

На правах рукописи

ЛЕБЕДЕВА СВЕТЛАНА АЛЕКСАНДРОВНА

**ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ С ПЕРЕСТРОЙКАМИ ГЕНА
KMT2A У ДЕТЕЙ: ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ И МОНИТОРИНГ
МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ**

3.1.28 – гематология и переливание крови
3.3.8 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации)

Научные руководители:

кандидат биологических наук **Зеркаленкова Елена Александровна**

доктор медицинских наук, профессор **Новичкова Галина Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Судариков Андрей Борисович – доктор биологических наук, заведующий отделом молекулярной генетики федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Бойченко Эльмира Госмановна – доктор медицинских наук, главный внештатный детский специалист гематолог, заведующая онкологическим отделением №6 Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Детский городской многопрофильный клинический специализированный центр высоких медицинских технологий».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, клиника «НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой»

Защита состоится «___» _____ 202_ года в ___ часов на заседании диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 21.1.025.01, созданного на базе ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им.Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул.Саморы Машела, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им.Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул.Саморы Машела, дом 1 и на сайте www.fnkc.ru

Автореферат разослан «___» _____ 202_ года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор **Жуков Николай Владимирович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это гетерогенная группа гемобластозов, для которой характерна опухолевая трансформация и экспансия незрелых миелоидных клеток. На долю ОМЛ приходится 15-20% от всех острых лейкозов (ОЛ) детского возраста [de Rooij, 2015].

Одним из наиболее частых генетических событий при ОМЛ у детей являются перестройки гена *KMT2A* (lysine methyltransferase 2A, ранее *MLL* – mixed lineage leukemia) – частота встречаемости составляет 20–25% всех случаев ОМЛ у детей [Conneely, 2021; Meyer, 2023]. Ген *KMT2A* кодирует фермент лизинметилтрансферазу 2A, который входит в состав крупного хроматин-модулирующего белкового комплекса, осуществляющего эпигенетический контроль экспрессии генов [Rao, 2015]. Перестройки данного гена представляют собой крайне гетерогенную группу и встречаются как при ОМЛ, так и при других вариантах ОЛ (острый лимфобластный – ОЛЛ, острый билинейный и бифенотипический лейкоз, вторичный ОЛ) [Balgobind, 2011; Meyer, 2023]. Пациенты с различными вариантами транслокаций с участием гена *KMT2A* в целом характеризуются неблагоприятным прогнозом [Casillas, 2003; Winters, 2017; Conneely, 2021]. Тем не менее, в ряде исследований было показано, что прогноз может варьировать в зависимости от природы гена-партнера [Balgobind, 2009; Conneely, 2021]. В других исследованиях было показано, что прогноз у пациентов с ОМЛ и ОЛЛ может зависеть от локализации точки разрыва (ТР) в гене *KMT2A*, при этом наиболее прогностически неблагоприятными являются транслокации, при которых ТР находится в интроне 11 гена *KMT2A*, вне зависимости от природы гена-партнера [Emerenciano, 2013; Цаур, 2016]. Однако важно отметить, что указанные исследования включали в себя преимущественно пациентов с ОЛЛ, причем в оба исследования не включались пациенты в возрасте старше 24 месяцев. Исходя из этого, очевидна необходимость всестороннего исследования

прогностической значимости характера перестройки гена *KMT2A*, включая локализацию ТР гена *KMT2A* и природу гена-партнера.

Диагностика минимальной остаточной болезни (МОБ) является крайне важным этапом, включенным в современные протоколы различными группами по лечению ОМЛ [Inaba, 2012]. Перестройки гена *KMT2A* являются удобным маркером для мониторинга МОБ, однако с учетом гетерогенности этих перестроек в ряде случаев их детекция и определение МОБ рутинными молекулярно-генетическими методами могут быть затруднены [Meyer, 2005; Lomov, 2021]. Соответственно, пациенты с *KMT2A*-позитивным ОМЛ нуждаются в проведении комплексного и детального генетического обследования в дебюте заболевания и после завершения каждого из ключевых этапов терапии. По этой причине существует необходимость всестороннего исследования молекулярно-генетических особенностей *KMT2A*-позитивного ОМЛ у детей, а также сравнения различных молекулярно-генетических методов детекции МОБ у данной группы пациентов.

Степень разработанности темы исследования

В зарубежной литературе имеются противоречивые данные о влиянии природы гена-партнера, вовлеченного в транслокацию с участием гена *KMT2A*, на прогноз общей и бессобытийной выживаемости у детей с ОМЛ [Balgobind, 2009; Harrison, 2010; Martinez-Climent, 1995; von Neuhoff, 2010; Pollard, 2021; Rubnitz, 2002; van Weelderen, 2024]. Влияние локализации ТР гена *KMT2A* на прогноз общей и бессобытийной выживаемости у детей с ОМЛ также недостаточно изучено и было проанализировано только в одном исследовании, включавшем в себя малое количество детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ [Emerenciano, 2013]. В Российской Федерации ранее оценка прогностического значения локализации ТР гена *KMT2A* у детей с ОМЛ проводилась только на небольшой группе пациентов, причем в исследование включались исключительно пациенты первого года жизни. Прогностическое значение природы гена-партнера, вовлеченного в транслокацию с участием гена *KMT2A*, в данном исследовании авторами не оценивалось [Цаур,

2016]. Таким образом вопрос влияния характера перестройки гена *KMT2A* на общую и бессобытийную выживаемость у детей с ОМЛ на сегодняшний день изучен недостаточно.

Кроме того, на сегодняшний день не существует единых рекомендаций как по методам определения перестроек гена *KMT2A* и определения молекулярного МОБ-статуса, так и по клинической интерпретации полученных результатов у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

Цель исследования

Усовершенствование подходов к диагностике и лечению пациентов детского возраста с *KMT2A*-позитивным ОМЛ с учетом структуры химерного *KMT2A*-гена, включая локализацию точки разрыва и природу гена-партнера.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать молекулярно-генетические особенности ОМЛ с перестройками гена *KMT2A* у детей, включая природу гена-партнера, вовлеченного в транслокацию с участием гена *KMT2A*.
2. Охарактеризовать молекулярно-генетические особенности ОМЛ с перестройками гена *KMT2A* у детей, включая локализацию точки разрыва в гене *KMT2A*.
3. Проанализировать значение природы гена-партнера, вовлеченного в транслокацию с участием гена *KMT2A*, для показателей общей (ОВ) и бессобытийной выживаемости (БСВ) у детей с ОМЛ.
4. Проанализировать значение локализации точки разрыва гена *KMT2A* для показателей ОВ и БСВ у детей с ОМЛ.
5. Оценить чувствительность различных молекулярно-генетических методов детекции МОБ у пациентов с перестройками гена *KMT2A*.
6. Разработать алгоритм определения перестроек гена *KMT2A* и мониторинга МОБ с использованием молекулярно-генетических методов у пациентов с ОМЛ.

Научная новизна исследования

Впервые в Российской Федерации на большой группе пациентов были изучены молекулярно-генетические характеристики *KMT2A*-позитивного ОМЛ у детей, включая частоту встречаемости и спектр перестроек гена *KMT2A*. Была проведена оценка сопряженности между природой гена-партнера и локализацией точки разрыва в гене *KMT2A* у детей в возрасте от 0 до 18 лет. Продемонстрировано отсутствие достоверной взаимосвязи между природой гена-партнера и локализацией точки разрыва в гене *KMT2A* у данной группы пациентов. Впервые в Российской Федерации на большой группе пациентов детского возраста с *KMT2A*-позитивным ОМЛ, получавших специфическую терапию согласно протоколу ОМЛ-MRD-2018, изучено влияние молекулярно-генетических характеристик, а именно природы гена партнера и локализации точки разрыва в гене *KMT2A*, на прогноз выживаемости.

Выполнено сравнение молекулярно-генетических методов мониторинга минимальной остаточной болезни у детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ; продемонстрировано более высокое нормализованное число копий химерного транскрипта при использовании моноплексной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в сравнении с мультиплексной ОТ-ПЦР.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе представлена подробная молекулярно-генетическая характеристика *KMT2A*-позитивного ОМЛ у детей, включая частоту встречаемости и спектр генов-партнеров, а также локализацию точек разрыва в гене *KMT2A*. Доказано отсутствие значимой сопряженности между природой гена-партнера и локализацией ТР в гене *KMT2A*.

Продемонстрировано, что характер перестройки гена *KMT2A* (а именно природа гена-партнера и локализация ТР в гене *KMT2A*) не имел достоверного значения для прогноза общей и бессобытийной выживаемости у детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

Продемонстрировано, что моноплексная ОТ-ПЦР для детекции *KMT2A*-химерных транскриптов характеризуется большей чувствительностью в сравнении с мультиплексной ОТ-ПЦР.

На основании результатов, полученных при проведении данной работы, разработан алгоритм определения перестроек гена *KMT2A* и мониторинга МОБ с использованием молекулярно-генетических методов у детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (генеральный директор – д.м.н., профессор Грачев Н.С.).

Исследование носит ретроспективно-проспективный характер и состоит из трех основных частей. Всего в исследование включено 296 пациентов с ОМЛ с подтвержденной перестройкой гена *KMT2A* в возрасте от 4 дней до 17,5 лет. Первая часть исследования посвящена изучению молекулярно-генетических особенностей ОМЛ с перестройками гена *KMT2A* у детей, включая природу гена-партнера и локализацию ТР гена *KMT2A*. Природа гена-партнера и локализация ТР в ДНК гена *KMT2A* была определена у всей исследуемой группы. В рамках первой части работы также проанализирована сопряженность природы гена-партнера и локализации ТР гена *KMT2A*. Вторая часть исследования посвящена анализу влияния характера перестройки гена *KMT2A* на показатели общей и бессобытийной выживаемости у детей с ОМЛ. По данным на январь 2025г. пациенты с перестройками гена *KMT2A* составили 26,6% от всех пациентов, включенных в протокол ОМЛ-MRD-2018. Для второй части исследования было отобрано 116 пациентов, получавших терапию согласно протоколу ОМЛ-MRD-2018, которым проводилась первичная диагностика в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации в период с июня 2018 г. по октябрь 2023 г.. Медиана времени наблюдения составила 2,5 года. Третья часть посвящена

сравнению молекулярно-генетических методов детекции МОБ у пациентов с различными вариантами перестроек гена *KMT2A*. Для третьей части исследования из общей когорты было отобрано 20 пациентов с известным характером перестройки гена *KMT2A*, при этом определение экспрессии химерного транскрипта выполнено суммарно в 37 точках, из них 14 – исследование в инициальных точках, 23 – исследование в контрольных точках, предусмотренных протоколом лечения.

Необходимый комплекс лабораторных исследований выполнен в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики, а также клинко-диагностической лаборатории, лаборатории иммунофенотипирования гемобластозов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Обработка результатов исследования проведена при помощи методов математической статистики. Полученные результаты систематизированы, изложены в 5 основных подглавах исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Перестройки гена *KMT2A* при ОМЛ у детей представляют собой значительную и крайне гетерогенную группу, что обусловлено широким спектром генов-партнеров и различной локализацией точки разрыва гена *KMT2A*. Диагностика перестроек гена *KMT2A* требует использования комплекса методов клинической лабораторной диагностики, включая стандартное цитогенетическое исследование, флуоресцентную гибридизацию *in situ*, различные варианты ПЦР и высокопроизводительного секвенирования.
2. Значения ОБ и БСВ у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ достоверно не отличались в зависимости от природы гена-партнера. Пациенты с $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ и пациенты с другими перестройками гена *KMT2A* характеризовались схожим прогнозом выживаемости.

3. Значения ОВ и БСВ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 достоверно не отличались от значений ОВ и БСВ у пациентов с другими локализациями точки разрыва гена *KMT2A*.
4. Моноплексная ОТ-ПЦР является высокочувствительным методом детекции *KMT2A* химерных транскриптов и может быть использована для детекции МОБ у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом выборки пациентов. Кроме того, достоверность полученных результатов и выводов обеспечена корректным выбором методов статистического анализа данных в соответствии с решаемыми задачами. Выводы, а также разработанные на их основании практические рекомендации логично следуют из результатов диссертационного исследования и соответствуют положениям, выносимым на защиту.

Результаты диссертационной работы доложены в ходе XVII Международной конференции «Актуальные вопросы детской онкологии, гематологии и иммунологии» (Беларусь, Минск, 2022) и представлены в виде постерного доклада в рамках конгресса Европейской ассоциации гематологов (European Hematology Association Congress) (Италия, Милан, 2025).

Материалы диссертации представлены в виде постерного доклада в рамках 5й Международной конференции Европейской школы гематологов (European School of Haematology 5th International Conference Acute Myeloid Leukemia “Molecular and Translational”: Advances in Biology and Treatment) (Португалия, 2019), представлены в виде устного доклада в рамках VI Всероссийской научно-практической конференция с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы - от диагностики к терапии» (г.Санкт-Петербург, 2021), а также опубликованы в виде тезисов в рамках X Конгресса НОДГО «Актуальные проблемы и перспективы развития детской гематологии-онкологии в Российской Федерации» (г.Сочи, 2019) и в рамках Всероссийской научно-практической

конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфизиологии» (г.Санкт-Петербург, 2024).

Внедрение результатов в практику

Разработанный алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A* используется в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации при диагностике пациентов с подозрением на наличие перестройки гена *KMT2A*. Данная лаборатория осуществляет референсную диагностику и молекулярный мониторинг пациентов с ОМЛ из 54 различных клиник Российской Федерации, что определяет выбор тактики терапии пациентов, включённых в протокол ОМЛ-MRD-2018. Основные положения и выводы диссертации используются в практике в клинических подразделениях ФГБУ «НМИЦ ДГОИ имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации и онкологических/гематологических отделениях клиник Российской Федерации, включенных в протокол ОМЛ-MRD-2018.

Личный вклад автора

Автором лично был проведен поиск и анализ литературных источников по теме диссертации. Совместно с научными руководителями были определены цель, задачи и методы исследования, разработана база данных для хранения и статистической обработки данных. Определен дизайн исследования, в соответствии с которым осуществлялось молекулярно-генетическое обследование пациентов, изучение данных анамнеза и результатов лабораторных исследований, оценка показателей ОБ и БСВ. Совместно с лабораторией цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России проводился отбор и обработка образцов пациентов и анализ полученных молекулярно-генетических данных. Автором осуществлялась координационная деятельность в составе кооперативной группы по лечению детей

с ОМЛ в рамках протокола ОМЛ-MRD-2018. Лично автором выполнена статистическая обработка и анализ полученных результатов. Проанализированы результаты исследования, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Публикации по теме диссертации

Материалы и результаты диссертации опубликованы в 9 печатных работах, из них 4 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертаций, 4 статьи в зарубежных журналах, индексируемых Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана на 135 страницах текста компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций, приложений и списка использованной литературы, включающего 172 источника: 161 зарубежный источник и 11 российских источников. Работа содержит 40 рисунков и 16 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общая характеристика работы

В ходе исследования проанализированы данные 296 пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ в возрасте от 4 дней до 17,5 лет, медиана возраста 2 года, которым проводилась первичная диагностика на базе лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации в период с января 2014 г. по июль 2024 г.. Соотношение мальчиков к девочкам составило 1,18 : 1. Пациенты получали специфическую терапию согласно различным протоколам в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и

иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава Российской Федерации, а также в других клиниках Российской Федерации. С 2018 года пациенты получали специфическую терапию согласно протоколу ОМЛ-MRD-2018. Анализ клинической информации проводился на основе медицинской документации и регистрационных форм.

Определение перестроек гена *KMT2A*

Цитогенетические и молекулярно-генетические исследования проводилось в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева».

В рамках первичной диагностики всем пациентам было выполнено стандартное кариотипирование клеток костного мозга либо периферической крови методом дифференциального окрашивания на G-полосы. Далее перестройки гена *KMT2A* подтверждали методом FISH с использованием коммерческих зондов: зонд на разрыв хромосомного региона 11q23 Kreatech *KMT2A* breakapart (Leica, Нидерланды) либо транслокационные зонды *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::AFDN*, *KMT2A::MLLT3*, *KMT2A::MLLT1* (Leica, Нидерланды), *KMT2A::MLLT10* (CytoTest, США). Природу гена-партнера *KMT2A* определяли методами мультиплексной ОТ-ПЦР, позволяющий выявить 8 основных генов-партнеров (*AFF1*, *MLLT3*, *MLLT1*, *MLLT10*, *AFDN*, *ELL*, *EPS15*, *MLLT6*) либо ДИ-ПЦР и методом высокопроизводительного секвенирования в случае редких перестроек гена *KMT2A*.

Определение минимальной остаточной болезни молекулярно-генетическими методами

Для сравнения молекулярно-генетических методов детекции МОБ у пациентов с различными вариантами перестроек гена *KMT2A* из общей группы было отобрано 20 пациентов с известной структурой *KMT2A*-химерного гена, при этом определение экспрессии химерного транскрипта выполнено суммарно в 37

точках, из них 14 – исследование в инициальных точках, 23 – исследование в контрольных точках, предусмотренных протоколом лечения. Определение экспрессии химерного транскрипта выполнялось двумя методами – мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для проведения моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени использовались те же праймеры и Taqman-зонды, что и при проведении мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, при этом проводился подбор наиболее специфических прямого и обратного праймеров с учетом характера перестройки гена *KMT2A*. Количественно уровень экспрессии химерного транскрипта выражался в соотношении количества копий химерного транскрипта к количеству копий контрольного транскрипта. В качестве контрольного гена использовался ген *ABL1* [Beillard и др., 2003].

Обработка данных и статистический анализ

Клинические и лабораторные данные всех пациентов были внесены в электронные таблицы Excel, в которых был выполнен первичный анализ. Для статистического анализа использовали программное обеспечение IBM SPSS Statistics версия 23. Кривые ОВ и БСВ были построены по методу Каплана-Мейера. При расчете БСВ за события принимались клиничко-гематологический рецидив любой локализации, МОБ-рецидив, прогрессия заболевания, летальный исход. Пациенты были цензурированы по дате последнего контакта на январь 2025 г. Медиана времени наблюдения за выжившими оценивалась с помощью обратного метода Каплана-Мейера. Для сравнения кривых выживаемости был использован непараметрический лог-ранговый критерий. Кумулятивную частоту развития рецидива (КЧР) рассчитывали с помощью метода конкурирующих рисков. Сопряженность природы гена-партнера и локализации ТР гена *KMT2A* оценивался с помощью критерия V Крамера. Для сравнения определения уровня экспрессии химерного транскрипта методами мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием пациент-специфичных праймеров был применен непараметрический критерий знаковых

рангов Уилкоксона для связанных выборок. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика пациентов

В анализ было включено 296 пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ в возрасте от 4 дней до 17,5 лет (медиана возраста 2 года). Соотношение мальчиков к девочкам составило 1,18 : 1. Распределение пациентов по возрасту и полу представлено на Рисунке 1. Наибольшую долю в исследуемой когорте составили пациенты в возрасте младше 12 месяцев ($n=64$, 21,6%). Для анализа пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от возраста: пациенты первых двух лет жизни (от 0 до 24 мес., 126 пациентов) и пациенты старше двух лет (170 пациентов).

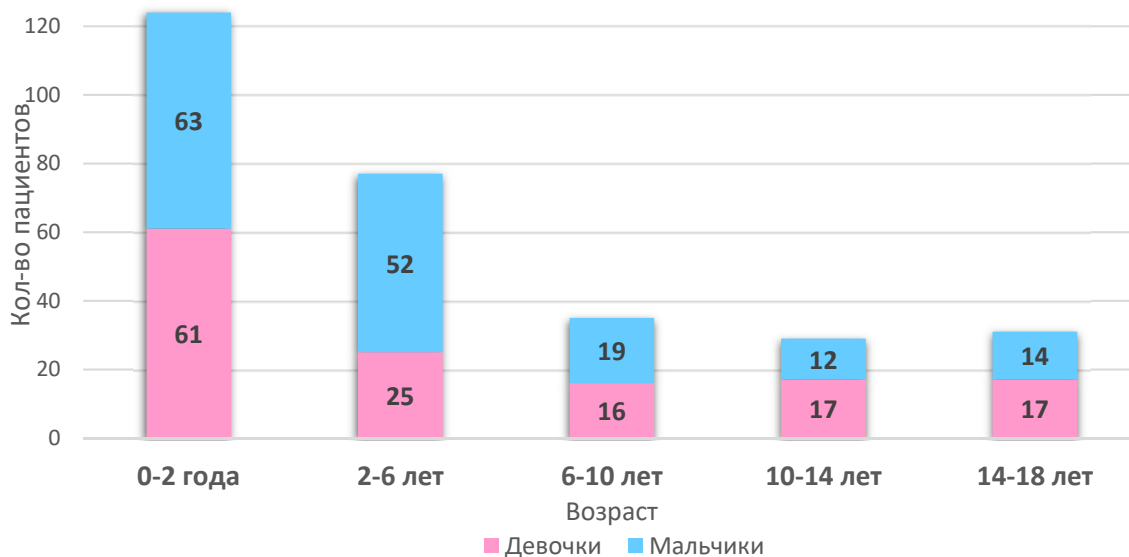


Рисунок 1 – Распределение пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ по полу и возрасту, $n=296$

Распределение пациентов по морфологическому варианту ОМЛ согласно ФАВ-классификации в зависимости от возраста представлено на Рисунках 2 и 3. В обеих возрастных группах более половины всех случаев были представлены М5-

морфологическим вариантом ОМЛ (n=70 (56%) и n=98 (58%) для пациентов первых двух лет жизни и пациентов старше двух лет соответственно).

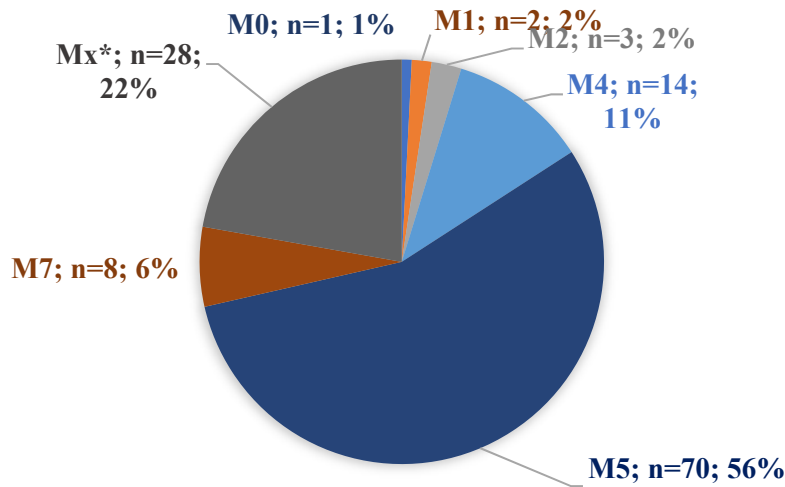


Рисунок 2 – Распределение пациентов первых двух лет жизни по морфологическому варианту согласно FAB-классификации, n=126.

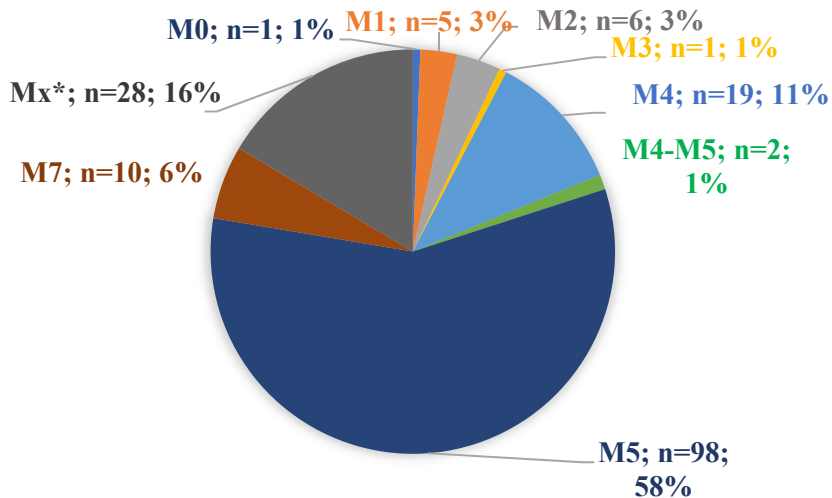


Рисунок 3 – Распределение пациентов старше двух лет по морфологическому варианту согласно FAB-классификации, n=170

* Mx – морфологический вариант не уточнен

Частота встречаемости различных генов-партнеров

В исследуемой группе наиболее частыми перестройками гена *KMT2A* являлись $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ и $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$. Результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований

представлены на Рисунках 4 и 5.

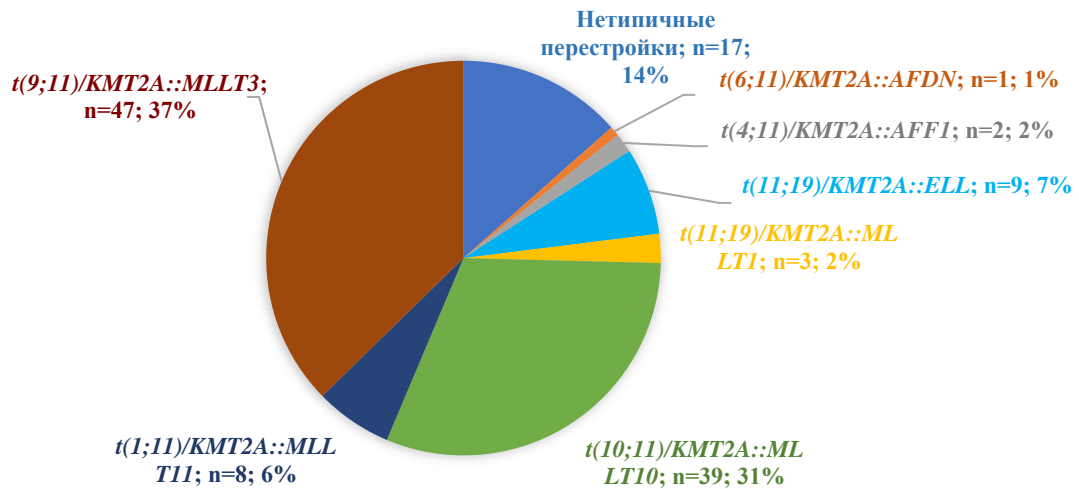


Рисунок 4 – Относительная частота различных перестроек гена *KMT2A* у детей первых двух лет жизни, n=126

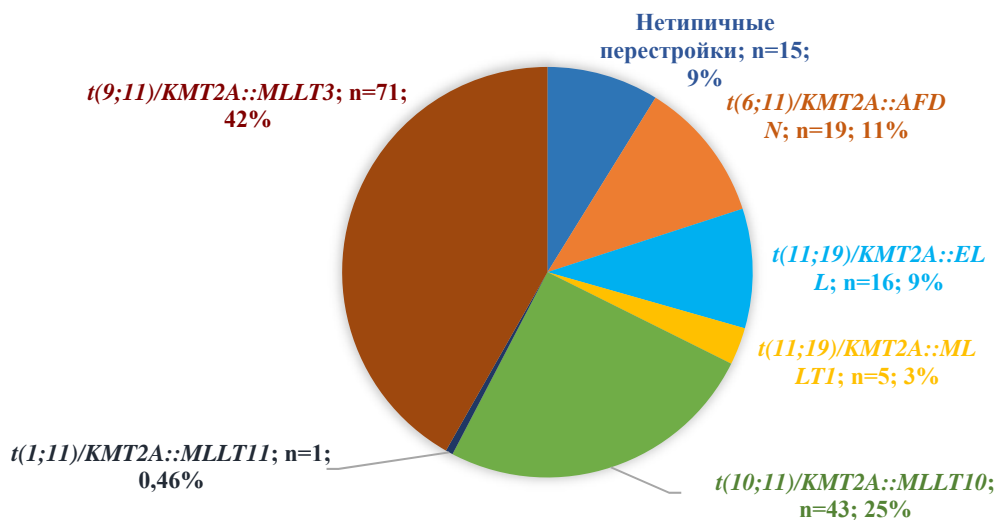


Рисунок 5 – Относительная частота различных перестроек гена *KMT2A* у детей старше двух лет, n=170

В группе пациентов первых двух лет жизни $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ и $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$ являлись наиболее частыми перестройками и встречались с сопоставимой частотой (n=47 (37%) и n=39 (31%) соответственно). Значительную долю в данной группе пациентов составляли нетипичные варианты перестроек гена *KMT2A* (n=17 (14%)).

В группе пациентов старше двух лет $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ составили практически половину всех перестроек гена *KMT2A* ($n=71$ (42%)). Второй по частоте встречаемости в данной возрастной группе являлась $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$ ($n=43$ (27%)). Доля нетипичных вариантов перестроек гена *KMT2A* у пациентов старшего возраста была меньше ($n=15$ (9%)), нежели у пациентов первых двух лет жизни. В общей сложности в ходе исследования было выявлено 32 случая перестроек гена *KMT2A* с участием 18 нетипичных генов-партнеров: *AB11*, *AB12*, *CBL*, *KNL*, *MYO1F*, *MLLT1*, *MLLT6*, *MLLT11*, *SEPTIN5*, *SEPTIN6*, *SEPTIN9*, *CLTC*, *CT45A9*, *CREBBP*, *BTK*, *PRPF19*, *SORBS1*, *SH3BP5L*.

Локализация точки разрыва в ДНК гена *KMT2A*

Распределение пациентов общей когорты в зависимости от локализации ТР в ДНК гена *KMT2A* и возрастной группы представлены на Рисунках 6 и 7. В группе пациентов первых двух лет жизни ТР гена *KMT2A* наиболее часто была локализована в интроне 9 ($n=57$ (45%)) и интроне 10 ($n=42$ (33%)). Локализация ТР гена *KMT2A* в интроне 11 была выявлена у 20 пациентов (16%). В единичных случаях ТР была локализована в интронах 7, 8 и экзонах 11 и 12 гена *KMT2A* (суммарно 6% всех пациентов в данной возрастной группе).

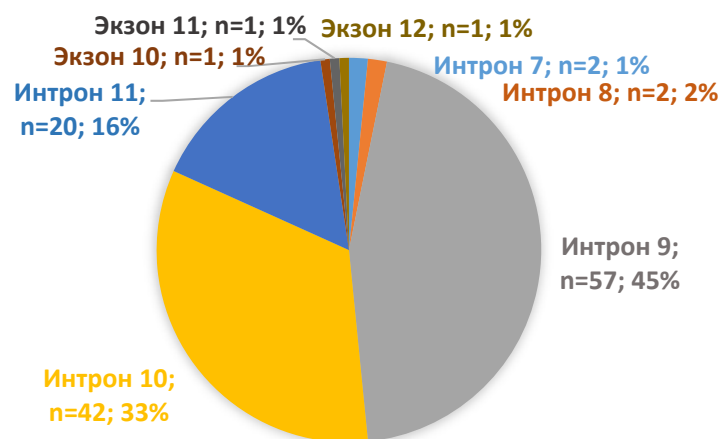


Рисунок 6 – Локализация точки разрыва в ДНК гена *KMT2A* у детей первых двух лет жизни, $n=126$

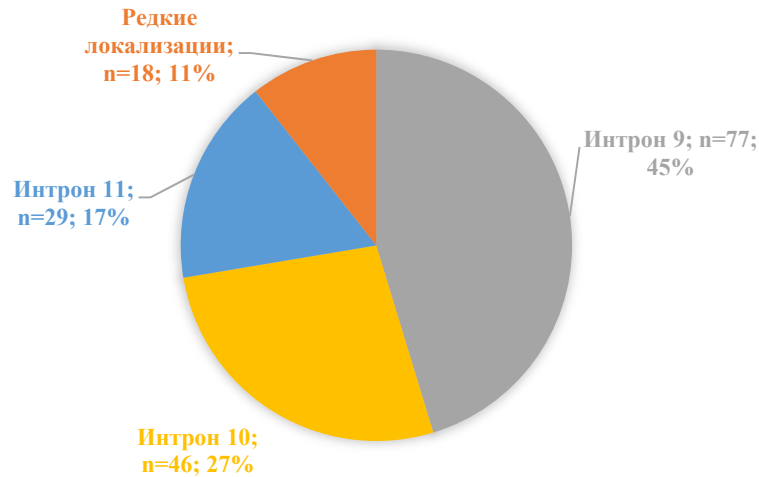


Рисунок 7 – Локализация точки разрыва в ДНК гена *KMT2A* у детей старше двух лет, n=170

У пациентов старше двух лет почти в половине всех случаев ТР гена *KMT2A* была локализована в интроне 9 (n=77 (45%)). Второй по частоте локализацией ТР гена *KMT2A* в данной возрастной группе являлся интрон 10 (n=46 (27%)). Частота встречаемости локализации ТР гена *KMT2A* в интроне 11 сопоставима с частотой встречаемости данной локализации у пациентов первых двух лет жизни года жизни (n=29 (17%)). Редкие локализации ТР гена *KMT2A* в данной возрастной группе встречались чаще (суммарно n=18 (11%)), нежели у пациентов первого года жизни.

Сопряженность локализации точки разрыва гена *KMT2A* и природы гена-партнера

Распределение пациентов первого года жизни в зависимости от природы гена-партнера и локализации ТР гена *KMT2A* отражено в Таблице 1. При $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ в данной возрастной группе наиболее часто ТР была локализована в интроне 9 (n=10 (45,5%)). Частота локализации ТР в интронах 10 и 11 при $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ была одинаковой (n=6 (27,3%)). При редких вариантах перестроек гена *KMT2A* ТР была с одинаковой частотой локализована в интронах 9 и 10 (n=9 (39%)), при $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$ ТР была локализована в интронах 9 и 10 с сопоставимой частотой (n=10 (47,6%) и n=9 (42,9%) соответственно). При

t(11;19)(q23.3;p13.1)/*KMT2A::ELL* наиболее часто ТР была локализована в интроне 10 (n=4 (66,7%)).

Таблица 1 – Сопряженность локализации точки разрыва гена *KMT2A* и природы гена-партнера при ОМЛ у детей первого года жизни, n=73.

		Ген-партнер					Всего	
		Редкие	<i>AFDN</i>	<i>ELL</i>	<i>MLLT10</i>	<i>MLLT3</i>		
Локализация ТР*	Интрон 9	Кол-во	9	1	1	10	10	31
		%	39,1%	100,0%	16,7%	47,6%	45,5%	
	Интрон 10	Кол-во	9	-	4	9	6	28
		%	39,1%	-	66,7%	42,9%	27,3%	
	Интрон 11	Кол-во	3	-	-	1	6	10
		%	13,0%	-	-	4,8%	27,3%	
	Редкая	Кол-во	2	-	1	1	-	4
		%	8,7%	-	16,7%	4,8%	-	
	Всего	Кол-во	23	1	6	21	22	73
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*ТР – точка разрыва гена *KMT2A*

Распределение пациентов старше 1 года в зависимости от природы гена-партнера и локализации ТР гена *KMT2A* отражено в Таблице 2. При t(9;11)(p21;q23.3)/*KMT2A::MLLT3* в данной возрастной группе наиболее часто ТР была локализована в интроне 9 (n=40 (41,7%)). Второй по частоте встречаемости локализацией ТР при t(9;11)(p21;q23.3)/*KMT2A::MLLT3* являлся интрон 10 (n=32 (33%)). При t(10;11)(p12;q23.3)/*KMT2A::MLLT10* более чем в половине случаев ТР была локализована в интроне 9 (n=32 (52,5%)). У большей части пациентов с t(6;11)(q27;q23.3)/*KMT2A::AFDN* ТР была локализована в интроне 9 (n=15 (78,9%)). Наиболее равномерным распределением по локализации ТР характеризовались пациенты с t(11;19)(q23.3;p13.1)/*KMT2A::ELL*. Для достоверной оценки сопряженности природы гена-партнера и локализации ТР у пациентов старше 1 года из анализа были исключены варианты перестроек гена *KMT2A*, представленные единичными случаями, при этом достоверных различий в распределении локализаций ТР гена *KMT2A* в зависимости от природы гена-партнера не было найдено (p=0,095).

Таблица 2 – Сопряженность локализации точки разрыва гена *KMT2A* и природы гена-партнера при ОМЛ у детей старше 1 года, n=223.

		Ген-партнер					Всего	
		Редкие	<i>AFDN</i>	<i>ELL</i>	<i>MLLT10</i>	<i>MLLT3</i>		
Локализация ТР*	Интрон 9	Кол-во	11	15	5	32	40	60
		%	39,3%	78,9%	26,3%	52,5%	41,7%	
	Интрон 10	Кол-во	7	4	5	12	32	39
		%	25,0%	21,1%	26,3%	19,7%	33,3%	
Интрон 11	Кол-во	8	-	4	6	21	103	
	%	28,6%		21,1%	9,8%	21,9%		
Редкая	Кол-во	2	-	5	11	3	21	
	%	7,1%		26,3%	18,0%	3,1%		
Всего		Кол-во	28	19	19	61	96	223
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

*ТР – точка разрыва гена *KMT2A*

Прогностическое значение природы гена-партнера

Спектр перестроек гена *KMT2A* в исследуемой когорте в зависимости от возраста представлен на Рисунках 8 и 9.

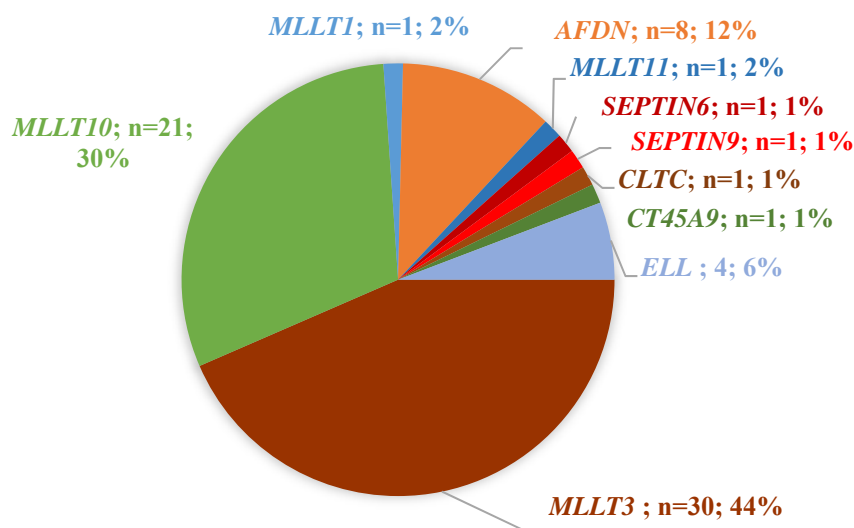


Рисунок 8 – Частота различных генов-партнеров гена *KMT2A* в исследуемой группе у детей первых двух лет жизни, n=47

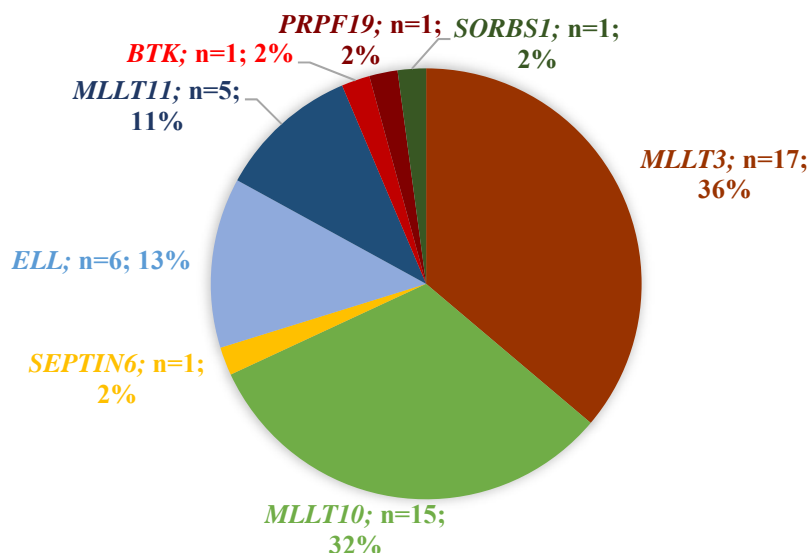


Рисунок 9 – Частота различных генов-партнеров гена *KMT2A* в исследуемой группе у детей старше двух лет, n=69

Наиболее частыми вариантами перестроек гена *KMT2A* в обеих возрастных группах являлись $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ (n=17 (36,2%) в группе пациентов первых двух лет жизни и n=30 (43,5%) в группе пациентов старше двух лет) и $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$ (n=15 (31,9%) в группе пациентов первых двух лет жизни и n=21 (30,4%) в группе пациентов старше 1 года). $t(1;11)(q21;q23.3)/KMT2A::MLLT11$ чаще встречалась у пациентов первых двух лет жизни (n=5 (10,6%)), чем у пациентов старше двух лет (n=1 (1,4%)). Перестройки гена *KMT2A* с участием редких генов-партнеров, с единичными описаниями в литературе, чаще встречались у пациентов первых двух лет жизни (n=4 (8,5%) в группе пациентов первого года жизни и n=4 (5,85%) в группе пациентов старше 1 года).

У пациентов старше двух лет наиболее высокие показатели 2,5-летней ОВ и БСВ (100% и 75±21,7% соответственно) были у пациентов с $t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL$ (Рисунок 10). Пациенты с $t(10;11)(p12;q23.3)/KMT2A::MLLT10$ в данной возрастной группе характеризовались самыми низкими показателями ОВ и БСВ (46,9±13,3% и 32±12,1% соответственно). Пациенты с $t(6;11)(q27;q23.3)/KMT2A::AFDN$ и $t(9;11)(p21;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ характеризовались схожими показателями ОВ

($62,5,2 \pm 17,1\%$ и $63,4 \pm 9,4\%$ соответственно) и БСВ ($37,5,2 \pm 17,1\%$ и $38,8 \pm 9,5\%$ соответственно). Тем не менее, все описанные различия не являлись статистически достоверными ($p=0,456$ для ОВ и $p=0,892$ для БСВ).

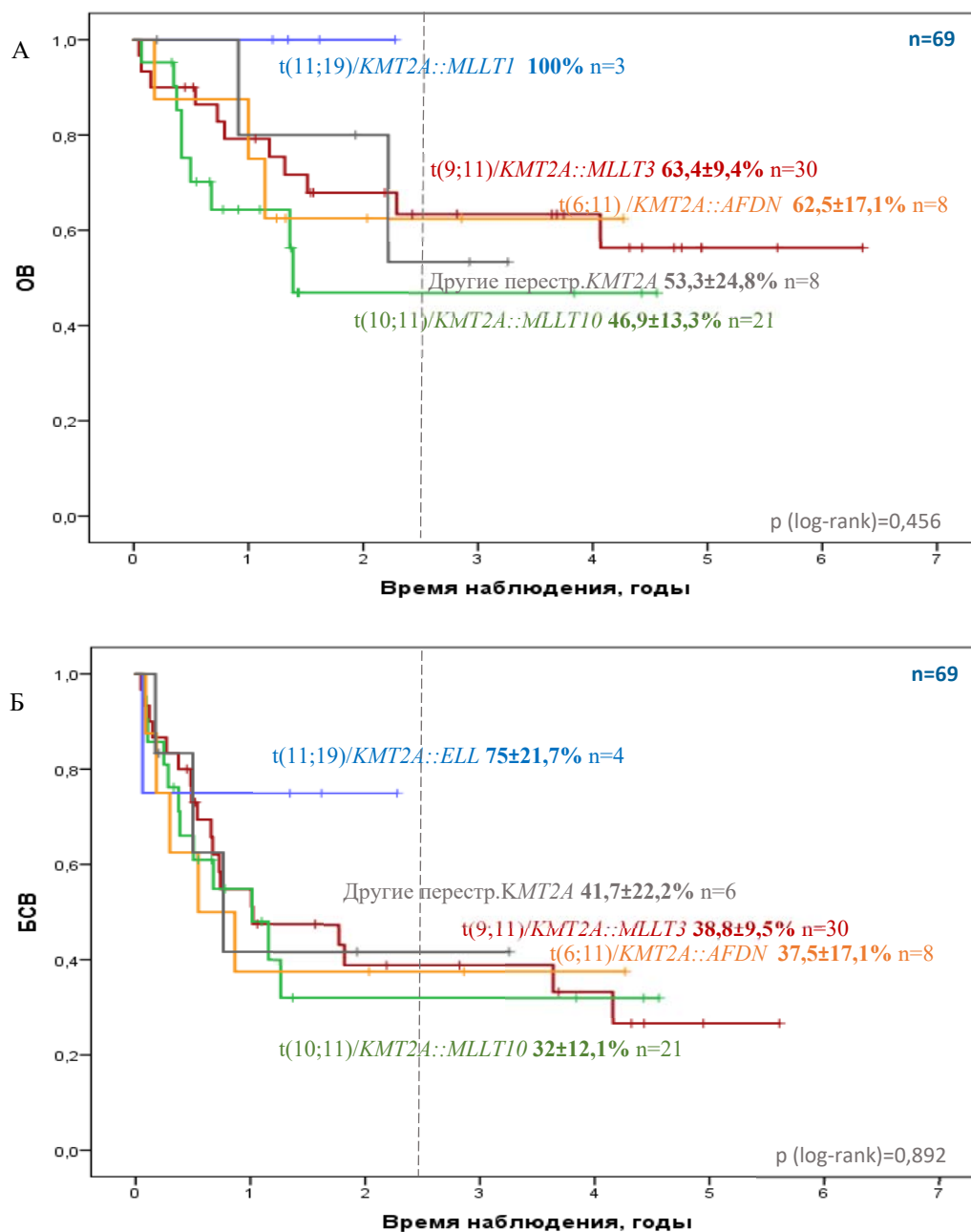


Рисунок 10 – Выживаемость в зависимости от природы гена-партнера гена *KMT2A* у пациентов старше двух лет, $n=69$; А: 2,5-летняя ОВ Б: 2,5-летняя БСВ

Среди пациентов первых двух лет жизни наиболее низкие показатели ОВ и БСВ наблюдались у пациентов с $t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL$ ($33,3 \pm 19,2\%$ в обоих случаях, Рисунок 11). Пациенты с нетипичными вариантами перестроек гена

KMT2A в данной возрастной группе характеризовалась наиболее высокими показателями ОВ и БСВ ($88,9\pm 10,5\%$ и $59,3\pm 25,2\%$ соответственно), однако нужно отметить, что достоверная оценка прогностического значения природы гена-партнера в данной возрастной группе не представляется возможной из-за небольшого количества пациентов в сравниваемых подгруппах и большой доли вариантов перестроек гена *KMT2A*, представленных единичными случаями ($p=0,12$ для ОВ и $p=0,427$ для БСВ).

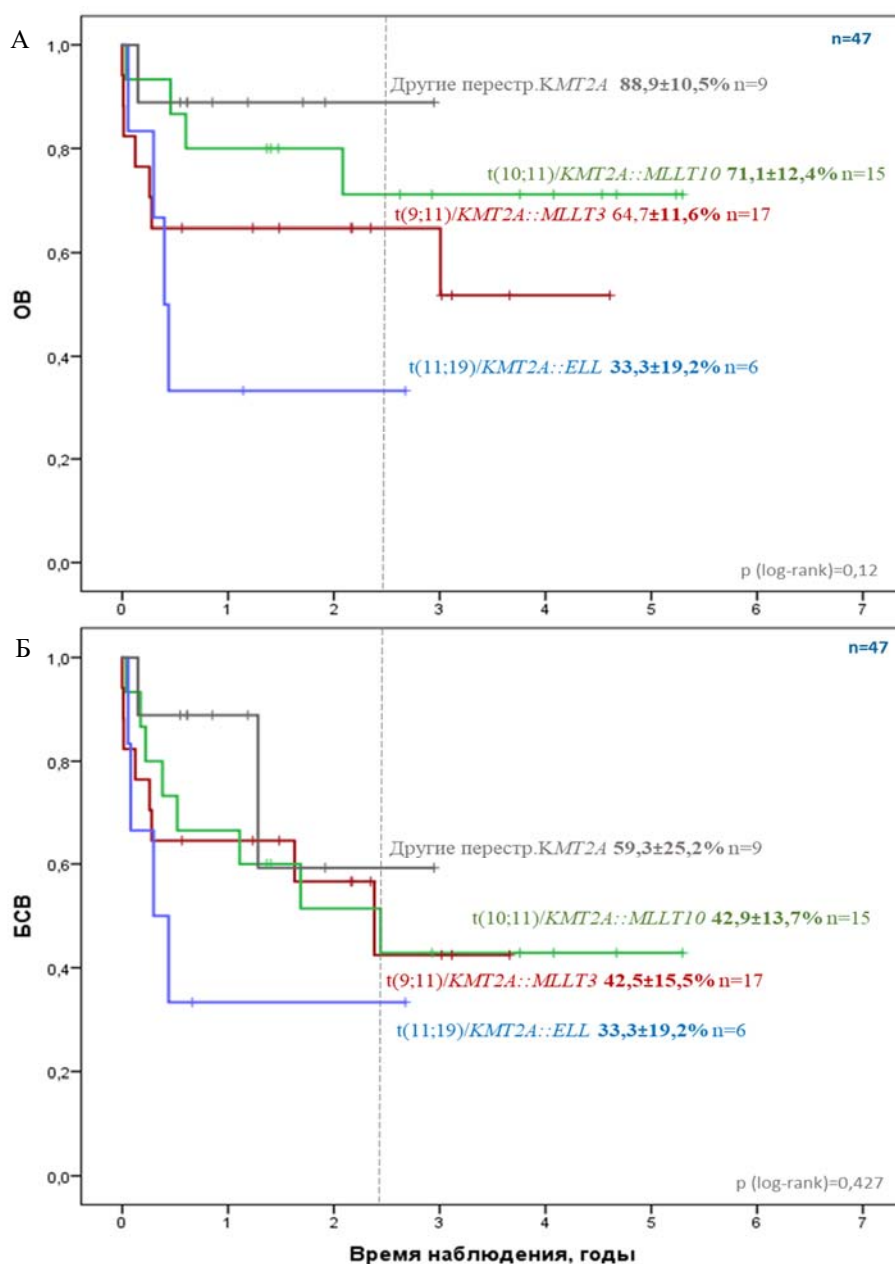


Рисунок 11 – Выживаемость в зависимости от природы гена-партнера гена *KMT2A* у пациентов первых двух лет жизни, $n=47$; А: 2,5-летняя ОВ Б: 2,5-летняя БСВ

В группе пациентов с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$, получавших терапию в рамках промежуточной группы риска, КЧР через 2 года от достижения полной ремиссии составил 31% (95% ДИ: 14%-50%) и значимо не отличался от КЧР в группе пациентов с другими вариантами перестроек гена *KMT2A*, получавших терапию в рамках высокой группы риска ($p=0,859$, Рисунок 12).

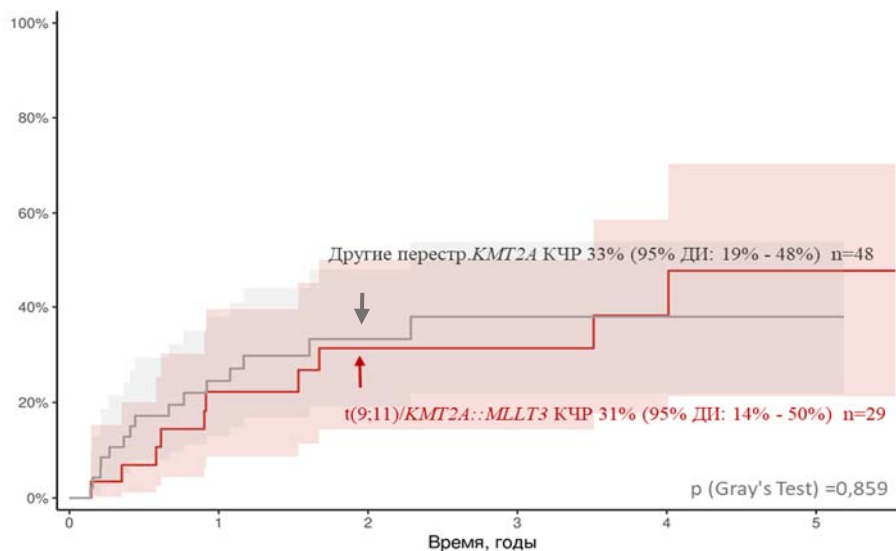


Рисунок 12 – КЧР у пациентов с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ и другими перестройками гена *KMT2A*, n=77

Значения 2,5-летней БСВ у пациентов с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$, которые были изначально стратифицированы в группу промежуточного риска и в дальнейшем не были рестратифицированы в группу высокого риска, и пациентов группы промежуточного риска без перестройки гена *KMT2A* достоверно не различались ($46\pm 8,9\%$ и $49,3\pm 4,7\%$ соответственно, $p=0,252$). Тем не менее, значения ОВ у данных двух групп пациентов различаются на уровне статистической тенденции: пациенты группы промежуточного риска с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ характеризуются более низкими значениями ОВ, чем пациенты группы промежуточного риска без перестройки гена *KMT2A* ($65,3\pm 8,2\%$ и $80,6\pm 3,5\%$ соответственно, $p=0,086$; Рисунок 13).

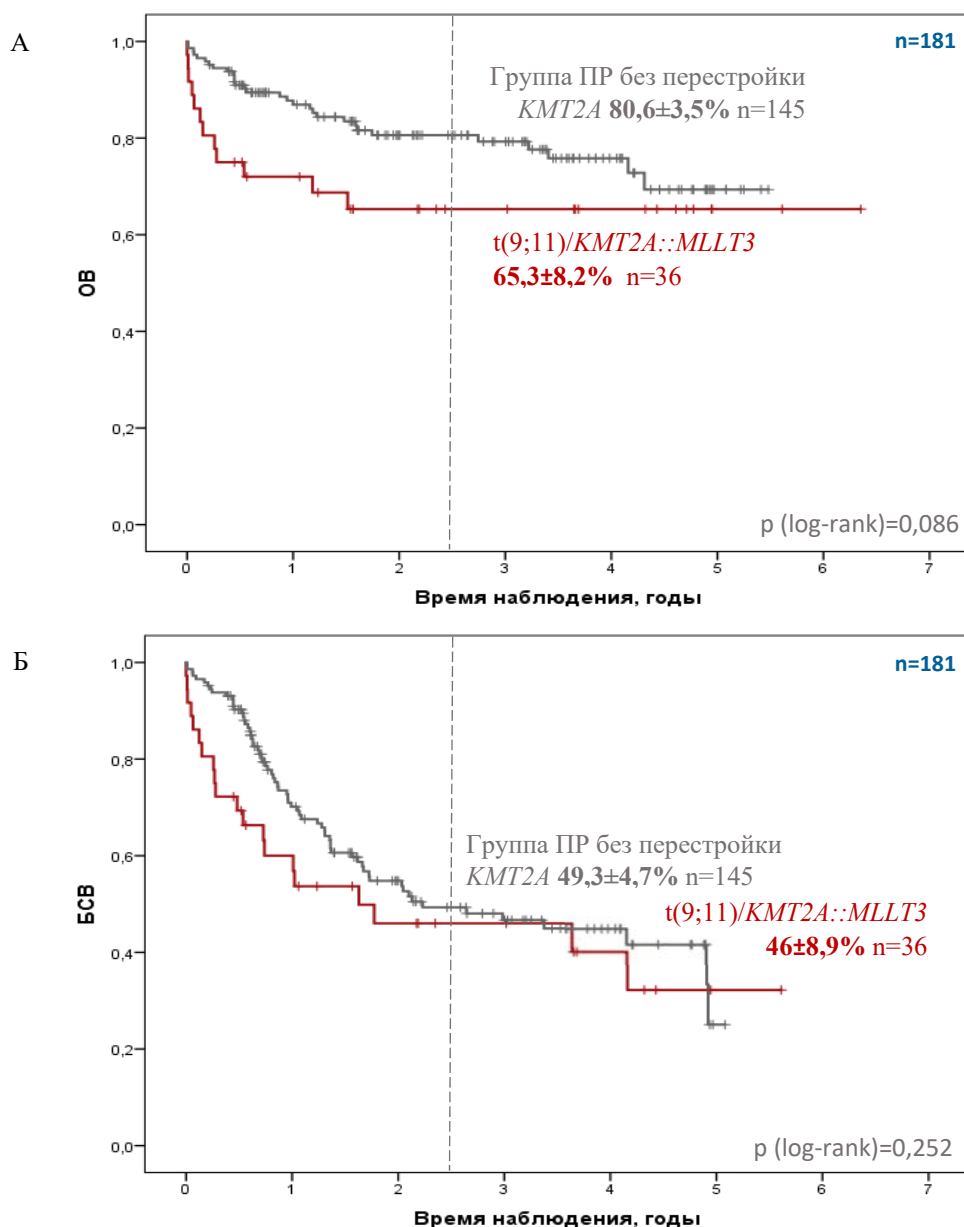


Рисунок 13 – Выживаемость у пациентов группы промежуточного риска с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLL3$ и пациентов группы промежуточного риска без перестройки гена *KMT2A*, n=181; А: 2,5-летняя ОВ Б: 2,5-летняя БСВ

Прогностическое значение локализации ТР гена *KMT2A*

Распределение пациентов по локализации ТР гена *KMT2A* в зависимости от возраста представлено в Таблице 3. Наиболее часто ТР в гене *KMT2A* была локализована в интроне 9 (46,5% всех случаев).

Таблица 3 – Распределение пациентов в зависимости от локализации точки разрыва гена *KMT2A* и возраста, n=116

Перестройка <i>KMT2A</i>	Пациенты первых двух лет жизни (n=47)		Пациенты старше двух лет (n=69)	
	Кол-во	Доля, %	Кол-во	Доля, %
Инtron 7	1	2,10%	3	4,30%
Инtron 8	2	4,30%	1	1,40%
Инtron 9	21	44,70%	33	47,80%
Инtron 10	13	27,70%	20	29,00%
Инtron 11	9	19,10%	11	15,90%
Экзон 11	1	2,10%	1	1,40%

Пациенты с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 характеризовались более высокими значениями ОВ в сравнении с пациентами с другой локализацией ТР гена *KMT2A* ($85,8 \pm 8\%$ и $57,8 \pm 5,6\%$ соответственно; Рисунок 15), однако данные различия не были статистически достоверными ($p=0,45$). Показатели БСВ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и другими локализациями ТР гена *KMT2A* достоверно не различались ($23,4 \pm 17,9\%$ и $42,8 \pm 5,5\%$, соответственно, $p=0,862$). При сравнении значений 2,5-летней БСВ между пациентами с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и в интроне 9 в зависимости от группы риска статистически достоверные различия не были обнаружены (группа высокого риска: БСВ 0% и $35,2 \pm 9,6\%$ соответственно, $p=0,992$; группа промежуточного риска: БСВ $44,4 \pm 21\%$ и $40,5 \pm 10,9\%$ соответственно, $p=0,881$) (Рисунок 14).

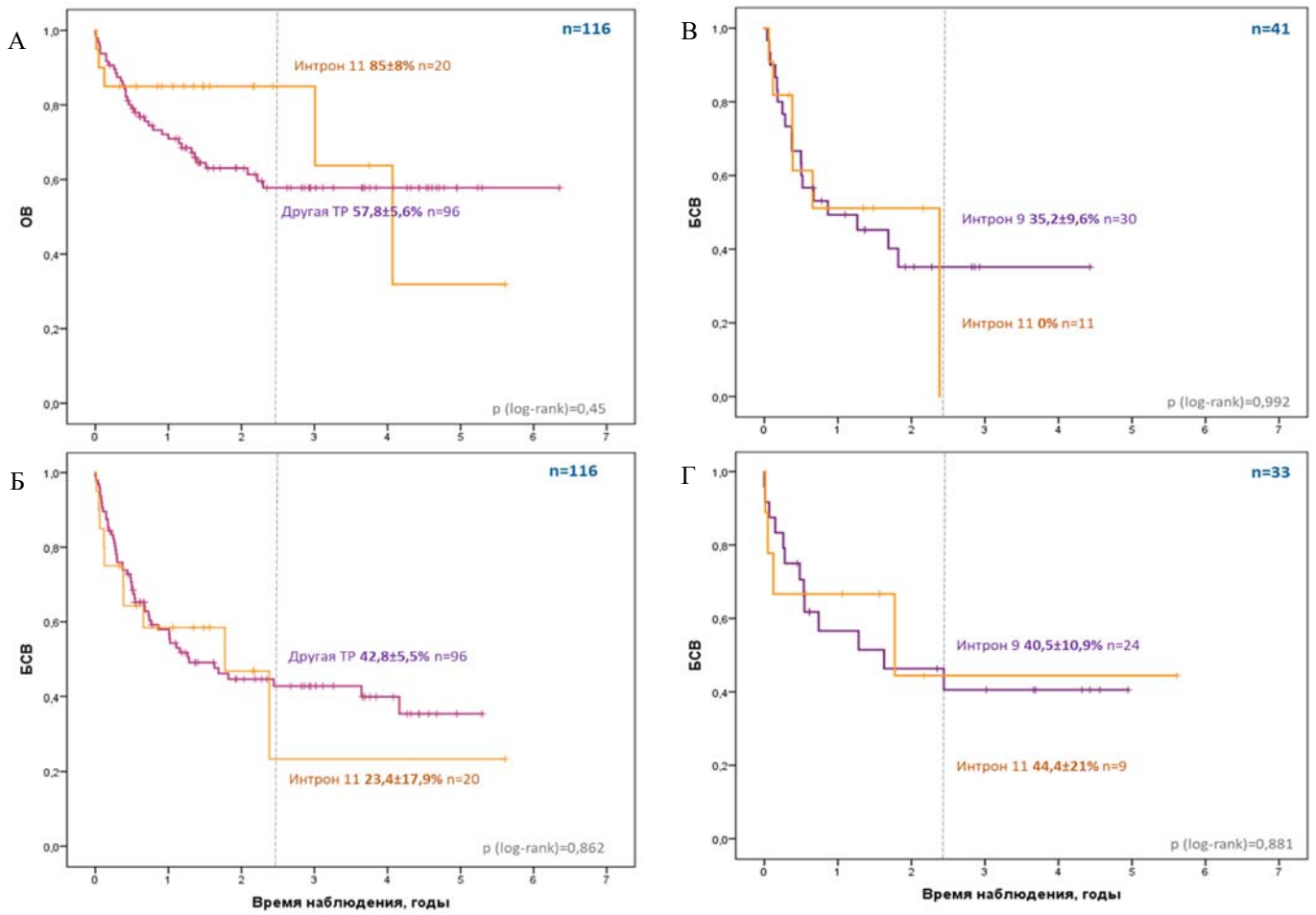


Рисунок 14 – А: 2,5-летняя ОБ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и с другими локализациями ТР гена *KMT2A*, $n=116$; Б: 2,5-летняя БСВ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и с другими локализациями ТР гена *KMT2A*, $n=116$; В: 2,5-летняя БСВ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и в интроне 9 в группе высокого риска, $n=41$; Г: 2,5-летняя БСВ у пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и в интроне 9 в группе промежуточного риска, $n=33$

Сравнение молекулярно-генетических методов детекции минимальной остаточной болезни у пациентов с различными вариантами перестроек гена *KMT2A*

В рамках исследования была проведена оценка уровня экспрессии *KMT2A*-химерных транскриптов в анализируемых точках ($n=37$) с использованием методов мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты определения экспрессии химерного транскрипта методами мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР, n=37

Химерный транскрипт	№	Точка	Мультиплекс	Моноплекс	Отношение моноплекс:мультиплекс
<i>KMT2A::MLLT3</i>	1	МОБ	+	+	0,9
<i>KMT2A::MLLT3</i>	2	МОБ	+	+	-//-
<i>KMT2A::MLLT3</i>	3	МОБ	+	+	-//-
<i>KMT2A::MLLT3</i>	4	МОБ	+	+	9,3
		иниц.	+	+	36,0
<i>KMT2A::MLLT3</i>	5	МОБ	+	+	-//-
		иниц.	+	+	0,1
<i>KMT2A::MLLT10</i>	6	МОБ	+	+	1,9
<i>KMT2A::MLLT3</i>	7	МОБ	+	+	8,8
		МОБ	+	+	-//-
		иниц.	+	+	6,8
<i>KMT2A::MLLT10</i>	8	МОБ	+	+	13,6
<i>KMT2A::MLLT10</i>	9	МОБ	-	+	-//-
<i>KMT2A::MLLT10</i>	10	иниц.	+	+	0,5
<i>KMT2A::AFDN</i>	11	МОБ	+	+	2,2
		иниц.	+	+	2,0
<i>KMT2A::MLLT3</i>	12	МОБ	+	+	-//-
		МОБ	+	+	54,7
		иниц.	+	+	160,6
<i>KMT2A::MLLT10</i>	13	МОБ	+	+	12,7
		МОБ	+	+	-//-
		иниц.	+	+	95,8
<i>KMT2A::MLLT10</i>	14	МОБ	-	+	-//-
		МОБ	+	+	3,2
<i>KMT2A::MLLT10</i>	14	иниц.	+	+	1,8
		иниц.	+	+	9,9
<i>KMT2A::AFDN</i>	15	иниц.	+	+	9,9
		МОБ	-	+	-//-
		МОБ	-	+	-//-
<i>KMT2A::AFDN</i>	16	иниц.	+	+	2,9
		МОБ	+	+	0,3
<i>KMT2A::AFDN</i>	17	МОБ	+	+	1,6
		МОБ	+	+	2,1
		иниц.	+	+	46,8
<i>KMT2A::MLLT3</i>	18	МОБ	+	+	-//-
		иниц.	+	+	18,6
<i>KMT2A::MLLT3</i>	19	иниц.	+	+	-//-
<i>KMT2A::MLLT3</i>	20	иниц.	+	+	-//-

В 33 случаях химерный транскрипт выявлялся обоими методами, в 4 случаях – только при использовании моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В 29 случаях из 33 относительная экспрессия химерного гена было выше при использовании метода моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, причем в 9 случаях из 29 химерный транскрипт детектировался мультиплексной ОТ-ПЦР, однако копияность оказывалась слишком низкой для количественного выражения. В целом при использовании моноплексной ОТ-ПЦР нормализованное число копий химерного транскрипта было достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР (непараметрический критерий знаковых рангов Уилкоксона, $p < 0,001$), что свидетельствует о более высокой чувствительности данного метода.

Алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A* и мониторинга минимальной остаточной болезни у пациентов с ОМЛ

На основании результатов данного исследования нами был разработан алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A* у пациентов с ОМЛ и последующего мониторинга МОБ (Рисунок 15).

При отсутствии подтвержденной перестройки гена *KMT2A* по результатам стандартного кариотипирования и FISH, однако наличии специфического иммунофенотипа бластных клеток, для исключения перестроек гена *KMT2A* показано выполнение ВПС ДНК либо ВПС РНК, в зависимости от технических возможностей и наличия биологического материала.

При отсутствии биологического материала для проведения стандартного кариотипирования для исключения перестроек гена *KMT2A* первым этапом выполняется ВПС ДНК либо ВПС РНК, в зависимости от технических возможностей и наличия биологического материала.

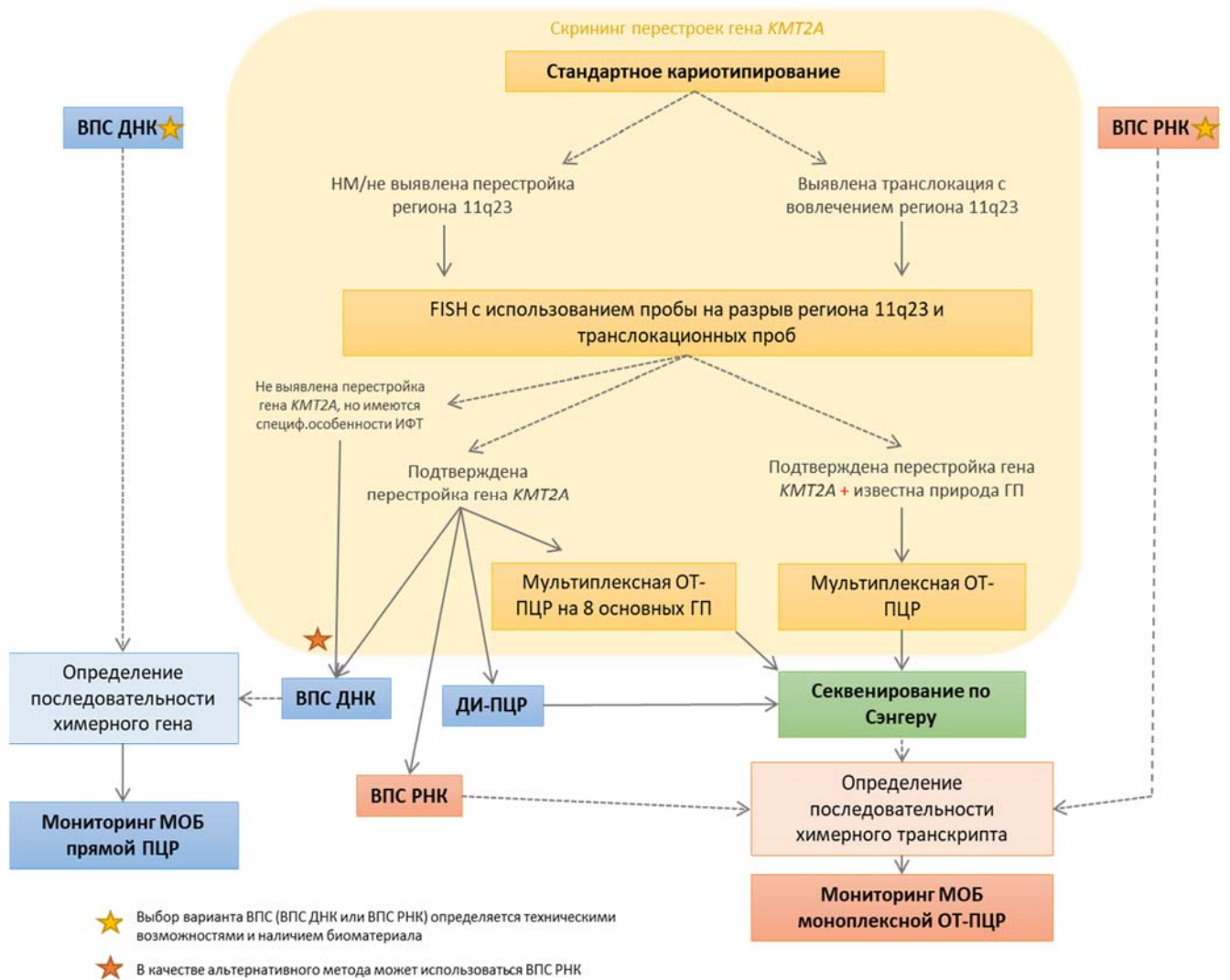


Рисунок 15 – Алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A* при ОМЛ и последующего мониторинга молекулярной МОБ.

ВПС – высокопроизводительное секвенирование; МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией; НМ – нет митозов; ГП – ген-партнер. Пунктирные стрелки указывают на результат исследований, сплошные стрелки отражают последовательность проведения исследований. Желтым цветом обозначен комплекс исследований, используемый для скрининга перестроек гена *KMT2A*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди всех пациентов, включенных в протокол ОМЛ-MRD-2018, пациенты с перестройками гена *KMT2A* составили 26,6% по данным на январь 2025г., что сопоставимо с ранее опубликованными данными. [Conneely, 2021; Meyer, 2023].

В нашем исследовании наиболее частыми генами-партнерами являлись *MLLT3* (t(9;11)(p21;q23.3)/*KMT2A::MLLT3*; n=118 (39,9%) в общей когорте) и *MLLT10* (t(10;11)(p12;q23.3)/*KMT2A::MLLT10*; n=82 (27,7%) в общей когорте), что согласуется с данными литературы [Meyer, 2023]. В результате проведенного исследования был выявлен ряд нетипичных перестроек гена *KMT2A*, в том числе впервые в мире были выявлены и описаны 2 редких гена-партнера *KMT2A*: гены *BTK* и *PRPF19* [Zerkalenkova, 2021].

ТР гена *KMT2A* наиболее часто была локализована в интроне 9 (n=134 (45,3%) в общей когорте) и в интроне 10 (n=88 (29,7%) в общей когорте), что также согласуется с международными данными [Meyer, 2023].

Описанная в литературе высокая частота встречаемости у младенцев с *KMT2A*-позитивным ОЛЛ t(4;11)(q21;q23.3)/*KMT2A::AFF1* и локализации ТР гена *KMT2A* в интроне 11 позволяет предположить существование некой биологической связи между природой гена-партнера и локализацией ТР в гене *KMT2A* [Emerenciano, 2013; Meyer, 2023; Цаур, 2016]. Однако наше исследование не продемонстрировало явную сопряженность между природой гена-партнера и локализацией ТР гена *KMT2A* у детей с ОМЛ вне зависимости от возраста.

По результатам проведенного анализа показатели ОВ и БСВ у пациентов с t(9;11)(p21;q23.3)/*KMT2A::MLLT3* и у пациентов с другими перестройками гена *KMT2A* значимо не различались (ОВ 65,3±8,2% против 55,1±7,9%, p=0,756; БСВ 46±8,9% против 43,2±7%, p=0,929). Кроме того, КЧР через 2 года от достижения полной ремиссии в группе пациентов с t(9;11)(p22;q23.3)/*KMT2A::MLLT3*, получавших терапию согласно протоколу ОМЛ-MRD-2018 в рамках группы промежуточного риска, значимо не отличалась от КЧР в группе пациентов с другими вариантами перестроек гена *KMT2A*, получавших терапию согласно протоколу ОМЛ-MRD-2018 в рамках высокой группы риска (КЧР 31% (95% ДИ: 14%-50%) против 33% (95% ДИ: 19%-48%), p=0,859).

При сравнении значений 2,5-летней БСВ между пациентами группы промежуточного риска с t(9;11)(p22;q23.3)/*KMT2A::MLLT3* и без перестройки гена *KMT2A* статистически достоверные различия не были обнаружены (46±8,9%

против $49,3 \pm 4,7\%$ соответственно, $p=0,252$). Тем не менее при сравнении значений 2,5-летней ОВ между этими двумя группами пациентов были выявлены различия на уровне статистической тенденции: пациенты группы промежуточного риска с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ характеризовались более низкими значениями ОВ, чем пациенты группы промежуточного риска без перестройки гена *KMT2A* ($65,3 \pm 8,2\%$ против $80,6 \pm 3,5\%$ соответственно, $p=0,086$). Обнаруженные различия могут свидетельствовать о более плохом ответе пациентов с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ на терапию при развитии рецидива или рефрактерности заболевания в сравнении с другими пациентами группы промежуточного риска. Таким образом, согласно результатам нашего исследования пациенты с ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ не характеризуются более благоприятным прогнозом в сравнении с пациентами с другими вариантами перестроек гена *KMT2A*. Полученные результаты согласуются с результатами крупных международных исследований [Balgobind, 2009; van Weelderen, 2024], в связи с чем данной группе пациентов целесообразно проведение аллогенной ТГСК в рамках первой линии терапии.

Мы не можем исключить, что $t(1;11)(q21;q23.3)/KMT2A::MLLT11$ оказывает благоприятное влияние на прогноз ОВ и БСВ у пациентов с ОМЛ, однако достоверная оценка прогностического значения этой редкой перестройки в рамках нашего исследования не представлялась возможной по причине малого количества пациентов ($n=6$).

Результаты нашего исследования, сравнивавшего пациентов с локализацией ТР гена *KMT2A* в интроне 11 и другими локализациями ТР гена *KMT2A*, показали, что у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ локализация ТР не имела значения для показателей ОВ ($85,8 \pm 8\%$ против $57,8 \pm 5,6\%$, $p=0,45$) и БСВ ($23,4 \pm 17,9\%$ против $42,8 \pm 5,5\%$, $p=0,86$). При сравнении показателей 2,5-летней БСВ у пациентов с наиболее частой локализацией ТР гена *KMT2A* (в интроне 9) и локализацией ТР в интроне 11 статистически достоверные различия не были обнаружены вне зависимости от группы риска ($35,2 \pm 9,6\%$ против 0% , $p=0,992$ в группе высокого риска; группа промежуточного риска: $40,5 \pm 10,9\%$ против $44,4 \pm 21\%$, $p=0,881$ в

группе промежуточного риска). Эти данные согласуются с данными литературы, согласно которым локализация ТР гена *KMT2A* в интроне 11 не оказывает значимого влияния на прогноз ОВ и БСВ при ОМЛ [Цаур, 2016].

На основании результатов настоящего исследования разработан алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A*, который может быть использован при первичной диагностике у пациентов с ОМЛ. Ключевым моментом является проведение комплекса цитогенетических и молекулярно-генетических исследований (стандартное кариотипирование, FISH, мультиплексная ОТ-ПЦР) для скрининга перестроек гена *KMT2A*. При невозможности проведения либо отрицательных результатах стандартного кариотипирования и FISH, но наличии специфического иммунофенотипа опухолевых клеток, для исключения перестроек гена *KMT2A* показано проведение дополнительных молекулярно-генетических исследований (ВПС ДНК/РНК, ДИ-ПЦР, мультиплексная ОТ-ПЦР).

Перестройки гена *KMT2A* представляют собой удобный маркер для мониторинга МОБ молекулярно-генетическими методами. Согласно нашим результатам при использовании моноплексной ОТ-ПЦР нормализованное число копий химерного транскрипта было достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР ($p < 0,001$), что свидетельствует о более высокой чувствительности данного метода. При этом более высокая чувствительность не была связана с худшим качеством материала для моноплексных реакций – напротив, копияность контрольного транскрипта *ABL1* при проведении моноплексной ОТ-ПЦР была сравнима или выше, чем при проведении мультиплексной ОТ-ПЦР. Для проведения моноплексной ОТ-ПЦР использовались те же праймеры и Taqman-зонды, что и при проведении мультиплексной ОТ-ПЦР, при этом проводился подбор наиболее специфических прямого и обратного праймеров с учетом природы гена-партнера и локализации точки разрыва в гене *KMT2A*. Такой подход не требует дополнительных временных и финансовых затрат на синтезирование уникальных пациент-специфических праймеров, однако позволяет увеличить чувствительность ОТ-ПЦР.

Заключение

На основании проведенного исследования можно заключить, что пациенты с ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23.3)/KMT2A::MLLT3$ не характеризуются более благоприятным прогнозом в сравнении с пациентами с другими вариантами перестроек гена *KMT2A*, в связи с чем данной группе пациентов целесообразно проведение аллогенной ТГСК в рамках первой линии терапии. Результаты нашего исследования показали, что у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ локализация ТР в интроне 11 гена *KMT2A* не оказывает значимого влияния на ОВ и БСВ. Таким образом локализация ТР гена *KMT2A* не должна учитываться при первичной стратификации пациентов по группам риска

Перестройки гена *KMT2A* при ОМЛ у детей представляют собой значительную и крайне гетерогенную группу. При первичной диагностике и при дальнейшем мониторинге МОБ с использованием молекулярно-генетических методов у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ рекомендуется использование комплекса методов клинической лабораторной диагностики согласно разработанному алгоритму (Рисунок 15).

Выводы

1. Наиболее частым геном-партнером в исследуемой группе являлся *MLLT3* (n=118: среди пациентов первых двух лет жизни n= 47 (37%); среди пациентов старше двух лет n=71 (42%)). Вторым по частоте являлся ген *MLLT10* (n=82: среди пациентов первых двух лет жизни n= 39 (31%); среди пациентов старше двух лет n=43 (25%)). Другие классические перестройки гена *KMT2A* ($t(11;19)(q23.3;p13.1)/KMT2A::ELL$, n=25; $t(6;11)(q27;q23.3)/KMT2A::AFDN$, n=20; $t(1;11)(q21;q23.3)/KMT2A::MLLT11$, n=9; $t(11;19)(q23.3;p13.3)/KMT2A::MLLT1$, n=8; $t(4;11)(q21;q23.3)/KMT2A::AFF1$, n=2) встречались реже. В 32 случаях были обнаружены перестройки гена *KMT2A* с участием 18 нетипичных генов-партнеров.
2. В исследуемой группе точка разрыва гена *KMT2A* наиболее часто была локализована в интроне 9 вне зависимости от возрастной группы (n=134: среди пациентов первых двух лет жизни n= 57 (45%); среди пациентов старше двух лет

n=77 (45%)). Второй по частоте являлась локализация точки разрыва в интроне 10 (n=88: среди пациентов первых двух лет жизни n= 42 (33%); среди пациентов старше двух лет n=46 (27%)).

3. Природа гена-партнера не показала достоверного влияния на ОВ и БСВ у детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ. Пациенты с t(9;11)(p21;q23.3)/*KMT2A::MLLT3* в сравнении с другими вариантами перестроек гена *KMT2A* не характеризуются более благоприятным прогнозом ОВ ($65,3 \pm 8,2\%$ против $55,1 \pm 7,9\%$, $p=0,756$) и БСВ ($46 \pm 8,9\%$ против $43,2 \pm 7\%$, $p=0,929$).

4. Локализация ТР гена *KMT2A* в интроне 11 в сравнении с другими локализациями ТР гена *KMT2A* не показала достоверного влияния на ОВ ($85,8 \pm 8\%$ против $57,8 \pm 5,6\%$, $p=0,45$) и БСВ ($23,4 \pm 17,9\%$ против $42,8 \pm 5,5\%$, $p=0,86$) у детей с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

5. При использовании моноплексной ОТ-ПЦР для детекции перестроек гена *KMT2A* нормализованное число копий химерного транскрипта достоверно выше, нежели при использовании мультиплексной ОТ-ПЦР ($p < 0,001$), что свидетельствует о более высокой чувствительности данного метода.

6. Разработанный алгоритм детекции перестроек гена *KMT2A* рекомендован для использования как при первичной диагностике, так и при дальнейшем мониторинге МОБ с использованием молекулярно-генетических методов у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ.

Практические рекомендации

1. С учетом большого количества генов-партнеров и различных возможных локализаций ТР в гене *KMT2A* определение перестроек гена *KMT2A* в дебюте ОМЛ требует применения комплекса цитогенетических и молекулярно-генетических методов. Исследование должно включать в себя последовательное выполнение стандартного кариотипирования, флуоресцентной гибридизации *in situ*, полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием полученного продукта по Сэнгеру, а также высокопроизводительного секвенирования для определения нетипичных перестроек гена *KMT2A* (Рисунок 15).

2. Пациентов детского возраста с *KMT2A*-позитивным ОМЛ следует стратифицировать в группу пациентов высокого риска вне зависимости от структуры *KMT2A*-химерного гена. Данной группе пациентов целесообразно проведение аллогенной ТГСК в рамках первой линии терапии.

3. Молекулярный мониторинг МОБ у пациентов с *KMT2A*-позитивным ОМЛ следует проводить с помощью моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Для проведения моноплексной ОТ-ПЦР необходимо подобрать одну специфическую пару праймеров и один Taqman-зонд с учетом структуры детектируемого при первичной диагностике *KMT2A*-химерного гена (а именно локализации точки разрыва в гене *KMT2A* и природы гена-партнера).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. *KMT2A*-позитивные острые миелоидные лейкозы у детей: молекулярно-генетическая характеристика и прогноз / **С.А. Лебедева**, Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Казакова, О.И. Солдаткина, Л.В. Земцова, Н.М. Тимофеева, Г.А. Новичкова, А.А. Масчан, М.А. Масчан, Ю.В. Ольшанская // Российский журнал детской гематологии и онкологии: сборник материалов X Конгресса НОДГО. – 2019. – С. 165-166.
2. Мониторинг минимальной остаточной болезни при остром миелоидном лейкозе с перестройками гена *KMT2A*: сравнение методов мультиплексной и моноплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени / **С.А. Лебедева**, А.Н. Борковская, Э.Р. Дадаханова, В.С. Вьюшков, О.И. Солдаткина, Н.М. Тимофеева, И.И. Калинина, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова, Ю.В. Ольшанская, Е.А. Зеркаленкова // Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа. – 2023. – Т. 9. – № 1. – С. 35-45 (ВАК).
3. Острый миелоидный лейкоз с транслокациями, вовлекающими ген *KMT2A*, у близнецов как модель для исследования лейкемогенеза: описание клинических случаев и генетические характеристики / З.З. Аскерова, Е.А. Зеркаленкова, **С.А. Лебедева**, К.С. Искакова, Д.А. Венёв, У.Н. Петрова, Д.Д. Байдильдина, Д.Н. Балашов, Г.О. Бронин, И.Я. Томилин, М.В. Натрусова, М.В. Гаськова, О.И. Солдаткина, Ю.В. Ольшанская, А.Н. Казакова, А.М. Попов, С.А. Кашпор, М.Э. Дубровина, Т.В. Конюхова, А.А. Масчан // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2025. – Т. 24. – № 1. – С. 167-174 (ВАК).
4. Предварительные результаты терапии пациентов группы промежуточного риска по протоколу ОМЛ-MRD-2018 / М. С. Васильева, И. И. Калинина, Д. А. Венёв, **С.А. Лебедева**, В.А. Банколе, З.А. Абашидзе, О.В. Алейникова, Ю.В. Ольшанская, Е.А. Зеркаленкова, М.В. Гаськова, А.Б. Итов, А.М. Попов, Е.В. Михайлова, С.А. Кашпор, С.А. Плясунова, М.Э. Дубровина, Т.В. Конюхова, К.А. Воронин, Л.А. Хачатрян, Д.Д. Байдильдина, Г.А. Цаур, Л.Г. Фечина, А.В. Попа, А.А. Масчан,

Г.А. Новичкова // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2025. – Т. 24. – № 1. – С. 14-25 (ВАК).

5. Прогностическое значение природы гена-партнера и локализации точки разрыва у детей с *KMT2A*-позитивным острым миелоидным лейкозом / **С.А. Лебедева**, И.И. Калинина, А.Н. Казакова, В.А. Банколе, М.С. Васильева, Д.А. Венёв, Д.Д. Байдильдина, О.В. Алейникова, А.В. Попа, А.А. Масчан, Г.А. Новичкова, Е.А. Зеркаленкова // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2025. – Т. 24. – № 1. – С. 58-65 (ВАК).

6. Acute myeloid leukemia with t(10;11)(p11-12;q23.3): Results of Russian Pediatric AML registration study / E.A. Zerkalenkova, **S.A. Lebedeva**, A.N. Kazakova, G.A. Tsaur, Y.V. Starichkova, N.M. Timofeeva, O.I. Soldatkina, E.V. Aprelova, A.M. Popov, N.I. Ponomareva, L.V. Baidun, C. Meyer, G.A. Novichkova, M.A. Maschan, A.A. Maschan, R. Marschalek, Y.V. Olshanskaya // International Journal of Laboratory Hematology. – 2019. – Vol. 41. – № 2. – P. 287-292.

7. BTK, NUTM2A, and PRPF19 Are Novel KMT2A Partner Genes in Childhood Acute Leukemia. / E.A. Zerkalenkova, **S.A. Lebedeva**, A.N. Borkovskaia, O.I. Soldatkina, O.M. Plekhanova, G.A. Tsaur, M.A. Maschan, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, Y.V. Olshanskaya // Biomedicines. – 2021. – Vol. 9. – № 924. – P. 4-13.

8. Cytogenetic and molecular genetic methods for chromosomal translocations detection with reference to the *KMT2A/MLL* gene /N.A. Lomov, E.A. Zerkalenkova, **S.A. Lebedeva**, V.S. Viushkov, M.A. Rubtsov // Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. – 2021. – Vol. 58. – № 3. – P. 180-206.

9. Quantification of NG2-positivity for the precise prediction of *KMT2A* gene rearrangements in childhood acute leukemia / E.A. Zerkalenkova, E.V. Mikhaylova, **S.A. Lebedeva**, O.I. Illarionova, L.V. Baidun, S.A. Kashpor, E.Y. Osipova, M.A. Maschan, A.A. Maschan, G.A. Novichkova, Y.V. Olshanskaya, A.M. Popov // Genes Chromosomes and Cancer. – 2021. – Vol. 60. – № 2. – P. 88-99.

Список сокращений и условных обозначений

БСВ – бессобытийная выживаемость

ВПС – высокопроизводительное секвенирование

ГП – ген-партнер

ДИ – доверительный интервал

ДИ-ПЦР – длинная инвертированная полимеразная цепная реакция

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КЧР – кумулятивная частота развития рецидива

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОВ – общая выживаемость

ОЛ – острый лейкоз

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ТР – точка разрыва

FAV – Франко-американо-британская кооперативная группа (англ. French-American-British cooperative group)

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

КМТ2А – лизинметилтрансфераза 2 А (англ. Histone-lysine N-methyltransferase 2A)

MRD – минимальная остаточная болезнь (англ. minimal residual disease)