УДК 616-006.446.8
DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17086
ISSN – 2073-8137

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ

А. В. Виноградов [1, 2], А. В. Резайкин [1], С. В. Сазонов [1, 3], Е. В. Щетинин [4, 5], Д. В. Бобрышев [4], А. Г. Сергеев [1]

[1] Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Российская Федерация
[2] Министерство здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Российская Федерация
[3] Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Российская Федерация
[4] Ставропольский государственный медицинский университет, Российская Федерация
[5] Краевой клинический онкологический диспансер, Ставрополь, Российская Федерация

THE SURVEY OF THE AGE DYNAMICS OF GENETIC AND MORPHOLOGICAL VARIANTS OF THE ACUTE MYELOID LEUKEMIAS

Vinogradov A. V. [1, 2], Rezaykin A. V. [1], Sazonov S. V. [1, 3], Shchetinin E. V. [4, 5], Bobryshev D. V. [4], Sergeev A. G. [1]

[1] Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation
[2] Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russian Federation
[3] Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation
[4] Stavropol State Medical University, Russian Federation
[5] Regional Clinical Oncology Center, Stavropol, Russian Federation

В исследование включены 257 больных ОМЛ, из них 153 в возрасте 15–59 лет, 104 – старше 60 лет. Скрининг хромосомных мутаций генов c-KIT, FLT3, NPM1, NRAS и TP53 проводили в лейкозных бластах с использованием стандартного цитогенетического метода и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени методом прямого автоматического мРНК-секвенирования. Преобладающим морфологическим вариантом ОМЛ в исследуемой группе по FAB-классификации был М2. При этом у больных пожилого и старческого возраста выявлено статистически значимое увеличение доли острых миелобластных лейкозов (подтипы М1 и М2 по FAB), но не острого промиелоцитарного лейкоза (М3 по FAB). Цитогенетический вариант ОМЛ был уточнен в 82,1 % проб. Преобладающим вариантом была диплоидия (39,8 %). При этом ее частота, наряду с ОМЛ с неуточненным кариотипом, статистически значимо увеличивалась в группе больных пожилого и старческого возраста. Частота специфических хромосомных мутаций, ассоциированных с благоприятным прогнозом, была максимальной в группе больных моложе 60 лет (29,4 %) и, напротив, снижалась в 3,2 раза в старшей возрастной группе. Генные мутации определялись в бластах на этапе диагностики ОМЛ у 34,2 % больных: FLT3 17,1 %, NPM1 13,4 %, NRAS 10,1 %, TP53 8,7 %, c-KIT 6,5 %. Возрастные различия определены для мутаций TP53, частота которых в старшей возрастной группе увеличивалась в 13,5 раз. Мутации c-KIT, напротив, определялась в 3,3 раза чаще в возрастной группе больных моложе 60 лет. Частота двойных мутаций составила 6,3 % и не изменялась в зависимости от возраста, что может быть обусловлено ограниченным объемом выборки и панели исследуемых генов.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, морфология, мутации, цитогенетика, секвенирование, возраст

The study includes the 257 patients with AML, 153 of them are 15–59 years old, 104 – aged 60 years and older. Screening of chromosomal mutations in leukemic blasts was performed using the standard cytogenetic method and real-time polymerase chain reaction, mutations in the c-KIT, FLT3, NPM1, NRAS and TP53 genes were detected by direct automatic mRNA sequencing. The predominant morphological variant of AML in the study group according to the FAB classification was M2 – 43.6 %. The statistically significant increasing in the proportion of acute myeloblastic leukemias (subtypes M1 and M2 according to FAB) was revealed in elderly and senile patients, and on the contrary, the decreasing in the frequency of acute promyelocytic leukemia (M3 according to FAB) was detected. The cytogenetic variant of AML was clarified in 82.1 % of the samples. The predominant variant was diploidy (39.8 %). Its frequency, along with AML with an unspecified karyotype,

statistically significantly increased in the group of elderly and senile patients. The frequency of specific chromosomal mutations associated with a favorable prognosis was maximum in the group of patients, younger than 60 years (29.4 %), and on the contrary, decreased in 3.2 times in the older age. Gene mutations were detected in leukemic blasts at the stage of AML diagnosis in 34.2 % of patients: FLT3 17.1 %, NPM1 13.4 %, RAS 10.1 %, TP53 8.7 %, c-KIT 6.5 %. Age differences were determined for TP53 mutations, the frequency of which in the older age group increased by 13.5 times. c-KIT mutations, on the contrary, were detected 3.3 times more often in the age group of patients younger than 60 years. The frequency of double mutations was 6.3 % and did not change depending on age, which may be due to the limited sample size and the panel of studied genes.

Keywords: acute myeloid leukemia, morphology, mutations, cytogenetics, sequencing, age

Для цитирования: Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сазонов С. В., Щетинин Е. В., Бобрышев Д. В., Сергеев А. Г. ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗОВ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022;17(4):357-360.
DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17086

For citation: Vinogradov A. V., Rezaykin A. V., Sazonov S. V., Shchetinin E. V., Bobryshev D. V., Sergeev S. V. THE SURVEY OF THE AGE DYNAMICS OF GENETIC AND MORPHOLOGICAL VARIANTS OF THE ACUTE MYELOID LEUKEMIAS. *Medical News of North Caucasus.* 2022;17(4):357-360. DOI – https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17086 (In Russ.)

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
ДИ – доверительный интервал
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
ОМЛ – острый миелоидный лейкоз
ПЦР – полимеразная цепная реакция
FAB-классификация – франко-американо-британская классификация лейкозов

Развитие злокачественных новообразований крови – это, как правило, многоэтапный процесс, связанный с генетической диверсификацией и отбором неопластических клонов, содержащих те или иные мутации [1, 2]. Соответственно на генетическом уровне можно выделить доклинические (предопухолевые) стадии и собственно манифестацию опухоли. При этом предопухоли на клеточном уровне могут персистировать несколько лет или даже десятилетий как в случае хронических, так и острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) [3, 4]. Доклиническая стадия заболевания может быть выявлена случайно путем скрининга здоровых людей и характеризуется нормальными или близкими к нормальным показателями крови и обнаружением одной или нескольких соматических мутаций, которые по отдельности проявляют низкий онкогенный потенциал. При этом пенетрантность такого состояния в миелоидное новообразование в течение жизни не является полной, так как зависит от количества и типа мутаций, а также продолжительности наблюдения. Соответственно мутационный профиль и фенотипические характеристики ОМЛ, манифестирующих в молодом, зрелом, пожилом и старческом возрасте, могут различаться [4, 5].

Цель исследования – изучить возрастную динамику генетических и морфологических подтипов острых миелоидных лейкозов у взрослых пациентов.

Материал и методы. Исследуемая группа состояла из 257 больных, в том числе 153 в возрасте от 15 до 60 лет, 104 – в возрасте 60 лет и старше, с впервые выявленным ОМЛ. Средний возраст составил 50,8±2,1 года. Пациенты проходили обследование и лечение в отделениях гематологии и химиотерапии с 2008 по 2021 год. Во всех случаях получено добровольное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Среди обследуемых женщины составляли 51,0 %, мужчины – 49,0 %.

Диагноз лейкоза устанавливали в соответствии с рекомендациями ВОЗ и критериями FAB-классификации. Проводили морфологическую верификацию варианта ОМЛ, включая цитологические, цитохимические исследования и иммунофенотипирование аспирата костного мозга, в отдельных случаях – гистологическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата подвздошной кости [2, 3].

Для детекции хромосомных аберраций выполняли стандартный цитогенетический анализ и полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени для детекции специфических аберраций хромосом t(3;21)(q26;q22), t(8;21)(q22;q22), t(9;22)(q34.1;q11.2), t(15;17)(q24;q21), inv(16)(p13;q22), сегмента 11q23.

Скрининг точечных мутаций осуществляли в 5 генах, в т. ч. c-KIT, FLT3, NPM1, NRAS и TP53 методом прямого автоматического секвенирования мРНК по ранее описанным методикам [6, 7]. Панель мутаций для молекулярно-генетического скрининга была разработана на основе международных рекомендаций [2, 5]. Среднее число исследованных генов на одного пациента составило 3,3 (диапазон 1–5).

Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеиновых кислот и белков осуществляли с использованием программного пакета MEGA X [8]. Для статистического анализа частот использовали критерий χ^2, доверительные интервалы (ДИ) устанавливали на основе биномиального распределения.

Результаты и обсуждение. В ходе проведенного исследования в 112 случаях из 257 (43,6 %, при 95 % ДИ от 37,7 до 49,7 %) у больных с ОМЛ был выявлен М2 морфологический вариант по FAB-классификации. У 63 (24,5 %, при 95 % ДИ от 19,7 до 30,1 %) пациентов определен подтип М4 ОМЛ, а у 30 (11,7 %, при 95 % ДИ от 8,3 до 16,2 %) – М3. Частота остальных вариантов ОМЛ не превышала 10 % (табл.). При этом у больных пожилого и старческого возраста выявлена тенденция к увеличению доли острых миелобластных лейкозов (подтипы М1 и М2 по FAB). Так, если у больных молодого возраста их доля составляла 46,4 % (при 95 % ДИ от 38,7 до 54,3 %), то в возрасте 60 лет и старше – 58,7 % (при 95 % ДИ от 49,1 до 67,7 %) (табл.), при статистическом анализе достоверности различий критерий χ^2=3,72, p=0,05.

Напротив, острый промиелоцитарный лейкоз (вариант М3 по FAB) в группе пациентов моложе 60 лет определялся в 3,4 раза чаще, чем у больных в возрас-

те 60 лет и старше (χ^2=7,99, p=0,01). Также обращает на себя внимание, что морфологический подтип М4эо определялся только в группе молодых больных, однако для доказательства указанной тенденции необходимо дальнейшее увеличение объема выборки (χ^2=2,06, p=0,15). По прочим морфологическим подтипам ОМЛ статистически значимых возрастных отличий выявлено не было.

Таблица

Распределение морфологических подтипов ОМЛ в зависимости от возраста

Морфологический вариант по FAB	Частота детекции, %	
	в возрасте моложе 60 лет	в возрасте 60 лет и старше
M0	4,6	2,9
M1	4,6	12,5
M2	41,8	46,2
M3	16,3	4,8
M4	23,5	26
M4эо	2,0	0
M5	2,6	1,9
M6	2,0	2,9
M7	1,3	0
Прочие	1,3	2,9

Цитогенетический вариант ОМЛ удалось уточнить в 211 пробах (82,1 %, при 95 % ДИ от 77,0 до 86,3 %) со статистически достоверными (χ^2=11,85, p<0,01) различиями эффективности кариотипирования проб в зависимости от возраста пациентов. В 17 пробах костного мозга больных в возрасте младше 60 лет (11,1 %, при 95 % ДИ от 7,0 до 17,1 %) и 29 – пожилого и старческого возраста (27,9 %, при 95 % ДИ от 20,2 до 37,2 %) уточнить кариотип лейкозных бластов не удалось ввиду отсутствия митозов в клетках.

Выявлена существенная разница в возможности обнаружения специфических хромосомных мутаций, ассоциированных с благоприятным прогнозом, у лиц разных возрастных групп (χ^2=11,26, p<0,01): их частота в группе больных моложе 60 лет составляла 29,4 % (при 95 % ДИ от 22,4 до 37,5 %), тогда как в старшей возрастной группе – в 3,2 раза ниже (9,3 %, при 95 % ДИ от 4,6 до 18,0 %). Для диплоидного кариотипа ОМЛ, напротив, имелась тенденция к увеличению частоты в группе больных в возрасте 60 лет и старше (48,0 %, при 95 % ДИ от 37,1 до 59,1 %), против 35,3 % (при 95 % ДИ от 27,8 до 43,6 %) в возрасте моложе 60 лет (χ^2=3,26, p=0,07).

Методом прямого автоматического мРНК-секвенирования установлено, что у 34,2 % больных (при 95 % ДИ от 27,8 до 41,2 %) генные мутации выявлялись в лейкозных бластах на этапе диагностики ОМЛ. Среди них наиболее высокие частоты были определены для FLT3 (17,1 %, при 95 % ДИ от 12,2 до 23,4 %), NPM1 (13,4 %, при 95 % ДИ от 8,7 до 20,2 %) и NRAS (10,1 %, при 95 % ДИ от 5,6 до 17,6 %). Мутации антионкогена TP53 обнаруживались в 8,7 % случаев (при 95 % ДИ от 4,8 до 15,3 %). Наиболее редко выявлялись мутации в гене c-KIT, частота которых составила 6,5 % (при 95 % ДИ от 3,2 до 12,8 %). Генетический полиморфизм с. 1621 A>C в гене c-KIT определялся также в 6,5 % проб, в том числе в одном случае в сочетании с несинонимичной транзицией с. 1636 A>G, также, по-видимому, являющейся полиморфным аллельным вариантом гена.

Значительная возрастная динамика (χ^2=11,41, p<0,01) была определена для мутаций в гене TP53, частота которых в старшей возрастной группе увеличивалась в 13,5 раз по сравнению с больными ОМЛ в возрасте младше 60 лет (19,6 %, при 95 % ДИ от 10,7 до 33,2 %, против 1,5 %, при 95 % ДИ от 0,3 до 7,8 %). В большинстве наблюдений мутации затрагивали кодирующие последовательности ДНК-связывающего домена белка, что обусловливало нарушение функций белка. Для мутаций в гене c-KIT, напротив, определялась тенденция к увеличению их частоты в возрастной группе больных моложе 60 лет в 3,3 раза (8,7 %, при 95 % ДИ от 4,0 до 17,7 %, против 2,6 %, при 95 % ДИ от 0,5 до 13,2 % в возрасте 60 лет и старше, χ^2=1,77, p=0,18). При этом если в старшей возрастной группе выявленная мутация в гене c-KIT была представлена делецией, то в группе больных моложе 60 лет в 3 случаях – несинонимичными нуклеотидными заменами (2 делеции, 1 инсерция). По остальным исследованным генным мутациям, а также полиморфному аллелю c-KIT с. 1621 A>C статистически значимых возрастных различий при ОМЛ выявлено не было.

Мутации в двух исследованных генах определены в 6,3 % случаев (при 95 % ДИ от 3,5 до 11,2 %), из них в 9 пробах (5,7 %, при 95 % ДИ от 3,0 до 10,5 %) – определялись мутации в гене NPM1 в сочетании с другими генами: FLT3 (n=7; 4,4 %, при 95 % ДИ от 2,1 до 8,8 %), c-KIT и NRAS (по одному наблюдению, 0,6 %, при 95 % ДИ от 0,0 до 3,4 %). Еще в одном случае было обнаружено сочетание мутаций в генах c-KIT и NRAS. Таким образом, средняя частота генных мутаций составила 1,1 на пробу. Различий в частоте двойных мутантов в зависимости от возраста выявлено не было, что, возможно, обусловлено ограниченным спектром исследованных генов и объёмом выборки и требует дальнейшего изучения.

Таким образом, при ОМЛ взрослых выявляется возрастная динамика как по морфологическим, так и по цитогенетическим и молекулярно-генетическим подтипам. При этом, несмотря на увеличение в пожилом и старческом возрасте вариантов с нормальным и неуточненным кариотипом, среди генных мутаций статистически достоверно увеличивается частота мутаций в гене TP53, ассоциированных с комплексными хромосомными аберрациями [9]. При этом увеличение доли морфологических вариантов M1 и M2 по FAB коррелировало с повышенной частотой мутаций TP53, так как они выявлялись преимущественно при указанных подтипах ОМЛ. У больных ОМЛ в возрасте моложе 60 лет отмечалось увеличение частоты мутаций в гене c-KIT, прогностически благоприятных специфических хромосомных аномалий, а также морфологического варианта M3 по FAB. При этом известно, что детекция мутаций c-KIT характерна для ОМЛ с генетическими аберрациями, ассоциированными с благоприятным прогнозом, в том числе с подтипом M3 по FAB [9]. Выявленные различия в ходе многопараметрического анализа могут использоваться для разработки дифференцированных по возрасту программ персонализированного лечения ОМЛ [10,11].

Выводы

1. Общая частота точечных мутаций в генах c-KIT, FLT3, NPM1, NRAS и TP53 при ОМЛ составила 34,2 %, при этом наиболее часто мутации определялись в гене FLT3 (17,1 %). Мутации в двух исследованных генах определены в 6,3 % образцов.

2. ОМЛ у больных моложе 60 лет характеризовался более высокой частотой морфологического вари-

анта М3 по FAB, наличием специфических хромосомных аберраций, ассоциированных с благоприятным прогнозом, а также мутаций в гене c-KIT.

3. Морфологические варианты ОМЛ М1 и М2 по FAB, нормального и неуточненного кариотипов, в том числе с мутацией в гене TP53, чаще выявлялись у больных пожилого и старческого возраста.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Kishtagari A., Levine R. L., Viny A. D. Driver mutations in acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol*. 2020;27(2):49-57. https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000567
2. Döhner H., Wei A. H., Löwenberg B. Towards precision medicine for AML. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2021;18(9):577-590. https://doi.org/10.1038/s41571-021-00509-w
3. Kansal R. Classification of acute myeloid leukemia by the revised fourth edition World Health Organization criteria: a retrospective single-institution study with appraisal of the new entities of acute myeloid leukemia with gene mutations in NPM1 and biallelic CEBPA. *Hum. Pathol.* 2019;90:80-96. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.04.020
4. Valent P., Kern W., Hoermann G., Milosevic Feenstra J. D., Sotlar K. [et al.]. Clonal Hematopoiesis with Oncogenic Potential (CHOP): Separation from CHIP and Roads to AML. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20(3):789. https://doi.org/10.3390/ijms20030789
5. Baer C., Walter W., Hutter S., Twardziok S., Meggendorfer M. [et al.]. «Somatic» and «pathogenic» – is the classification strategy applicable in times of large-scale sequencing? *Haematologica.* 2019;104(8):1515-1520. https://doi.org/10.3324/haematol.2019.218917
6. Виноградов А. В., Изотов Д. В., Резайкин А. В., Сазонов С. В., Щетинин Е. В. [и др.]. Молекулярно-генетический анализ мутаций в гене c-KIT у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастном аспекте. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020;15(3):315-319. [Vinogradov A. V., Izotov D. V., Rezaykin A. V., Sazonov S. V., Shchetinin E. V. [et al.]. Molekulyarno-geneticheskij analiz mutacij v gene c-KIT u bol'nyh ostrymi mieloidnymi lejkozami v vozrastnom aspekte. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. – Medical News of North Caucasus.* 2020;15(3):315-319. (In Russ.)]. https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15075
7. Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сазонов С. В., Щетинин Е. В., Бобрышев Д. В., Сергеев А. Г. Мутационный статус острого миелобластного лейкоза с созреванием (М2) у взрослых больных. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2021;16(1):18-21. [Vinogradov A. V., Rezaykin A. V., Sazonov S. V., Shchetinin E. V., Bobryshev D. V., Sergeev S. V. Mutacionnyj status ostrogo mieloblastnogo lejkoza s sozrevaniem (M2) u vzroslyh bol'nyh. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. – Medical News of North Caucasus.* 2021;16(1):18-21. (In Russ.)]. https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16005
8. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018;35(6):1547-1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
9. Rose D., Haferlach T., Schnittger S., Perglerova K., Kern W., Haferlach C. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31(1):11-17. https://doi.org/10.1038/leu.2016.163
10. Carter J. L., Hege K., Yang J., Kalpage H. A., Su Y. [et al.]. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal. Transduct. Target. Ther.* 2020;5:288. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00361-x
11. Haferlach T., Schmidts I. The power and potential of integrated diagnostics in acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol*. 2020;188(1):36-48. https://doi.org/10.1111/bjh.16360

Поступила 05.10.2021

Сведения об авторах:

Виноградов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук,
главный специалист отдела организации специализированной медицинской помощи, врач-гематолог;
тел.: 89194389233; e-mail: a.vinogradov@egov66.ru; https://orcid.org/0000-0002-2033-3422

Резайкин Алексей Васильевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинской физики,
информатики и математики; тел.: 89126785460; e-mail: alexrez@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-8665-5299

Сазонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии;
тел.: 89122439164; e-mail: prof-ssazonov@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-7064-0079

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии, заведующий отделением клинической фармакологии;
тел.: (8652)352524; e-mail: ev.cliph@rambler.ru; https://orcid.org/0000-0001-6193-8746

Бобрышев Дмитрий Викторович, кандидат медицинских наук, начальник центра персонализированной медицины;
тел.: (8652)357369; e-mail: bobryshevrg@ya.ru; https://orcid.org/0000-0002-3947-4786

Сергеев Александр Григорьевич, доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии;
тел.: 89126862914; e-mail: sergeev@usma.ru