© Коллектив авторов, 2014

Особенности иммунофенотипа бластных клеток у больных *de novo* острым миелоидным лейкозом с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD*

С.В. ГРИЦАЕВ, И.С. МАРТЫНКЕВИЧ, Ж.В. ЧУБУКИНА, Е.В. ПЕТРОВА, И.И. КОСТРОМА, М.П. ИВАНОВА, Л.С. МАРТЫНЕНКО, Н.А. ПОТИХОНОВА, Л.Н. БУБНОВА, К.М. АБДУЛКАДЫРОВ

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России, Санкт-Петербург

The specific features of the immunophenotype of blast cells in patients with de novo normal karyotype acute myeloid leukemia and *FLT3-ITD* mutation

S.V. GRITSAEV, I.S. MARTYNKEVICH, ZH.V. CHUBUKINA, E.V. PETROVA, I.I. KOSTROMA, M.P. IVANOVA, L.S. MARTYNENKO, N.A. POTIKHONOVA, L.N. BUBNOVA, K.M. ABDULKADYROV

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Biomedical Agency of Russia, St. Petersburg

Резюме

Цель исследования. Изучение особенностей *de novo* острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с мутацией *FLT3-ITD*.

Материалы и методы. Проведен анализ результатов обследования 101 больного. Морфологические препараты костного мозга окрашивали по Паппенгейму. Кариотип изучали с помощью стандартного GTG-метода. Иммунофенотипирование бластных клеток проводили в пятицветном анализе на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500.

Результаты. Мутация *FLT3-ITD* обнаружена у 21 больного, которые имели разную морфологическую природу бластов, разные варианты кариотипа и нередко дополнительную мутацию гена *NPM1*. Отличительной особенностью у 10 больных с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* (без мутации гена *NPM1*) было увеличение числа случаев с высокой экспрессией HLA-DR и CD7 по сравнению с контрольной группой, в которую включены 18 больных ОМЛ с нормальным кариотипом и без мутации *FLT3-ITD*: 50% против 6,2% (p=0,007) и 100% против 55,6% (p=0,014) соответственно.

Заключение. ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* представляет группу, однородную по биологическому фенотипу лейкозных клеток.

Ключевые слова: de novo острый миелоидный лейкоз, нормальный кариотип, мутация FLT3-ITD, иммунофенотип, HLA-DR, CD7.

Aim. To study the specific features of de novo acute myeloid leukemia (AML) with *FLT3-ITD* mutation.

Subjects and methods. The results of examination were analyzed in 101 patients. Bone marrow morphological specimens were stained with Pappenheim stain. The karyotype was investigated using the standard GTG-banding method. Blast cells were immunotyped in a five-color analysis on a Cytomics FC 500 laser flow cytofluorometer.

Results. *FLT3-ITD* mutation was identified in 21 patients who had a varying morphological nature of blasts, different karyotype variants, and frequently additional *NPM1* gene mutation. The distinctive property of 10 patients with normal karyotype and *FLT3-ITD* mutation (without *NPM1* gene mutation) was the larger number of cases with high expression of HLA-DR and CD7 than in the control group that included 18 patients with normal karyotype AML without *FLT3-ITD* nutation: 50% versus 6.2% (p=0.007) and 100% versus 55.6% (p=0.014), respectively.

Conclusion. Normal karyotype AML with *FLT3-ITD* mutation is a group that is homogeneous in the biological phenotype of leukemia cells.

Key words: de novo acute myeloid leukemia, normal karyotype, FLT3-ITD mutation, immunophenotype, HLA-DR, CD7.

БК — бластные клетки
КМ — костный мозг
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз
ПК — периферическая кровь
ПР — полные ремиссии

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет группу клональных заболеваний миелоидной ткани, характеризующихся нарушением дифференцировки и созревания гемопоэтических клеток с накоплением значительной массы незрелых (бластных) клеток (БК) преимущественно в костном мозге (КМ) [1, 2]. Отличительным признаком ОМЛ является выраженная морфологическая, иммунологическая и молекулярно-генетическая гетерогенность лейкозных клеток. Вариабельность ОМЛ отражена в классификации ВОЗ органов кроветворной и лимфоидной тканей [3, 4].

Согласно последней версии классификации ВОЗ (2008) выделяют 4 группы ОМЛ: 1) с характерными генетическими изменениями; 2) с дисплазией нескольких ростков; 3) связанный с предшествующей терапией; 4) не подпадающий под признаки перечисленных групп. По сравнению с версией от 2001 г. в группе ОМЛ с повторяющимися молекулярно-генетическими аберрациями, кото-

рые сопряжены с определенными морфологическими находками и ассоциированы с характерным клиническим течением, число вариантов увеличено за счет таких аберраций, как транслокация t(6;9)(p23;q34)/*DEK-NUP214*, инверсия inv(3)(q21q26.2)/*RPN1-EVI1*.

Расширены также диагностические критерии для ОМЛ с признаками дисплазии посредством добавления к типичным морфологическим находкам цитогенетических маркеров, имеющих вид сбалансированных и несбалансированных перестроек, таких как делеция и моносомия 7-й хромосомы, моносомия 5-й хромосомы, делеция del(11q) и другие аберрации [4].

Вместе с тем, несмотря на принципиальную роль хромосомных аберраций в формировании клинико-гематологического фенотипа ОМЛ и активное манипулирование цитогенетическими изменениями в классификационных системах, необходимо отметить следующее. Во-первых, повреждения в кариотипе, которые позволяют прогнозировать течение заболевания, имеются лишь у некоторых больных ОМЛ (около 40% больных ОМЛ имеют нормальный кариотип). Так, CBF (core binding factor) варианты с транслокацией t(8;21) и инверсией inv(16) составляют от 10 до 15% всех случаев ОМЛ [5—7]. Во-вторых, в рамках классификации ВОЗ существует значительная группа ОМЛ без дополнительных характеристик.

Отсутствие хромосомных аберраций у больных ОМЛ объясняет повышенный интерес к молекулярно-генетическим повреждениям, которые могут 1) быть непосредственно задействованы в лейкозогенезе; 2) принимать участие в формировании клинико-гематологической картины; 3) влиять на эффективность стандартной цитостатической терапии; 4) рассматриваться как перспективные «мишени» для терапевтического воздействия. Такими повреждениями являются мутации генов *FLT3*, *NPM1* и *CEBPA*.

Согласно рекомендациям European LeukemiaNet изучение статуса перечисленных генов способствует более четкому распределению по группам риска больных ОМЛ с нормальным кариотипом. Так, случаи с единичной мутацией гена *NPM1* или гена *CEBPA* отнесены в группу благоприятного прогноза. Напротив, мутация *FLT3-ITD* сопровождается ухудшением прогноза независимо от статуса гена *NPM1*. Наличие у больного ОМЛ с нормальным кариотипом мутации *FLT3-ITD* дает основание определить его в группу с промежуточным—1 риском [8], хотя, по мнению E. Estey [9], больного с мутацией *FLT3-ITD* следует относить к группе промежуточного—2 риска.

Одновременно рассматривается вопрос о возможном включении ОМЛ с одиночной мутацией гена *NPM1* или *CEBPA* в группу с повторяющимися генетическими повреждениями в качестве новых самостоятельных вариантов [4]. Это неудивительно, так как ряд авторов продемонстрировали клинико-гематологическую однородность больных ОМЛ с мутацией гена *NPM1* [10—12]. Установлено, что мутация гена *NPM1* встречается преимущественно у взрослых больных *de novo* ОМЛ, БК которых чаще всего имеют моноцитарную природу, нормальный кариотип и практически не экспрессируют антиген CD34. Мутация обнаруживается во всех лейкозных клетках и отличается стабильностью. Случаи ОМЛ с мутацией гена *NPM1* имеют уникальный профиль экспрессии генов, отличительными признаками которого являются снижение активности гена *CD34*, повышение активности генов группы *HOX*, а также дисрегуляция микроРНК, в частности активация *miR-10a* и *miR-10b*. Больные ОМЛ с изолированной мутацией *NPM1* обычно хорошо отвечают на индукционные курсы терапии и имеют относительно благоприятный прогноз.

Что касается случаев ОМЛ с мутацией *FLT3-ITD*, то данные, представленные разными авторами, не позволяют сделать окончательное заключение об однородном составе этой группы из-за противоречивого характера результатов. Тем не менее проблема имеет несомненную практическую актуальность, так как обнаружение мутации *FLT3-ITD* сопряжено с крайне неблагоприятным течением большинства случаев ОМЛ [13]. Обусловлено ли снижение эффективности цитостатической терапии клиническими показателями (пол, возраст), гематологическими параметрами (лейкоцитоз, характер морфологических изменений БК, вариант ОМЛ), особенностями иммунофенотипа лейкозных клеток, дополнительными биологическими повреждениями или наличием только мутации *FLT3-ITD*, неясно.

Цель данного исследования — выявить особенности *de novo* ОМЛ с мутацией *FLT3-ITD*. Для этого запланировано решение 2 задач. Во-первых, оценить вариабельность морфологических и цитогенетических показателей у больных ОМЛ с мутацией *FLT3-ITD*. Во-вторых, установить, насколько однородным является состав группы больных ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* по данным отдельных гематологических показателей и изучения иммунофенотипа БК.

Материалы и методы

Результаты обследования больных ОМЛ получены из базы данных гематологической клиники, клинико-гематологической и молекулярно-генетической лаборатории, а также лаборатории иммуногематологии.

Сведения об авторах:

Мартынкевич Ирина Степановна — д.б.н., рук. молекулярно-генетической лаб.

Чубукина Жанна Викторовна — к.м.н., н.с. лаб. иммуногематологии

Петрова Екатерина Вадимовна — м.н.с. молекулярно-генетической лаб.

Кострома Иван Иванович — м.н.с. клинического отд-ния химиотерапии, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга

Иванова Марина Петровна — к.м.н., врач-генетик молекулярно-генетической лаб.

Мартыненко Людмила Сергеевна — н.с. молекулярно-генетической лаб.

Потихонова Надежда Александровна — к.м.н., зав. клинико-диагностической лаб.

Бубнова Людмила Николаевна — д.м.н., проф., рук. лаб. иммуногематологии

Абдулкадыров Кудрат Мугутдинович — д.м.н., проф., рук. клинического отд-ния химиотерапии, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга

Контактная информация:

Грицаев Сергей Васильевич — д.м.н., г.н.с. клинического отд-ния химиотерапии, депрессий кроветворения и трансплантации костного мозга; тел. +7(812)717-5468; e-mail: gritsaevsv@mail.ru

Ассоциация мутационного статуса гена *FLT3* и иммунофенотипа БК

Показатель	$CD34^+$		$HLA\text{-}DR^+$		$CD7^+$	
	M±*m*	%*	*M*±*m*	%*	*M*±*m*	%*
FLT3-ITD$^+$ (*n*=10)	73,1±23,5	9 (90%) из 10	22,1±21,4	5 (50%) из 10	70,3±20,1	10 (100%) из 10
FLT3-ITD$^-$ (*n*=18)	63,7±26,7	15 (83,3%) из 18	7,3±8,2	1 (5,6%) из 18	42,3±35,1	10 (55,6%) из 18
p	0,472	0,635	0,347	0,007	0,061	0,014

Примечание. * — число случаев ОМЛ с экспрессией кластера дифференцировки на ⩾20% БК.

Диагноз ОМЛ устанавливали по критериям классификации ВОЗ [3, 4].

Морфологические препараты КМ окрашивали по Паппенгейму. Для дифференцированного подсчета клеточного состава миелограммы анализировали не менее 500 клеток.

Исследование кариотипа осуществляли по стандартному GTG-методу. В отсутствие хромосомных аберраций у больных ОМЛ с созреванием БК дополнительно проводили FISH-исследование для выявления транслокации t(8;21).

Мутационный статус генов *FLT3* и *NPM1* изучали методом полимеразной цепной реакции тотальной геномной ДНК [13].

Иммунофенотипирование БК КМ проводили в пятицветном анализе на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США) с использованием панели моноклональных антител («Beckman Coulter», США), меченных разными флуорохромами (FITC, PE, ECD, Pc-5, Pc-7), к поверхностным и внутриклеточным дифференцировочным антигенам миеломоноцитарного и лимфоидного ряда: CD45, CD34, HLA-DR, CD38, CD117, CD33, CD13, CD11c, CD9, CD14, CD64, CD15, CD16, CD56, CD1a, CD2, CD3,CD5, CD7, CD4, CD8, CD10, CD19, CD20, CD22, CD79a, MPO, TdT.

Для выполнения поставленных задач сформулированы критерии включения, на основании которых осуществляли отбор больных из баз данных. Общими критериями для всех больных были *de novo* ОМЛ без предшествующей цитостатической терапии, кроме приема гидроксимочевины, возраст 18 лет и старше, наличие доступной информации о результатах изучения миелограмм и исследования кариотипа.

Для решения второй задачи потребовалось выполнение дополнительных условий: 1) исключение из общей группы пациентов больных ОМЛ с хромосомными аберрациями независимо от их характера; 2) иммунофенотипирование БК КМ с обязательным определением экспрессии антигенов HLA-DR, CD7, CD34; 3) доступность результатов исследования цельной крови и мазков периферической крови (ПК) с дифференцированным подсчетом лейкоцитарной формулы, проведенного во время верификации диагноза; 4) отсутствие мутации гена *NPM1*.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ Excel и Statistica. Различие между отдельными показателями принимали достоверным при $p<0,05$.

Результаты

За период с 2005 г. по декабрь 2012 г. в молекулярно-генетической лаборатории РНИИГТ исследование мутационного статуса генов *NPM1* и *FLT3* выполнено 101 больному ОМЛ.

Мутация *FLT3-ITD* обнаружена у 21 больного, соответствующего критериям включения в исследование. Среди них 11 (52,4%) мужчин и 10 (47,6%) женщин, соотношение 1,1:1,0. Медиана возраста больных составила 56 лет (от 32 до 76 лет).

Распределение по вариантам классификации ВОЗ было следующим: 2 больных с транслокацией t(15;17) (острый промиелоцитарный лейкоз), 1 — без созревания БК, 11 — с созреванием БК, 4 больных острым миеломонобластным лейкозом, 2 — острым монобластным лейкозом и 1 — эритромиелозом. Таким образом, в большинстве случаев БК имели миелоидную или моноцитарную природу — у 12 (57,1%) и 6 (28,6%) больных соответственно.

По результатам цитогенетического исследования обнаружено, что у 13 (61,9%) больных с мутацией *FLT3-ITD* имелся нормальный кариотип. В остальных случаях обнаружены цитогенетические поломки, представленные разными вариантами хромосомных аберраций. Транслокация t(15;17)(q22;q21) имелась у 2 больных. Одиночные аберрации, включая трисомию 8-й хромосомы и делецию del(9q)(q22), верифицированы у 2 пациентов. У 3 больных выявлены двойные аберрации и у 1 больного — множественные поломки. Необходимо отметить, что у 3 больных с ⩾2 хромосомными аберрациями характер повреждений соответствовал критериям моносомного кариотипа [14].

Одновременно с мутацией *FLT3-ITD* у 3 пациентов обнаружена мутация гена *NPM1*.

Отдельному анализу подвергнуты данные обследования больных ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD*. Заданным критериям включения соответствовали 10 больных. Группу сравнения составили 18 больных.

Возраст больных *de novo* ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией гена *FLT3-ITD* был от 23 до 76 лет, медиана — 62 года. При этом 6 (60%) больных были старше 60 лет.

Заболевание представлено случаями с созреванием БК (у 7 больных), острым миеломонобластным лейкозом (у 2) и острым монобластным лейкозом (у 1).

На период верификации диагноза в анализе ПК+ выявлены следующие показатели: л. 23,1±19,6·10^9/л (2,9—69,6·10^9/л), бл. 43,1±28,1% (0—95%), Hb 86,7±13,1 г/л (55—118 г/л), тр. 52,0±29,8·10^9/л (13,0—178,0·10^9/л).

В пунктате КМ среднее содержание миелокариоцитов составило 116,2±87,4·10^9/л (10,0 — 380,0·10^9/л). Количество БК и эритроидных клеток в миелограмме достигало 60,5±12% (27,4—77,1%) и 13,8±6% (5,2—26,6%) соответственно.

Медиана возраста больных контрольной группы была 49 лет (от 19 до 76 лет) и достоверно не отличалась от возраста больных ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* (p=0,164).

При сравнении результатов иммунофенотипирования БК у больных с мутацией гена *FLT3-ITD* и без таковой не выявлено значимых различий по средним показателям экспрессии CD34 и HLA-DR (p=0,472 и p=0,347 соответственно). Различие по средним показателям экспрессии CD7 также было недостоверным, однако наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии данного антигена на БК больных с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* (p=0,061; **см. таблицу**).

Поэтому дополнительно проанализировано число больных, у которых на БК экспрессия отдельных антигенов превышала 20% (диагностически значимая величина). Между группами с мутацией *FLT3-ITD* и без нее не выявлено различий по числу больных с высокой экспрес-

сией CD34 — 90% против 83,3% (p=0,635). В то же время больных с высокой экспрессией HLA-DR и CD7 было значительно больше в группе с нормальным кариотипом и мутацией *FLT3-ITD* — 50% против 5,6% (p=0,007 и 100% против 55,6%; p=0,014; **см. таблицу**).

Обсуждение

Одним из способов повышения выживаемости больных ОМЛ является адаптация интенсивности цитостатической терапии к варианту прогноза [9]. Для распределения больных ОМЛ на группы риска могут быть использованы клинические, гематологические и морфологические показатели. В то же время, как продемонстрировано в многочисленных исследованиях, наиболее информативным фактором риска на этапе диагностики ОМЛ является кариотип [15, 16]. Обнаружено, что отдельные хромосомные аберрации, такие как инверсия inv(16), транслокация t(8;21) и транслокация t(15;17), ассоциированы с относительно благоприятным прогнозом независимо от отсутствия или наличия дополнительных цитогенетических аномалий [5, 17]. Напротив, выявление так называемого моносомного кариотипа сопряжено с крайне неблагоприятным течением ОМЛ даже в случае проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [18, 19].

Число хромосомных аберраций, для которых установлен прогностический потенциал, постоянно увеличивается. Вместе с тем остается проблема больных *de novo* ОМЛ с нормальным кариотипом. В некоторой степени прогнозировать течение такого варианта ОМЛ можно по скорости элиминации БК из ПК в период индукционной терапии [20], а также клеточности КМ и количеству БК в костномозговом пунктате на 14-й день постиндукционного периода [21]. Однако наибольший практический интерес представляют молекулярно-генетические повреждения: мутации или нарушения экспрессии отдельных генов. Это обусловлено тем, что большинство генетических аберраций могут не только использоваться для определения прогноза, но также быть маркерами объема резидуальных лейкозных клеток и «мишенями» для так называемой таргетной терапии. К таким повреждениям относятся мутации генов *NPM1* и *FLT3*, определение которых включено в большинство алгоритмов лечения больных *de novo* ОМЛ [8, 9].

Рецептор FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) является одним из представителей суперсемейства трансмембранных рецепторных тирозинкиназ. Экспрессия FLT3 тирозинкиназы обнаружена преимущественно в стволовых кроветворных клетках $CD34^+$, в лимфоцитах тимуса и лимфатических узлов. Структуру FLT3 можно представить в виде 2 частей: рецепторная часть расположена на клеточной мембране и состоит из 5 иммуноглобулиновых доменов, которые связываются с лигандом. Внутренняя часть состоит из подмембранного (юкстамембранного) домена и 2 каталитических (киназных) доменов. Связывание рецептора с лигандом ведет к его димеризации, фосфорилированию и связыванию с внутриклеточными Src-киназами, что приводит к запуску каскада реакций по MAP-киназному пути и экспрессии генов, отвечающих за пролиферацию, рост и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток.

Рецептор FLT3 кодируется геном *FLT3*, который состоит из 993 аминокислот [22, 23]. Обнаружено несколько приобретенных мутаций гена *FLT3*, которые вовлечены в лейкозогенез. Для рецептора FLT3 характерны 2 основных типа мутаций — внутренняя тандемная дупликация (internal tandem duplication FLT3-ITD) и точечная мутация в «А-петле» (FLT3-TKD). FLT3-ITD встречается примерно у 15—35% больных ОМЛ, размер инсерции может составлять от 3 до 400 п.о. Наличие FLT3-ITD ассоциировано с быстрым прогрессированием заболевания, устойчивостью к стандартной терапии и, следовательно, с неблагоприятным прогнозом как у детей, так и у взрослых. Так P. Kottaridis и соавт. [24] в случае обнаружения мутации FLT3-ITD выявили снижение частоты полных ремиссий — ПР (78% против 84% у больных без мутации; p=0,05), а также 5-летней общей выживаемости (32% против 44%; p<0,001) и безрецидивной выживаемости (23% против 39%; p<0,001) из-за высокой частоты рецидивов (64% против 44%; p<0,001). В то же время, по данным S. Schnittger и соавт. [25], при выявлении мутации FLT3-ITD следует ожидать снижения «бессобытийной» выживаемости, тогда как частота ПР и медиана общей выживаемости не зависят от мутационного статуса гена *FLT3*.

Различие результатов исследований может быть обусловлено многими факторами. Так, установлено прогностическое значение размера инсерционной последовательности у FLT3-ITD-положительных больных: более крупный размер инсерционной последовательности ассоциирован с высокой вероятностью рецидива [26]. Различные размер, вид, аллельная нагрузка мутаций в подмембранном домене могут иметь уникальную биологическую и клиническую значимость, тем самым внося дополнительную сложность в использование FLT3-ITD в качестве прогностического маркера [26, 27].

Вместе с тем следует признать, что более важным является состав анализируемых групп в исследованиях, который различается не только по возрасту больных и их коморбидности, но и по цитоморфологическим вариантам ОМЛ, вариантам кариотипа, сопутствующим генетическим повреждениям. Необходимо напомнить, что большинство из перечисленных параметров сами являются независимыми прогностическими факторами. Так, M. Breccia и соавт. [28] выявили, что наряду с мутацией FLT3-ITD негативное влияние на результаты лечения оказывают предшествующий миелодиспластический синдром, индекс коморбидности, рассчитанный по шкале Charlson, и лейкоцитоз >$100\cdot10^9$/л. По данным H. de Jonge и соавт. [29], гиперлейкоцитоз >$100\cdot10^9$/л сопряжен с наихудшими результатами лечения в случаях, характеризующихся промежуточным вариантом кариотипа и генотипом $NPM1^+$/$FLT3\text{-}ITD^+$.

В то же время в отличие от слитных генов *BCR/ABL* и *PML-RARά* мутация FLT3-ITD не ассоциирована с каким-то одним уникальным клинико-гематологическим фенотипом ОМЛ. Напротив, она может быть находкой, независимой от морфологических и цитогенетических изменений. При этом у больных острым промиелоцитарным лейкозом и ОМЛ с нормальным кариотипом и моноцитарной природой БК вероятность обнаружения мутации FLT3-ITD выше, чем при других вариантах ОМЛ. И хотя вопрос о прогностическом значении мутации у больных острым промиелоцитарным лейкозом остается нерешенным, в большинстве исследований продемонстрировано отсутствие негативного влияния FLT3-ITD на эффектив-

ность лечения [30—32], что также может отражаться на показателях выживаемости в группах, специально не отобранных больных.

Результаты собственного исследования подтверждают выраженную гетерогенность *de novo* ОМЛ с мутацией FLT3-ITD по клинико-гематологическим и молекулярно-генетическим характеристикам. Единственным параметром, который регулярно встречается у большинства больных ОМЛ с мутацией FLT3-ITD, является лейкоцитоз. Однако этого критерия явно недостаточно для формирования самостоятельной группы.

Оправданным представляется использовать наличие мутации FLT3-ITD для создания отдельного прогностического варианта в рамках ОМЛ с четко очерченными клинико-гематологическими и цитогенетическими показателями, каким является ОМЛ с нормальным кариотипом.

Мутация FLT3-ITD обнаруживается у 20—40% больных *de novo* ОМЛ с нормальным кариотипом [24, 27]. Отличительным признаком этой категории больных, как и больных ОМЛ с мутацией FLT3-ITD в целом, является более высокое количество лейкоцитов в ПК, чем у больных без мутации: 44,8—68,0·10^9 и 12,5—27,0·10^9/л соответственно [33, 34]. Предполагается, что причиной лейкоцитоза является конституциональная активация рецептора тирозинкиназы, приводящая к автономной, независимой от цитокинов, пролиферации клеток [23]. По данным F. Ostronoff и соавт. [35], лейкоцитоз более 20,0·10^9/л может рассматриваться как фактор, позволяющий предполагать наличие мутации *FLT3-ITD*. Однако лейкоцитоз >20,0·10^9/л констатируется у 58% больных *de novo* ОМЛ и только у 32% больных ОМЛ с мутацией *FLT3-ITD*, причем в группе со всеми вариантами кариотипа [29].

В связи с этим значительный интерес представляет изучение дополнительных, негематологических, факторов, позволяющих достаточно полно охарактеризовать случаи *de novo* ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией FLT3-ITD. Как установлено, отличительной особенностью больных ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией FLT3-ITD является высокая экспрессия антигена CD7 на БК [34, 36, 37]. Так V. Rausei-Mills и соавт. [37] при обследовании 31 больного ОМЛ обнаружили аберрантную экспрессию CD7 у 11 из 15 больных с мутацией FLT3-ITD и у 1 из 16 пациентов без мутации: 73 и 6% соответственно (p<0,001). Достоверное различие по аберрантной экспрессии CD7 обнаружено и P. Chauhan и соавт. [34]: 32% с мутацией и 8% без мутации (p<0,01). Различие по числу случаев с высокой экспрессией антигена CD7, как и различие по экспрессии других антигенов, включая HLA-DR и CD34, между разными исследованиями объясняется числом обследованных больных. Так, P. Chauhan и соавт. [34] проанализировали данные 136 больных, из которых у 27 выявлена мутация FLT3-ITD. Не менее важным является различие по возрастному составу больных, также как по морфологическим вариантам ОМЛ.

Вероятно, этими же причинами обусловлены и данные, полученные авторами статьи: высокая экспрессия антигена CD7 обнаружена у всех 10 больных с мутацией FLT3-ITD. Как установлено F. Schneider и соавт. [38], с возрастом у больных ОМЛ с нормальным кариотипом распространенность мутации FLT3-ITD снижается. В проведенном исследовании, хотя различие недостоверно, медиана возраста больных с мутацией составила 62 года, тогда как без мутации — 49 лет. Нельзя исключить, что экспрессия антигена CD7 у больных *de novo* ОМЛ может не только быть сопряжена с мутацией FLT3-ITD, но и отражать такие биологические особенности, как существование ранее не распознанного миелодиспластического синдрома, заболеваемость которым, как известно, увеличивается с возрастом.

Несмотря на различие в показателях, собственные данные подтверждают факт аберрантного иммунофенотипа БК больных ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией FLT3-ITD [34, 36, 37].

Существует мнение, что высокая экспрессия антигена CD7 на БК больных ОМЛ свидетельствует о возникновении лейкоза из ранних коммитированных гемопоэтических клеток. Подтверждением этой гипотезы может быть и другая находка проведенного анализа: высокая частота экспрессии антигена HLA-DR на БК больных с мутацией FLT3-ITD.

Полученные данные дают основание сделать вывод, что ОМЛ с нормальным кариотипом и мутацией FLT3-ITD представляет группу, однородную по целому ряду гематологических показателей и биологических характеристик лейкозных клеток. Для окончательного подтверждения данного тезиса необходимо дальнейшее накопление материала, который позволил бы выявить возможную ассоциацию мутации FLT3-ITD с возрастом, профилем экспрессии генов и эпигенетическими повреждениями, эффективностью стандартных индукционных и консолидирующих курсов терапии.

Немаловажным итогом проведенного исследования является также возможность прогнозировать вероятность обнаружения у больных *de novo* ОМЛ с нормальным кариотипом мутации FLT3-ITD. Как свидетельствуют собственные данные и данные литературы, маркерами возможной детекции мутации FLT3-ITD является лейкоцитоз в сочетании с аберрантной экспрессией антигена CD7 и/или повышенной экспрессией HLA-DR на БК. Целесообразность получения данной информации обусловлена появлением лекарственных препаратов, обладающих анти-FLT3-активностью [39, 40]. Учитывая, что резистентность БК больных ОМЛ с мутацией FLT3-ITD к цитостатическим препаратам не сопряжена с активностью гена множественной лекарственной резистентности [41—43], методом профилактики рецидива и улучшения безрецидивной выживаемости больных ОМЛ можно считать раннее назначение ингибиторов FLT3.

Заключение

Обязательным условием диагностики ОМЛ является проведение комплексного обследования больных с изучением иммунофенотипической характеристики БК, кариотипа и мутационного статуса отдельных генов. Результаты проведенных исследований дают основание установить природу БК и тем самым выбрать соответствующую схему лечения. Вместе с тем тщательный анализ результатов лабораторных исследований по мере их выполнения позволяет в ранние сроки предположить наличие дополнительных к возрасту и количеству лейкоцитов в ПК неблагоприятных факторов прогноза, например мутации FLT3-ITD, и тем самым выбрать оптимальную по интенсивности цитостатическую терапию.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Волкова М.А.* Клиническая онкогематология. М: Медицина 2007; 1120.
2. *Estey E., Dohner H.* Acute myeloid leukaemia. Lancet 2006; 368 (9550): 1894—1907.
3. *Vardiman J.W., Harris N.L., Brunning R.D.* The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood 2002; 100 (7): 2292—2302.
4. *Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al.* The 2008 revision of the World Health Organisation (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood 2008; 114 (5): 937—951.
5. *Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Абдулкадыров К.М. и др.* Острый миелобластный лейкоз с транслокацией t(8;21) (q22;q22): ретроспективный анализ выживаемости больных. Вестн гематол 2010; 1: 80—85.
6. *Sanderson R.N., Johnson P.R.E., Moorman A.V. et al.* Population-based demographic study of karyotypes in 1709 patients with adult acute myeloid leukemia. Leukemia 2006; 20 (3): 444—450.
7. *Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V. et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 2010; 116 (3): 354—365.
8. *Dohner H., Estey E.H., Amadori S. et al.* 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—474.
9. *Estey E.H.* Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am J Hematol 2012; 87 (1): 90—99.
10. *Rau R., Brown P.* Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukemia: towards definition of a new leukemia entity. Hematol Oncol 2009; 27 (4): 171—181.
11. *Haferlach C., Mecucci C., Schnittger S. et al.* AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. Blood 2009; 114 (14): 3024—3032.
12. *Falini B., Martelli M.P., Bolli N. et al.* Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? Blood 2011; 117 (4): 1109—1120.
13. *Мартынкевич И.С., Грицаев С.В., Москаленко М.В. и др.* Мутации генов FLT3 и NPM1 у больных острыми миелоидными лейкозами и влияние мутации FLT3-ITD на выживаемость больных с нормальным кариотипом. Тер арх 2010; 12: 33—39.
14. *Breems D.A., Löwenberg B.* Acute myeloid leukemia with monosomal karyotype at the far end of the unfavorable prognostic spectrum. Haematologica 2011; 96 (4): 491—493
15. *Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Мартыненко Л.С. и др.* Возраст и кариотип — факторы риска у больных первичным острым миелоидным лейкозом. Клин онкогематол 2010; 4: 359—364.
16. *Grimwade D., Mrózek K.* Diagnostic and prognostic value of cytogenetics in acute myeloid leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2011; 25 (6): 1135—1161.
17. *Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Петрова Е.В. и др.* Выживаемость больных CBF-вариантами de novo острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и кариотип. Вестн гематол 2012; 4: 11.
18. *Deeg H.J., Scott B.L., Fang M. et al.* Five-group cytogenetic risk classification, monosomal karyotype, and outcome after hematopoietic cell transplantation for MDS or acute leukemia evolving from MDS. Blood 2012; 120 (7): 1398—1408.
19. *Cornelissen J.J., Breems D., van Putten W.L. et al.* Comparative analysis of the value of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in acute myeloid leukemia with monosomal karyotype versus other cytogenetic risk categories. J Clin Oncol 2012; 30 (17): 2140—2146.
20. *Elliott M.A., Litzow M.R., Letendre L.L. et al.* Early peripheral blood blast clearance during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia predicts superior relapse-free survival. Blood 2007; 110 (13): 4172—4174.
21. *Lancet J.E., List A.F., Bello C.M. et al.* Outcomes and prognostic factors following double-induction chemotherapy in AML — a large, single institutional experience. Blood 2011; 118 (21): Abstr. 3605.
22. *Gilliland D.G., Griffin J.D.* Role of Flt3 in leukemia. Curr Opin Hematol 2002; 9 (4): 274—281.
23. *Rombouts W.J., Blokland I., Lowenbery B. et al.* Biologic characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplication in the Flt3 gene. Leukemia 2000; 14 (4): 675—683.
24. *Kottaridis P.D., Gale R.E., Frew M.E. et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 Trials. Blood 2001; 98 (6): 1752—1759.
25. *Schnittger S., Schoch C., Dugas M. et al.* Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. Blood 2002; 100 (1): 59—66.
26. *Kayser S., Schlenk R.F., Krauter J. et al.* Prognostic impact of mutant to wild-type ratio and insertion site in acute myeloid leukemia with FLT3 internal tandem duplication. Blood 2012; 120 (21): Abstr. 785.
27. *Gale R.E., Green C., Allen C. et al.* The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood 2008; 111 (5): 2776—2784.
28. *Breccia M., Frustaci A.M., Cannella L. et al.* Comorbidities and FLT3-ITD abnormalities as independent prognostic indicators of survival in elderly acute myeloid leukaemia patients. Hematol Oncol 2009; 27 (3): 148—153.
29. *de Jonge H.J.M., Valk P.J.M., S.J.M. de Bont E.S.J.M. et al.* Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. Haematologica 2011; 96 (9): 1310—1317.
30. *Noguera N.I., Breccia M., Divona M. et al.* Alterations of the FLT3 gene in acute promyelocytic leukemia: association with diagnostic characteristics and analysis of clinical outcome in patients treated with the Italian AIDA protocol. Leukemia 2002; 16 (11): 2185—2189.
31. *Callens C., Chevret S., Cayuela J.-M. et al.* Prognostic implication of FLT3 and Ras gene mutations in patients with acute promyelocytic leukemia (APL): a retrospective study from the European APL Group. Leukemia 2005; 19 (7): 1153—1160.
32. *Barragan E., Montesinos P., Camos M. et al.* Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. Haematologica 2011; 96 (10): 1470—1477.

33. *Frohling S., Schlenk R.F., Breitruck J. et al.* Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. Blood 2002; 100 (13): 4372—4380.
34. *Chauhan P.S., Bhushan B., Mishra A.K. et al.* Mutation of FLT3 gene in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and its association with clinical and immunophenotypic features. Med Oncol 2011; 28 (2): 544—551.
35. *Ostronoff A., Othus M., Kantarjian H.M. et al.* A scoring system for prediction of FLT3-ITD positivity in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. Blood 2012; 120 (21): Abstr. 2590.
36. *Chandía M.A., Vidriales M.B., Chillón C. et al.* Immunophenotypic characteristics of CD34+ cells according to genetic markers in acute myeloid leukemias with normal karyotype. Blood 2012; 120 (21): Abstr. 2554.
37. *Rausei-Mills V., Chang, M.D., Gaal K.K. et al.* Aberrant expression of CD7 in myeloblasts is highly associated with de novo acute myeloid leukemias with FLT3/ITD mutation. Am J Clin Pathol 2008; 129 (4): 624—629.
38. *Schneider F., Hoster E., Schneider S. et al.* Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). Ann Hematol 2012; 91 (1): 9—18.
39. *Stone R.M., Fischer T., Paquette R. et al.* Phase IB study of the FLT3 kinase inhibitor midostaurin with chemotherapy in younger newly diagnosed adult patients with acute myeloid leukemia. Leukemia 2012; 26 (9): 2061—2068.
40. *Rollig C., Brandts C., Shaid S. et al.* Survey and analysis of the efficacy and prescription pattern of sorafenib in patients with acute myeloid leukemia. Leuk Lymphoma 2012; 53 (6): 1062—1067.
41. *Pallis M., Turzanski J., Grundy M. et al.* Resistance to spontaneous apoptosis in acute myeloid leukaemia blasts is associated with p-glycoprotein expression and function, but not with the presence of FLT3 internal tandem duplications. Br J Haemat 2003; 120 (6): 1009—1016.
42. *Marzac C., Teyssandier I., Calendini O. et al.* Flt3 internal tandem duplication and P-glycoprotein functionality in171 patients with acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2006; 12 (23): 7018—7024.
43. *Galimberti S., Rossi A., Palumbo G.A. et al.* FLT3 mutations do not influence MDR-1 gene expression in acute myeloid leukemia. Anticancer Res 2003; 23 (4): 3419—3426.

Поступила 11.02.2013