ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ОПЫТ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА, РЕЗИСТЕНТНОГО К ПРОГРАММНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ, У БОЛЬНОГО МОЛОДОГО ВОЗРАСТА

© 2019 г. А. В. Виноградов[1,2]*, А. В. Резайкин[3], Е. А. Партылова[2], С. В. Сазонов[3], А. Г. Сергеев[3]

*E-mail: a.vinogradov@egov66.ru

[1]Министерство здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

[2]Государственное бюджетное учреждение Свердловской области «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия;

[3]ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Екатеринбург, Россия

Поступила: 29.05.2019. **Принята:** 30.06.2019

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больного Л., 38 лет, проходившего программное химиотерапевтическое лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре, а впоследствии – сдерживающее химиотерапевтическое и симптоматическое лечение под контролем онколога на базе медицинской организации по месту жительства. При иммуногистохимическом исследовании трепанобиоптата подвздошной кости определялся диффузный инфильтрат из мононуклеаров среднего и мелкого размеров с чертами бластов, со светлым ядром несколько неправильной формы с одним или несколькими ядрышками, коэкспрессирующих в ядре и цитоплазме MPO и CD34, слабо и неравномерно CD117, в части клеток – CD68. Цитохимические реакции на липиды были положительны в 29,0% бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 81,0% бластных клеток. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, MPO-cyt. При цитогенетическом исследовании (G-banding) определялся аберрантный кариотип 47, XY, +13. Методом прямого секвенирования определялись несинонимичные трансверсии c. 182 A>C в протоонкогене NRAS и c. 215 C>G в антионкогене TP53. Опухоль была резистентна к программной полихимиотерапии, при этом кариотип ОМЛ изменялся со временем за счет появления дополнительных аберрантных клонов, несущих новые структурные и количественные хромосомные аномалии. Количество функционально значимых мутаций в гене NRAS также увеличилось: наряду с определявшейся в дебюте заболевания трансверсией c. 182 A>C, на 40 месяце наблюдения была выявлена дополнительная замена – c. 35 G>C. Иммунофенотипические характеристики бластных клеток при этом не изменялись. Общая продолжительность наблюдения и лечения больного составила 42 месяца.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, иммунофенотип, цитогенетика, прямое автоматическое секвенирование

DOI: 10.31857/S102872210007232-0

Адрес: Екатеринбург, Министерство здравоохранения Свердловской области, Виноградов Александр Владимирович.

Тел.: +79089093135, **E-mail:** a.vinogradov@egov66.ru

Авторы:

Виноградов А. В., к.м.н., главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области, Екатеринбург, Россия;

Резайкин А. В., к.м.н., доцент кафедры медицинской физики, информатики и математики ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

Партылова Е. А., к.м.н., старший врач клинико-диагностической лаборатории ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург, Россия;

Сазонов С. В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия;

Сергеев А. Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика и лечение острых миелоидных лейкозов (ОМЛ), резистентных к программной полихимиотерапии, являются одной из актуальных задач современной онкогематологии. Общеизвестной стратегией, направленной на преодоление резистентности ОМЛ, является интенсификация химиотерапии с последующей аллогенной трансплантацией костного мозга в первой ремиссии. Это неизбежно сопровождается селекцией больных, имеющих медицинские противопоказания, в т.ч. относительные, к такому лечению. Стратегии ведения больных ОМЛ вне ремиссии (например, в рамках оказания паллиативной помощи) систематически не проработаны, за исключением некоторых клинических исследований таргетных биофармацевтических препаратов, эффективность которых, как правило, недостаточна и ограничена продлением жизни пациентов на 12–18 месяцев [1–3].

Цель работы – выполнить анализ случая иммунологической диагностики и длительного сдерживающего лечения больного ОМЛ молодого возраста, резистентного к программной полихимиотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больного Л., 38 лет, проходившего программное химиотерапевтическое лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре, а впоследствии – сдерживающее химиотерапевтическое и симптоматическое лечение у районного онколога на базе медицинской организации по месту жительства. Общая продолжительность наблюдения составила 42 месяца. Диагностику ОМЛ осуществляли на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования [1, 2]. Также выполнены иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата подвздошной кости, цитогенетическое исследование (G-banding) и детекция генных мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 18–26 гена DNMT3A, 12–15 и 19–21 гена FLT3, 7–12 и 16–19 гена KIT, 1–4 гена KRAS, 9–12 гена NPM1, 1–4 гена NRAS, 4–11 гена TP53, 6–9 гена WT1 методом прямого автоматического секвенирования. Праймеры, использовавшиеся для детекции мутаций в указанных генах, технологии выделения РНК и секвенирования кДНК описаны нами ранее [4–8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследуемом случае заболевание манифестировало с появления лихорадки до 40°С, петехиальной сыпи на различных участках кожи в сочетании с ветряночными папулами и пустулами с геморрагическим пропитыванием (диагностирован дебют ветряной оспы), стоматита, гингивита, десневых кровотечений.

В клиническом анализе крови уровень гемоглобина составил 69 г/л, лейкоцитов – $76{,}5\times10^3$/мкл (бластемия – 61,0%), тромбоцитов – 12×10^3/мкл. В гиперклеточном костном мозге (миелокариоциты – 120000/мкл) бластные клетки составляли 47,2%, базофилы – 4,6%. Цитохимические реакции на липиды были положительны в 29,0% бластов, мелкогранулярный гликоген на диффузном фоне определялся в 81,0% бластных клеток. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией $CD45^{low}$ (63%), CD34 (63%), CD13 (62%), cytMPO (47%), CD117 (33%), CD33 (30%), CD38 (27%), HLA-DR (15%). При иммуногистохимическом исследовании определялся диффузный инфильтрат из мононуклеаров среднего и мелкого размеров с чертами бластов, со светлым ядром несколько неправильной формы с одной или несколькими ядрышками, коэкспрессирующих в ядре и цитоплазме MPO и CD34, слабо и неравномерно CD117, в части клеток – CD68. На основании данных морфологического исследования у больного был диагностирован ОМЛ, вариант М2базо по FAB-классификации. При дополнительном инструментальном обследовании выявлена умеренная гепатоспленомегалия, инфаркт селезенки, небольшое количество жидкости в левом плевральном синусе, в биохимическом анализе – повышенный уровень ЛДГ (1291 Е/л).

При цитогенетическом исследовании определялся аберрантный кариотип лейкозных бластов 47, XY, +13. ПЦР-методом химерные транскрипты BCR-ABL и CBFB2-MYH11 не определялись. Методом прямого секвенирования определялась криптическая трансверсия с. 182 A>C по второй позиции кодона CAA в гене NRAS, приводившая к замене аминокислотного остатка глутамина на пролин в кодируемом полипептиде (p. 61 Q>P). Кроме того, в кодирующей последовательности антионкогена TP53 определялась несинонимичная трансверсия с. 215 C>G, являющаяся полиморфным аллельным вариантом, не имеющим в патогенезе лейкозов [7]. Кодирующие последовательности экзонов остальных исследованных генов полностью соответствовали «дикому типу».

Программное лечение ОМЛ проводилось по протоколу ОМЛ 01.10 Российской исследовательской группы по изучению острых лейкозов. В течение трех дней пациент получал предфазу нарастающими дозами гидроксикарбамида с 1,0 до 3,0/сут внутрь. В фазе индукции ремиссии использовался цитарабин 100 мг/м^2 с 1-го по 7-й день, даунорубицин 60 мг/м^2 с 1-го по 3-й дни («7+3») [3]. В постцитостатическом периоде на +7 сутки диагностирована фебрильная нейтропения, по поводу которой пациент получал антибиотики широкого спектра действия и противогрибковые препараты. На +10 сутки после окончания курса полихимиотерапии в клиническом анализе крови сохранялась бластемия 15% при уровне лейкоцитов 2700/мкл, низкий уровень гемоглобина (88 г/л) и тромбоцитов (7×10^3/мкл) на фоне заместительной трансфузионной терапии в полном объеме. Констатирована резистентность лейкозных клеток к первому курсу индукции ремиссии. На +21 сутки начат второй курс индукции ремиссии по той же схеме («7+3»), однако на +14 сутки после его окончания в аспирате костного мозга сохранялась лейкемическая инфильтрация (до 50% бластов), в связи с чем материал был повторно направлен на иммунофенотипическое, цитогенетическое и молекулярно-генетические исследования.

После проведенного обследования подтвержден диагноз ОМЛ, М2базо по FAB-классификации, резистентный к двум курсам химиотерапии по схеме «7+3». При этом кариотип лейкозных клеток изменился на 47, XY,+13 / 47, XY, +mar (16) / 46, XY, del (5) (p1.3–1.5) / 46, XY (**Рисунок 1**), но трансверсия с. 182 A>C в гене NRAS продолжала определяться как в пробах костного мозга, так и периферической крови. Для преодоления резистентности выполнен курс интенсивной химиотерапии НАМ (цитарабин 11,7/сут в 1–3 дни, митоксантрон 19,5/мг сут в 3–5 дни) [3]. Постцитостатический период характеризовался персистирующей панцитопенией и осложнился herpes zoster в сроки на +50 сутки после окончания курса. При исследовании аспирата костного мозга вновь сохранялась лейкемическая инфильтрация (недифференцированные бласты – 10,4%). Констатирована резистентность опухоли к проводимому лечению.

В связи с персистирующей панцитопенией больному было продолжено паллиативное лечение малыми дозами цитарабина 20 мг 2 раза в сутки подкожно, а в дальнейшем он был переведен на таблетированные препараты (6-меркаптопурин, гидроксикарбамид), которые получал амбулаторно под контролем онколога по месту жительства в течение трех лет. Осуществлялась заместительная трансфузионная терапия в целях коррекции анемии и тромбоцитопении. При контрольных осмотрах гематолога исследовались аспираты костного мозга. Оказалось, что на 40 месяце лечения аберрантный кариотип лейкемических клеток изменился на 47, XY, add(14)(q32),–10, +13, +20 [5] / 47, XY, +13 [3] / 47, XY, add(14)(q32), +13 [2] / 46, XY, add(14)(q32),–10, +13 [2]. При этом в гене NRAS, наряду с ранее определявшейся несинонимичной трансверсией с. 182 A>C, была выявлена дополнительная мутация – с.35 G>C. Смерть пациента наступила на 42 месяце наблюдения на фоне прогрессирования синдрома костномозговой недостаточности.

ОБСУЖДЕНИЕ

Диагностика и лечение резистентных к стандартной программной полихимиотерапии форм ОМЛ представляет собой достаточно серьезную проблему в клинической онкогематологии. С одной стороны, наличие неблагоприятных молекулярных и цитогенетических предикторов позволяет прогнозировать низкую эффективность ответа ОМЛ на лечение цитарабином и антрациклинами, с другой, эффективные таргетные препараты для лечения ОМЛ с комплексными генетическими аномалиями и мутациями в гене NRAS не разработаны, а потому в качестве основной лечебной опции используется аллогенная трансплантация костного мозга вне ремиссии заболевания, хотя ее эффективность невысока [9]. При наличии медицинских противопоказаний к интенсивной химиотерапии и трансплантации методом выбора является паллиативная химиотерапия [3].

В описанном наблюдении отмечалось наличие трисомии по хромосоме 13 и несинонимичной замены с. 182 A>C в гене NRAS, являвшихся факторами неблагоприятного прогноза ОМЛ, в дебюте заболевания. Лейкемические клетки были резистентными к трем курсам интенсивной полихимиотерапии. Длительная персистирующая панцитопения и тяжелые инфекционные осложнения являлись противопоказанием для дальнейшей интенсификации лечения. Тем не менее, на фоне сдерживающего лечения малыми дозами цитарабина, 6-меркаптопурином и гидроксикарбамидом, удалось стабилизировать течение заболевания. В результате, общая

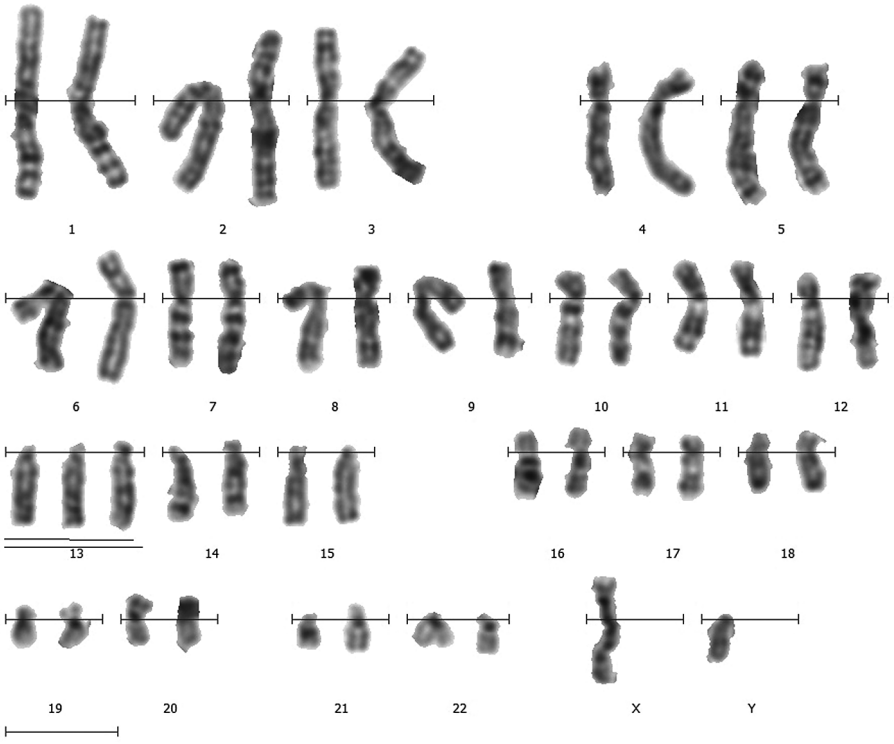

Рисунок 1. Кариотип лейкемических клеток при ОМЛ М2 базо после окончания двух курсов программной полихимиотерапии.

продолжительность наблюдения пациента вне ремиссии составила около 3,5 лет. При этом трансверсия с. 182 A>C в гене NRAS определялась в пробах костного мозга и периферической крови как в дебюте заболевания, так и на всех последующих этапах его наблюдения и лечения. Иммунофенотипические характеристики бластных клеток не изменялись. Кариотип лейкемических клеток эволюционировал во все периоды наблюдения резистентного ОМЛ за счет появления дополнительных аберрантных клонов, несущих как новые структурные, так и количественные аномалии хромосом. Кроме того, на 40 месяце наблюдения в гене NRAS, наряду с ранее определявшейся мутацией с. 182 A>C, была выявлена еще одна функционально значимая замена – с. 35 G>C, что также являлось маркером клональной эволюции резистентного ОМЛ в терминальной стадии.

ВЫВОДЫ

1. Мутации в гене NRAS, анеуплоидии и комплексные аберрации хромосом являлись факторами риска развития резистентности ОМЛ к программной полихимиотерапии.

2. Кариотип лейкемических клеток эволюционировал при резистентном ОМЛ за счет появления дополнительных аберрантных клонов, несущих новые структурные и количественные аномалии хромосом.

3. Количество функционально значимых мутаций в гене NRAS, определяемых методом прямого секвенирования, увеличилось в ходе эволюции резистентного ОМЛ: наряду с определявшейся в дебюте заболевания несинонимичной трансверсией с. 182 A>C, на 40 месяце наблюдения дополнительно определялась замена с. 35 G>C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al.* WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC, 2008, 439.
2. *Vardiman J. V., Thiele J., Arber D. A. et al.* The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009, 114 (5), 937–952.
3. *Савченко В. Г., Паровичникова Е. Н., Афанасьев Б. В. и соавт.* Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. Гематология и транс-

фузиология 2014, 59 (S.2), 2–29. [*Savchenko V. G., Parovichnikova E. N., Afanasyev B. V. et al.* National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. Hematol. Transfusiol 2014, 59 (S.2), 2–29.]

4. *Виноградов А. В.* Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах. Российский онкологический журнал 2013, 4, 34–35. [*Vinogradov A. V.* Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 during acute myeloid leukemia Russian Journal of Oncology 2013, 4, 34–35.]
5. *Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сазонов С. В., Сергеев А. Г.* Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15–45 лет. Гены и клетки 2018, 14 (3), 70–74. [*Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sazonov S. V., Sergeev A. G.* Clinical and pathological features DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. Genes and cells 2018, 14 (3), 70–74.]
6. *Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.* Детекция точечных мутаций в гене DNMT3A при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования. Бюллетень сибирской медицины 2015, 14(1), 18–23. [*Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G.* DNMT3A gene point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Bulletin of Siberian Medicine 2015, 14(1), 18–23.]
7. *Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.* Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Вестник Башкирского университета 2014, 3, 845–847. [*Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G.* KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Bulletin of Bashkir State University 2014, 3, 845–847.]
8. *Виноградов А. В., Резайкин А. В., Сергеев А. Г.* Прогностическое значение мутаций гена TP53 при программном лечении острых лейкозов. Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН 2013. 24(2), 33–40. [*Vinogradov A. V., Rezaikin A. V., Sergeev A. G.* Prognostic impact of TP53 mutations in the treatment of acute leukemia. Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS2013. 24(2), 33–40.]
9. *Гиндина Т. Л., Мамаев Н. Н., Николаева Е. С. и соавт.* Исход аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток при острых миелоидных лейкозах с гипердиплоидным кариотипом. Клиническая онкогематология. 2016. 9(4), 383–390. [*Gindina T. L.. Mamayev N. N.. Nikolayeva E. S. et al.* Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with hyperdiploid karyotype. Clin. Oncohematol. 2016. 9(4), 383–390.]

IMMUNOLOGICAL EVALUATION AND TREATMENT OF RESISTANCE ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN YOUNG ADULT (CASE REPORT)

© 2019 A. V. Vinogradov[1,2]*, A. V. Rezaykin[3], E. A. Partylova[2], S. V. Sazonov[3], A. G. Sergeev[3]

**E-mail: a.vinogradov@egov66.ru*
[1]Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russia;
[2]Sverdlovsk Regional State Hospital N1, Ekaterinburg, Russia;
[3]Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia

Received: 29.05.2019. **Accepted:** 30.06.2019

Aim: to analyze the case of immunological detection and treatment of young male with resistant acute myeloid leukemia in Sverdlovsk Regional Hematological Centre. Bone marrow and peripheral blood samples obtained from male, aged 38, treated using intensive chemotherapy programs and then obtained supportive care and palliative chemotherapy in municipal hospital. Immunohistochemical characterization of AML blast cells: medium and small cells with one or several nucleoli, MPO, CD34, CD117, CD68 positive. In cytochemistry lipids were positive in 29.0% of blasts, glycogen – 81.0%. Immunophenotype of blast cells was CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, MPO-cyt (+). Karyotype was 47, XY, +13 and changed during AML clonal progression. In case, two non-synonymous substitution were co-existed in samples: NRAS gene c. 182 A>C and TP53 gene c. 215 C>G. The number of NRAS gene point mutations changed during AML clonal progression (additional c. 35 G>C substitution was found). Immunophenotype of blast cells not changed during progression. Overall time of patient observation was 42 week.

Key words: acute myeloid leukemia, immunophenotyping, cytogenetics, direct sequencing

Authors:

Vinogradov A. V.,✉ MD, chief therapist of the Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Ekaterinburg, Russia;

Ekaterinburg, Sverdlovsk Regional Ministry of Health. Phone: +79089093135, **E-mail:** a.vinogradov@egov66.ru;

Rezaykin A. V., MD, professor assistant of Department of Medical Physics, Informatics and Mathematics, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;

Partylova E. A., MD, senior physician of clinical laboratory, Sverdlovsk Regional State Hospital N1, Ekaterinburg, Russia;

Sazonov S. V., MD, professor, chief of Department of Histology, Cytology and Embryology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia;

Sergeev A. G., MD, professor, chief of Department of Microbiology, Virology and Immunology, Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russia.