

Молекулярно-генетическая характеристика ОМЛ с t(8;21) у детей

А.В. Панферова, М.В. Гаскова, Е.А. Зеркаленкова, Е.В. Апрелова, А.Н. Казакова, Н.М. Тимофеева, О.И. Солдаткина, Е.Н. Никитин, Ю.Ю. Чекменева, И.И. Калинина, С.А. Плясунова, Ю.В. Ольшанская, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан, А.А. Масчан

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Подгруппу острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) с хромосомными перестройками t(8;21)(q22;q22) и inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) обозначают как CBF-ОМЛ (от англ. *core binding factor* – острый миелоидный лейкоз). Эта клинически и биологически гетерогенная группа имеет относительно хороший прогноз, тем не менее в 40% случаев происходят рецидивы заболевания. Известно, что экспрессия *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных протеинов недостаточна для индуцирования лейкоза, по этой причине CBF-ОМЛ считают классической моделью патогенеза в результате кооперации нескольких событий. Для того чтобы охарактеризовать наиболее полный спектр мутаций у 30 пациентов с t(8;21)-ОМЛ, мы выполнили высокопроизводительное секвенирование 54 генов. Показано, что молекулярный профиль детских ОМЛ с t(8;21) высоко гетерогенен и имеет 60% мутаций в генах *KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*, активирующих внутриклеточные сигнальные пути с участием тирозинкиназ. Варианты мутаций встречаются с разными долями мутантного аллеля. Мутации в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию (*ASXL1*, *KDM6A*, *EZH2*, *BCORL1*, *BCOR*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), и в генах когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) выявлены также с высокой частотой – 43%. Таким образом, полученные данные поддерживают теорию функционального взаимодействия нескольких мутаций и влияния такой кооперации на патофизиологию ОМЛ с t(8;21), отражая уникальный патогенез в данной подгруппе. Применение современных технологий, таких как метод высокопроизводительного секвенирования, целесообразно для диагностики детских ОМЛ.

Ключевые слова: ОМЛ, t(8;21), высокопроизводительное секвенирование.

Контактная информация:

Панферова Агнеса Владимировна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России.

Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, ул. Саморы Машела, 1
Тел.: 8 (909) 670-0045

E-mail: a.panfyorova@gmail.com

DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-1-9-15

Molecular characterization of pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21)

A.V. Panfyorova, M.V. Gaskova, E.A. Zerkalnikova, E.V. Aprelova, A.N. Kazakova, N.M. Timofeeva, O.I. Soldatkin, E.N. Nikitin, Y.Y. Chekmeneva, I.I. Kalinina, S.A. Plyasunova, Y.V. Olshanskaya, G.A. Novichkova, M.A. Maschan, A.A. Maschan

Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Acute myeloid leukemia (AML) with t(8;21) or inv(16) have been considered as unique group within AML and are usually reported as core binding factor AML (CBF-AML) but there is significant clinical and biological heterogeneity within and relapse incidence reaches up to 40%. It is known that, translocations involving CBFs are not sufficient to induce fulminant leukemia alone, therefore is considered as a model for the multistep pathogenesis of AML. To characterize more broad spectrum of genetic changes we performed extensive mutational analysis of 54 genes by high-throughput sequencing in 30 patients with t(8;21)-AML. The molecular landscape of pediatric AML with t(8;21) was highly heterogeneous and harbored frequent mutations in genes activating tyrosine kinase signaling (including *KIT*, *N/KRAS*, and *FLT3*) – 60% in group with variable mutant allele ratios. Mutations in genes that regulate chromatin conformation or encode members of the cohesin complex were observed with high frequencies – 43% as well. These data support the theory of synergic cooperation between these events and suggest that diverse cooperating mutations may influence CBF-AML pathophysiology as well as clinical behavior and point to potential unique pathogenesis of t(8;21). The adoption of advances in DNA sequencing as a high-throughput sequencing technology is a useful tool in diagnostics of pediatric AML.

Key words: AML, t(8;21), high-throughput sequencing.

Correspondence:

Agnesa V. Panfyorova, PhD, senior researcher, Dmitriy Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, Immunology Ministry of Healthcare of Russian Federation.

Address: Russia 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
Tel.: +7 (909) 670-0045

E-mail: a.panfyorova@gmail.com

Подгруппу острых миелобластных лейкозов (ОМЛ) с хромосомными перестройками t(8;21)(q22;q22) и inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22), приводящими к образованию химерных генов *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11*, обозначают как CBF-ОМЛ (от англ. *core binding factor* – острый миелоидный

лейкоз). CBF-ОМЛ составляют до 25% детских и 15% взрослых *de novo* ОМЛ [1]. Выявление характерных для данного типа ОМЛ цитогенетических маркеров принципиально важно для определения тактики ведения пациентов [2]. При включении в программу терапии высоких доз цитозина арабинозида CBF-ОМЛ

имеют относительно хороший прогноз [3–7]. Тем не менее в 40% случаев происходят рецидивы заболевания, что свидетельствует о клинической гетерогенности этой группы [7–11]. С момента первого описания $t(8;21)$ и $inv(16)$ ОМЛ в 1973 [12] и 1983 [13] годах реаранжировки генов *RUNX1* и *CBFB* хорошо изучены; известно, что экспрессия *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных протеинов недостаточна для индуцирования лейкоза [14–18]. По этой причине CBF-ОМЛ считаются классической моделью патогенеза в результате кооперации нескольких событий: нарушения нормальной функции транскрипционных факторов (таких как CBF-комплекс), влияющих на дифференцировку, и возникновения активирующих мутаций, которые усиливают клеточную пролиферацию [19]. Доказательством существования этой модели является факт наличия дополнительных мутаций в генах *KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*, активирующих внутриклеточные сигнальные пути с участием тирозинкиназ, которые встречаются при обоих подтипах CBF-ОМЛ [8].

Подгруппы ОМЛ с $t(8;21)$ и $inv(16)$ в клинических исследованиях часто объединяют с учетом их высокой выживаемости и вовлеченности в патогенез CBF-транскрипционных факторов. Однако у этих групп имеются свои биологические и клинические особенности [20]. Так, морфологически, по FAB-классификации, пациенты с $t(8;21)$ имеют М2 ОМЛ (с созревaniem) подтип, а пациенты с $inv(16)$ – чаще М4Ео (острый миеломоноцитарный лейкоз с атипичными эозинофилами) [21]. Более того, профилирование экспрессии генов CBF-ОМЛ уверенно разделяет $t(8;21)$ и $inv(16)$ на разные подгруппы на основании различия в активации сигнальных путей [22]. Генетические основы для морфологических и экспрессионных различий между двумя подгруппами становятся понятными только в последнее время, при более подробном их изучении. Например, мутации в генах *ASXL1* и *ASXL2*, которые были описаны сравнительно недавно, встречаются у 35% пациентов с $t(8;21)$ [23, 24]. Интересно, что мутации в гене *ASXL2* – не частое событие при других вариантах ОМЛ; авторы предполагают потенциально важное функциональное взаимодействие между мутациями в *ASXL2* и *RUNX1-RUNX1T1* – химерным транскриптом [24]. В работе *C.H. Hsu и соавт.*, 2015 [25], проведено секвенирование и профилирование транскриптома CBF-ОМЛ у 31 ребенка: кластеризация экспрессии генов показала, что относительно ОМЛ с нормальным кариотипом при CBF-ОМЛ снижена экспрессия генов семейства *homeobox* (HOX), включая два транскрипционных фактора – *MEIS1* и *NKX2-3*. Авторы предположили, что дисрегуляция HOX-генов играет одну из центральных ролей в патогенезе CBF-ОМЛ. В исследованиях *N. Duployez и соавт.*, 2014,

[26] показано, что в группе CBF-ОМЛ довольно часто встречается изменение числа копий гена – CNV (от англ. *copy number variation*). В работе представлены результаты геномного профилирования у 73 пациентов: случаи CNV выявляли чаще (84-loss и 47-gain), чем унипарентальную дисомию ($n = 14$), кроме того, было найдено 145 однонуклеотидных замен. Показано, что дополнительные CNV вовлекают главным образом целые хромосомы, части хромосом (плечи) или большие хромосомные регионы; $Del(9q)$ и потеря половой хромосомы встречаются почти исключительно в группе ОМЛ с $t(8;21)$. Другие изменения числа копий, такие как трисомия 8, gain 13q, были выявлены в обеих подгруппах, а gain 1q и $del(2q)$ – в группе ОМЛ с $t(8;21)$. Наиболее характерной аномалией в обеих подгруппах была $Del(7q)$ – 16 и 23% соответственно. Минимально делетированный регион 7q содержал при этом 57 генов, включая *MLL3* и *EZH2*; найдены также фокальная делеция *IKZF1* – у одного пациента, у другого – *NF1* и три случая делеции *CCDC26*. За исключением известных мутаций в генах *KIT*, *RAS*, *FLT3*, при ОМЛ с $t(8;21)$ наиболее часто отмечали мутации в *ASXL1/2* (8/24%) и генах когезинового комплекса: *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG2*, *NIPBL* (суммарно 27%). Мутации были обнаружены также в генах эпигенетической регуляции: *EZH2* (5%), *TET2* (8%), *IDH1/2* (5%) и *WT1* (11%). В статье *N. Duployez и соавт.*, 2016, [27] с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на большой группе пациентов – 215 человек, в том числе 43 ребенка с $t(8;21)$, показано, что активирующие мутации в генах рецепторов тирозинкиназы (*KIT*, *N/KRAS* и *FLT3*) – частые события в обеих подгруппах CBF-ОМЛ. Напротив, мутации в генах, ответственных за регуляцию конформации хроматина, или в генах, кодирующих белки комплекса когезина, наиболее характерны для группы ОМЛ с $t(8;21)$ – 42 и 18% соответственно, тогда как, например, в группе $inv(16)$ -ОМЛ они практически отсутствовали. Показано, что мутации в генах эпигенетической модификации или комплекса когезина ассоциированы с плохим прогнозом у пациентов, которые имеют дополнительные мутации в генах тирозинкиназного пути, что позволило авторам предположить синергическую кооперацию между этими событиями.

Таким образом, функциональное взаимодействие нескольких мутаций может влиять на патофизиологию CBF-ОМЛ и указывать на уникальный патогенез каждой из подгрупп, в частности ОМЛ с $t(8;21)$. В данном контексте определение дополнительных генетических изменений позволит наиболее точно понять патогенез CBF-ОМЛ с $t(8;21)$, спрогнозировать клинический исход и найти подходы для новых терапевтических мишеней. Оценить возможность применения метода высокопроизводительного секве-

нирования, определить и охарактеризовать с его помощью спектр мутаций у детей в группе CBF-ОМЛ с t(8;21) – основные цели исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проанализированы результаты обследования 30 детей (15 девочек и 15 мальчиков); медиана возраста – 135 мес. (от 1 до 204 мес.). Клинико-биологические данные и протоколы лечения представлены в таблице 1.

Проведен молекулярно-генетический анализ 30 инициальных образцов костного мозга пациентов с ОМЛ t(8;21); транслокация ранее выявлена методом кариотипирования и подтверждена методом FISH. ДНК выделяли из нормализованной до 2×10^6 клеток суспензии мононуклеаров аспирата костного мозга на приборе *MagNaPure LC 2.0* с использованием набора *MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I*. Все образцы исследовали методом фрагментного анализа внутренних тандемных дупликаций для выявления FLT3-ITD [28] на генетическом анализаторе *ABI PRISM 3500*. На этом же приборе с помощью метода секвенирования по Сэнгеру анализировали ген *KIT* [29]. Методом высокопроизводительного секвенирования на платформе *Illumina* с использованием набора *TruSight Myeloid Sequencing Panel (Illumina, США)* для пробоподготовки – создания библиотек ампликонов (рис. 1) – анализировали 54 гена: *ABL1* (экзоны 4–6), *DNMT3A* (полностью), *KDM6A* (полностью), *RUNX1* (полностью), *ASXL1* (экзон 12), *ETV6* (полностью), *KIT* (экзоны 2, 8–11, 13+17), *SETBP1* (экзон 4), *ATRX* (8–10, 17–31), *EZH2* (полностью), *KRAS* (экзоны 2+3), *SF3B1* (экзоны 13–16), *BCOR* (полностью), *FBXW7* (экзоны 9, 10, 11), *MLL* (экзоны 5–8), *SMC1A* (экзоны 2, 11, 16+17), *BCORL1* (полностью), *FLT3* (экзоны 14, 15, 20), *MPL* (экзон 10), *SMC3* (экзоны 10, 13, 19, 23, 25–28), *BRAF* (экзон 15), *GATA1* (экзон 2), *MYD88* (экзон 3–5), *SRSF2* (экзон 1), *CARL* (экзон 9), *GATA2* (экзоны 2–6), *NOTCH1* (экзоны 26–28, 34), *STAG2* (полностью), *CBL* (экзоны 8+9), *GNAS* (экзоны 8, 9), *NPM1* (экзон 12), *TET2* (3, 4–11), *CBLB* (9.10), *HRAS* (экзоны 2, 3), *NRAS* (экзоны 2, 3), *TP53* (экзон 2, 3–11), *CBLC* (экзон 9, 10), *IDH1* (экзон 4), *PDGFRA* (экзоны 12, 14, 18), *U2AF1* (экзоны 2, 6), *CDKN2A* (полностью), *IDH2* (экзон 4), *PHF6* (полностью), *WT1* (7+9), *CEBPA* (полностью), *IKZF1* (полностью), *PTEN* (экзоны 5, 7), *ZRSR2* (полностью), *CSF3R* (экзоны 14–17), *JAK2* (экзоны 12, 14), *PTPN11* (экзоны 3, 13), *CUX1* (полностью), *JAK3* (экзон 13), *RAD21* (полностью), описанных при ОМЛ и вовлеченных в патогенез заболевания, на приборе *MiSeq (Illumina, США)* по параметрам, установленным производителем (8 образцов на v3 600 cycles, парноконцевое чтение 2×150).

Таблица 1

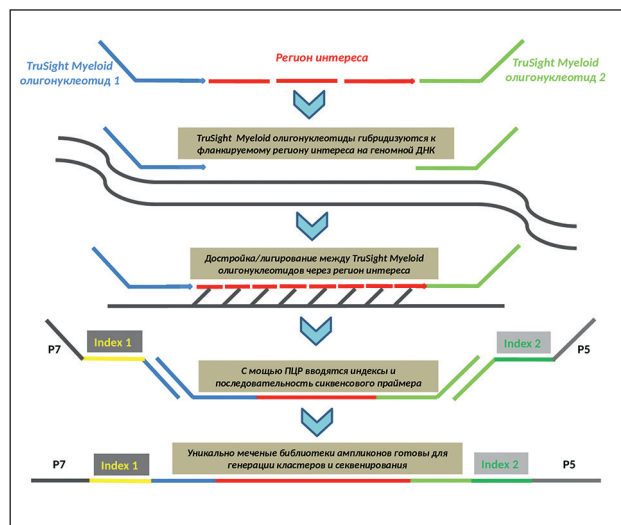
Клинико-биологические особенности пациентов с ОМЛ t(8;21)

№ ID	Пол	FAB-вариант	ИФТ, особенности	Протокол лечения
8	д	Mx	Ранние гемопоэтические предшественники, миелоидные с коэкспрессией CD56	ОМЛ–ММ–2006
12	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
13	м	M2/M4	Миеломоноцитарные, CD19	ОМЛ–ММ–2006
14	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD56	ОМЛ–ММ–2006
18	м	M4	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
19	д	M4	Миеломоноцитарные с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
21	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
22	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
33	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
35	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–2007 НИИ ДОГ
38	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	AML–BFM–98
40	м	Н.и.	Полиморфный	AML–BFM–2004
84	м	M2	Миелоидный с коэкспрессией CD56	ОМЛ–ММ–2006
85	м	M4	Миелоидный с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
86	д	M5a	Ранние гемопоэтические предшественники с коэкспрессией CD19	AML–BFM–98
88	д	M2–M4	Миелоидный с коэкспрессией CD56	ОМЛ–ММ–2006
96	д	M2–M4	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
97	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	ОМЛ–ММ–2006
98	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD79a	ОМЛ–ММ–2006
99	м	M2	Миелоидные	ОМЛ–ММ–2006
100	д	M4	Миелоидные с коэкспрессией CD19	н.и.
102	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	н.и.
103	д	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
106	м	M5a	Миелоидные с коэкспрессией CD56	AML–BFM–98
132	д	M2	Миелоидные	н.и.
165	м	M2	Ранние гемопоэтические предшественники и миелоидные	ОМЛ–ММ–2006
166	д	M1	Гетерогенная, основная – миелоидные с коэкспрессией CD19, CD79a + 7,5% – миелоидные и B-линейные: CD19, CD22, CD79a	ОМЛ–ММ–2006
167	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
168	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19, CD56	ОМЛ–ММ–2006
174	м	M2	Миелоидные с коэкспрессией CD19	AML–BFM–2004

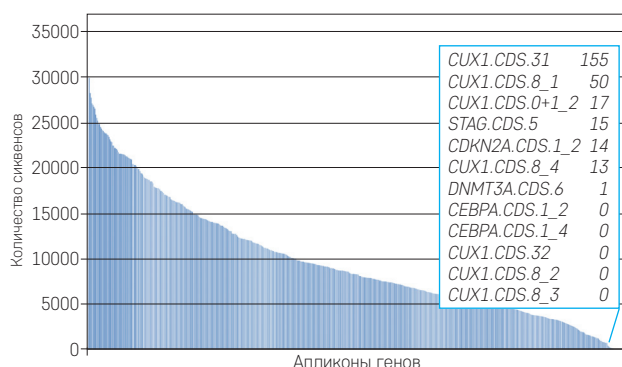
Примечание: н.и. – нет информации; д – девочка; м – мальчик.

Рисунок 1

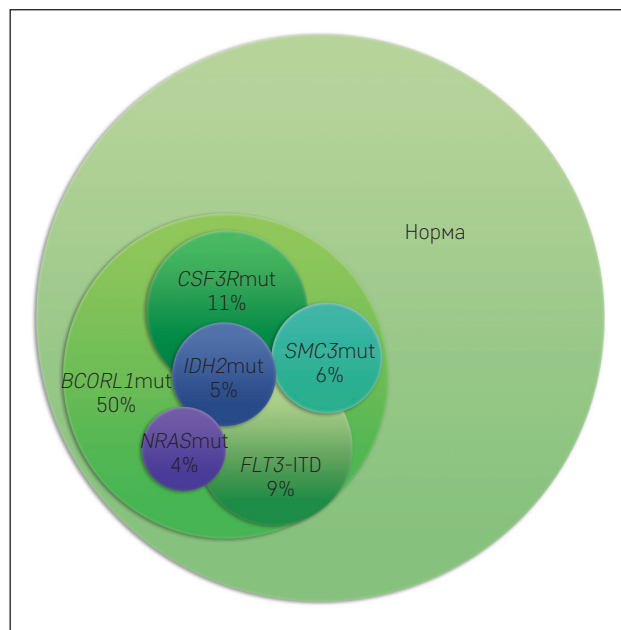
Принцип создания библиотеки *TruSight Myeloid Panel*

**Рисунок 2**

Покрываемость по ампликонам относительно одного пациента, подготовка библиотек *TruSight Myeloid Panel* (Illumina)

**Рисунок 3**

Молекулярный профиль пациента № 8
(% указывает долю альтернативного аллеля относительно каждого гена)



Первичный и вторичный анализ данных, аннотацию вариантов проводили с помощью программного обеспечения Illumina: *MiSeq Reporter Software* и *VariantStudio Variant Analysis Software v2.2*. Среднее покрытие на образец составило около 3700х ридов (рис. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В анализируемой группе 29 пациентов имели как минимум одну мутацию, а в среднем количество мутаций составило 2–3 на одного пациента. У пациента № 8 с диагнозом ОМЛ t(8;21), ЦНС IV с поражением спинномозгового канала и развитием миелоидной саркомы наблюдали наибольшее количество мутаций, представленных разной долей альтернативного варианта, что демонстрирует большую мутационную нагрузку лейкоэмического клона и ее сложный характер (рис. 3).

Результаты высокопроизводительного секвенирования и фрагментного анализа с описанием мутаций представлены в таблице 2. Среди всех проанализированных генов наиболее часто мутации встретились в группе генов семейства рецепторов тирозинкиназы (*KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*) – у 18 (60%) из 30 пациентов. Мутации в гене *KIT*, определяющие переход пациентов в высокую группу риска, выявлены у 3 пациентов методом секвенирования по Сэнгеру, а методом высокопроизводительного секвенирования – у 4 (13%), в том числе вариант с.2447A > T у пациента № 35 с низким содержанием альтернативного аллеля (7%). Мутации в гене *FLT3* представлены двумя вариантами однонуклеотидных замен в тирозин-киназном домене (*FLT3*-TKD) и двумя вариантами внутренних тандемных дупликаций (*FLT3*-ITD), при этом один пациент имел два типа *FLT3*-ITD: 192 и 288 пар оснований (рис. 4). Внутренние тандемные дупликации в гене *FLT3* выявлены методом фрагментного анализа, при этом алгоритм биоинформатической обработки данных высокопроизводительного секвенирования дал отрицательные результаты.

Рисунок 4

Фрагментный анализ, ген *FLT3*: по оси абсцисс – длина ПЦР-продукта, пар оснований (п.о.); по оси ординат – флуоресценция, F1): а) первый пик – норма 415 п.о.; второй – *FLT3*-ITD 192 п.о.; третий пик – *FLT3*-ITD 288 п.о.; б) первый пик – норма 415 п.о.

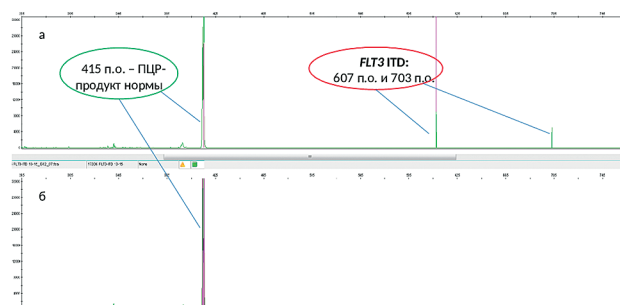


Таблица 2

Результаты исследования пациентов с ОМЛ t(8;21), включая структурное описание наиболее часто встречающихся патогенных вариантов мутаций

№ пациента	Пол	FAB- вариант	Ген, вариант мутации, % альтернативного варианта, глубина прочтения					Другие гены с патогенными вариантами мутаций	Группа риска
			FLT3	KIT	NRAS	KRAS	EZH2		
8	д	Mx	ITD: 108 п.о.		с.35G >T 4% x13211			CSF3R, SMC3, IDH2 BCORL1	Промежуточная
12	д	M2	с.2503G > T 27% x10755		с.183A >T 7% x1208		с.1662_1663insTT 10% x7812		Промежуточная
13	м	M2-M4						CBL	Промежуточная
14	д	M2				с.38G > A 37% x11758 с.35G > A 8% x11775			Промежуточная
18	м	M4			с.190T > G 22% x962			FBXW7	Промежуточная
19	д	M4			с.38G > A 42% x13791				Промежуточная
21	м	M2						CEBPA	Промежуточная
22	д	M2					с.1875_1876insG 36% x2662	CEBPA, IDH2	Промежуточная
33	м	M2						NOTCH1	Промежуточная
35	м	M2		с.2447A > T 7% x938				ATRX	Высокая
38	д	M2					с.1926_1927insG 37% x3689	PHF6, TET2	Промежуточная
40	м	н.и.			с.181C > A 20% x1040 с.38G>A 7% x5459				Промежуточная
84	м	M2			с.35G > A 15% x4799				Промежуточная
85	м	M4	ITD:192 п.о., 288 п.о.						Промежуточная
86	д	M5a					с.553G > C 50% x5948	IDH1	Промежуточная
88	д	M2-M4		с.2447A > T 42% x 3016				ETV6	Высокая
96	д	M2-M4					с.1773C > A 10% x4174	ZRSR2	Промежуточная
97	м	M2			с.35G > A 39% x4883				Промежуточная
98	д	M2							Промежуточная
99	м	M2						BCORL1	Промежуточная
100	д	M4			с.35G > T 39% x5086 с.38G > A 8% x4979			ETV6	Промежуточная
102	д	M2		с.2447A >T 41% x1808					Высокая
103	д	M2			с.181C > A 47% x697				Промежуточная
106	м	M5a				с.38G > A 29% x18106	с.389A > G 31% x10265		Промежуточная
132	д	M2					с.61_62insA 41% x 10266		Промежуточная
165	м	M2						с.1926_1927insG 30% x4105	Промежуточная
166	д	M1	с.1775T > G 9% x13262		с.181C > A 12% x1073				Промежуточная
167	м	M2					с.2198A > G 13% x1913	CBL	Промежуточная
168	м	M2		с.2447A > C 43% x4699				KDM6A	Высокая
174	м	M2				с.38_39delGCinsAT 16% x639	с.2187dupT 24% x550	ETV6	Промежуточная

Примечание: реф. транскрипты FLT3: NM_004119.2, KIT: NM_000222.2, NRAS: NM_002524.4, KRAS: NM_033360.2, EZH2: NM_004456.4, ASXL1: NM_015338; н.и. – нет информации.

В генах *NRAS* и *KRAS* мутации выявлены у 10 и 3 пациентов соответственно, в некоторых случаях у пациента присутствовали две мутации в одном гене, но с разной частотой альтернативного варианта. Кроме того, у 13 пациентов найдены мутации в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию (*ASXL1*, *KDM6A*, *EZH2*, *BCORL1*, *BCOR*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), и мутации в генах когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*); чаще определялись мутации в гене *EZH2* (у 6 пациентов) и гене *ASXL1* (у 4 пациентов). Таким образом, у 43% пациентов имелись дополнительные мутации в генах эпигенетической регуляции и когезинового комплекса. Мутации в этих генах описаны и наиболее часто встречаются у взрослых пациентов с ОМЛ, однако в последнее время в связи с применением метода высокопроизводительного секвенирования мутации в этих генах часто описывают для группы CBF-ОМЛ и у детей.

В целом исследуемая группа генетически высоко гетерогенна, сочетания мутаций в определенных закономерностях и генах достоверно не выделены, однако у 3 из 4 пациентов с мутациями в гене *FLT3* выявляли также мутации в гене *NRAS*. В 2014 году *N. Duployez* и соавт. [27] описали на своей группе пациентов 24% мутаций в гене *ASXL2* и предположили взаимодействие эффекта этого события с химерным транскриптом *RUNX1-RUNX1T*, однако используемая панель не предполагала анализ гена *ASXL2*, поэтому не позволила оценить частоту встречаемости мутаций в этом гене. В нашей группе пациентов, напротив, мутации в гене *ASXL1* встретились чаще (13 против 8%). Большую разницу можно заметить относительно гена *EZH2*: мутации чаще отмечены в нашей группе (20 против 5%, упоминаемых в литературе) [27].

Метод высокопроизводительного секвенирования позволил достоверно выявить мутации в гене *KIT*, в том числе у пациента с низким содержанием бластной популяции на инициальной точке диагностики, что из-за низкой чувствительности не позволило сделать метод секвенирования по Сэнгеру. Мутации в гене *KIT* наблюдали в 13% случаев, тогда как в литературе разные авторы отмечают частоту порядка 17–41%. На основании наличия или отсутствия мутаций в этом гене строится риск-стратифи-

кация пациентов, поэтому применение такого подхода оправдано для данной группы пациентов. Однако пробоподготовка *TruSight Myeloid panel* не позволяет полностью и с хорошей глубиной покрытия анализировать ген *CEBPA*, что важно для группы пациентов с нормальным кариотипом, так как биаллельные мутации в этом гене определяют пациентов в группу благоприятного прогноза и стандартного риска. Для гена *FLT3* алгоритмы и программы коммерческой биоинформатической обработки не позволяют обнаружить внутренние tandemные дупликации, поэтому он не является методом, исключающим проведение фрагментного анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование высокопроизводительного секвенирования позволило достаточно эффективно выявлять мутации в генах, включенных в систему диагностики детских ОМЛ, для стратификации по группам риска, в том числе у пациентов с низким содержанием бластной популяции. Ранее, при использовании секвенирования по методу Сэнгера, это было затруднительно, а в некоторых случаях невозможно. ОМЛ с t(8;21) как правило имеют несколько дополнительных мутаций, нередко представляя сложную клональную архитектуру. Высокопроизводительное секвенирование обладает существенным преимуществом для диагностики ОМЛ у детей, позволяя более подробно описывать молекулярный профиль, в дальнейшем это дает возможность более точно определить прогноз и осуществить выбор риск-адаптированной или таргетной терапии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

А.В. Панферова [http:// orcid.org/0000-0002-8580-3499](http://orcid.org/0000-0002-8580-3499)

И.И. Калинина [http:// orcid.org/0000-0002-0813-5626](http://orcid.org/0000-0002-0813-5626)

Ю.В. Ольшанская [http:// orcid.org/0000-0002-2352-7716](http://orcid.org/0000-0002-2352-7716)

Г.А. Новичкова [http:// orcid.org/0000-0002-2322-5734](http://orcid.org/0000-0002-2322-5734)

А.А. Масчан [http:// orcid.org/0000-0002-0016-6698](http://orcid.org/0000-0002-0016-6698)

Литература

1. Schoch C., Kern W., Schnittger S., et al. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* 2004; 89 (9): 108–290.
2. Döhner H., Estey E.H., Amadori S., et al; European Leukemia Net. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115 (3): 453–74.
3. Sander A., Zimmermann M., Dworzak M., et al. Consequent and intensified relapse therapy improved survival in pediatric

- AML: Results of relapse treatment in 379 patients of three consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2010; 24: 1422–8.
4. Kaspers G.J., Zimmermann M., Reinhardt D., et al. Improved outcome in pediatric relapsed acute myeloid leukemia: Results of a randomized trial on liposomal daunorubicin by the International BFM Study Group. *J Clin Oncol* 2013; 31: 599–607.
 5. Klein K., Kaspers G., Harrison C.J., et al. Clinical Impact of Additional Cytogenetic Aberrations, cKIT and RAS Mutations, and Treatment Elements in Pediatric t(8;21)-AML: Results From an International Retrospective Study by the International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group. *J Clin Oncol* 2015 Dec 20; 33 (36): 4247–58.
 6. Pession A., Masetti R., Rizzari C., et al. Results of the AIEOP AML 2002/01 multicenter prospective trial for the treatment of children with acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 122 170–8.
 7. Gibson B.E., Webb D.K., Howman A.J., et al. United Kingdom Childhood Leukaemia Working Group; the Dutch Childhood Oncology Group. Results of a randomized trial in children with Acute Myeloid Leukaemia: Medical research council AML12 trial. *Br J Haematol* 2011; 155: 366–76.
 8. Jourdan E., Boissel N., Chevret S., et al. French AML Intergroup. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2013; 121(12): 2213–23.
 9. Schlenk R.F., Benner A., Krauter J., et al. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 to 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 2004; 22 (18): 3741–50.
 10. Appelbaum F.R., Kopecky K.J., Tallman M.S., et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol* 2006; 135 (2): 165–73.
 11. Marcucci G., Mr'ozek K., Ruppert A.S., et al. Prognostic factors and outcome of core binding factor acute myeloid leukemia patients with t(8;21) differ from those of patients with inv(16): a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005; 23 (24): 5705–17.
 12. Rowley J.D. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet* 1973; 16 (2): 109–12.
 13. Le Beau M.M., Larson R.A., Bitter M.A., et al. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic clinicopathological association. *N Engl J Med* 1983; 309 (11): 630–6.
 14. Renneville A., Roumier C., Biggio V., et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 2008; 22 (5): 915–31.
 15. Speck N.A., Gilliland D.G. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2002; 2 (7): 502–13.
 16. Downing J.R. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13 (1): 48–54.
 17. Miyamoto T., Nagafuji K., Akashi K., et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 87 (11): 4789–96.
 18. Wiemels J.L., Xiao Z., Buffler P.A., et al. In utero origin of t(8;21) AML1-ETO translocations in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99 (10): 3801–5.
 19. Gilliland D.G. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol* 2002; 39 (4 suppl 3): 6–11.
 20. Duployez N., Willekens C., Marceau-Renaut A., et al. Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: current and emerging factors. *Expert Rev Hematol* 2015; 8 (1): 43–56.
 21. Sangle N.A., Perkins S.L. Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135 (11): 1504–9.
 22. Schoch C., Kohlmann A., Schnittger S., et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 (15): 10008–13.
 23. Micol J.-B., Duployez N., Boissel N., et al. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations. *Blood* 2014; 124 (9): 1445–9.
 24. Metzeler K.H. ASXL genes and RUNX1: an intimate connection? *Blood* 2014; 124 (9): 1382–3.
 25. Hsu C.-H., Nguyen C., Yan C., et al. Transcriptome profiling of pediatric core binding factor AML. *PLoS One* 2015; 10 (9): e0138782.
 26. Duployez N., Labis E., Marceau-Renaut A., et al. Genomic Landscape of Pediatric CBF-AML By SNP-Array Karyotyping and Extensive Mutational Analysis. *Blood* 2014; 124: 1007.
 27. Duployez N., Marceau-Renaut A., Boissel N., et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2451–9.
 28. Bertoli S., Vergez F., Sarry J.-E., et al. Do AML patients with DNMT3A exon 23 mutations benefit from idarubicin as compared to daunorubicin? A single center experience Olivier LaRoche1. *Oncotarget* 2011; 2 (11): 850–61.
 29. Sihto H., Sarlomo-Rikala M., Tynnen O., et al. KIT and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha Tyrosine Kinase Gene Mutations and KIT Amplifications in Human Solid Tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23 (1).