DOI: 10.20953/1726-1708-2016-1-41-45
УДК 616.155.34-008.64-053.1-092

Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2016, т. 15, №1, с. 41–45
Pediatric Haematology/Oncology and Immunopathology, 2016, volume 15, No 1, p. 41–45

Генетические предикторы неблагоприятного течения тяжелой врожденной нейтропении у пациентов с мутацией в гене *ELANE*

Е.А.Деордиева, Т.В.Варламова, Е.В.Райкина, А.Ю.Щербина

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Тяжелая врожденная нейтропения (ТВН) является редким генетически обусловленным заболеванием с обрывом созревания гранулоцитов в костном мозге и, как следствие, высоким риском развития угрожающих жизни инфекций. У большей части пациентов (60–80%) заболевание вызвано мутацией в гене *ELANE*. В подтверждение ранее опубликованных данных Международного регистра ТВН (Severe Congenital Neutropenia International Registry) мы показали ассоциацию конкретных мутаций в гене *ELANE* (в позициях C151 и G214) с особо тяжелым течением заболевания, что проявляется резистентностью к терапии гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и развитием миелодиспластического синдрома.

Ключевые слова: дети, врожденная нейтропения, циклическая нейтропения, мутация в гене ELANE, тяжесть течения, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром

Для цитирования: Деордиева Е.А., Варламова Т.В., Райкина Е.В., Щербина А.Ю. Генетические предикторы неблагоприятного течения тяжелой врожденной нейтропении у пациентов с мутацией в гене *ELANE*. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(1): 41–45. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-1-41-45

Genetic predictors of an unfavorable course of severe congenital neutropenia in patients with *ELANE* gene mutation

E.A.Deordieva, T.V.Varlamova, E.V.Raikina, A.Yu.Shcherbina

Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, Russian Federation

Severe congenital neutropenia (SCN) is a rare genetically determined disease with disruption of granulocyte maturation in bone marrow, resulting in a high risk of life-threatening infections. The disease is caused by *ELANE* gene mutation in the majority (60–80%) of patients. Our study confirms the data of the Severe Congenital Neutropenia International Registry: we have demonstrated an association of *ELANE* gene mutations (in C151 and G214 positions) with a particularly severe disease course, manifesting by resistance to therapy with granulocyte colony-stimulating factor and the development of myelodysplastic syndrome.

Key words: children, congenital neutropenia, cyclic neutropenia, ELANE gene mutation, severe course, granulocyte colony-stimulating factor, acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome

For citation: Deordieva E.A., Varlamova T.V., Raikina E.V., Shcherbina A.Yu. Genetic predictors of an unfavorable course of severe congenital neutropenia in patients with *ELANE* gene mutation. Vopr. gematol./onkol. immunopatol. pediatr. (Pediatric Haematology/Oncology and Immunopathology). 2016; 15(1): 41–45. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-1-41-45

Тяжелая врожденная нейтропения (ТВН) и ее более легкая разновидность – циклическая нейтропения (ЦН) являются редкими генетически обусловленными заболеваниями, сопровождающимися ранним блоком созревания нейтрофилов в костном мозге [1–4]. На сегодняшний день описано более 15 генов, мутации которых приводят к развитию ТВН и ЦН. Однако мутации в гене *ELANE*, наследуемые по аутосомно-доминантному типу, выявляются у 60–80% пациентов с ТВН/ЦН [5, 6]. Исследования показывают, что экспрессия мутантного гена *ELANE* приводит к неправильному фолдингу белка (процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространствен-

Для корреспонденции:

Деордиева Екатерина Анатольевна, врач аллерголог-иммунолог Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России

Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 1130
E-mail: deor2005@yandex.ru

Статья поступила 25.01.2016 г., принята к печати 21.03.2016 г.

For correspondence:

Ekaterina A. Deordieva, MD, Outpatient Department, Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of the Russian Federation

Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 1130
E-mail: deor2005@yandex.ru

The article was received 25.01.2016, accepted for publication 21.03.2016

ную структуру), вследствие чего он накапливается в клетке, вызывая апоптоз развивающихся миелоидных клеток и, в конечном итоге, приводит к неэффективному миелопоэзу [7–10]. У пациентов с ТВН, как правило, абсолютное количество нейтрофилов составляет менее чем 0,5 × 10^9/л [5], что сопровождается развитием тяжелых, угрожающих жизни инфекций, в связи с этим они нуждаются в пожизненном применении гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) [11]. Кроме того, больные с ТВН (но не с ЦН) имеют высокий риск развития миелодиспластичского синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) [12]. У части пациентов с ТВН ответ даже на крайне высокие дозы Г-КСФ отсутствует, что наряду со случаями развития МДС/ОМЛ является свидетельством особенно тяжелого течения заболевания и показанием к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [12]. Приобретенные соматические мутации в генах *CSF3R, RAS* и *RUNX1* связаны с развитием МДС и ОМЛ у больных с ТВН [13–15], однако на сегодняшний день отсутствует понимание молекулярно-генетической основы различий в риске развития лейкоза при ЦН и ТВН [16]. Помимо развития МДС/ОМЛ, крайне низкое количество гранулоцитов до начала терапии Г-КСФ и плохой ответ на терапию также относятся к критериям более тяжелого течения ТВН [11]. Однако исследователи расходятся во мнении по поводу корреляции генотипа и фенотипа у больных с мутациями в гене *ELANE*. Например, M.Germeshausen и соавт. [17] не выявили связи конкретных мутаций в гене *ELANE* с прогнозом заболевания [17], в то время как исследование Французской группы показало связь мутации G185R с тяжелым течением заболевания в трех семьях [18].

Пациенты и методы

Мы провели ретроспективный анализ историй болезни 17 пациентов (10 мальчиков, 7 девочек) в возрасте от 1-го года до 16 лет (медиана 7 лет) с мутациями в гене *ELANE* (16 пациентов с ТВН и одного пациента с ЦН), наблюдавшихся в Федеральном научно-клиническом центре детской гематологии, онкологии и иммунологии (ФНКЦ ДГОИ) им. Дмитрия Рогачева Минздрава России (Москва) в период с января 2012 г. по настоящее время.

Выявление мутаций гена *ELANE* (5 экзонов с прилежащими интронными регионами) проводили методом прямого бидирекционного (двунаправленного) автоматического секвенирования с применением ABI 3130XL генетического анализатора (“Applied Biosystems”, США).

Мутации описывали согласно номенклатуре, рекомендованной Обществом по изучению вариабельности генома человека (Human Genome Variation Society), референсные последовательности: NM_001972.2; NG_009627.1.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ, интегрированных в Microsoft Office 2008.

Результаты исследования и их обсуждение

Наиболее крупное исследование, целью которого было выявление связи между дефектами гена *ELANE* и клиническими проявлениями болезни, было проведено V.Makaryan и соавт. [19]. Авторы проанализировали данные пациентов из Международного регистра ТВН (Severe Congenital Neutropenia International Registry – SCNIR) со 104 отдельными мутациями в гене *ELANE* (рис. 1). У 187 пациентов с ТВН были обнаружены 94 мутации, а у 120 пациентов с ЦН – 22 мутации. Было показано, что, как правило, при ЦН и ТВН встречаются разные мутации, однако 12 мутаций наблюдались у пациентов с обоими заболеваниями. Среди различных мутаций гена *ELANE* преобладали миссенс-мутации (n = 65), встречались также мутации со сдвигом рамки считывания (n = 15), нонсенс-мутации (n = 8), интронные мутации (n = 8), а также делеции или вставки без нарушения рамки считывания (n = 7). Интерес представляет тот факт, что миссенс-мутации чаще встречались при ТВН (у 134, или 71,7%, из 187 пациентов), чем при ЦН (у 59, или 49,2%, из 120 пациентов; $p = 2 \times 10^{-4}$). Тем не менее все мутации со сдвигом рамки считывания были ассоциированы исключительно с ТВН.

Как видно на рис. 2, мутации у пациентов, наблюдавшихся в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, локализовались во всех экзонах гена *ELANE*. В связи с небольшим числом пациентов не удалось провести сравнительную характеристику мутаций при ТВН и ЦН, однако интерес представляет тот факт, что у одной пациентки с ЦН была обнаружена мутация в 46-й позиции, которая, по данным SCNIR, ранее была описана только у больных с ТВН.

При анализе регистра SCNIR у 30 (16%) из 187 пациентов с ТВН с 25 различными мутациями в гене *ELANE* зафиксировано развитие МДС/ОМЛ; 79 (76%) из 104 мутаций до сих пор не были связаны с развитием МДС/ОМЛ. МДС развился примерно у ⅓ (у 6, или 31,6%, из 19) пациентов с мутациями со сдвигом рамки считывания, у ¼ (у 3, или 25%, из 12) пациентов с нонсенс-мутациями, у 3 (20%) из 15 пациентов с интронными мутациями, и только у 17 (12,7%) из 134 пациентов с миссенс-мутациями [19].

Таким образом, можно заключить, что мутации, приводящие к значимому нарушению синтеза белка (мутации, отличные от миссенс-мутаций), ассоциированы с худшим прогнозом заболевания.

На рис. 1 показаны специфические мутации, ассоциированные, по данным V.Makaryan и соавт. [19], с развитием МДС/ОМЛ. Последний наиболее часто развивался у пациентов с мутацией C151Y (у 3, или 75%, из 4 пациентов) и у пациентов с мутацией G214R (у 3, или 33,3%, из 9 пациентов). МДС/ОМЛ также развился у 2 (8,3%) из 24 пациентов с мутацией S126L. Наблюдался только один случай развития МДС/ОМЛ при каждой из других мутаций, ассоциированных с МДС/ОМЛ.

Как было сказано выше, кроме МДС/ОМЛ, низкое количество гранулоцитов до начала терапии Г-КСФ и плохой ответ на терапию также относятся к критериям более тяжелого течения ТВН [11]. Эти параметры были оценены у 241 пациента из регистра SCNIR – у 165 пациентов с ТВН и у 76 пациентов с ЦН. Как и следовало ожидать, среднее значение абсолютного количества нейтрофилов у пациентов с ТВН было меньше, чем у пациентов с ЦН (0,10 против 0,40 × 10^9/л; $p = 5 \times 10^{-20}$), а эффективная доза Г-КСФ – выше (6,7 против 2,1 мкг/кг в сутки; $p = 2 \times 10^{-14}$). В груп-

пах больных с ЦН и ТВН не было обнаружено статистически значимых различий между средними значениями абсолютного количества нейтрофилов в зависимости от специфичности мутации или класса мутации, а также их расположения. Однако, как и в случае с ОМЛ/МДС, очень низкое количество нейтрофилов (определяемое как 0) значительно чаще встречалось у пациентов с такими мутациями, как A57T (4 случая из 4), C151Y (3 случая из 4) и G214R (3 случая из 7).

Эффективная доза Г-КСФ у пациентов с ЦН была примерно одинаковой вне зависимости от типа и локализации мутации. Напротив, у пациентов с ТВН были обнаружены корреляции между средней дозой Г-КСФ и расположением мутации, а также между средней дозой Г-КСФ и типом му-

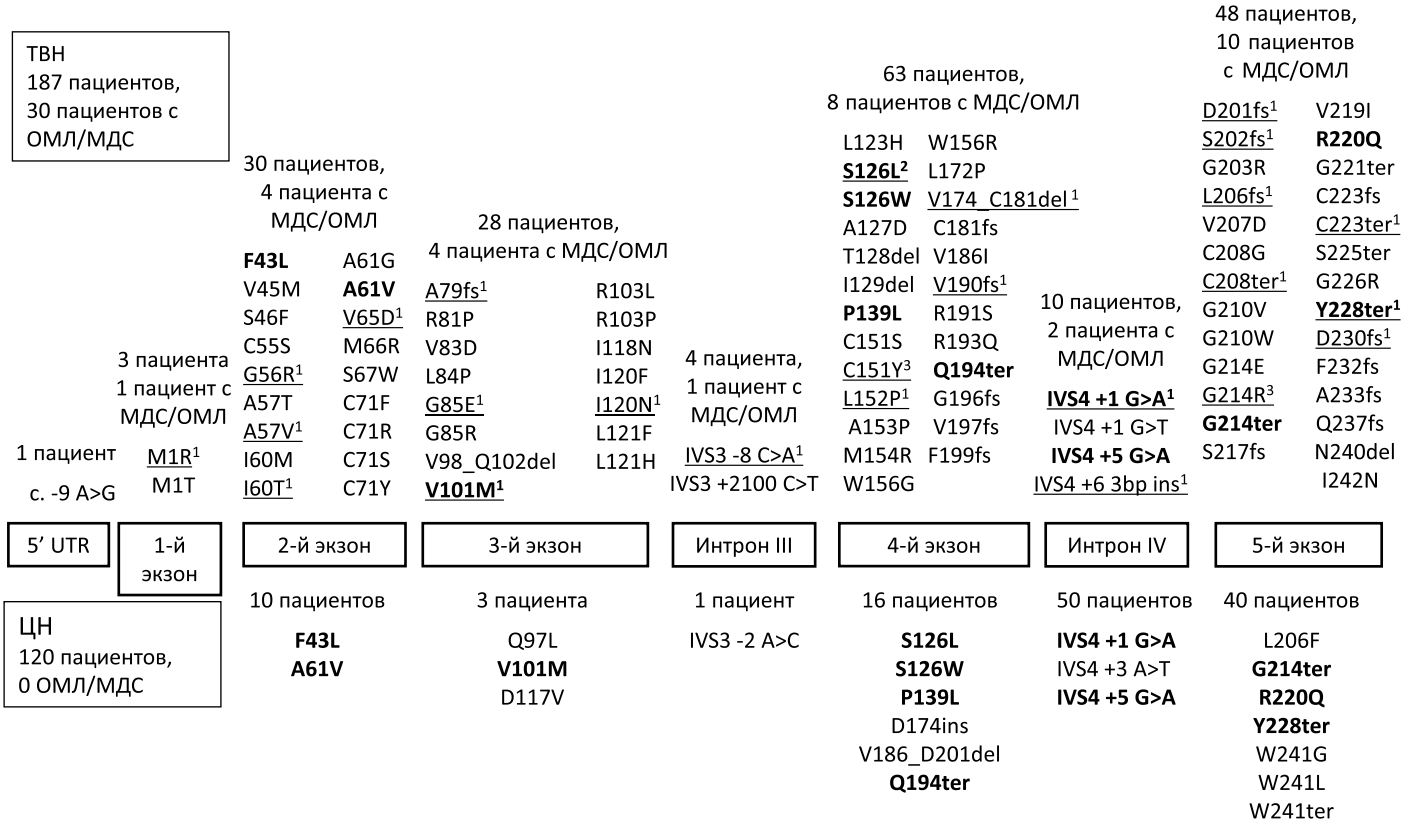

Рис. 1. **Мутации гена *ELANE* у пациентов с ТВН и ЦН** (по данным SCNIR; *n* = 307; цит. по [19])**.**
Здесь и на рис. 2: линейная развертка гена *ELANE* – 5 экзонов и 4 интрона; мутации при ТВН перечислены над картой гена, а те, которые наблюдались при ЦН, – под картой; мутации, наблюдавшиеся при обоих заболеваниях, выделены жирным; мутации, при которых развился МДС/ОМЛ, подчеркнуты, а в виде надстрочной цифры указано число пациентов с этими мутациями, у которых развился МДС/ОМЛ.

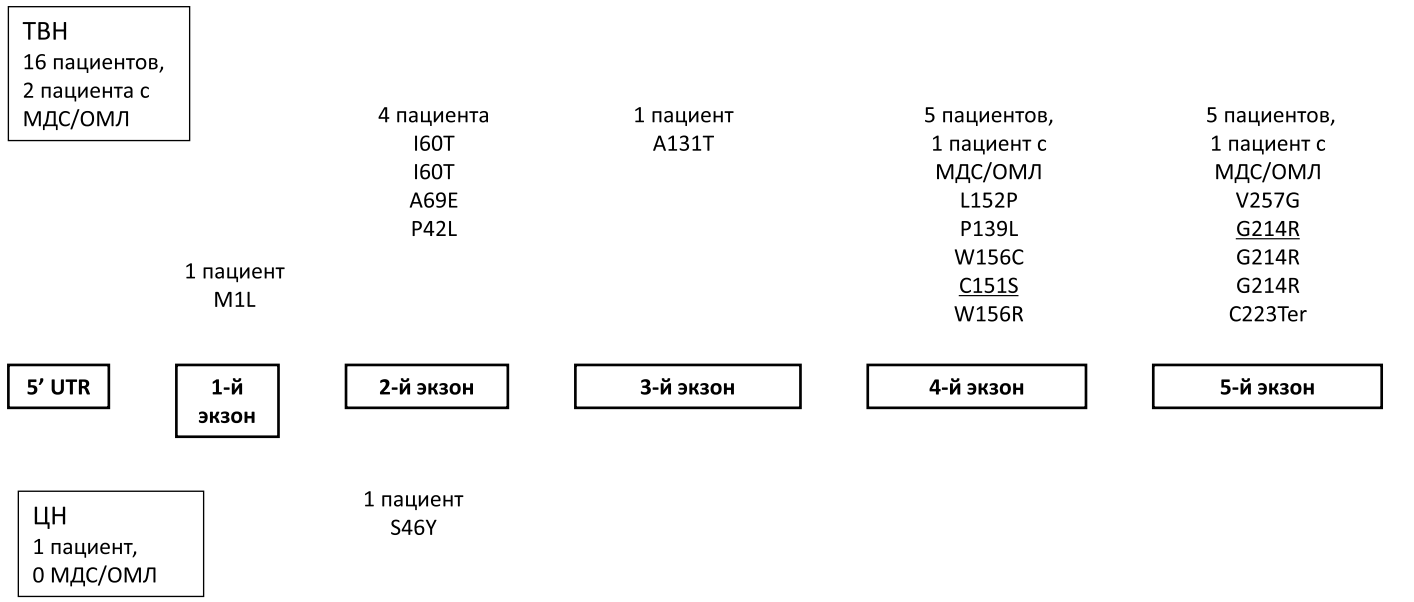

Рис. 2. **Мутации гена *ELANE* у пациентов с ТВН и ЦН, наблюдавшихся в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России** (*n* = 17)**.**

тации. Более высокие дозы препарата были связаны с мутациями, расположенными в локусах поблизости от 5`- и 3`-концов гена, а не во внутренних областях гена. В частности, в более высоких дозах препарата нуждались пациенты с уже упоминавшимися ранее мутациями C151Y и G214R, в то время как более низкие дозы Г-КСФ были эффективны у пациентов с мутациями P139L и IVS4+5 G>A. У 5 пациентов с мутацией G214R была выполнена ТГСК в связи с отсутствием ответа на терапию Г-КСФ (средняя использованная доза препарата, которая не привела, тем не менее, к терапевтическому эффекту, составляла 80 мкг/кг в сутки) [19].

При суммарном анализе риска таких факторов тяжести заболевания, как развитие МДС/ОМЛ, необходимость проведения ТГСК и летальный исход, также была выявлена связь с расположением мутации и ее конкретным типом. После 20 лет лечения Г-КСФ доля пациентов, у которых возникли эти угрожающие жизни осложнения, составила 53% среди пациентов с мутациями, локализованными в области гена от 5` UTR-региона до 2-го экзона, 71% – среди пациентов с мутациями в 5-м экзоне, 35% – среди пациентов с мутациями внутренних областей гена (от 3-го экзона до IV интрона).

После 20 лет терапии Г-КСФ у всех 8 (100%) пациентов с мутацией G214R и у всех 4 (100%) пациентов с мутацией C151Y были угрожающие жизни осложнения, которые отсутствовали у всех 11 пациентов с мутациями P139L и IVS4+5 G>A и были зарегистрированы только у 2 (10%) из 20 пациентов с мутацией S126L. В целом, после 20-летней терапии Г-КСФ общее количество случаев угрожающих жизни осложнений составило 46% при ТВН и 7% при ЦН.

В анализируемой нами группе больных описанные выше неблагоприятные мутации были выявлены у 4 пациентов: мутации в позиции C151 (мутация C151S) – у одного пациента и мутации в позиции G214 (мутация G214R) – у 3 пациентов. У всех 4 пациентов среднее значение количества гранулоцитов до начала терапии составило 0. У двух пациентов с мутацией G214R отмечено полное отсутствие ответа на терапию максимальными дозами короткодействующих (филграстим) и пролонгированных форм Г-КСФ (пег-филграстим), у одной пациентки не было получено ответа на короткодействующие Г-КСФ, ответ на пролонгированную форму Г-КСФ (пег-филграстим) был получен, но был нестойким. У пациента с мутацией C151S ответ был достигнут только при применении высокой дозы Г-КСФ – 40 мкг/кг. У двух пациентов (у одного пациента с мутацией C151S, а у другого пациента с мутацией G214R) развился МДС, одному ребенку была выполнена ТГСК, другой ребенок умер.

В связи с тем, что ТВН является редким заболеванием (частота составляет 1–2 случая на 1 млн населения), анализ молекулярно-генетических причин и прогностических признаков более тяжелого течения заболевания возможен только при объединении усилий многих центров, наблюдающих таких больных.

Анализ прогностических факторов тяжелого течения заболевания у наблюдаемых нами 17 больных с ТВН и ЦН подтвердил ранее опубликованные данные SCNIR [19]. Для двух мутаций гена *ELANE* (в позициях C151 и G214) была показана ассоциация с особо тяжелым течением и плохим прогнозом заболевания. По нашему мнению, эта информация крайне важна для определения ранних показаний для проведения ТГСК у больных с ТВН, что позволит избежать у них развития таких угрожающих жизни состояний, как МДС/ОМЛ и тяжелые инфекции на фоне резистентной к терапии нейтропении. В дальнейшем большой интерес представляет изучение молекулярно-генетических механизмов, обусловливающих эту ассоциацию.

Литература/References

1. Dale DC. ELANE-related neutropenia [Internet]. University of Washington, Seattle (WA): Gene ReviewsTM; 2002. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1533/[updated 14 July 2011].
2. Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. Nat Genet. 1999;23(4):433-6.
3. Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. Blood. 2000;96(7):2317-22.
4. Dale DC, Bolyard AA, Aprikyan A. Cyclic neutropenia. Semin Hematol. 2002;39(2):89-94.
5. Welte K, Zeidler C, Dale DC. Severe congenital neutropenia. Semin Hematol. 2006;43(3):189-95.
6. Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, Hann IM, Linch DC. Mutations in the ELA2 gene encoding neutrophil elastase are present in most patients with sporadic severe congenital neutropenia but only in some patients with the familial form of the disease. Blood. 2001;98(9):2645-50.
7. Köllner I, Sodeik B, Schreek S, Heyn H, von Neuhoff N, Germeshausen M, et al. Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. Blood. 2006;108(2):493-500.
8. Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, Xia J, Boxer LA, Dale D, et al. Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. Blood. 2007;110(13):4179-87.
9. Nanua S, Murakami M, Xia J, Grenda DS, Woloszynek J, Strand M, et al. Activation of the unfolded protein response is associated with impaired granulopoiesis in transgenic mice expressing mutant Elane. Blood. 2011;117(13):3539-47.
10. Borregaard N. Severe congenital neutropenia: new lane for ELANE. Blood. 2014;123(4):462-3.
11. Dale DC, Cottle TE, Fier CJ, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. Am J Hematol. 2003;72(2):82-93.
12. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. Br J Haematol. 2010;150(2):196-9.
13. Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. Blood. 2010;115(25):5131-6.
14. Link DC, Kunter G, Kasai Y, Zhao Y, Miner T, McLellan MD, et al. Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. Blood. 2007;110(5):1648-55.
15. Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE, Zeidler C, Klimenkova O, Klimiankou M, et al. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia: a unique pathway in myeloid leukemogenesis. Blood. 2014;123(14):2229-37.
16. Horwitz MS, Corey SJ, Grimes HL, Tidwell T. ELANE mutations in cyclic and severe congenital neutropenia: genetics and pathophysiology. Hematol Oncol Clin North Am. 2013;27(1):19-41.

17. Germeshausen M, Deerberg S, Peter Y, Reimer C, Kratz CP, Ballmaier M. The spectrum of ELANE mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia. Hum Mutat. 2013;34(6):905-14.
18. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, Cassinat B, Rodrigues-Lima F, Beaufils S, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. Blood. 2004;103(11):4119-25.
19. Makaryan V, Zeidler C, Bolyard AA, Skokowa J, Rodger E, Kelley ML, et al. The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia. Curr Opin Hematol. 2015;22(1):3-11.

Информация о соавторах:

Варламова Татьяна Владимировна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5410
E-mail: varltatwell@mail.ru

Райкина Елена Владиславовна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярной биологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (495) 287-6570, доб. 5410
E-mail: e_raikina@inbox.ru

Щербина Анна Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий, заведующая отделением иммунологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России
Адрес: 117997, ГСП-7, Москва, ул. Саморы Машела, 1
Телефон: (499) 287-6570, доб. 6299
E-mail: shcher26@hotmail.com

Information about co-authors:

Tatyana V. Varlamova, Researcher, Laboratory of Molecular Biology, Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5410
E-mail: varltatwell@mail.ru

Elena V. Raikina, PhD, Head of the Laboratory of Molecular Biology, Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 5410
E-mail: e_raikina@inbox.ru

Anna Yu. Shcherbina, MD, PhD, Professor, Deputy Director of the Institute of Hematology, Immunology and Cellular Technologies, Head of the Department of Immunology, Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of the Russian Federation
Address: 1, Samory Mashela street, Moscow, GSP-7, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 287-6570, ext. 6299
E-mail: shcher26@hotmail.com