чаще начали появляться публикации с описанием клинических случаев с указанием на наличие парадоксальной коэкспрессии *BCR-ABL* и *JAK2 V617F* у пациентов с хроническим миелолейкозом. Это стало поводом для проведения анализа в группе пациентов с хроническим миелолейкозом, находившихся на лечении в Областном гематологическом центре Свердловской области, с целью выявления у них мутации *JAK2 V617F*.

Цель. Выявить прогностическую значимость мутации *JAK2 V617F* для оценки течения и клинического исхода у пациентов с хроническим миелолейкозом.

Материалы и методы. Данное ретроспективное исследование было проведено на базе

ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1». Критерии включения — пациенты с впервые выявленным хроническим миелолейкозом, ранее не получавшие терапию ингибиторами тирозинкиназ. Всем пациентам были проведены оба молекулярно-генетических анализа: определение мутаций *BCR-ABL* и *JAK2 V617F*. Данные для анализа были получены на основе анализа медицинской документации: амбулаторных карт и историй болезни. Анализировались следующие параметры: возраст, пол, размеры селезенки (см. из-под реберной дуги), данные лабораторных исследований: уровень тромбоцитов в периферической крови, уровень бластов в костном мозге, ответ на стандартную терапию и общая выживаемость. Статистический анализ полученных данных проводился с помощью программы STATISTICA (Statsoft).

Результаты. Всего в исследование были включены 24 пациента с хроническим миелолейкозом, которые были поделены на две группы, в зависимости от того, было ли выявлено сосуществование мутаций *BCR-ABL* и *JAK2 V617F*. В группу А, где данное условие было выполнено, вошло 6 человек. В группу В, где наряду с мутацией *BCR-ABL* не было выявлено *JAK2 V617F*, вошло 14 человек.

В группе А средний возраст пациентов составил 58 лет (46; 62). Соотношение мужчин и женщин — 5:1. По критериям Sokal пациенты разделились следующим образом: низкий риск — 1 пациент (16,7%), средний риск — 1 пациент (16,7%), высокий риск — 4 пациента (66,7%). У 4 пациентов этой группы диагноз был установлен в хронической фазе, у 2 —

в фазе акселерации. В данной группе было 2 летальных случая в течение периода наблюдения (оба пациента вышли в бластный криз). В группе В средний возраст на момент исследования (постановки диагноза) составил 58,6 лет (53; 66). Соотношение мужчин и женщин — 5:9. По критериям Sokal пациенты разделились следующим образом: низкий риск — 2 пациента (14%), средний риск — 8 пациентов (57%), высокий риск — 4 пациента (28%). Во всех 14 случаях диагноз был установлен в хронической фазе. В данной группе летальных случаев в течение всего периода наблюдения не было.

В обеих группах проводилась стандартная терапия в соответствии с российскими рекомендациями по терапии хронического миелолейкоза. Несмотря на то, что в процентном соотношении в группе А пациентов высокой группы риска в 2,4 раза больше, в целом достоверных отличий по критериям Sokal между группами не было ($p = 0,393702$). Также группы А и В достоверно не отличались друг от друга ни по одному из демографических или клинических параметров, кроме наличия мутантного гена *JAK2 V617F* ($p = 0,002265$) и общей выживаемости ($p = 0,021850$).

Выводы. Несмотря на малую численность сравниваемых групп, выявлены статистически достоверные различия, позволяющие предполагать, что мутация *JAK2 V617F* может рассматриваться как возможный прогностический фактор для течения и клинического исхода течения хронического миелолейкоза при стандартной терапии, что, на наш взгляд, требует пристального внимания и дальнейшего изучения.

**Мирошниченко А. М.^{1,2}, Комков А. Ю.^{1,2}, Минервина А. А.²,
Мамедов И. З.², Ольшанская Ю. В.¹, Масчан М. А.¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук

ВЫЯВЛЕНИЕ ПЕРЕСТРОЕК ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ ДЛЯ МОНИТОРИНГА МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ

Введение. Диагностика минимальной остаточной болезни (МОБ) является важнейшим прогностическим фактором, позволяющим определить эффективность терапии

и выбрать стратегию дальнейшего лечения заболевания. Мониторинг МОБ посредством выявления характерных клональных перестроек иммуноглобулиновых генов предпо-

лагают первоначальное выявление опухолеспецифических молекулярных маркеров, а именно варибельных участков локусов T- и B-клеточных рецепторов, в клетках костного мозга пациента до лечения и мониторинг количества клеток с такими маркерами в костном мозге после терапии.

Цель исследования. Разработка метода мониторинга МОБ на основе секвенирования нового поколения (NGS) для количественной оценки концентрации опухолевых клеток в костном мозге после терапии.

Материалы и методы. Метод основан на массивном параллельном секвенировании V(D)J перестроек локусов T- и B-клеточных рецепторов, предварительно амплифицированных в ходе мультиплексной ПЦР. Для мониторинга МОБ в образце, полученном после лечения, производится поиск характерных для данного пациента перестроек, найденных в первичном образце, и определяется концентрация опухолевых клонов. Основную группу анализируемых образцов составили образцы костного мозга больных острым лимфобластным лейкозом в возрасте от 1 года до 10 лет.

Результаты. С помощью описанного метода был проведен анализ МОБ в образцах ДНК из костного мозга 20 пациентов. На первом этапе исследования у каждого пациента были выявлены специфические V(D)J перестройки. Анализ МОБ, а именно поиск ранее идентифицированных опухолеспецифических перестроек, производился для каждого пациента на 36-й день после начала терапии. Чувствительность определения концентрации лейкомиического клона в среднем равнялась 1 опухолевой клетке на 100 000 нормальных клеток.

Выводы. Предложенный подход удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к современным методам анализа МОБ, и отличается высокой точностью, которую обеспечивает уникальность нуклеотидной последовательности маркеров, и чувствительностью, ограниченной исключительно количеством клеток, поступивших в анализ. Таким образом, анализ нуклеотидных последовательностей опухоль-специфических T- и B-клеточных рецепторов с помощью NGS является одним из самых перспективных подходов к выявлению МОБ.

Мотыко Е. В., Мартынкевич И. С., Полушкина Л. Б., Мартыненко Л. С., Иванова М. П., Цыбакова Н. Ю., Клеина Е. В., Раджабова А. М., Шуваев В. А., Волошин С. В., Четчин А. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АБЕРРАЦИЙ ПРИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ТЕЧЕНИЯ ОСТРЫХ МИЕЛОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Введение. Современные методы молекулярной диагностики позволяют выявить большое количество мутаций в различных генах, играющих важную роль в патогенезе острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Совместно с цитогенетическими aberrациями, мутации генов являются мощными прогностическими маркерами у больных ОМЛ и могут быть использованы при выборе тактики лечения пациентов. Данные мутации также целесообразно использовать в качестве мишеней для таргетных препаратов.

Цель. Целью данного исследования являлось изучение мутационного профиля больных ОМЛ, частоты встречаемости мутаций, их распределения в зависимости от варианта кариотипа и клинико-гематологических осо-

бенностей, влияния на прогноз течения заболевания.

Материалы и методы. В исследование включено 100 пациентов: 96 с de novo ОМЛ и 4 со вторичными ОМЛ из предшествующих МДС или лимфомы. Возраст больных составил от 18 до 84 лет (медиана 55 лет), среди них 47 мужчин и 53 женщины. Скрининг мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* и *IDH2* проводили методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с дальнейшим анализом кривых плавления. Мутации в генах *FLT3*, *SKIT* и *NPM1* анализировали с помощью ПЦР, в гене *NRAS* с помощью секвенирования. Цитогенетические препараты окрашивали стандартным GTG дифференциальным методом.

Результаты. Мутации в генах *FLT3*, *CKIT*, *NRAS*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *NPM1* были обнаружены у 57/100 (57,0 %) больных ОМЛ. Всего было выявлено 94 мутации: 24 (24,0 %) — *FLT3-ITD*, 8 (8,0 %) — *FLT3-TKD*, 2 (2,0 %) — в *CKIT* (D816V), 11 (11,0 %) — в *NRAS*, 13 (13,0 %) — в *DNMT3A*, 5 (5,0 %) — в *IDH1* (также у 8/100 пациентов был обнаружен полиморфизм rs11554137 в гене *IDH1*), 4 (4,0 %) — в *IDH2* и 27 (27,0 %) — в *NPM1*. У 28 больных обнаружены одиночные мутации и у 29 пациентов мутации носили сочетанный характер, при этом наиболее часто встречалась комбинация *FLT3-ITD*+/*NPM1*+ (у 9 больных). Наиболее часто ($p = 0,001$) мутации детектировались у пациентов с нормальным кариотипом (НК) (40/53), тогда как в группе с неблагоприятным кариотипом только 2/11 больных имели мутации. При анализе возрастных особенностей показано, что существенно чаще мутации обнаруживались у пациентов в возрасте 60–69 лет. Мы обнаружили, что мутации *FLT3-ITD* типичны для больных с М2 вариантом (ФАБ) ($p = 0,044$), *FLT3-TKD* — с М1 ($p = 0,001$), *DNMT3A* и *NPM1* — для М5 ($p = 0,004$ и $p = 0,105$, соответственно), полиморфизм rs11554137 в *IDH1* — для М4 ($p = 0,001$) и *CKIT*, *NRAS* — для СВФ-ОМЛ. Мутации *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* и в гене *DNMT3A* ассоциировались с повышенным уровнем лейкоцитов в периферической крови в дебюте заболевания ($p = 0,001$, $p = 0,012$, $p = 0,001$, соответственно). Мы также оценили прогностический потенциал найденных мутаций. Сравнительный анализ общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) у больных с и без мутаций показал существенное неблагоприятное влияние мутаций *FLT3-*

ITD ($p = 0,001$, $p = 0,021$), *FLT3-TKD* при сравнении с пациентами с генотипом *FLT3-ITD*⁻ ($p = 0,040$, $p = 0,044$), в гене *DNMT3A* ($p = 0,034$, $p = 0,039$), полиморфизма rs11554137 в гене *IDH1* ($p = 0,045$, $p = 0,004$). Мутации в гене *CKIT* были связаны с высоким риском рецидива. В группе больных с благоприятным прогнозом мы детектировали тенденцию к понижению ОВ и БРВ ($p = 0,203$, $p = 0,143$) у пациентов с мутациями в гене *NRAS*. Больные с мутациями в гене *NPM1* показали лучшую ОВ и БРВ ($p = 0,001$, $p = 0,017$, соответственно) по сравнению с пациентами без мутации, тогда как больные с генотипом *NPM1*+/*FLT3-ITD*+ были отнесены к группе промежуточного прогноза.

Выводы. Мутации в генах *FLT3*, *NRAS*, *DNMT3A*, *IDH1/2* и *NPM1* довольно частые события у больных ОМЛ. Большинство обнаруженных мутаций имеют значительно более высокую частоту встречаемости в группе больных с НК. В то же время почти все найденные мутации имеют сильное влияние на прогноз: неблагоприятное (в генах *FLT3*, *DNMT3A* и полиморфизм rs11554137 в *IDH1*) и благоприятное (в гене *NPM1*). Мутации в отдельных генах (*CKIT*, *NRAS*) оказывают негативное влияние на БРВ и ОВ у больных с благоприятным кариотипом. Наличие двух или более мутаций у одного больного может оказывать влияние на прогноз (*NPM1*+/*FLT3-ITD*+ по сравнению с *NPM1*+/*FLT3-ITD*⁻). Разработка нового подхода к классификации ОМЛ, с учетом цитогенетических aberrаций и сочетанной встречаемости различных мутаций, позволит выбрать оптимальную современную терапию.

Овсеян В. А., Шубенкина А. А., Зотина Е. Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *NFKB1* В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Введение. Конституциональная активация ядерного белка каппа В (NF-κB) наблюдается практически у всех больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Важная роль данного фактора обусловлена его участием в регуляции экспрессии множества генов, вовлеченных в пролиферацию, дифференциров-

ку, апоптоз клеток, а также воспалительный и иммунный ответ. Обеспечивая механистическую связь между воспалением и онкогенезом, NF-κB контролирует способность пре-неопластических и злокачественных клеток противостоять противоопухолевым механизмам, основанным на апоптозе. При этом акти-

вазия данного фактора не только защищает опухолевые клетки от апоптоза, но и стимулирует их пролиферацию. NF-κB представляет собой гомо- или гетеродимерные комплексы белков семейства Rel: p50/p105 ((NF-κB1), p52/p100 ((NF-κB2), p65 (RelA), c-Rel и RelB. Гетеродимер p50/p65 является самой распространенной формой NF-κB, обнаруживаемой практически во всех типах клеток. В настоящее время имеются данные о том, что вызывающий изменение экспрессии полиморфизм *-94ins>del* (четырёхнуклеотидная инсерция/делеция) в промоторной области гена *NFKB1* способен влиять на развитие ряда солидных опухолей, острых лейкозов и неходжкинских лимфом. В то же время сведения, касающиеся возможного влияния полиморфизма данного гена на патогенез ХЛЛ, малочисленны и противоречивы. Кроме того, для понимания патогенеза заболевания представляет несомненный интерес также изучение возможной взаимосвязи между полиморфизмом гена *NFKB1* и приобретенными мутациями гена *NOTCH1*, который кодирует трансмембранный белок I класса, действующий как лиганд-активируемый фактор транскрипции, регуляции дифференцировки, пролиферации и апоптоза клеток. При этом важно отметить, что наиболее часто встречающаяся мутация в гене *NOTCH1*, представляющая собой делецию 2 нуклеотидов (*c.7541_7542delCT*) в PEST-домене, предопределяет неблагоприятное клиническое течение ХЛЛ и плохой прогноз.

Цель работы. Целью настоящей работы являлось изучение возможной ассоциации полиморфного локуса *-94ins>del* гена *NFKB1* с развитием ХЛЛ, манифестацией заболевания на разных стадиях и двухнуклеотидной делецией *c.7541_7542delCT* гена *NOTCH1* в момент постановки диагноза.

Материалы и методы. Исследование полиморфизма *-94ins>del* гена *NFKB1* было проведено у 230 больных ХЛЛ и 314 здоровых неродственных представителей — жителей Вятского региона России с помощью ПЦР с последующей детекцией ампликонов методом электрофореза. Стадирование болезни у пациентов было выполнено согласно стратификационной системе J. Vinet. Для анализа гена *NOTCH1* на наличие делеции *c.7544_7545delCT*, составляющей 80 % всех

мутаций в гене *NOTCH1* (34 экзон, домен PEST), была использована аллель-специфичная ПЦР.

Результаты. В результате проведенных исследований установлено, что полиморфизм *-94ins>del* гена *NFKB1*, скорее всего, не влияет на формирование предрасположенности к ХЛЛ. В то же время выявлено, что гомозиготное носительство аллеля *-94del* гена *NFKB1* понижает риск манифестации заболевания на поздних стадиях в момент постановки диагноза (OR = 0.66, 95 % CI = 0.46–0.97; $p = 0.03$). Снижение продукции фактора NF-κB1, вызванное делецией в промоторной области кодирующего гена, по-видимому, уменьшает уровень регулируемых данным фактором антиапоптотических регуляторов и провоспалительных эффекторов, обеспечивающих выживание и дифференцировку В-клеток в герминальном центре. Вследствие этого у гомозигот по аллелю *-94del* по сравнению с носителями *-94ins/ins* уменьшается частота появления более агрессивных лейкозных клонов, благодаря которым к моменту диагностики заболевания накапливается опухолевая масса, соответствующая поздним стадиям. Кроме того, выявлено, что генотипы, содержащие аллель *-94del*, встречались у больных с делецией *c.7544_7545delCT* в гене *NOTCH1* реже по сравнению с пациентами с интактным геном в лейкозных клетках (соответственно 52,6 % и 67,6 %, $\chi^2 = 4,17$, $p = 0,04$) на момент постановки диагноза. Из анализа отношений шансов следует, что *-94del*-генотипы понижают риск появления опухолевых клеток с двухнуклеотидной делецией в гене *NOTCH1* (OR = 0,53, 95 % CI = 0,29–0,98) к моменту постановки диагноза.

Выводы. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что 4-нуклеотидная делеция в районе полиморфного локуса *-94* в промоторной области гена *NFKB1* играет протективную роль в манифестации ХЛЛ на поздних стадиях в момент постановки диагноза. Кроме того, носительство, по крайней мере, одного аллеля *-94del* данного гена препятствует появлению лейкозных клеток с двухнуклеотидной делецией *c.7544_7545delCT* в гене *NOTCH1* к моменту постановки диагноза.

Овсепян В. А., Трегубова Е. В., Шубенкина А. А., Лучинин А. С., Докшина И. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства», г. Киров

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ 2 ФАЗЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ В РАЗВИТИИ Ph-НЕГАТИВНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗИЙ (МПН)

Введение. Истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, относящиеся к классическим Ph-негативным МПН, представляют собой клональные заболевания, возникающие на уровне стволовой кроветворной клетки. Характерной особенностью этой группы заболеваний является пролиферация одной или более клеточной линии миелопоэза в костном мозге с признаками сохранной терминальной дифференцировки и изменения показателей периферической крови. Несмотря на достигнутые успехи в понимании отдельных звеньев патогенеза указанной группы заболеваний, связанные, прежде всего, с открытием соматической мутации *V617F* гена *JAK2*, их этиология до сих пор неизвестна. В последние годы накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что определенный вклад в возникновение злокачественных новообразований могут вносить конституциональные особенности генома, в частности, полиморфизм ряда генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Среди таких генов следует выделить, прежде всего, такие ключевые гены ферментов 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков (ФБК), как глутатион-S-трансферазы $\mu 1$ (*GSTM1*), $\theta 1$ (*GSTT1*) и $\pi 1$ (*GSTP1*), катализирующие конъюгацию глутатиона с электрофильными группами широкого спектра ксенобиотиков и обеспечивающих благодаря этому защиту генома, а также NAD(P)H-хиноноксидоредуктаза (*NQO1*). Данный фермент предотвращает образование свободных радикалов семихинона и активных кислородных молекул, защищая, таким образом, клетку от окислительного стресса. Генам, кодирующим вышеотмеченные ферменты, свойственны функционально значимые полиморфизмы. Гомозиготная замена *C>T* в позиции *609* (*P187S*, rs1800566) в 6 экзоне гена *NQO1* вызывает практически полную утрату активности кодируемого им фермента вследствие усиленной деградации послед-

него. Для генов *GSTM1* и *GSTT1* характерны делеционные («нулевые») полиморфизмы, связанные с отсутствием их белкового продукта. У единственного же члена семейства *GSTP* — гена *GSTP1* функционально наиболее значимый полиморфизм связан с однонуклеотидной заменой *1578A>G* (*105Ile>Val*). В настоящее время имеются единичные и противоречивые сведения о возможном влиянии полиморфизма вышеуказанных генов на патогенез МПН.

Цель работы. Целью настоящей работы явилось изучение возможной ассоциации полиморфных вариантов вышеуказанных генов с развитием Ph-негативных МПН.

Материалы и методы. Материалом для исследования полиморфизма послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови 402 больных и 315 практически здоровых неродственных представителей — жителей Вятского региона России. Идентификацию «нулевых» полиморфизмов генов *GSTM1* и *GSTT1* проводили методом мультиплексной ПЦР. Полиморфный локус *Ile105Val* гена *GSTP1* исследовали методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Генотипирование вариантов полиморфного локуса *609C>T* гена *NQO1* выполняли с помощью одноэтапной 3-праймерной ARMS-ПЦР (ARMS — amplification refractory mutation system). Детекцию продуктов амплификации и рестрикции проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Результаты. В результате проведенных исследований установлена ассоциация «нулевого» генотипа *0/0* гена *GSTT1* с риском развития Ph-негативных МПН (OR = 1,54, 95 % CI = 1,04–2,27; *p* = 0,03). Кроме того, выявлено, что риск заболевания повышают также *609T*-генотипы гена *NQO1* (OR = 1,43, 95 % CI = 1,06–1,94; *p* = 0,02). В то же время не обнаружено влияния полиморфизмов генов *GSTM1* и *GSTP1* на риск МПН. Возможная па-

тогенетическая роль полиморфизмов генов *GSTT1* и *NQO1*, связанных с подавлением активности соответствующих ферментов, скорее всего, обусловлена ухудшением детоксикации экзогенных и эндогенных мутагенов.

Выводы. Впервые в российской популяции выявлены генетические маркеры развития Rh-негативных МПН, которые являют-

ся полиморфными вариантами генов *GSTT1* и *NQO1*. Таким образом, показано, что наличие определенных генотипов по полиморфным локусам генов ФБК может оказывать влияние на предрасположенность к МПН. Полученные результаты обосновывают необходимость дальнейшего изучения роли генов ФБК в этиопатогенезе МПН.

Оспанова М. Е., Улжибаева К. З., Кенжсин А. Е.

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения (РГП на ПХВ) «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Казахстан

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДВУХ АФЕРЕЗНЫХ СИСТЕМ ПО СБОРУ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У АУТОЛОГИЧНЫХ И АЛЛОГЕННЫХ ДОНОРОВ

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является одним из эффективных методов лечения ряда гематологических и онкологических заболеваний и некоторых иммунодефицитных состояний. В качестве источника ГСК для трансплантации могут быть использованы: костный мозг, периферическая кровь и плацентарная кровь. Сбор ГСК периферической крови может осуществляться клеточными сепараторами с перемежающимся током крови (Haemonetics MCS+, Fresenius AS-204) и постоянным током крови (COBE Spectra CaridianBCT, Spectra Optia TerumoBCT, Baxter CS-3000, CS-3000 Plus). На базе Научно-производственного центра трансфузиологии (НПЦТ) проводятся процедуры аппаратного сбора моноклеарных клеток (ГСК, лимфоцитов) у аллогенных и аутологичных доноров (с мобилизацией или без мобилизации) с последующей трансплантацией. В наличии имеются клеточные сепараторы с перемежающимся током крови с одноигольным венозным доступом (HaemoneticsMCS+ (MCS), с 2010 года) и постоянным током крови с двухигольным венозным доступом (SpectraOptia (SO), с декабря 2015 года).

Цель. В данном исследовании проведен сравнительный анализ работы обеих систем по сбору моноклеарных клеток периферической крови за 2015–2016 гг.

Материалы и методы. В 2015–2016 г. г. в НПЦТ на аппарате MCS произвели 62 процедуры по сбору ГСК периферической крови у аллогенных доноров (n = 40) и аутологич-

ных доноров (n = 22), 6 процедур по сбору лимфоцитов у аллогенных доноров (без предварительной мобилизации), 68 процедур по терапевтическому лимфоцитозерезу у аутологичных доноров. На аппарате SO произвели 66 процедур по сбору ГСК периферической крови у аллогенных (n = 40) и аутологичных (n = 26), 3 процедуры по сбору лимфоцитов у аллогенных доноров (без предварительной мобилизации), 8 процедур по терапевтическому лимфоцитозерезу у аутологичных доноров.

Результаты. Согласно анализу работ обеих систем, в образцах ГСК периферической крови, полученных на SO, по сравнению с образцами, полученными на MCS+, среднее содержание ядросодержащих клеток (ЯСК) выше в 1,7 раза, среднее содержание ГСК CD34+ выше в 1,86 раза, среднее содержание тромбоцитов выше в 1,2 раза. Согласно полученным данным, в образцах ГСК периферической крови, полученных на SO, отмечается более низкий уровень гематокрита (в 4,3 раза) и в 3,3 раза меньше примеси эритроцитов. В образцах донорских лимфоцитов, полученных на SO, по сравнению с образцами, полученными на MCS+, среднее содержание ЯСК выше в 1,7 раза, среднее содержание CD3+ выше в 1,89 раза. Также в образцах, полученных на SO, отмечается более низкий уровень гематокрита (в 15,9 раза), в 22,8 раза меньше примеси эритроцитов. В образцах аутологичных лимфоцитов, полученных на SO, по сравнению с образцами, полученными на MCS+, среднее содержание ЯСК выше в 2,9 раза, от-

мечается более низкий уровень гематокрита (в 7,9 раза), в 7,7 раза меньше примеси эритроцитов. Терапевтический сбор лимфоцитов проводился у пациентов, в анамнезе которых было проведение аллогенной трансплантации ГСК, множественных манипуляций, связанных с внутривенным введением лекарственных препаратов, в том числе химиотерапевтических, что обусловило отсутствие надежного венозного доступа. Поэтому у данной категории пациентов преимущественно применялся MCS+ — сепаратор с перемежающимся током крови и с одноигольным венозным доступом.

Выводы. Анализ данных показал большую эффективность сбора на SpectraOptia

мононуклеарных клеток, CD34+, CD3+, меньшую примесь эритроцитов в полученных продуктах, по сравнению с Haemonetics MCS+. В то же время отмечается большая примесь тромбоцитов в продуктах, собранных на SO. Следует отметить, что применение MCS+ при высоком содержании CD34+ в периферической крови после эффективной мобилизации обеспечивает достаточное для трансплантации содержание мононуклеарных клеток и CD34+ в собранном продукте. Также MCS+, имеющий одноигольный доступ, является альтернативной аферезной системой у пациентов с проблемным венозным доступом.

**Павлова А. А., Павлова И. Е., Бубнова Л. Н., Бессмельцев С. С., Клеина Е. В.,
Гарифуллин А. Д., Мартынкевич И. С., Волошин С. В., Четчин А. В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL-1, IL-4, IL-6 И TGF- β 1 И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. Стратификация больных множественной миеломой (ММ) на группы риска с использованием цитогенетических и молекулярных маркеров позволяет получать более надежные результаты. В то же время известно, что в патогенезе ММ задействован широкий спектр полиморфных генов цитокинов, которые играют значительную роль в процессе развития опухолевого клона при этом заболевании. Поэтому целью настоящего исследования являлся анализ взаимосвязи полиморфных вариантов генотипов цитокинов и цитогенетических нарушений у больных ММ Северо-Западного региона России.

Методы. Нами были обследованы 24 пациента с ММ; диагноз симптоматической ММ был верифицирован на основании критериев Международной рабочей группы по изучению миеломы. Контрольную группу составили 100 здоровых волонтеров, средний возраст $51,2 \pm 6,9$ лет. Все обследованные лица являлись жителями Северо-Западного региона России. Геномную ДНК выделяли из периферической крови. Определение SNP генов IL-1, IL-4 и IL-6 TGF- β 1 проводили с помощью PCR-SSP. Стандартное цитогенетическое исследование клеток костного мозга выполня-

ли на GTG-окрашенных хромосомах и интерфазный FISH анализ проводили с применением ДНК проб: LSI 13(RB1)13q14, IGH/CCND1, IGH/FGFR3, LSI TP53 (17q13.1).

Результаты. Ранее нами было показано, что некоторые полиморфные варианты генов цитокинов, ассоциированные с развитием ММ (IL-1 α -889 TT, IL-1 β +3962 TT, IL-6-174 GG and IL-6 nt565 GG), можно рассматривать как дополнительные негативные прогностические факторы, тогда как генотипы IL-4-33 CC and TGF- β 1 codon 25 GG — являются иммуногенетическими факторами резистентности развития ММ. Для анализа взаимосвязи «негативных» и «позитивных» генотипов цитокинов с цитогенетическим статусом определяли частоту выявления нарушений кариотипа в следующих группах больных: 1-я группа — с наличием только «негативных» генотипов цитокинов, 2-я группа — с наличием только «позитивных» генотипов цитокинов, 3-я группа — с наличием как «негативных», так и «позитивных» генотипов. Ввиду небольшого числа обследованных пациентов выделено 2 группы в зависимости от цитогенетического статуса: пациенты с нормальным и с патологическим кариотипом. Установле-

но, что у больных с наличием «положительных» генотипов цитокинов IL-4-33 CC и TGF-β1 codon 25 GG реже всего определялись цитогенетические аномалии (0.111 против 0.778 в 1-й группе и 0.667 во 2-й группе) и чаще, чем в других группах определялся нормальный кариотип (0.889 против 0.222-1-я гр. и 0.333-2-я гр.). У больных с наличием «негативных» генотипов цитокинов (IL-1α -889 TT, IL-1β +3962 TT, IL-6-174 GG and IL-6 nt565 GG) отмечалась наибольшая частота (0,778) выявления нарушений кариотипа. Необходимо отметить, что среди пациентов с наличием как «негативных», так и «положительных» геноти-

пов цитокинов цитогенетические аномалии определяются в 2 раза чаще, чем нормальный кариотип (0.667 против 0.333).

Вывод. Таким образом, наши результаты позволяют рассматривать «положительные» генотипы цитокинов IL-4-33 CC and TGF-β1 как маркеры, ассоциированные с нормальным кариотипом, тогда как «негативные» генотипы IL-1α -889 TT, IL-1β +3962 TT, IL-6-174 GG and IL-6 nt565 GG или сочетание «негативных» и «положительных» генотипов ассоциированы с цитогенетическими нарушениями у больных ММ.

**Панкрашкина М. М.^{1,2}, Ефремова Е. В.³, Виноградова О. Ю.^{1,2,4}, Фоминых М. С.³,
Шуваев В. А.³, Полушкина Л. Б.³, Мартынкевич И. С.³, Волошин С. В.⁴,
Птушкин В. В.^{1,2,4}, Четкин А. В.³**

¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница им. С. П. Боткина Департамента здравоохранения», г. Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачёва Минздрава», г. Москва

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА РФ, Санкт-Петербург

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РУКСОЛИТИНИБА В РАМКАХ ОБЫЧНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

Введение. Руксолитиниб (ингибитор янускиназы) стал первым таргетным препаратом, продемонстрировавшим высокую клиническую эффективность у больных первичным миелофиброзом (ПМФ): снижение интенсивности симптомов опухолевой интоксикации, уменьшение размеров селезенки, увеличение общей выживаемости, что на сегодняшний день может служить целью лечения этого заболевания. Помимо этого, руксолитиниб оказывает влияние как на мутацию *JAK2V617F*, так и на «дикий» тип *JAK*-киназы, в связи с чем может быть эффективным и при лечении больных миелофиброзом с негативным *JAK2V617F* — статусом. Вместе с тем, данные, полученные в ходе клинических исследований лекарственных препаратов, могут отличаться от результатов, наблюдаемых в рамках обычной клинической практики в связи с тщательным отбором больных, включаемых в исследование, с целью минимизации частоты нежелательных явлений.

Цель исследования. Оценить результаты терапии руксолитинибом в рутинной клинической практике, его влияние на гемотрансфузионную зависимость, динамику аллельной нагрузки мутантного гена *JAK2V617F* у больных миелофиброзом.

Материалы и методы. В исследование были включены 45 пациентов (19 мужчин и 26 женщин). Критериями включения были: гистологически подтвержденный диагноз первичного или вторичного миелофиброза, хроническая фаза заболевания. У 34 пациентов диагностирован первичный миелофиброз, у 9 — постполицитемический и у 2 — миелофиброз после эссенциальной тромбоцитемии. По шкале DIPPS+ пациенты распределялись следующим образом: низкий риск — 1 пациент, промежуточный-1 определялся у 33 больных, промежуточный-2 у 12 пациентов. Медиана возраста на момент начала терапии составляла 60 лет (35–79 лет). Цитогенетическое исследование было выполнено у 17 пациентов, у 14 из которых был нормальный

кариотип, у 1 пациента обнаружена делеция длинного плеча 10 хромосомы [del(10)(q22)], у 2-х определялся комплексный кариотип. В 29 (64 %) случаях была выявлена мутация в гене *JAK2V617F*, в 5 (11 %) в гене *CALR*, в 7 (15,5 %) в гене *MPL* и 4 (8,8 %) пациента имели тройной негативный статус в отношении драйверных мутаций. Руксолитиниб назначался как в качестве первой, так и второй линии в результате неэффективности предшествующей циторедуктивной терапии. Стартовая доза руксолитиниба зависела от уровня тромбоцитов (5 мг 2 раза в день [от 50 до 100×10⁹/л], 15 мг 2 раза в день [от 100 до 200×10⁹/л], или 20 мг 2 раза в день [более 200×10⁹/л]) и корректировалась в процессе лечения в зависимости от возникновения нежелательных реакций и ответа.

Оценка эффективности терапии включала в себя динамический контроль размеров селезенки (в сантиметрах из-под реберной дуги) и определение наличия симптомов опухолевой интоксикации, к которым относятся: повышенная ночная потливость со сменой нательного и/или постельного белья, кожный зуд, тяжесть и боль в левом подреберье, раннее насыщение и боль в мышцах и костях. Дополнительный анализ заключался в определении динамики аллельной нагрузки гена *JAK2V617F* на фоне проводимой терапии.

Результаты. Медиана продолжительности терапии составила 16,5 месяцев (1–45 месяцев). У 36 (80 %) пациентов перед началом терапии определялись симптомы опухолевой интоксикации. У 32 (88,9 %) больных отмечалось отсутствие симптомов опухолевой интоксикации уже через 2 недели от начала терапии. У 5 (11,1 %) больных селезенка не выступала из-под края реберной дуги. У 8 (17,7 %) больных селезенка уменьшилась более, чем на 50 %, у 16 (35,5 %) менее 50 %, и у 16 (35,5 %) сохранялась стабилизация заболевания (селезенка оставалась прежних размеров). Медиана уровня гемоглобина перед началом терапии составила 99 г/л (50–199 г/л), на 3 месяца терапии — 102 г/л (61–157 г/л), на 6 месяцев — 109 г/л (72–157

г/л) и на 12 месяцев — 120 г/л (68–148 г/л). Четырнадцать пациентов перед началом лечения имели гемотранфузионную зависимость, которая сохранялась у 12 (86 %) пациентов через 3 месяца от начала терапии. У всех пациентов уровень гемоглобина был стабильным на протяжении лечения, вне зависимости от трансфузионного статуса пациентов на момент старта терапии. За весь период наблюдения умерло четыре пациента: 1 в результате прогрессии заболевания через 9 месяцев от начала лечения, 1 пациент умер в результате прогрессирующей анемии IV степени (точная причина смерти не известна), 1 пациент вследствие желудочно-кишечного кровотечения (тромбоцитопения IV ст.) и 1 пациентка выбыла из-под наблюдения (непосредственная причина смерти не известна). У 2 (4 %) пациентов наступила бластная трансформация миелофиброза. Двадцать девять пациентов (64 %) имели мутацию *JAK2V617F*. Медиана аллельной нагрузки на момент начала терапии составила 56,5 % у 22 пациентов, на 12 месяцев — 44,96 % у 14 человек. На момент проведения анализа 40 (84,4 %) пациентов продолжают лечение Руксолитинибом. Причины прекращения терапии: нежелательные явления (стойкая гипербилирубинемия III ст.) — 1, смерть — 4 пациента.

Выводы. Руксолитиниб эффективен у больных миелофиброзом при использовании в рамках обычной клинической практики. Наиболее быстрый эффект наблюдается в виде сокращения размеров селезенки и уменьшения симптомов опухолевой интоксикации. У всех пациентов снизилась интенсивность симптомов заболевания, улучшилось общее самочувствие, что, несомненно, способствует улучшению приверженности и повышению качества медицинской помощи. По результатам нашего наблюдения руксолитиниб оказывает небольшое влияние на уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F*. Переносимость лечения руксолитинибом удовлетворительная у подавляющего большинства больных.

Панферова А. В., Гаськова М. В., Тимофеева Н. М., Солдаткина О. И.,
Чекменева Ю. Ю., Казакова А. Н., Калинина И. И., Ольшанская Ю. В., Новичкова Г. А.,
Масчан М. А., Масчан А. А.

ННПЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева
ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия
Рогачёва», Москва

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОМЛ С Т(8;21) У ДЕТЕЙ

Введение. CBF-ОМЛ (от англ. «core binding factor» острый миелоидный лейкоз) включает ОМЛ с t(8;21)(q22; q22) и inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13; q22) хромосомными перестройками, приводящими к образованию *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных генов, соответственно. CBF-ОМЛ составляют 25 % детских и 15 % взрослых de novo ОМЛ. Выявление характерных для данного типа ОМЛ цитогенетических маркеров имеет принципиальное значение для определения тактики ведения пациентов. Считается, что CBF-ОМЛ имеют хороший прогноз относительно других подтипов ОМЛ, лечение с использованием высоких доз цитарабина привело к значительно лучшим показателям выживаемости. Тем не менее, в 40 % случаев происходят рецидивы заболевания, что свидетельствует о клинической гетерогенности этой группы. С момента первого описания t(8;21) и inv(16) ОМЛ в 1973 и 1983, реаранжировки генов *RUNX1* и *CBFB* хорошо изучены. Перестройки *RUNX1* и *CBFB* приводят к нарушению генов, кодирующих субъединицы CBF-комплекса (гетеродимерный комплекс транскрипционного фактора), который регулирует экспрессию, необходимую для нормального гемопоэза. Экспрессия *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных протеинов недостаточна для индуцирования фульминантной формы лейкоза, поэтому CBF-ОМЛ считаются классической моделью развития патогенеза в результате кооперации нескольких событий: нарушения нормальной функции транскрипционных факторов (таких как CBF-комплекс), влияющих на дифференцировку и возникновение активирующих мутаций, которые увеличивают клеточную пролиферацию. Доказательством этой модели является факт наличия дополнительных мутаций в генах *KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*, активирующих внутриклеточные сигнальные пути с участием тирозинкиназ, они часто встречаются при обоих подтипах CBF-ОМЛ.

Цель исследования: определить и охарактеризовать спектр мутаций у детей с CBF-ОМЛ с t(8;21).

Методы исследования. 26 инициальных образцов костного мозга пациентов с ОМЛ t(8;21) были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Для подготовки библиотек использовали набор TruSight Myeloid Sequencing Panel (Illumina, США), сиквенс осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) по параметрам, установленным производителем. Вторичный анализ данных и аннотацию вариантов также проводили с помощью программного обеспечения Illumina: MiSeq Reporter Software и VariantStudio Variant Analysis Software v2.2.

Результаты. Проанализированы результаты обследования 26 детей, 14-ти девочек и 12-ти мальчиков (медиана возраста — 137 месяцев), у пяти из которых (19 %) имел место рецидив заболевания. В этой группе 25 пациентов имели как минимум 1 мутацию, остальные 2, 3 и 4, у пациентки с диагнозом ОМЛ t(8;21), ЦНС IV, миелоидная саркома спинномозгового канала было выявлено 6 мутаций. Среди всех проанализированных генов наиболее часто мутации встретились в группе генов семейства рецепторов тирозинкиназы (*KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*). 11 пациентов имели мутации в гене *NRAS*, 3 — в *KRAS*. Мутации в гене *KIT* встретились у 3 (11,5 %) пациентов, тогда как в литературе описана частота порядка 20 %–50 %. Мутации в гене *FLT3* были представлены 1 мутацией TKD и двумя *FLT3* ITD. Кроме того, мутации в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию (*ASXL1*, *KDM6A*, *EZH2*, *BCORL1*, *BCOR*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) и когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) найдены у 11 пациентов, чаще определялись мутации в гене *EZH2* (у 3 пациентов). Таким образом, 11 (42 %) пациентов имели мутации в генах эпигенетической регуляции и когезинового комплекса.

Выводы. Частота выявления мутаций в генах семейства рецепторов тирозинкиназы и в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию при ОМЛ с t(8;21), в нашем исследовании совпадает с опубликованными ранее данными. В нашей работе будет дана подробная характеристика мутаций и проанализировано их влияние на течение заболевания.

довании совпадает с опубликованными ранее данными. В нашей работе будет дана подробная характеристика мутаций и проанализировано их влияние на течение заболевания.

Полушкина Л. Б.¹, Мартынкевич И. С.¹, Шуваев В. А.¹, Мотыко Е. В.¹, Фоминых М. С.¹, Криволапов Ю. А.², Асауленко З. П.², Мартыненко Л. С.¹, Иванова М. П.¹, Цыбакова Н. Ю.¹, Волошин С. В.¹, Бессмельцев С. С.¹, Четкин А. В.¹

¹ ФГБУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург

² ФГБОУВО Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРОГНОЗА У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ МИЕЛОФИБРОЗОМ

Введение. Согласно сообщениям последних лет, перспективным инструментом прогнозирования при первичном миелофиброзе (ПМФ) служат данные молекулярно-генетического и цитогенетического анализа: тип/отсутствие маркера клональности (МК), мутационный статус генов эпигенетической регуляции (ЭР) транскрипции, кариотип. Вариабельность сочетания повреждений генома во многом является причиной клинической и прогностической гетерогенности ПМФ. Поэтому оценивать вышеприведенные показатели необходимо комплексно с учетом их возможного взаимного влияния.

Цель. Определить прогностическую значимость маркеров клональности, мутаций генов эпигенетической регуляции, кариотипа и их комбинации для ОВ пациентов с ПМФ.

Материалы и методы. В исследование включены 110 пациентов с диагнозом ПМФ (38 (34,5%) мужчины), медиана возраста 59 лет (16–82 лет). Медиана наблюдения 2,6 года (0,14–22,97 лет). У всех пациентов проводили определение JAK2V617F-статуса (ПЦР-ПДРФ), при JAK2(-) детектировали мутации в 515 кодоне гена MPL (ПЦР-ПДРФ) и мутации 9 экзона гена CALR (секвенирование по Сенгеру). У 106 пациентов выполнен анализ генов ASXL1, EZH2, IDH1/2 методом кривых плавления с последующим секвенированием. У 48/110 (43,6%) больных проведено цитогенетическое исследование.

Результаты. МК обнаружены у 81,8% пациентов: JAK2(+) — 50,0%; CALR(+) — 25,5% (14,5% тип 1, 10,9% — тип 2), 6,4% — MPL(+) больных. У 18,2% МК не выявлены (TN – triple-negative). Мутации генов ЭР обнаружены в 20,8% случаев: мутации нонсенс и сдвига

рамки считывания гена ASXL1 (мутации преждевременной терминации — ASXL1term) — 8,5%, сочетание ASXL1term и ASXL1mis (миссенс) — 3,8%, ASXL1mis — 4,7%, сочетание ASXL1term и EZH2 — 1,9%, сочетание ASXL1term и IDH2 — 0,9%, IDH1 — 0,9%. У 27,1% пациентов выявлен неблагоприятный кариотип (+8,+21,+7,—7/7q,—5/5q, перестройки 11q и 12p, моносомии, комплексный кариотип, а также del(6)(q15), add(6)(p25), del(X)(q22), t(X;7)(p21;q11)). По данным однопараметрического регрессионного анализа на ОВ оказывали влияние: мутации ASXL1term (отношение рисков (ОР) 2,9, p = 0,018), неблагоприятный кариотип (ОР 8,2, p < 0,001) и три-негативный статус (ОР 8,1, p < 0,001). Для мутаций в гене CALR значение p было пограничным: ОР 0,3, p = 0,052. ASXL1mis не оказывали влияния на ОВ (p = 0,378). По результатам многопараметрического регрессионного анализа, включавшего такие переменные, как TN-, CALR-, ASXL1term-статус и неблагоприятный кариотип, ключевое влияние на ОВ независимо друг от друга оказывали неблагоприятный кариотип (ОР = 7,4, p = 0,001) и наличие терминирующей мутации в гене ASXL1 (ОР = 2,8, p = 0,023). При оценке модели Кокса без учета кариотипа значимое влияние на ОВ оказывали TN-статус (ОР = 2,4, p = 0,050) и ASXL1term-статус (ОР = 3,3, p = 0,012), тогда как наличие мутаций в гене CALR теряло порог статистической значимости (ОР = 0,3, p = 0,075). Тем не менее данный фактор был значим (ОР = 0,2, p = 0,015), когда в качестве ковариаты выступал только ASXL1term-статус, который также сохранял свою значимость в данной модели (ОР = 3,9, p = 0,004). В модели, включавшей TN- и ASXL1term-статус, оба

параметра значимо влияли на выживаемость (ОР = 3,6, $p = 0,003$ и ОР = 2,5, $p = 0,048$ соответственно). Оценку значимости различий ОБ проводили в зависимости от *CALR/ASXL1* и *TN/ASXL1* статуса, а также в группах с различным вариантом кариотипа и *ASXL1term*-статусом. При анализе ОБ с учетом *CALR/ASXL1* статуса худшую выживаемость продемонстрировали *CALR(-)/ASXL1term* пациенты (медиана 2,5 года, $p = 0,021$). Прослеживалась статистическая тенденция к улучшению выживаемости среди *CALR(+)/ASXL1wild-type (wt)* (медиана не достигнута при времени наблюдения 10,1 года) пациентов по сравнению с *CALR(-)/ASXL1wt* (медиана 13,5 года) ($p = 0,124$). Достоверных отличий по ОБ между *CALR(+)/ASXL1term* и *CALR(+)/ASXL1wt*, *CALR(+)/ASXL1term* и *CALR(-)/ASXL1wt* не выявлено. Медиана ОБ среди *TN/ASXL1term* пациентов составила 0,9 года, *TN/ASXL1wt* — 3,6 года, *MK(+)/ASXL1wt* — 13,8 лет, не достигнута в *MK(+)/ASXL1term* группе (при времени наблюдения 10,3 года) ($p < 0,0001$). Попарный анализ показал, что обнаружение *ASXL1term* достоверно снижает ОБ *TN* больных ($p = 0,007$). Общая выживаемость *MK(+)/ASXL1term* пациентов была достоверно

лучше в сравнении с *TN/ASXL1wt* больными ($p = 0,044$). Значимых отличий ОБ у *MK(+)* пациентов с различным *ASXL1*-статусом не выявлено. При комплексном учете данных анализа генов ЭР и кариотипа медиана ОБ *ASXL1term* пациентов с кариотипом низкого риска статистически значимо не отличалась от таковой у *ASXL1wt* пациентов с хромосомными аномалиями высокого риска (медиана 1,6 и 1,4 года, соответственно, $p = 0,291$). Статистически значимых отличий не было обнаружено и среди *ASXL1term* пациентов с кариотипами низкого и высокого риска (медиана ОБ 1,6 и 1,2 года, $p = 0,610$). Медиана ОБ *ASXL1wt* пациентов с кариотипом низкого риска составила 6,4 года ($p = 0,0005$).

Выводы. Наиболее высокая степень значимости различий отмечена при сравнении ОБ в группах, сформированных по комплексу характеристик *TN/ASXL1* и кариотип/*ASXL1*. Наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* существенно ухудшает выживаемость у больных без маркеров клональности. Выживаемость пациентов с наличием любого из параметров — кариотипа высокого риска или *ASXL1term* — достоверно хуже, чем у *ASXL1wt* пациентов с кариотипом низкого риска.

Раджабова А. М.¹, Волошин С. В.¹, Мартынкевич И. С.¹, Шуваев В. А.¹, Мотыко Е. В.¹, Полушкина Л. Б.¹, Шихбабаева Д. И.¹, Иванова М. П.¹, Тиранова С. А.¹, Зенина М. Н.¹, Кудряшова С. А.¹, Балашова В. А.¹, Чубукина Ж. В.¹, Успенская О. С.², Карягина Е. В.³, Чечеткин А. В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

² Ленинградская областная клиническая больница, г. Санкт-Петербург

³ Городская больница № 15, Санкт-Петербург

КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА *FLT3* У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ В ОБЫЧНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Введение. Выявление мутаций гена *FLT3* (ITD или TKD) при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) рассматривается в качестве неблагоприятного маркера, влияющего на течение заболевания, развитие рецидивов и уменьшение общей выживаемости (ОБ) пациентов. Несмотря на высокую частоту встречаемости мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD (приблизительно у 30 % больных ОМЛ выявляется одна из мутаций гена *FLT3*), в настоящее время неизвестна роль количественной нагрузки мутантного гена *FLT3*. Также отсутствуют данные рандомизированных клинических исследований,

необходимых для индивидуализации лечения больных ОМЛ, основанной на *FLT3* мутационном статусе. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) рассматривается в качестве консолидации у *FLT3*-ITD+ пациентов, однако проведение ее может быть затруднено у пожилых пациентов и в странах, где алло-ТГСК доступна не всем. С другой стороны, развитие таргетной терапии — ингибиторов *FLT3*-киназы дает новую надежду на улучшение результатов лечения данной прогностически неблагоприятной подгруппы пациентов с ОМЛ.

Цель. Оценить частоту встречаемости мутаций гена *FLT3* и ее влияние на клинические показатели и общую выживаемость пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ).

Материалы и методы. Проанализирована частота выявления мутаций в гене *FLT3*, показатели клинического анализа крови, кариотип и длительность ОВ в зависимости от наличия или отсутствия мутаций гена *FLT3* у 199 пациентов с ОМЛ (83 мужчин/116 женщин). Медиана возраста пациентов на момент установления диагноза составила 52 года (20–86 лет). Для выявления мутаций гена *FLT3* использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей рестрикцией и определением 2 основных типов мутаций — внутренняя тандемная дупликация (*FLT3-ITD*) и точечная мутация в «А-петле» (*FLT3-TKD*). Статистический анализ включал тесты Kruskal-Wallis ANOVA и анализ ОВ по методу Каплана-Мейера.

Результаты. В исследуемой группе пациентов частота встречаемости мутаций гена *FLT3* составила: *FLT3-ITD* — 22,6 % (45/199), *FLT3-TKD* — 5,5 % (11/199), *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD* в комбинации — 1,0 % (2/199); остальные — 70,8 % (141/199) пациентов не имели мутаций в гене *FLT3* (*FLT3-*).

При сравнении показателей гемограммы были получены статистически значимые различия по уровню лейкоцитов ($p = 0,0009$)

и количеству бластов ($p = 0,01$) между *FLT3* (-) и *FLT3*(+) больными. Хромосомные аберрации были выявлены у 38 % (17/45) пациентов группы *FLT3-ITD+*, у 64 % (7/11) — *FLT3-TKD+*, у 100 % (2/2) — *FLT3-ITD/TKD+* больных кариотип был нормальным, в группе *FLT3-* пациентов генетические аномалии выявлены в 51 % (72/141) случаев. Все пациенты получали лечение различных режимов химиотерапии в зависимости от возраста, общесоматического статуса и коморбидности (7+3, 5+2, HAM). ТГСК была выполнена 14 % (28/199) пациентам (алло/ауто — 17/11): в группе *FLT3-ITD+* произведено 3 алло-ТГСК; *FLT3-TKD+* — 1 алло-ТГСК и 1 — ауто-ТГСК; *FLT3-* 13 алло-ТГСК и 10 ауто-ТГСК. Выявили значимые ($p = 0,00024$) различия в длительности ОВ между *FLT3-ITD+*, *FLT3-TKD+* и *FLT3-* пациентами. Медиана ОВ составила: 5,1 месяцев для *FLT3-ITD+*, 7,1 месяцев для *FLT3-TKD+* и 13,0 месяцев для *FLT3-* больных ОМЛ.

Выводы. Мутации в гене *FLT3* встречаются у трети пациентов с ОМЛ и оказывают неблагоприятное влияние на длительность общей выживаемости. Определение мутационной нагрузки гена *FLT3* в динамике заболевания для контроля минимальной остаточной болезни, а также применение таргетной терапии для *FLT3*- позитивных пациентов, не подлежащих ТГСК, позволит улучшить диагностику и индивидуализировать терапию ОМЛ.

**Рамильева И. Р.¹, Буркитбаев Ж. К.¹, Турганбекова А. А.¹,
Баймукашева Д. К.¹, Жибурт Е. Б.²**

¹ Научно-производственный центр трансфузиологии Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Астана, Казахстан

² Национальный медико-хирургический центр имени Н. И. Пирогова, г. Москва, Россия

ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТЕЙ НЛА У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Острый лейкоз (ОЛ) — довольно редкое заболевание и составляет лишь 3 % злокачественных опухолей человека. Однако среди гемобластозов острые лейкозы занимают одно из первых мест по частоте встречаемости. Заболеваемость острыми лейкозами составляет в среднем 5 случаев на 100 000 населения в год. В 75 % случаев заболевание диагностируется у взрослых. Среднее соотношение миелоидных лейкозов (ОМЛ) и лимфоидных (ОЛЛ) лейкозов составляет 6:1. Тем

не менее в детском возрасте в 80–90 % случаев ОЛ отмечаются лимфобластные формы, а после 40 лет наблюдается обратное соотношение — у 80 % больных ОЛ выявляется миелоидный вариант заболевания. В настоящее время большой фактический материал свидетельствует, что человеческий лейкоцитарный антиген (HLA) может иметь сильные ассоциативные связи с одним заболеванием и умеренно или слабо выраженные — с другим.

Цель. Изучение особенностей HLA-фенотипа у пациентов с ОМЛ в Казахстане и проведение поиска связи между развитием данной патологии и генами HLA-системы.

Материалы и методы. Изучили частоту встречаемости HLA-антигенов I класса (HLA-A, B) и II класса (HLA-DRB1*) у больных с ОМЛ, проживающих в Казахстане. Обследовали 3808 человек: 3621 здоровых доноров крови (из них HLA-A 3621, B — 3607, Cw — 3582, DRB1-3595, DQB1-3576) и 187 пациентов с диагнозом ОМЛ. Типирование доноров крови и пациентов (HLA-A, B, C, DRB1, DQB1) определяли молекулярно-генетическим методом на наборах Protrans (Protrans, Германия). Результаты оценили с использованием дескриптивных статистик, непараметрического χ^2 -критерия, отношения шансов (ОШ)

и 95 % доверительного интервала (ДИ 95 %).

Результаты. Проведенный анализ выявил характерный профиль распределения специфичностей системы HLA у пациентов с ОМЛ в казахстанской популяции. Изучение распределения антигенов системы HLA у пациентов с ОМЛ позволило предположить существование ассоциативных связей между наличием в фенотипе пациентов HLA-A*31, B*37 и развитием ОМЛ. Также установлена, предположительно, протективная роль в отношении данной патологии ряда антигенов HLA-A*02, B* C*02, DRB1*01, *04, DQB1*06.27.

Выводы. Полученные данные могут быть использованы при изучении различных заболеваний, ассоциированных с HLA-антигенами.

Романенко Н. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ПЕРВИЧНОГО МИЕЛОФИБРОЗА С АНЕМИЕЙ

Введение. Первичный миелофиброз (ПМФ) является одним из миелопролиферативных заболеваний и особую роль в диагностике имеет не только клиническая картина заболевания, изучение морфологии костного мозга и трепанобиоптата, но и цитогенетическое исследование с использованием молекулярно-биологических методов. Особую роль при ПМФ играет наличие анемии, ухудшающее качество жизни пациентов и общую выживаемость. Это важно учитывать в комплексной терапии заболевания, а для коррекции анемии применяют трансфузии эритроцитов (ТЭ) и в редких случаях эритропоэстимулирующие препараты (ЭПСП). Однако эффективность лечения анемии при ПМФ с помощью ЭПСП остается дискуссионной в связи с низкой клеточностью костного мозга, сниженным количеством эритрокарицитов и риском тромбозов при гипертромбоцитозе в периферической крови.

Клинический случай. Больная СМР 72 лет с 2012 г. наблюдается с подозрением на ПМФ в РосНИИ гематологии и трансфузиологии. В марте 2014 г. у пациентки появились жалобы на слабость, головокружение, утомляемость. При объективном обследо-

вании выявлены бледность кожных покровов, спленомегалия (4 см из-под реберной дуги). Периферическая кровь: Hb — 64 г/л, Ht — 20,7 %, эритроциты — $1,9 \times 10^{12}$ /л, ретикулоциты — 13%, лейкоциты — $3,9 \times 10^9$ /л, со всеми переходными формами нейтрофилов, тромбоциты — 92×10^9 /л. В миелограмме отмечалось пониженное число миелокарицитов (18×10^9 /л), относительное увеличение клеток нейтрофильного ряда (75,6 %) за счет зрелых форм, эритроидный росток у нижнего предела нормы (13,4 %); в трепанобиоптате выявлен ретикулиновый и коллагеновый фиброз (2 ст.); цитогенетически филадельфийской хромосомы не обнаружено, BCR-ABL не выявлено, мутация гена JAK2 не обнаружена, но выявлена CALR, что позволило подтвердить диагноз ПМФ. Для коррекции анемии пациентка получала ТЭ (по 3 дозы каждые 2 месяца). В качестве противоопухолевой терапии — интерферон альфа (по 3.000.000МЕ 3 раза в неделю). Однако эффект от гемотрансфузий был не стойким. Кроме того, через два года трансфузионной терапии в сыворотке крови выявлено увеличение уровня сывороточного ферритина (1500 нг/мл). Концентрация сывороточного эритропоэтина составила

103 мМЕ/мл (гипотетический уровень при данной степени анемии >300 мМЕ/мл). Больной был назначен эпоэтин бета (по 10 000 МЕ подкожно 3 раза в неделю). Через 9 недель уровень Hb увеличился до 120 г/л без переливаний эритроцитов. После отмены эпоэтина уровень Hb постепенно снижался в течение 4-х месяцев до 87 г/л. Повторное 6-недельное лечение эпоэтином бета без ТЭ привело к нормализации уровня Hb (127 г/л), который удерживался на протяжении 4-х месяцев. В дальнейшем пациентке потребовалось проводить еще курсы терапии эпоэтином бета, для поддержания концентрации Hb в пределах 110–120 г/л. При этом течение за-

болевания в целом стабилизировалось. Спленомегалия не нарастала. Тромботических осложнений не отмечалось.

Выводы. Таким образом, представленные данные показали необходимость комплексного обследования, включающего цитогенетическое и молекулярно-биологическое исследование при диагностике ПМФ. В комплексное лечение ПМФ с анемией у некоторой категории больных может быть включен эпоэтин. Однако такую терапию при ПМФ следует назначать при сохранном эритропоэзе, отсутствии тромбоцитоза и невысоком уровне сывороточного эритропоэтина.

**Ругаль В. И., Семенова Н. Ю., Балашова В. А., Артюхина З. Е., Волошин С. В.,
Мартынкевич И. С., Шмидт А. В., Бессмельцев С. С.**

ФГБУ «РосНИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕМЕНТОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ НИШИ ПРИ СОЧЕТАНИИ МИЕЛОДИСПЛАЗИИ (5Q СИНДРОМ) И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Введение. Структурами костного мозга, формирующих нишу гемопоэтических стволовых клеток, являются синусоидальные сосуды микроциркуляторного русла, клеточные и внеклеточные элементы эндоста. Повреждение гемопоэтической ниши в эксперименте приводит к развитию у животных миелодисплазии с последующей трансформацией в острый лейкоз. В настоящее время состояние гемопоэтической ниши интенсивно изучается в клинике при заболеваниях кроветворной ткани.

Цель. Целью работы было выявление морфологических особенностей нишеформирующих структур костного мозга на материале цельных фрагментов губчатой кости, полученных от больной П. (59 лет) с сочетанием миелодиспластического синдрома с изолированной делецией длинного плеча хромосомы 5 (5q синдром) и множественной миеломы.

Материал и методы. Материалом исследований послужил трепанобиоптат подвздошной кости. Паренхиматозная и стромальная ткань были изучены в гистологических препаратах с использованием гистоморфологических, гистохимических и иммуногистохимических методов.

Результаты. В костномозговых пространствах отмечалось снижение клеточности. На-

личие качественных перестроек миелоидной ткани, интерстициальная и диффузная инфильтрация плазматическими клетками с наличием двуядерных форм. Молодые гранулоцитарные клетки располагались в центральных отделах лакун, зрелые гранулоциты значительно снижены в количестве. Эритропоэз характеризовался отсутствием островной структуры, преобладанием молодых форм, наличием мегалобластов. Мегакариоцитарный росток был представлен преимущественно мегакариоцитами мелких размеров с ядрами округлой формы, располагавшихся эксцентрично. При окраске по Гомори выявлен ретикулиновый фиброз первой степени. Небольших размеров очаговая сеть ретикулиновых волокон регистрировалась в субэндостальных зонах, непосредственно на поверхности костных трабекул. CD34 экспрессировали диффузно располагавшиеся единичные миелоидные клетки, предшественники и эндотелиоциты. Выявлялось увеличение в три раза количества синусов костного мозга в сравнении с нормой. Преобладали крупные синусоидальные сосуды, в том числе, располагавшиеся в субэндосте. Плазматические клетки экспрессировали CD138, λ-IgL.

Выводы. Гистоморфологическое исследование костного мозга свидетельствует

о миелодисплазии, множественной миеломе и структурных перестройках элементов гемопоэтической ниши. Трансформация миело-лимфопоза может быть обусловлена дефектом клеток предшественников, коммитированных в миелоидном и лимфоидном направлении. Однако установленные изме-

нения структур, формирующих эндостально-васкулярную нишу, не позволяют исключить в генезе указанной сочетанной патологии роль дефектов клетки-предшественницы, общей для миелоидной и лимфоидной линии, жизнедеятельность которой и ее направление дифференцировки регулируются нишей.

**Рябчикова Н. Р.¹, Сафуанова Г. Ш.¹, Миннихметов И. Р.²,
Исламгулов Д. В.², Карунас А. С.², Хуснутдинова Э. К.²**

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

² Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *BCR-ABL* У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ С ВЫСОКОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — наиболее частое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся реципрокной транслокацией $t(9;22)(q34; q11)$, приводящей к образованию онкогенного химерного гена *BCR-ABL* на 22q-хромосоме. Ген *BCR-ABL* кодирует цитоплазматический химерный протеин, обладающий выраженной тирозинкиназной активностью. Появление препаратов, ингибирующих тирозинкиназы (ИТК), коренным образом изменило тактику лечения ХМЛ, сделав ее патогенетически направленной. Однако в 20–30 % случаях у больных, получающих лечение ИТК, возникает резистентность к терапии. Одним из механизмов возникновения устойчивости к иматинибу является появление мутаций в гене *BCR-ABL1*.

Цель. Поиск изменений нуклеотидной последовательности в гене *BCR-ABL*, приводящих к возникновению резистентности при лечении иматинибом, у больных ХМЛ из Республики Башкортостан.

Материалы исследования. Образцы РНК и кДНК, выделенные из периферической крови 114 больных с клинически и цитогенетически установленным диагнозом «Хронический миелолейкоз», проходивших обследование в Республиканской клинической больнице имени Куватова г. Уфа. У всех пациентов был определен уровень экспрессии гена *BCR-ABL*

с помощью набора «ОНКОСКРИН-1-1-Q» (ООО «ГеноТехнология»). Анализ мутаций в гене *BCR-ABL* был проведен у 50 пациентов ХМЛ, показывающих высокий уровень экспрессии, путем прямого секвенирования кДНК.

Результаты исследования. Были выявлены четыре мутации в киназном домене в гене *BCR-ABL1* у больных с высоким уровнем экспрессии из РБ. У двух пациентов было обнаружено по одной мутации *M244V* (2 %) и *H396K* (2 %), у семи пациентов — мутация *M351T* (20 %), у четырех пациентов — мутация *T315I* (14 %) и у трех пациентов было выявлено по две мутации — *T315I* и *M351T*. Кроме мутаций нами также были обнаружены два полиморфных варианта (*K247R* и *Q346Q*). Предполагается, что присутствие этих полиморфных вариантов не требует изменения тактики лечения.

Выводы. Установлено, что мутации киназного домена встречаются в 32 % случаев у больных ХМЛ из РБ с высокой экспрессией гена *BCR-ABL*, что свидетельствует о необходимости проведения своевременной диагностики данных мутаций и корректировки тактики лечения. В первую очередь мутации должны определяться у пациентов с неадекватным ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназ в соответствии рекомендациями ELN.

Сидорова Ю. В., Чернова Н. Г., Якутик И. А., Смирнова С. Ю., Рыжикова Н. В.,
Никулина Е. Е., Синицына М. Н., Ковригина А. М., Звонков Е. Е., Сударигов А. Б.

Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ

АНАЛИЗ ТОЧЕЧНОЙ МУТАЦИИ RHOA GLY17VAL И Т-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С АНГИОИММУНОБЛАСТНОЙ ЛИМФОМОЙ

Введение. Ангиоиммунобластная лимфома (АИТЛ) — периферическая Т-клеточная лимфома, характеризующаяся полиморфной инфильтрацией лимфатических узлов, пролиферацией сосудов и фолликулярных дендритных клеток. Кроме лимфоузлов, АИТЛ поражает селезенку, печень, кожу и костный мозг. Заболевание практически всегда ассоциировано с вирусом Эпштейн-Барр, что позволяет предположить его роль в этиологии ангиоиммунобластной лимфомы. Опухолевые Т-клетки в большинстве случаев CD4+, экспрессируют пан-Т-клеточные антигены — CD3, CD2, CD5, маркеры нормальных фолликулярных Т-хелперов — CD10, CXCL13, PD-1. Для подтверждения диагноза, оценки распространенности процесса проводят морфологическое, иммуногистохимическое, молекулярно-генетическое исследование пораженной ткани. При первичном обследовании ткани лимфатического узла клональный продукт реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов (TCR) часто не совпадает по длине с клональным продуктом, выявляемым в костном мозге или других тканях. Исследование Т-клеточной клональности не дает ответа на вопрос, относятся ли выявляемые клональные продукты к опухолевой или реактивной популяции лимфоцитов. Недавно обнаруженная соматическая мутация RHOA Gly17Val определяется у 53–71% пациентов с АИТЛ и позволяет количественно оценить наличие опухолевых клеток.

Цель. Оценить количество клеток с мутацией RHOA Gly17Val в лимфатических узлах, крови, костном мозге и коже у пациентов с АИТЛ, и сопоставить с результатами определения Т-клеточной клональности.

Материалы и методы. В исследование включено 40 пациентов с диагнозом АИТЛ, установленным на основании критериев диагностики ВОЗ 2016. Соотношение м/ж — 25/15, медиана возраста составила 65 лет (36–92). На материале лимфатических узлов (ЛУ), кожи, костного мозга (КМ), крови выполнены исследования клональности Т-лимфоцитов

по реаранжировкам генов TCRG (V γ -J γ) и TCRB (V β -J β , D β -J β) по протоколу BIOMED-2 методом ПЦР с последующим проведением фрагментного анализа на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Т-клеточная клональность определяется при наличии 10% и более клональных Т-лимфоцитов от общего количества Т-лимфоцитов. Мутация RHOA Gly17Val анализировалась при помощи количественной TaqMan аллель-специфичной ПЦР. Чувствительность данного метода составила 1% клеток с мутацией от общего количества клеток в образце.

Результаты. Клональные реаранжировки TCR генов обнаружены в ЛУ у 37 из 40 пациентов (92%). Мутация RHOA (Gly17Val) в лимфоузлах была выявлена у 60% (24 из 40) пациентов. Т-клеточная клональность выявлена в 26 из 28 исследованных первичных образцах КМ, однако у 12-ти из 26 пациентов (46%) клональные реаранжировки TCR не совпадали по длине с выявляемыми в ЛУ. Количество клеток с мутацией RHOA было высоким в ЛУ (в среднем 26,7% от общего количества клеток), тогда как в костном мозге клетки с RHOA мутацией либо не выявлялись (у 7 пациентов), либо выявлялись в малом количестве (у 10 пациентов — в среднем 2% от общего количества клеток). Сопоставление данных гистологии, Т-клеточной клональности, количества RHOA позитивных клеток показало, что поражение КМ обнаруживается у большинства пациентов (у 13 из 17–76%), хотя бы одним из методов. Одновременно образцы крови и костного мозга исследованы у 7-ми RHOA позитивных пациентов, при этом количество клеток с RHOA мутацией было незначительно выше в крови, чем в КМ у 5-ти из 7-ми пациентов. Первоначальные образцы кожи получены у 6-ти RHOA позитивных пациентов: у 5-ти из них выявлен значительный процент клеток с RHOA мутацией (в среднем 25%) и подтверждено специфическое поражение кожи при гистологическом исследовании. В целом, мы обнаружили хорошую корреляцию (Spearman's Rho=0,8198,

p-level < 0,00001) в исследованных образцах (n = 51) между выраженностью Т-клеточной клональности (совпадающей с пиками в ЛУ) и количеством RHOA положительных клеток. Образцы кожи, костного мозга и крови с пиками Т-клеточной клональности, отличающимися от таковых найденных в ЛУ, были также отрицательны на наличие клеток с мутацией RHOA. Таким образом, в данных образцах Т-клеточная клональность носила реактивный характер, возможно связанный с аутоиммунными или противовирусными реакциями организма.

Заключение. Точечная мутация RHOA (*Gly17Val*) выявляется у 60 % пациентов с АИТЛ методом аллель-специфичной

ПЦР, но только лимфоузлы имеют диагностическую ценность как для выявления Т-клеточной клональности, так и данной RHOA мутации. Процентное содержание опухолевых клеток в КМ при АИТЛ низкое (в среднем менее 2 % от общего количества клеток), но по совокупности данных молекулярного и гистологического исследования КМ поражен у большинства пациентов. Выраженность Т-клеточной клональности (совпадающей с пиками в ЛУ) коррелирует с количеством клеток с мутацией RHOA. При наличии в КМ, коже, селезенке и т. д. клональных продуктов, отличных от выявляемых в ЛУ, их необходимо интерпретировать как реактивные.

Смирнихина С. А.^{1*}, Челышева Е. Ю.², Лавров А. В.^{1,3}, Мозговой И. В.³,
Кочергин-Никитский К. С.¹, Адильгереева Э. П.¹, Шухов О. А.², Туркина А. Г.², Куцев С. И.^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ УСПЕШНОЙ ОТМЕНЫ ИТК У БОЛЬНЫХ ХМЛ

Введение. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — онкогематологическое заболевание, возникающее в результате транслокации t[9;22] и образования химерного гена *BCR/ABL*, белок которого обладает тирозинкиназной активностью и обуславливает усиленную пролиферацию клеток. ХМЛ эффективно лечится с помощью ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), глубокой молекулярной ремиссии достигают 50–76 % пациентов. Первые исследования по отмене ИТК показывают, что около 50 % больных рецидивируют. Причины рецидива на сегодняшний день остаются малоизученными. Для поиска молекулярно-генетических предикторов безопасной остановки ИТК ранее мы провели полноэкзомное секвенирование пациентов с рецидивом и без него после отмены терапии и выявили 4 молекулярных маркера, ассоциированных с рецидивом ХМЛ: rs1800440 в гене *CYP1B1*, rs67925233 в *ALPK2*, rs839 в *IRF1* и отсутствие rs34006803 в *PARP9* (дикий тип). Показано, что белки *IRF1* и *PARP9* участвуют в *TP53*-опосредованном апопто-

тическом пути, при этом *IRF1* усиливает апоптоз, тогда как *PARP9*, наоборот, угнетает.

Цель. Валидация молекулярных маркеров, ассоциированных с рецидивом ХМЛ, а также оценка уровня экспрессии генов, составляющих *TP53*-опосредованный проапоптотический путь, в группе пациентов с ХМЛ после отмены ИТК.

Материалы и методы. Валидация молекулярных маркеров rs1800440, rs67925233, rs839 и rs34006803 проведена секвенированием по Сэнгеру на выборке из 27 пациентов с хронической фазой ХМЛ, из которых 22 являлись участниками клинической апробации метода наблюдения без терапии в ФГБУ ГНЦ МЗ РФ. Группы риска по Sokal на момент диагноза низкая/промежуточная/высокая — у 17/8/2 пациентов соответственно. Терапия до прекращения лечения: иматиниб (n = 17) и нилотиниб (n = 10). Предлеченность интерфероном в анамнезе была у 4 из 27 больных. Медиана длительности терапии последним ИТК составила 6 лет (от 3 до 15 лет). До остановки лечения у всех пациентов глубокий

МО сохранялся 1 год и более. Для 11 больных из этой группы была проведена оценка экспрессии генов *PARP9*, *TP53*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF2* с помощью ПЦР-РВ.

Результаты. Развитие молекулярного рецидива (потеря большого молекулярного ответа) после отмены ИТК зарегистрирована у 14 (52 %) из 27 больных при медиане наблюдения 3 мес (от 1 до 13 мес.), терапия возобновлена у всех 14 больных. У 13 (48 %) больных продолжено наблюдение без лечения при медиане наблюдения 9 мес. (от 6 до 31 мес.). По результатам валидации выявлена тенденция увеличения доли пациентов с рецидивом при увеличении числа выше описанных генетических маркеров. Пациенты, в генотипе которых обнаружено 3–4 маркера, рецидивировали в 67 % случаев (8/12), при наличии менее 3 маркеров — в 40 % случаев

(6/15). Группы были сопоставимы по степени риска по шкале Sokal и длительности приема последнего ИТК, однако небольшой объем выборки пока не позволяет обнаружить достоверно значимую корреляцию, требуется дальнейшее наблюдение. Одиннадцати пациентам (4 без рецидива и 7 с рецидивом) проведена оценка экспрессии генов *PARP9*, *TP53*, *STAT1*, *STAT3*, *IRF1*, *IRF2*, однако достоверных различий между группами не обнаружено.

Выводы. В работе показано снижение вероятности сохранения ремиссии без лечения при ХМЛ после отмены ИТК при наличии в генотипе пациентов одновременно 3 или 4 маркеров: наличие rs1800440, rs67925233, rs839 и отсутствие rs34006803. Не выявлено различий между группами пациентов в уровне экспрессии генов, участвующих в TP53-опосредованном апоптотическом пути.

**Смирнова С. Ю., Сидорова Ю. В., Чернова Н. Г., Сычевская К. А., Рыжикова Н. В.,
Никулина Е. Е., Глинщикова О. А., Сеницина М. Н., Звонков Е. Е.,
Ковригина А. М., Сударииков А. Б.**

ФГБУ «Гематологический научный центр МЗ РФ», Москва

ПЕРСИСТЕНЦИЯ CD8+ КЛОНАЛЬНЫХ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С CD4+ АНГИОИММУНОБЛАСТНОЙ Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

Введение. Ангиоиммунобластная лимфома (АИТЛ) — периферическая Т-клеточная лимфома, характеризующаяся полиморфной инфильтрацией лимфатических узлов (ЛУ), пролиферацией высоких эндотелиальных венул и фолликулярных дендритных клеток. Кроме ЛУ, АИТЛ поражает селезенку, печень, кожу и костный мозг (КМ). Заболевание практически всегда ассоциировано с Эпштейн-Барр вирусом (EBV), что позволяет предположить его роль в этиологии АИТЛ. Опухолевые Т-клетки в большинстве случаев *CD4+*, экспрессируют пан-Т-клеточные антигены — *CD3*, *CD2*, *CD5*, маркеры нормальных фолликулярных Т-хелперов — *CD10*, *CXCL13*, *PD-1*. Для подтверждения диагноза, оценки распространенности процесса проводят морфологическое, иммуногистохимическое, молекулярно-генетическое исследование пораженной ткани, иммунофенотипирование. Мы обнаружили, что при первичном обследовании Т-клеточная клональность по реаранжировкам генов Т-клеточных рецепторов (TCR), выявляемая в ткани ЛУ, часто не совпадает

с клональностью выявляемой в КМ, крови и других тканях. Исследование Т-клеточной клональности не дает ответа на вопрос, относятся ли выявляемые в КМ и крови клональные продукты к опухолевой или реактивной популяции лимфоцитов. Мы исследовали Т-клеточную клональность у пациентов с АИТЛ в динамике, определили принадлежность персистирующих в крови клональных продуктов к *CD4+* или *CD8+* популяции лимфоцитов.

Цель. Определить иммунологические характеристики персистирующих в крови и КМ клональных Т-лимфоцитов

Материалы и методы. В исследование включено 26 пациентов с диагнозом АИТЛ, установленным на основании критериев диагностики ВОЗ 2008. Средний возраст пациентов 67 лет (36–92), соотношение мужчин и женщин — 15:11. На материале ЛУ, КМ, крови выполнены исследования клональности Т-лимфоцитов по протоколу BIOMED-2 методом ПЦР с последующим проведением фрагментного анализа на ABI PRISM 3130

(Applied Biosystems). Материал исследован в дебюте заболевания и на различных этапах лечения пациентов. У 5 пациентов выполнена селекция *CD8+* и *CD4+* популяции лимфоцитов периферической крови (при помощи MicroBeads, Miltenyi Biotec), с последующим определением Т-клеточной клональности в каждой из популяций.

Результаты. В материале ЛУ у всех пациентов выявлена моноклональная картина по реаранжировкам генов *TCRG*, *TCRB*. У 6-ти из 26 пациентов (23 %) клональные продукты в ЛУ соответствовали клональным продуктам в крови и КМ, у 8 пациентов (30 %) хотя бы один из клональных продуктов, выявленных в материале КМ и/или крови, не соответствовал по длине клональным продуктам, выявленным в ткани ЛУ, у 12 пациентов (46 %) клональные реаранжировки в крови и КМ полностью отличались от выявленных в ткани ЛУ. Таким образом, у 20 пациентов (76 %) при первичном исследовании в крови и КМ выявлены отличные от ЛУ Т-клеточные клоны. У 14 из 20 пациентов клональность в крови и КМ исследована в динамике и обнаружено, что у 7-и из 14 пациентов (50 %) клональные продукты персистировали на протяжении длительного времени и не исчезали при достижении ремиссии заболевания. Период наблюдения в среднем составил 12 месяцев (от 1 до 44 мес.). По нашим данным, не было

выявлено связи между персистенцией данных Т-клеточных клонов и активностью EBV инфекции в крови. У 4-х пациентов в ремиссии заболевания с персистирующей Т-клеточной клональностью выделены *CD4+* и *CD8+* популяции Т-лимфоцитов методом магнитной селекции. У всех пациентов клональные продукты, которые изначально были выявлены в КМ и крови определялись в *CD8+* популяции клеток (рис. 1). У одного из пациентов в популяции *CD4+* клеток выявлен клональный продукт, соответствующий клональному продукту, выявленному в ЛУ в дебюте заболевания. У одного пациента селекция популяций лимфоцитов крови проведена в дебюте заболевания, клональность выявлена в *CD4+* клетках и полностью соответствовала клональным реаранжировкам ЛУ.

Выводы. Таким образом, данное исследование подтверждает, что клональные продукты в КМ и крови, не совпадающие с ЛУ, выявляются у большинства пациентов с АИТЛ (76 %), относятся к *CD8+* лимфоцитам, могут персистировать в течение длительного времени (период наблюдения от 1 до 44 мес.), могут сохраняться в ремиссии заболевания и вероятно носят реактивный характер, что необходимо учитывать при интерпретации данных клональности в крови и костном мозге.

Солдаткина О. И., Земцова Л. В., Апрелова Е. В., Зеркаленкова Е. А., Масчан Н. М., Масчан А. А., Ольшанская Ю. В.

ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва», Москва

РЕЗУЛЬТАТЫ КОМПЛЕКСНОГО ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ОСТРОМ ПРОМИЕЛОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) (M3 и M3v по международной ФАБ — классификации) у детей и подростков составляет до 5–10 % случаев ОМЛ (~0,1–0,2 случая на 100 000 детского населения в год). В большинстве случаев пациенты с ОПЛ имеют хромосомную транслокацию *t(15;17)(q22; q12–21)*, ведущую к образованию химерного гена *PML-RARa* на деривате 15 хромосомы и ectopической экспрессии этого гена. Тем не менее, описаны редкие случаи ОПЛ, не имеющие в кариотипе транслокацию *t(15;17)*. В большин-

стве из них она представлена в криптической форме или в составе комплексных перестроек с тремя или более точками разрывов и может быть выявлена методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). В литературе менее чем в 1 % случаев описаны варианты транслокации с участием гена *RARa*. На данный момент описано менее десяти генов-партнеров *RARa*. Среди них *NPM1*, *NUMA1*, *PLZF*, *PRKAR1A*, *FIP1L1*, *BCOR*, *STAT5B*. Они представлены цитогенетическими перестройками *t(5;17)(q35; q21)*, *t(11;17)(q13; q21)*, *t(11;17)(q23; q21)*,

del(17)(q21; q24)/t(17;17)(q21; q24), t(4;17)(q12; q21), t(X;17)(p11; q12), der(17) и t(3;17)(p25, q21). В период с декабря 2010 года в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики было диагностировано 84 пациента с ОПЛ (44 девочки и 37 мальчиков в возрасте от 5 месяцев до 18 лет, медиана 10,6). Методом стандартного кариотипирования с использованием GTG-окрашивания хромосом у 34 % (29) пациентов был обнаружен ка-

риотип, несущий транслокацию t(15;17)(q22; q12–21) без дополнительных хромосомных перестроек. Более чем у 20 % (19) пациентов были выявлены дополнительные хромосомные аномалии. Из них 35 % (30) пациентам не удалось провести исследование методом стандартного кариотипирования по причине отсутствия митотических пластинок или ввиду отсутствия материала для культивирования.

**Сычевская К. А.¹, Смирнова С. Ю.¹, Сидорова Ю. В.¹,
Рыжикова Н. В.¹, Городецкий В. Р.², Судариков А. Б.¹**

¹ Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4

² Научно-исследовательский институт ревматологии имени В. А. Насоновой, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34а

ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОЙ КЛОНАЛЬНОСТИ CD57+ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ Т-КЛЕТОЧНОМ ЛЕЙКОЗЕ ИЗ БОЛЬШИХ ГРАНУЛЯРНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Введение. Т-клеточный лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (Т-ЛБГЛ) — зрелоклеточная лимфоидная опухоль, характеризующаяся стойкой клональной экспансией клеток с морфологией больших гранулярных лимфоцитов (более $2 \times 10^9/\text{л}$) с иммунофенотипом $CD3^+ CD8^+ CD57^+ TCR\alpha\beta$. Важным диагностическим критерием Т-ЛБГЛ является подтверждение моноклональности лимфоцитов периферической крови молекулярными методами исследования. Тем не менее, подтверждение наличия опухолевого процесса на ранних стадиях развития заболевания бывает затруднено из-за низкого процента опухолевых клеток среди нормальных лимфоцитов. Дополнительную сложность представляет дифференциальная диагностика Т-ЛБГЛ и реактивной лимфопролиферации. Особенностью Т-ЛБГЛ является частая ассоциация с аутоиммунной патологией, для которой характерно развитие узконаправленного иммунного ответа и, следовательно, рестрикция репертуара Т-клеточных рецепторов. CD57 — маркер, характерный для популяции Т-ЛБГЛ. Можно полагать, что положительная селекция CD57+ клеток больных с возможным диагнозом лейкоза с последующим определением Т-клональности позволит обогатить исследуемые образцы опухолевой популяцией лимфоцитов и таким образом улучшить диагностику заболевания в сомнительных случаях.

Цель. Изучение целесообразности использования магнитной селекции CD57+ лимфоцитов в дифференциальной диагностике Т-ЛБГЛ.

Материалы и методы. В работу включено 12 пациентов с предполагаемым диагнозом Т-ЛБГЛ. Медиана возраста больных составила 57 лет (от 34 до 84). Все пациенты диагностировались и наблюдались в Научно-исследовательском институте ревматологии имени В. А. Насоновой. Группу контроля составили 7 здоровых доноров с медианой возраста 53 года (от 45 до 58 лет). Выделение CD57+ фракции лимфоцитов проводили с помощью набора для клеточной селекции MACS (Miltenyibiotec, Германия). Т-клеточную клональность оценивали по перестройкам генов Т-клеточных рецепторов $TCRG (VG-JG)$, $TCRB (VB-JB/DB-JB)$ с последующим фрагментным анализом ПЦР-продуктов.

Результаты. По результатам исследования Т-клеточной клональности изолированных лимфоцитарных популяций в выборке пациентов с диагнозом Т-ЛБГЛ можно выделить три характерных группы: у 3-х из 12 больных (25 %) в общей популяции был обнаружен сомнительный моноклональный продукт, который полностью доминировал в селектированных CD57+ клетках. Во второй группе больных (5/12–41,7 %) в общей популяции лимфоцитов была выявлена четкая моноклональная картина. У четырех из этих

больных при исследовании *CD57+* клеток моноклональность была подтверждена. У пятого пациента в популяции *CD57+* клеток профиль клональности был расценен как олигоклональный. В третьей группе больных (4/12–33,3 %) с поликлональной или олигоклональной картиной в общей популяции результат определения Т-клеточной клональности в селектированных *CD57+* клетках был расценен также как олигоклональный или поликлональный. В качестве контроля была проанализирована выборка из семи здоровых доноров. В трех из семи случаях профиль клональности общей популяции лимфоцитов был расценен как сомнительный моноклональный. Идентичный ПЦР-продукт был обнаружен в *CD57+* клетках, однако практически у всех доноров (6/7) популяция *CD57+* лимфоцитов была олигоклональна. Таким образом, наличие клональных и олигоклональных продуктов характерно для нормальной

популяции *CD57+* клеток, которые представляют собой цитотоксические лимфоциты в стадии терминальной дифференцировки, для которых возможна рестрикция репертуара антигенных рецепторов. Полученные данные не позволяют однозначно оценивать выявление Т-клеточного моноклонального продукта в *CD57+* клетках как проявление опухолевой лимфопротиферации.

Выводы. Метод магнитной селекции *CD57+* лимфоцитов с последующим определением реаранжировок генов *TCR* может быть использован в клинической практике для уточнения сомнительных результатов исследования Т-клональности при предполагаемом диагнозе Т-ЛБГЛ. Однако выявление доминирующего клонального продукта у пациентов с подозрением на Т-ЛБГЛ при исследовании *CD57+* клеток не может однозначно быть расценено как признак наличия Т-клеточной опухоли.

Таурова С. А., Поспелова Т. И., Ковынев И. Б., Березина О. В.

ГБУЗ НСО Городская клиническая больница № 2, Новосибирск. ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Новосибирск

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ В-КЛЕТОЧНОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ В ЛАБОРАТОРИИ ГОРОДСКОГО ГЕМАТОЛОГИЧЕСКОГО ЦЕНТРА Г. НОВОСИБИРСКА

Введение. В настоящее время цитогенетические aberrации при хроническом В-клеточном лимфолейкозе (В-ХЛЛ) являются наиболее ценными факторами прогноза, так как могут быть определены уже в начале болезни.

Цель. Оценить эффективность цитогенетической диагностики при В-ХЛЛ в соответствии с критериями ВОЗ на территории г. Новосибирска и Новосибирской области.

Материал и методы. За период с 2014 по 2016 гг. в цитогенетической лаборатории на базе Городской клинической больницы № 2 пациентам региона, направленным с диагнозом В-ХЛЛ, проведены стандартные цитогенетические исследования (СЦИ) с использованием В-клеточных митогенов. Всего обследовано 53 пациента, средний возраст больных 62 года (от 31 до 78 лет), из них 36 мужчин (69,2 %, средний возраст — 61 год), 17 женщин (30,8 %, средний возраст —

64,8 лет). У 36 пациентов (68 %) СЦИ были дополнены флуоресцентной гибридизацией *in situ* (FISH), использовались следующие ДНК-пробы: P53(17p13.1) Deletion Probe (Cytocell), ATM(11q22.3) Deletion Probe (Cytocell), MYB(6q23.3) Deletion Probe (Cytocell), 13q14.3 (DLEU1) Deletion Probe (Cytocell), Chromosome 12 Alpha Satellite Probe (Cytocell).

Результаты. При СЦИ хромосомные aberrации (ХА) обнаружены у 34 пациентов (64,2 % случаев). С наибольшей частотой выявлена трисомия 12 (у 9 пациентов — в 17 % случаев), как единственная aberrация — у 4 больных (7,5 %), что соответствует промежуточному прогнозу течения заболевания, у 5 человек (9,4 %) в сочетании с другими ХА, что более характерно для неблагоприятного прогноза, в том числе у 3 пациентов (5,7 %) — в составе комплексного кариотипа. Del(11)(q22–23) обнаружена у 17 % больных, но как единственная aberrация только у од-

ного пациента, что также может соответствовать промежуточному прогнозу заболевания, у 8 человек (15 %) — в сочетании с другими ХА, у 4 из них — в составе комплексных изменений. Перестройки 17p, наличие которых всегда свидетельствует о неблагоприятном прогнозе, обнаружены у 4 пациентов (7,5 % случаев), у 3 из них — в составе комплексного кариотипа. Также с одинаковой частотой (у 3 человек — в 6 % случаев) выявлены del(13)(q14) и del(6)(q21). Del(13)(q14) как единственная аберрация не встречалась, у 2 пациентов (3,8 %) выявлена в составе комплексных изменений кариотипа. Del(6q) обнаружена у 2 больных (3,8 %) как единственная аберрация, у одного (1,9 %) — в составе комплексного кариотипа. Также были выявлены другие ХА: моносомия X у 4 человек (7,5 %) (у 3 из них — как единственная ХА), перестройки 2q (t(2;14)(q37; q11), t(2;5)(q21; q31), t(2;17)(q24; q11)), трисомия 2, отсутствие хромосомы Y выявлены у 2 пациентов (3,8 %) каждая. Комплексные изменения кариотипа описаны у 11 пациентов (20,8 %). Как единственные ХА также встречались add(15p), add(20)(p13). Во многих случаях FISH-исследованием были

подтверждены del(11q), del(17p), del(6q). У 3 человек была обнаружена делеция локуса гена *ATM* (11q22.3), у 1 пациента — делеция локуса гена *P53* (17p13.1), не выявленные при СЦИ.

Выводы. Частота выявления наиболее значимых аберраций в лаборатории соответствует среднестатистическим показателям. Исключение составляет выявление del(13)(q14), которая, согласно ряду исследований, считается наиболее частым структурным хромосомным нарушением, в нашей лаборатории del(13)(q14) обнаружена лишь в 6 % случаев. Вероятно, это связано с длительным отсутствием в лаборатории ДНК-пробы к этому локусу. С помощью комбинации СЦИ и FISH хромосомные аберрации описаны у 37 пациентов В-ХЛЛ (69,8 % случаев). Комбинация стандартного цитогенетического исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ* позволяет чаще выявлять цитогенетические аберрации. Но и проведение стандартного цитогенетического исследования необходимо, так как ряд цитогенетических нарушений может быть выявлен только при этом исследовании.

**Фоминых М. С.¹, Шухов О. А.², Шуваев В. А.¹, Мартынкевич И. С.¹, Полушкина Л. Б.¹,
Чельшева Е. Ю.², Туркина А. Г.², Четкин А. В.¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СОЧЕТАННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В Rh-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ И МУТАЦИЙ ГЕНА *BCR-ABL* У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ ПРИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

Введение. Около 30–40 % больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в хронической фазе не достигают оптимального ответа на терапию иматинибом, основной причиной чего является резистентность к лечению. Основными причинами резистентности признаны дополнительные хромосомные аберрации (ДХА) в Rh-положительных клетках и мутации гена *BCR-ABL*. Пациенты, у которых выявляются мутации гена *BCR-ABL* (особенно в области Р-петли и мутация кодона Т315) и ДХА в Rh-положительных клетках, имеют неблагоприятный прогноз и высокий риск прогрессии заболевания в продвинутые

фазы. На данный момент в литературе имеется лишь несколько сообщений о сочетанном влиянии ДХА и точечных мутаций гена *BCR-ABL* на прогноз и течение ХМЛ.

Цель. Оценить клиническое значение сочетанного обнаружения мутаций гена *BCR-ABL* и ДХА в Rh-положительных клетках для общей выживаемости и летальности, связанной с прогрессированием заболевания у пациентов с ХМЛ.

Материалы и методы. В исследование были включены данные 30 пациентов с ДХА в Rh-положительных клетках, которые наблюдались в нашем центре с 2005 по 2015 год.

Все пациенты получали терапию ингибиторами тирозинкиназ. Медиана возраста составила 47 лет (20–75 лет), 14 (47 %) женщин и 16 (53 %) мужчин. По шкале Sokal больные распределялись следующим образом: низкий риск — 6 (20 %), промежуточный — 10 (33 %), высокий — 14 (47 %). 5 больных (17 %) были отнесены к высокой группе риска по шкале EUTOS. У 23 (77 %) пациентов была верифицирована хроническая фаза в момент диагностики и у 7 (23 %) — фаза акселерации. 26 (87 %) пациентов начали терапию иматинибом в дозировке 400 мг в сутки, 3 (10 %) получали нилотиниб 400 мг 2 раза в сутки и 1 (3 %) больной начал лечение дазатинибом в дозе 100 мг в сутки. Проводился анализ общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ. Многопараметрический регрессионный анализ при помощи метода Кокса включал в себя следующие параметры: количество ДХА, вариант ДХА, возраст, вариант ИТК, фаза заболевания в момент диагностики (хроническая или фаза акселерации), сочетание мутаций гена *BCR-ABL* и ДХА. Для расчета кумулятивной частоты летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ, использовался метод оценки кумулятивной частоты событий (CIF), с учетом конкурирующих факторов (в данном случае — это смерть, обусловленная другими причинами). Сравнительный анализ частоты событий проводился методом Грея.

Результаты. Медиана наблюдения в группе больных с ДХА ($n = 30$) составила 51 месяц (3–124 месяца). Всего 6 (20 %) больных умерло на момент проведения анализа данных, у 5 (17 %) из них была зарегистрирована прогрессия заболевания. Сочетание мутаций гена *BCR-ABL* и ДХА в Ph-положительных клетках было выявлено у 6 (20 %) пациентов. Всего было обнаружено 5 различных мутаций (*T315I*, *E355G*, *G250E*, *D363Y*, *E279K*), при

этом у одного пациента одновременно выявлены 2 мутации (*F359C* и *T315I*). 46 % больных (12/26) переведены на вторую линию терапии с иматиниба на нилотиниб и дазатиниб, третья линия терапии дазатинибом в дальнейшем проводилась у 12 % (3/26) пациентов. Среди больных, которые начали лечение ингибиторами тирозинкиназ 2-го поколения, 2 (50 %) переведены с нилотиниба на дазатиниб. ДХА «большого пути» (трисомия 8, +der(22)t(9;22)(q34;q11), i(17)(q10), трисомия 19) обнаружены у 16 (53 %) больных. По данным многопараметрического регрессионного анализа сочетанное обнаружение мутаций гена *BCR-ABL* и ДХА в Ph-положительных клетках оказывало статистическую значимость на ОВ ($p = 0,003$) и летальность, связанную с прогрессией заболевания ($p = 0,003$) с момента выявления ДХА. Результаты проведенного сравнительного анализа продемонстрировали значительное влияние на выживаемость у больных ХМЛ с сочетанием ДХА в Ph-положительных клетках с мутациями гена *BCR-ABL*. Обнаружение мутаций в дополнение к ДХА в Ph-положительных клетках достоверно уменьшает общую 4-летнюю выживаемость — 28 %, против 95 % в группе с ДХА, но без мутаций, $p < 0,0001$ и увеличивает кумулятивную частоту летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ (4-летняя 72 %) по сравнению с пациентами, у которых определялись только ДХА (4-летняя 5 %), $p = 0,0003$.

Заключение. Наше исследование демонстрирует, что сочетанное обнаружение ДХА в Ph-положительных клетках и мутаций гена *BCR-ABL* у больных ХМЛ оказывает значимое влияние на прогноз и течение заболевания. Пациенты с одновременным выявлением мутаций гена *BCR-ABL* и ДХА имеют плохой прогноз и могут быть отнесены к высокой группе риска.

**Фоминых М. С.¹, Шухов О. А.², Шуваев В. А.¹, Мартынкевич И. С.¹, Иванова М. П.¹,
Челышева Е. Ю.², Туркина А. Г.², Четкин А. В.**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» Федерального медико-биологического агентства, г. Санкт-Петербург

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Гематологический научный центр» Минздрава России, г. Москва

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ХРОСОМНЫХ АНОМАЛИЙ В Rh-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ МИЕЛОЛЕЙКОЗОМ В ЭРУ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ

Введение. Выявление дополнительных хромосомных аномалий (ДХА) у больных с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) до внедрения ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) ассоциировалось с резистентностью к терапии и ухудшением общей выживаемости. Существующая классификация ДХА основывается только на частоте выявления тех или иных аномалий, и клиническое значение этих аберраций в настоящий момент противоречиво. Особого внимания заслуживают комплексные ДХА, так как известно, что обнаружение сложных хромосомных перестроек при других гематологических заболеваниях относится к негативным прогностическим факторам.

Целью нашего исследования было определить клиническое влияние комплексных ДХА в Rh-положительных клетках у больных с ХМЛ при терапии ИТК.

Материал и методы. В исследование были включены данные 30 пациентов с ДХА в Rh-положительных клетках, которые наблюдались в нашем центре с 2005 по 2015 год. Цитогенетическое исследование костного мозга проводили стандартным цитогенетическим методом (не менее 20 метафазных пластин), интерпретацию патологии кариотипа производили в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом [ISCN, 2013]. Проводился анализ общей выживаемости (ОВ) и кумулятивной частоты летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ. Многопараметрический регрессионный анализ при помощи метода Кокса включал в себя следующие параметры: количество ДХА, вариант ДХА, возраст, вариант ИТК, фаза заболевания в момент диагностики (хроническая или фаза акселерации). Для расчета кумулятивной частоты летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ, использовался метод оценки кумулятивной частоты событий (CIF), с учетом конкурирующих факторов (в данном

случае — это смерть, обусловленная другими причинами). Сравнительный анализ частоты событий проводился методом Грея.

Результаты. Медиана наблюдения в группе больных с ДХА ($n = 30$) составила 51 месяц (3–124 месяца). Хроническая фаза заболевания в момент диагноза была установлена у 23 (77 %) пациентов. Иматиниб в качестве терапии первой линии применялся у 20 (67 %) пациентов, 3 (10 %) больных получали нилотиниб. Фаза акселерации была верифицирована у 7 (23 %) пациентов, в этой группе 6 больных начали терапию иматинибом и еще один пациент получал терапию дазатинибом. ДХА «большого пути» (трисомия 8, +der(22)t(9;22)(q34;q11), i(17)(q10), трисомия 19) обнаружены у 16 (53 %) больных. Комплексные ДХА (2 и более аномалии) были выявлены у 7 (23 %) пациентов, при этом у 4 из них обнаруживались ДХА «большого пути». Общая 10-летняя выживаемость во всей группе пациентов с ДХА составила 67 %, кумулятивная частота летальных исходов по причине прогрессии ХМЛ — 23 %. По данным многопараметрического регрессионного анализа статистическую значимость оказывали следующие факторы: количество ДХА ($p = 0.03$, HR = 13.2) и возраст ($p = 0.03$, HR = 1.14). При сравнительном анализе 10-летняя ОВ составила 31 % и 77 % ($p < 0.05$) у больных с комплексными ДХА и с одной ДХА, соответственно. 10-летняя кумулятивная частота летальных исходов, связанных с прогрессией ХМЛ, также была выше в группе больных с комплексными ДХА — 54 % против 10 % в группе с одной ДХА в Rh+-клетках, ($p < 0.05$).

Заключение. Результаты нашего исследования демонстрируют, что при терапии ИТК больные с ХМЛ, у которых выявляются комплексные ДХА, подвержены более высокому риску прогрессии заболевания и, как следствие, летальности, по сравнению с пациентами, у которых выявляется только одна ДХА.

Харченко Т. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова Министерства здравоохранения России, Санкт-Петербург

ПРОБЛЕМЫ ПОДГОТОВКИ ЛАБОРАТОРНЫХ ГЕНЕТИКОВ ДЛЯ ГЕМАТОЛОГИИ

В настоящее время генетические методы играют важнейшую роль в диагностике и прогнозировании течения заболевания и оценки эффективности применяемой терапии. В связи с этим подготовка квалифицированных кадров для решения этих задач приобретает первостепенное значение. Одной из проблем является определение того, специалисты какой специальности должны выполнять генетические исследования. С одной стороны, гематологическая диагностика является одним из направлений клинической лабораторной диагностики (КЛД) и генетические исследования в этой области должны выполняться этими специалистами, однако молекулярно-генетические и, особенно, цитогенетические методы полностью являются прерогативой врачей лабораторных генетиков и не входят в систему подготовки врачей КЛД. В то же время, существующие программы подготовки врачей лабораторных генетиков, напротив, направлены в первую очередь на подготовку врачей для диагностики наследственной патологии и не включают в себя специальные знания по гематологии. Тестовые задания сдачи сертификационного экзамена для лабораторных генетиков также предусматривают наличие специальных знаний в области диагностики именно наследственной патологии. Во многих регионах в гематологических стационарах отсутствуют ставки врачей лабораторных генетиков и материал для исследования направляется в лаборатории медико-генетических центров, где есть такие специалисты. Безусловно, цитогенетические методы диагностики универсальны для всех тканей, однако существует целый ряд особенностей, отличающих работу с опухолями,

и даже опытный цитогенетик, впервые столкнувшийся с таким материалом, испытывает серьезные трудности в работе. Различия касаются как методики приготовления хромосомных препаратов, так и подхода к анализу кариотипа и, самое главное, интерпретации полученных результатов, что может приводить к невозможности выдачи врачами медико-генетических центров квалифицированных заключений по опухолевым тканям. В ряде случаев, напротив, прямо на местах в лабораториях гематологических стационаров происходит расширение функциональных обязанностей врачей КЛД до генетической диагностики. Обучение специалистов в таких случаях проводится в краткосрочном режиме в виде усовершенствования на рабочем месте, без получения соответствующих диплома и сертификата, что неизбежно ведет к отсутствию систематической подготовки и влечет за собой проблемы квалификации специалистов и аккредитации лабораторий. Фактически, клиническая цитогенетика разделилась сейчас на два основных направления — диагностика врожденной патологии и онкогематологическая диагностика и необходимо максимально оптимизировать подготовку специалистов для этих направлений. Возможно, проблему удастся разрешить при переходе на новую систему последипломного образования — обучения по системе непрерывного медицинского образования и аккредитации специалистов, для этого необходимо разработать отдельные аккредитационные программы, учитывающие различие задач, стоящих перед лабораторными генетиками, занятыми в диагностике наследственной патологии и онкогематологии.

Цаур Г. А. ^{1, 2, 3, 4}

- ¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург
- ² Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
- ³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург
- ⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

РОЛЬ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО (СЛЕДУЮЩЕГО) ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗОВ

Введение. Технологии секвенирования нового поколения (next generation sequencing –NGS) прочно вошли в клиническую практику при большинстве онкологических и онкогематологических заболеваний за рубежом. Однако в нашей стране в силу технологической сложности и относительно высокой стоимости подобные исследования выполняются в ограниченном количестве мест.

Цель. На основе анализа литературных данных описать возможности технологии NGS в диагностике острых лейкозов (ОЛ) и мониторинге минимальной остаточной болезни (МОБ).

Материалы и методы. В работе представлены результаты опубликованных исследований за период 2012–2016 годов, показывающие основные возможности и ограничения технологии NGS в диагностике ОЛ.

Результаты. Показана роль NGS в диагностике ОМЛ, ОЛЛ у детей и взрослых, по-

казаны различия в профиле выявляемых генетических аномалий. Отмечено значение высокоточных алгоритмов анализа данных. Определено значение NGS в мониторинге минимальной остаточной болезни при ОЛЛ у детей и взрослых. Проведен сравнительный анализ выявления МОБ стандартными методами (ПЦР с выявлением индивидуальных перестроек генов *Ig/TCR* и многоцветная проточная цитометрия) и NGS. Показаны преимущества и недостатки каждого из методов.

Выводы. Таким образом, секвенирование нового поколения является важным диагностическим механизмом, позволяющим на относительно небольшом количестве материала (ДНК, РНК) охарактеризовать десятки и сотни генетических aberrаций, оценить их совместное прогностическое значение.

Цаур Г. А.^{1, 2, 3, 4}, **Друй А. Е.**^{2, 5}, **Солодовников А. Г.**^{2, 4}, **Попов А. М.**⁵, **Шапочник А. П.**⁶,
Вержбицкая Т. Ю.^{1, 2}, **Вахонина Л. В.**^{1, 2}, **Власова А. А.**¹, **Ригер Т. О.**^{1, 2}, **Ольшанская Ю. В.**⁵,
Шорилов Е. В.⁷, **Цвиренко С. В.**^{1, 4}, **Стренева О. В.**^{1, 2}, **Савельев Л. И.**^{1, 2, 4}, **Фечина Л. Г.**¹

- ¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург
- ² Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург
- ³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург
- ⁴ Государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург
- ⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава России, Москва
- ⁶ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», Оренбург
- ⁷ Общество с ограниченной ответственностью «ПЭТ-технологии», Екатеринбург

ДЕЛЕЦИИ В ГЕНЕ *IKZF1* (IKAROS) У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМ ЛИМФОБЛАСТНЫМ ЛЕЙКОЗОМ ИЗ В-ЛИНЕЙНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Введение. Делеции в гене *IKZF1* являются прогностически значимым фактором, ассоциированным с неблагоприятным ис-

ходом острого лимфобластного лейкоза из В-линейных предшественников (ВП-ОЛЛ) у детей, получавших лечение в разных стра-

нах по различным терапевтическим протоколам. Однако в нашей стране подобные исследования ранее не проводились.

Цель. Оценка распространенности и прогностического значения делеций *IKZF1* у пациентов с ВП-ОЛЛ, получавших лечение в детских онкогематологических клиниках Екатеринбурга и Оренбурга.

Материалы и методы. В исследование был включен 141 пациент с ВП-ОЛЛ в возрасте от 1,1 до 16 лет (медиана 3,15 лет). Выявление делеций в гене *IKZF1* проводили методом множественной лигазной амплификации зондов (MLPA) с использованием наборов *SALSA MLPA P335 ALL-IKZF1* и *SALSA MLPA P202 IKZF1* (IKAROS) (оба «MRC-Holland», Нидерланды) согласно инструкции производителя.

Результаты. Делеции *IKZF1* были обнаружены у 15 (10,6 %) пациентов. Делеция всего гена обнаружена в 3 (20 %) случаях, самые частые из фокальных делеций — делеции экзонов 4–7 и экзонов 2–7 — обнаружены в 4 (26,7 %) случаях каждая. Делеции *IKZF1* чаще выявляли у детей старше 10 лет ($p = 0,007$), при инициальном лейкоцитозе выше $30 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,003$) и наличии транслокации $t(9;22)(q34;q11)$ ($p = 0,003$). Наличие делеций сопровождалось замедленным клиренсом бластных клеток: М3-статусом костного мозга (КМ) на 15-й день индукционной терапии ($p = 0,003$), отсутствием клинико-гематологической ремиссии ($p < 0,001$), высоким уровнем минимальной остаточной болезни (МОБ) на 15-й, 36-й и 85-й дни терапии ($p = 0,014$; $p < 0,001$; $p = 0,001$ соответственно). Больные с делециями *IKZF1* имели более низкие показатели бессобытийной выживаемости (БСВ)

($0,30 \pm 0,15$ и $0,89 \pm 0,03$; $p < 0,001$) и общей выживаемости (ОВ) ($0,44 \pm 0,19$ и $0,93 \pm 0,02$; $p < 0,001$) и более высокую кумулятивную вероятность развития рецидива ($0,67 \pm 0,18$ и $0,07 \pm 0,02$; $p < 0,001$). Проведение многофакторного анализа показало, что делеции *IKZF1* являются независимым фактором, снижающим БСВ (относительный риск — ОР 4,755; 95 % ДИ 1,856–12,185; $p = 0,001$), ОВ (ОР 4,208; 95 % ДИ 1,322–13,393; $p = 0,015$) и увеличивающим риск рецидива (ОР 9,083; 95 % ДИ 3,119–26,451; $p < 0,001$). Наиболее ярко неблагоприятное прогностическое значение делеций *IKZF1* проявилось в группе промежуточного риска ($p < 0,001$), а у больных из стандартной и высокой групп риска наличие делеций не было связано с прогнозом. Большинство делеций *IKZF1*–12 из 15 (80 %) было выявлено в группе «другие В-линейные ОЛЛ» ($n = 83$). В этой группе делеции *IKZF1* являлись независимым фактором, снижающим БСВ (ОР 6,172; 95 % ДИ 1,834–20,767; $p = 0,003$) и увеличивающим риск рецидива (ОР 16,303; 95 % ДИ 3,324–79,965; $p = 0,015$). Важно отметить, что даже при включении в многофакторную модель такого мощного показателя как МОБ, делеции *IKZF1* сохраняли свое независимое прогностическое значение по влиянию на БСВ, ОВ и риск рецидива.

Выводы. Таким образом, мы охарактеризовали частоту встречаемости делеций у детей с ВП-ОЛЛ; показали, что делеции гена *IKZF1* являются независимым фактором, ухудшающим прогноз ВП-ОЛЛ у детей в РФ. Независимое прогностическое значение делеций сохраняется даже в присутствии факторов ответа на терапию, включая МОБ.

Шихбабаева Д. И., Мартынкевич И. С., Шуваев В. А., Капустин С. И., Полушкина Л. Б., Замотина Т. Б., Фоминых М. С., Удальева В. Ю., Зотова И. И., Шмелева В. М., Смирнова О. А., Волошин С. В., Бессмельцев С. С., Чечеткин А. В., Абдулкадыров К. М.

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА НА ТРОМБОТИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ИСТИННОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ

Введение. Тромботические осложнения — одна из основных причин инвалидизации и смерти больных истинной полицитемией (ИП). Выделяется множество факторов, влияющих на частоту тромбозов при ИП. Однако до сих пор не определена роль генетических особенностей системы гемостаза в развитии тромботических осложнений у больных ИП.

яющих на частоту тромбозов при ИП. Однако до сих пор не определена роль генетических особенностей системы гемостаза в развитии тромботических осложнений у больных ИП.

Цель. Целью исследования было оценить влияние наличия протромбогенных вариантов аллельных полиморфизмов генов *FV* (Лейденская мутация), протромбина, метилтетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), фибриногена (*FI*), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*), тромбоцитарного рецептора фибриногена (*GP11A*), гипергомоцистеинемии на частоту тромботических осложнений у больных ИП.

Материалы и методы. В ходе исследования была собрана и проанализирована информация о частоте встречаемости протромбогенных вариантов аллельных полиморфизмов генов *FV*, протромбина, *MTHFR*, *FI*, *PAI-1*, *GP11A* у 116 больных ИП (51 мужчина и 65 женщин). Медиана возраста пациентов на момент постановки диагноза составила 59,5 лет (от 28 до 81 года). Медиана периода наблюдения составила 5 лет (от 0,13 до 35 лет). У всех больных была обнаружена мутация *JAK2V617F*. Больные были обследованы методом ПЦР на наличие полиморфизма нуклеотидов в следующих генах: *FV* (G1691A, или Лейденская мутация), протромбина (G20210A), метилтетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*, C677T), фибриногена (*FI*, —455G/A), ингибитора активатора плазминогена (*PAI-1*, —675 4G/5G), тромбоцитарного гликопротеина IIIa (*GP11a*). Была проанализирована общая частота наличия протромботических вариантов указанных генов и статистическая значимость различий их частот в группах больных ИП с тромбозами (артериальными и венозными) в анамнезе и без таковых. Проведено сравнение с контрольной группой (КГ), которую составили 228 здоровых индивидов. У 36 из 116 (31 %) больных был исследован уровень гомоцистеина.

Для анализа данных использовались методы описательной статистики, значимость межгрупповых различий в распределении генотипов оценивали с помощью точного метода Фишера. Различия уровня гомоцистеина оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Результаты. Между группами больных ИП, больных ИП с тромбозами и контрольной группой статистически значимые различия

получены в генах *MTHFR* и *GP3a* ($p < 0,05$). Протромботический вариант аллельного полиморфизма гена *MTHFR* значительно чаще встречался в общей группе больных ИП, а также группе больных ИП с тромбозами по сравнению с контрольной группой. Статистические значимые различия в частоте встречаемости мутации гена *FV* ($p = 0,02$) при сравнении групп больных ИП с венозными тромбозами и больных ИП без тромбозов, а также статистические тенденции по гену *FV* ($p = 0,06$) в группах больных с артериальными и венозными тромбозами. Мутация в гене *FV* значительно чаще встречалась в группе больных ИП с венозными тромбозами. Статистические тенденции получены по частоте встречаемости мутации в гене протромбина ($p = 0,08$) между группами больных ИП с артериальными тромбозами и группой больных без тромбозов. В группе больных с артериальными тромбозами мутация в гене протромбина встречена чаще, чем в группе больных без тромбозов.

Группы больных ИП с тромбозами и без статистически значимо отличались друг от друга по уровню гомоцистеина ($p = 0,0001$). В группе больных с тромбозами средний уровень гомоцистеина составил 16,5 мкмоль/л, в группе больных без тромбозов — 10,7 мкмоль/л. При сравнении групп больных с наличием протромботического варианта аллельного полиморфизма гена *MTHFR* и без него также были получены статистически значимые различия по уровню гомоцистеина ($p = 0,00007$). В группе больных с наличием протромботического полиморфизма гена *MTHFR* он составил 16,5 мкмоль/л, в группе с нормальным генотипом 10,3 мкмоль/л.

Выводы. Протромботический вариант аллельного полиморфизма гена *MTHFR* (C677T), мутация в гене *FV* (Лейденская мутация) и гипергомоцистеинемия могут рассматриваться как факторы риска развития тромботических осложнений у больных ИП. Изучение генетических особенностей системы гемостаза у больных ИП в дебюте заболевания может помочь в оценке риска тромботических осложнений и обеспечить своевременную их профилактику.

