

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



На правах рукописи

Осипова Дарья Сергеевна

**Методы молекулярно-генетической диагностики гистиоцитоза из клеток
Лангерганса у детей**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.1.28. Гематология и переливание крови

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

кандидат медицинских наук

Райкина Елена Владиславовна

доктор медицинских наук, доцент

Масчан Михаил Александрович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ГИСТИОЦИТОЗ ИЗ КЛЕТОК ЛАНГЕРГАНСА (ГКЛ). ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Классификация и клиническая картина ГКЛ	13
1.2 Патогенез ГКЛ	15
1.3 Спектр мутаций при ГКЛ.....	21
1.4 Лечение ГКЛ	24
1.5 Молекулярная диагностика ГКЛ.....	27
1.5.1 Виды биоматериала для диагностики драйверной соматической мутации	27
1.5.2 Методы обнаружения соматических мутаций при ГКЛ.....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	35
2.1 Дизайн исследования	35
2.2 Характеристика пациентов	35
2.3 Объекты исследования.....	37
2.4 Инициальное определение мутации <i>BRAF</i> V600E	39
2.4.1 Постановка мсПЦР и секвенирования по Сэнгеру.....	39
2.4.2 Оценка и мониторинг аллельной нагрузки <i>BRAF</i> V600E методом цкПЦР	40
2.5 Постановка таргетной кастомизированной NGS-панели	42
2.6 Выявление химерных транскриптов с помощью таргетного РНК- секвенирования	45
2.7 Статистическая обработка данных	46
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	48

3.1	Диагностический этап	48
3.1.1	Инициальная диагностика мутации <i>BRAF</i> V600E	48
3.1.2	Выявление драйверных мутаций, отличных от V600E, с помощью таргетной NGS панели	56
3.2	Научно-клинический этап.....	67
3.2.1	Поиск химерных транскриптов с помощью таргетного РНК-секвенирования	67
3.2.2	Анализ генотип-фенотипических корреляций.....	69
3.2.3	Мониторинг аллельной нагрузки мутации <i>BRAF</i> V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ		80
4.1	Обсуждение результатов инициального определения <i>BRAF</i> статуса.....	80
4.2	Обсуждение результатов секвенирования таргетной NGS панели	83
4.3	Обсуждение результатов анализа генотип-фенотипических корреляций	87
4.4	Обсуждение результатов мониторинга аллельной нагрузки в сцДНК и популяции миелоидных предшественников	89
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ		94
5.1	Перспективы дальнейшего развития темы исследования	98
ВЫВОДЫ		99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ		101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....		102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		104
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....		115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Гистиоцитоз из клеток Лангерганса (ГКЛ) – миелоидное неопластическое заболевание, возникающее вследствие избыточной пролиферации и аккумуляции в органах и тканях клеток, фенотипически похожих на клетки Лангерганса и экспрессирующих CD1a CD207. Это приводит к избыточному разрастанию, локальному повреждению и нарушению функции пораженных органов [1].

Основной функцией нормальных непатологических клеток Лангерганса, которые представляют собой разновидность дендритных клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, является антиген-презентация [2]. При ГКЛ такие клетки приобретают активирующую соматическую мутацию, что вызывает их клональную пролиферацию и, как следствие, нарушение регуляции взаимодействий клеток иммунной системы в поражённых очагах. Этот процесс может затрагивать органы и ткани в различных сочетаниях, в связи с чем клинические проявления ГКЛ могут варьировать от доброкачественных локализованных форм до стремительно прогрессирующих диссеминированных.

Этиология и патогенез ГКЛ по сей день остаются предметом изучения, так как заболевание сочетает в себе как признаки неопластического, так и воспалительного процессов. Наличие клональной пролиферации патологических клеток Лангерганса (ПКЛ) было доказано ещё в 1994 году, а последующие исследования выявили у примерно 50% пациентов с ГКЛ точечную соматическую мутацию *BRAF V600E*, приводящую к митотической активации и ингибированию апоптоза [3–6]. Наличие соматического драйвера доказывает неопластическую природу заболевания, однако, из-за функциональных особенностей ПКЛ (их активной пролиферации и антиген-презентации), клеточный инфильтрат в очагах поражения является полиморфным и содержит, помимо ПКЛ, лимфоциты, эозинофилы, моноциты и макрофаги, что можно отнести к чертам реактивного процесса [7]. Кроме того, некоторые формы ГКЛ могут протекать локализованно и

доброкачественно, характеризуясь спонтанным выздоровлением, что является нехарактерным для неопластических процессов явлением.

С момента установления роли мутации *BRAF* V600E в биологии ГКЛ молекулярно-биологические исследования, направленные на детекцию *BRAF* V600E, находятся в центре внимания исследователей. Помимо выявления мутантных ПКЛ в очагах гистиоцитарных поражений, аллельная нагрузка *BRAF* V600E также может быть детектирована в свободно циркулирующей ДНК (сцДНК), причем её наличие связано с более тяжелым течением ГКЛ и повышенной вероятностью рецидива, а динамика изменения соответствует ответу на терапию [8]. Также, в работе Y. Xiao и соавт. [9] было показано, что патологический клон присутствует в костном мозге пациентов с ГКЛ, вне зависимости от системности заболевания. Различия в клинической картине, по мнению авторов, связаны с вариациями уровня экспрессии мутантного аллеля в клетках-предшественниках, что влияет на состав и пропорциональные количества клеточных популяций, несущих эту мутацию в костном мозге. В случае моносистемного гистиоцитоза количество патологических клеток может быть ниже уровня чувствительности метода их детекции. В связи с этим, поиск мутации в костном мозге следует проводить с использованием методов с высокой аналитической чувствительностью, таких как, например, цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), так как уровень аллельной нагрузки может быть крайне низким или даже оставаться невыявленным стандартными методами.

В настоящее время отсутствует биомаркер для определения минимальной остаточной болезни (МОБ). В этой связи измерение аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников у пациентов с ГКЛ представляет значительный клинический интерес. Этот показатель может быть использован в качестве маркера МОБ, а также помочь в оптимизации продолжительности терапии таргетными препаратами.

Кроме мутации *BRAF* V600E, при ГКЛ были описаны другие мутации в генах – участниках RAS/RAF–MEK–ERK сигнального пути. На данный момент в мировой литературе существует всего одна зарубежная публикация, в которой

описаны генотип-фенотипические корреляции у пациентов с различными драйверными мутациями при ГКЛ [10], а у российских пациентов подобные исследования не проводились. Методом выбора для поиска мутаций, отличных от *BRAF V600E*, является высокопроизводительное секвенирование (Next Generation Sequencing – NGS) ДНК с большой глубиной прочтения целевых регионов, а также секвенирование методом NGS мРНК для выявления химерных транскриптов. По данным литературы, 24% пациентов с ГКЛ имеют мутацию, отличную от *BRAF V600E*, или мутации в гене *MAP2K1* [7], поэтому поиск альтернативных генетических причин заболевания у пациентов с ГКЛ является крайне актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

ГКЛ является редким заболеванием с разнообразными фенотипическими проявлениями и недостаточно исследованным патогенезом. На сегодняшний день стандартом терапии остается протокол международного гистиоцитарного сообщества (HS) – LCH-IV. Однако данный протокол не учитывает возможности применения целевых препаратов и не стратифицирует пациентов в зависимости от их молекулярного статуса. В результате, в настоящее время отсутствует единая методология для оценки и мониторинга МОБ, которая бы основывалась на анализе аллельной нагрузки драйверной мутации.

Цель исследования

Разработка и оптимизация методов молекулярно-генетической диагностики и молекулярного мониторинга гистиоцитоза из клеток Лангерганса у детей.

Задачи исследования

1. Выполнить сравнительный анализ эффективности различных методов определения мутации *BRAF V600E*.
2. Внедрить в практику наиболее эффективную методику оценки аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в различных видах биоматериала, таких как свободно-циркулирующая ДНК плазмы крови, ДНК из отсортированных популяций миелоидных гемопоэтических предшественников КМ на этапе диагностики, а также на различных этапах терапии.

3. Оценить возможность использования показателя аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в качестве биомаркера активности ГКЛ и эффективности проводимой терапии.

4. Разработать собственную кастомизированную NGS панель, включающую гены, мутации в которых описаны при гистиоцитозе из клеток Лангерганса, и провести молекулярно-генетический анализ образцов пациентов, у которых отсутствует мутация *BRAF* V600E. Провести анализ данных NGS мРНК у пациентов, у которых с помощью таргетного секвенирования ДНК мутации не были найдены.

5. Провести анализ генотип-фенотипических корреляций у пациентов с ГКЛ.

6. Сформулировать оптимальный алгоритм молекулярно-генетической диагностики ГКЛ.

Научная новизна исследования

Впервые для пациентов с ГКЛ в возрасте от 6 мес. до 18 лет, получающих терапию по исследовательскому апробационному протоколу NCT03585686, проведен анализ данных мониторинга аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в контрольных точках, предусмотренных данным протоколом.

Кроме того, для пациентов с ГКЛ аллельная нагрузка впервые была проанализирована одновременно в нескольких типах биоматериала, что предоставило возможность оценить эффективность терапии с учетом индивидуальных особенностей каждого пациента. Впервые в мире оценку МОБ проводили в популяции миелоидных предшественников КМ.

Также для пациентов без мутации *BRAF* V600E была разработана оригинальная кастомизированная таргетная NGS-панель для выявления генетических причин заболевания.

Впервые описаны генотип-фенотипические корреляции у российских пациентов с различными драйверными мутациями при ГКЛ.

Практическая значимость

Анализ полученных результатов позволил сформулировать оптимальный алгоритм молекулярно-генетической диагностики ГКЛ. Оценка возможности использования показателя аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в качестве биомаркера активности ГКЛ и эффективности проводимой терапии по исследовательскому апробационному протоколу NCT03585686 позволил внедрить в практику этот метод оценки МОБ. Анализ генотип-фенотипических корреляций позволил расширить понимание биологии ГКЛ.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проведено на базе лаборатории молекулярной биологии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. В ходе исследования были применены такие методы, как секвенирование по Сэнгеру, цифровая капельная ПЦР, высокопроизводительное секвенирование нового поколения с использованием кастомизированной таргетной панели генов. Исследование носит ретроспективный характер, описывает результаты, которые были получены в ходе работы с биоматериалом (периферическая кровь, костный мозг, образцы очагов поражения, фиксированные в формалине и залитые в парафиновый блок (FFPE)) пациентов с диагнозом ГКЛ.

Исследование состоит из следующих основных частей: анализ данных секвенирования по Сэнгеру или цифровой капельной ПЦР с целью выявления мутации *BRAF V600E* (биоматериал – FFPE, КМ, сцДНК); в случае невыявления *BRAF V600E* – поиск драйверной мутации с помощью таргетной NGS панели «Гистиоцитозы»; в случае выявления *BRAF V600E* - определение и мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в различных видах биоматериала (сцДНК, популяции миелоидных предшественников) методом цифровой капельной ПЦР; в случае невыявления драйверной соматической мутации на уровне ДНК - поиск химерных транскриптов с помощью высокопроизводительного секвенирования мРНК. Последним этапом был анализ полученных данных и поиск генотип-фенотипических корреляций, анализ потенциала применения методов

молекулярной диагностики для выявления МОБ и оценки эффективности терапии, создание оптимального алгоритма молекулярно-генетической диагностики.

Положения, выносимые на защиту

1. Сравнительный анализ различных методов детекции мутации *BRAF* V600E показал, что цифровая капельная ПЦР является наиболее эффективным методом её выявления у пациентов с ГКЛ. Использование цкПЦР для оценки аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в свободно циркулирующей ДНК на этапе диагностики, а также сравнение диагностической чувствительности цкПЦР со стандартными методами обнаружения мутации в биоптатах, показали, что этот метод может стать эффективной альтернативой инвазивной биопсии для первичной оценки BRAF-статуса у пациентов с ГКЛ.

2. Разработанная кастомизированная таргетная NGS панель является эффективным методом для молекулярно-генетического анализа образцов пациентов, у которых отсутствует мутация *BRAF* V600E.

3. Наличие мутации *BRAF* V600E ассоциировано с системным течением гистиоцитоза, а также с кожными поражениями. Уровень аллельной нагрузки *BRAF* V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников костного мозга может служить биомаркером для оценки активности заболевания и мониторинга эффективности лечения.

Степень достоверности результатов исследования

Достоверность результатов исследования обеспечена большой выборкой, включающей 230 пациентов с диагнозом ГКЛ, применением актуальных методик молекулярно-генетического анализа, репрезентативностью полученных данных и корректным выбором методов статистического анализа данных в соответствии с поставленными задачами.

Апробация диссертации

Апробация диссертации проведена на совместном заседании экспертных комиссий по лабораторной диагностике, клеточным технологиям и фундаментальным исследованиям и гематологии, иммунологии и педиатрии ФГБУ

«НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, протокол №3 от 11.03.2025 г.

Результаты работы и ее основные положения доложены на следующих научно-практических конференциях в виде устных или постерных докладов: Молекулярные основы клинической онкологии (Обнинск, 2019), 35th Annual Meeting of the Histiocyte Society (Мемфис, 2019), Полисистемные орфанные заболевания как междисциплинарная проблема (Москва, 2020), V Конгресс гематологов России (Москва, 2020), 39th Annual Meeting of the Histiocyte Society (Афины, 2023), 38th Annual Meeting of the Histiocyte Society (Стокгольм, 2022), SIOP Asia (Ереван, 2023).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, из которых 2 – в зарубежных изданиях и 5 – в журналах, входящих в перечень ВАК при Минобрнауки Российской Федерации. Все статьи опубликованы в журналах, индексируемых МБД.

Внедрение результатов в практику

На основе проведенного исследования был создан алгоритм молекулярно-генетической диагностики ГКЛ, который впоследствии был внедрен в работу лаборатории молекулярной биологии ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России. Полученные результаты молекулярно-генетических анализов теперь активно используются в клинической практике – при выявлении соответствующих драйверных мутаций, пациентам могут быть назначены таргетные препараты (вемурафениб, дабрафениб – в случае мутации *BRAF* V600E, или МЕК-ингибиторы, например, траметиниб). По результатам мониторинга аллельной нагрузки в рамках протокола NCT03585686 оценивается эффективность проводимой терапии.

Участие автора в получении результатов исследования

Автор провел анализ литературных источников, посвященных патогенезу, молекулярно-генетическим характеристикам, подходам к лечению и оценке

минимальной остаточной болезни (МОБ) у пациентов с ГКЛ. В сотрудничестве с научными руководителями определялись цель и задачи исследования, а также его дизайн, в рамках которого была проведена молекулярно-генетическая характеристика пациентов. Автор также выполнял процессирование образцов, разработку и валидацию лабораторных методик выделения нуклеиновых кислот из различных видов биоматериала, разработку и валидацию молекулярных методов выявления мутаций. Также автор осуществлял сбор материала с оценкой клинического статуса посредством анализа необходимой медицинской документации пациентов, включенных в данное исследование.

Структура и объём диссертации

Диссертация представлена на 120 страницах и включает следующие разделы: введение, которое охватывает актуальность проблемы, цели, задачи, научную новизну, практическую значимость и внедрение результатов в клиническую практику; обзор литературы; материалы и методы исследования; результаты; обсуждение полученных данных; заключение; выводы; практические рекомендации, список обозначений и сокращений, библиографический список и приложение А.

Работа содержит 6 таблиц, 28 рисунков.

Список литературы включает 106 источников, из которых 6 являются отечественными и 100 — иностранными.

ГЛАВА 1. ГИСТИОЦИТОЗ ИЗ КЛЕТОК ЛАНГЕРГАНСА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Гистиоцитоз (от лат. «histio» — ткань, «cyto» — клетка, «osis» — множество) представляет собой группу редких заболеваний, характеризующихся накоплением в пораженных органах и тканях клеток, морфологически схожих с гистиоцитами — тканевыми макрофагами или дендритными клетками. Клинические проявления этого заболевания могут варьировать от лёгких доброкачественных форм до распространенных и быстро прогрессирующих.

Сложный патогенез, который может затронуть практически все системы и ткани организма, значительно усложнил классификацию и диагностику гистиоцитоза из клеток Лангерганса. Первое упоминание об этом заболевании датируется 19 веком, когда Альфред Хэнд описал клинический случай с типичными симптомами гистиоцитоза [12]. В дальнейшем, в начале 20 века, исследователи независимо друг от друга описали различные проявления ГКЛ, однако не подозревали, что эти заболевания имеют общую этиологию. Было выделено несколько синдромов, классифицированных как болезни накопления — синдром Хэнд-Шуллера-Кристчена (экзофтальм, поражение костей черепа и несахарный диабет) [13]; болезнь Леттерера-Зиве (лимфопролиферация, гепатоспленомегалия, анемия и пятнисто-папулезная сыпь) [14]; эозинофильная гранулема (множественные поражения костей) [15]. Л. Лихтенштайн и Х. Яффе в 1943 году предположили общий гематологический генез этих патологий [16], а через 9 лет была предложена общая классификация «Гистиоцитоз X», где «X» указывало на неизвестную этиологию [17].

Важным шагом в установлении происхождения патологических клеток стало открытие в 1961 году гранул Бирбека в их цитоплазме, которые имели палочкообразную форму и дискоидное расширение на конце [18]. М. Бирбек первым описал эти гранулы как ультраструктурную особенность клеток Лангерганса, а в 1973 году К. Незелоф предложил, что эти гранулы встречаются в патологических клетках при гистиоцитозе, что свидетельствует о пролиферации и

диссеминации клеток Лангерганса [19]. Специфичность гранул Бирбека для клеток Лангерганса позволила выявить их в очагах ГКЛ, что подтверждало общность их происхождения. Обнаружение гранул Бирбека с помощью электронной микроскопии по-прежнему является важным диагностическим критерием ГКЛ [20]. После установления сходства патологических клеток с клетками Лангерганса, название заболевания было изменено на актуальное на сегодняшний день — гистиоцитоз из клеток Лангерганса.

ГКЛ относится к редким заболеваниям. Заболеваемость ГКЛ составляет около 8 случаев на 1 000 000 у детей до 15 лет [21], а частота ГКЛ у новорожденных составляет 1-2 случая на 1 000 000 [22]. Средний возраст постановки диагноза - 3 года. Соотношение мальчиков и девочек - 2:1 [1].

1.1 Классификация и клиническая картина ГКЛ

Первая классификация гистиоцитозов, опубликованная в 1987 году группой Гистиоцитарного Общества, делила заболевания на три категории: патологии дендритных клеток, включающие гистиоцитоз из клеток Лангерганса (ГКЛ), ювенильную ксантогранулему (ЮКГ) и болезнь Эрдгейма-Честера (ЭЧБ); нелангергансоклочечные гистиоцитозы, такие как болезнь Розаи-Дорфмана и гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; а также злокачественные гистиоцитарные заболевания - гистиоцитарная саркома [23].

В 2016 году классификация была обновлена с учетом молекулярно-генетических особенностей и теперь включает пять групп: (L, C, H, M, R): лангергансоклочечные гистиоцитозы (L); кожный и слизисто-кожный гистиоцитоз (C); злокачественные гистиоцитозы (M); болезнь Розаи – Дорфмана (R); гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, к которому также относится синдром активации макрофагов (H). Группа лангергансоклочечных гистиоцитозов также не является однородной и объединяет ГКЛ, болезнь Эрдгейма – Честера и диссеминированную ювенильную ксантогранулему, так как данным патологиям характерен одинаковый спектр мутаций и схожие клинические проявления [24].

Сам ГКЛ в зависимости от клинического течения заболевания и числа пораженных органов классифицируется на моносистемную (Single System – SS) и мультисистемную форму (Multisystem, MS), которые, в свою очередь, стратифицированы по группам риска в зависимости от наличия или отсутствия поражений органов риска. К органам риска (Risk Organs, RO) относят печень, селезенку и костный мозг.

При моносистемной форме ГКЛ (группа низкого риска) выделяют:

- унифокальное поражение (солитарное поражение одной анатомической области – кожи, кости, лимфатического узла)
- мультфокальное поражение (множественные очаги поражения скелета, множественное поражение лимфоузлов)

При мультисистемной форме выделяют:

- группа промежуточного риска: поражение двух и более органов без вовлечения органов риска (MS RO-)
 - группа высокого риска: вовлечение одного и более органов риска (MS RO+)
- [25]. Пациенты с поражением этих органов составляют группу с неблагоприятным прогнозом, сниженным ответом на терапию и повышенным риском рецидивов [26].

Клинические проявления ГКЛ зависят от количества и локализации очагов поражения. Обычно затрагиваются такие органы, как кости, кожа, легкие, костный мозг, лимфатические узлы, печень, селезенка, эндокринные железы, головной и спинной мозг. Общие симптомы включают лихорадку, слабость, интоксикацию, снижение аппетита и потерю массы тела.

Наиболее сложную терапевтическую группу представляют пациенты с поражением органов риска. Поражения печени клинически проявляются гепатомегалией, желтухой, синдромами печеночноклеточной недостаточности и холестаза. Исходом поражения печени может быть портальная гипертензия и цирроз печени. При поражении селезенки характерна спленомегалия и обусловленный ею гиперспленизм [1]. Поражение костного мозга ведет к его недостаточности: развитию анемии, тромбоцитопении, лейкопении и нейтропении,

что клинически проявляется анемией, кровоточивостью и инфекционными осложнениями [26].

Первичная диагностика ГКЛ проводится на основании данных физикального, лабораторного и инструментального обследования. Верификация диагноза возможна на основании иммуногистохимического исследования биопсийного материала, полученного из очага поражения. Основным методом диагностики ГКЛ – гистологическое и иммуногистохимическое исследование биоптата. Подтверждающими показателями являются характерная морфология клеточного инфильтрата, экспрессия CD1a или лангерина (CD207) на патологических клеточных элементах. При установлении диагноза «гистиоцитоз из клеток Лангерганса» определяют распространённость (моно- или мультисистемная форма), а также *BRAF* V600E - статус (позитивный или негативный) молекулярно-генетическими методами [1].

1.2 Патогенез ГКЛ

При ГКЛ поражение органов и тканей связано с инфильтрацией их патологическими клетками (ПКЛ), которые имеют сходство с клетками Лангерганса, представляющими собой подтип дендритных клеток. Эти клетки обладают рядом маркеров, общих с нормальными не патологическими клетками Лангерганса [27]. Они экспрессируют CD1a, трансмембранный белок семейства гликопротеинов CD1, который находится на поверхности антигенпрезентирующих клеток и структурно относится к белкам главного комплекса гистосовместимости (МНС). CD1a образует гетеродимеры с β 2-микроглобулином и участвует в презентации антигенов Т-клеткам [28]. Кроме того, ПКЛ несут на поверхности CD207 или лангерин - мембранный белок, относящийся к лектинам типа С. Лангерин находится на поверхности клеток и при связывании лиганда индуцирует формирование гранул Бирбека, что приводит к интернализации антигена и его неклассическому процессингу для последующей презентации антигена Т-лимфоцитам [29].

Хотя название ГКЛ отражает суть заболевания, патологические клетки в этом случае значительно отличаются от нормальных клеток Лангерганса. В исследовании Hutter и соавт. (2012) был проведен сравнительный транскриптомный анализ патологических гистиоцитов, нормальных клеток Лангерганса, миелоидных дендритных клеток и плазмоцитарных дендритных клеток, полученных из различных очагов поражения у пациентов с разными формами болезни. Транскрипционный анализ охватил более 2000 генов, из которых около 200 транскриптов имели более высокий уровень экспрессии в гистиоцитах по сравнению с другими клетками, участвующими в иммунном ответе, а 53 транскрипта, наоборот, показали пониженную экспрессию. Это свидетельствует о том, что эти гены образуют уникальный транскриптомный профиль гистиоцитов, показывая, что они формируют отдельную клеточную популяцию (Рисунок 1) [30].

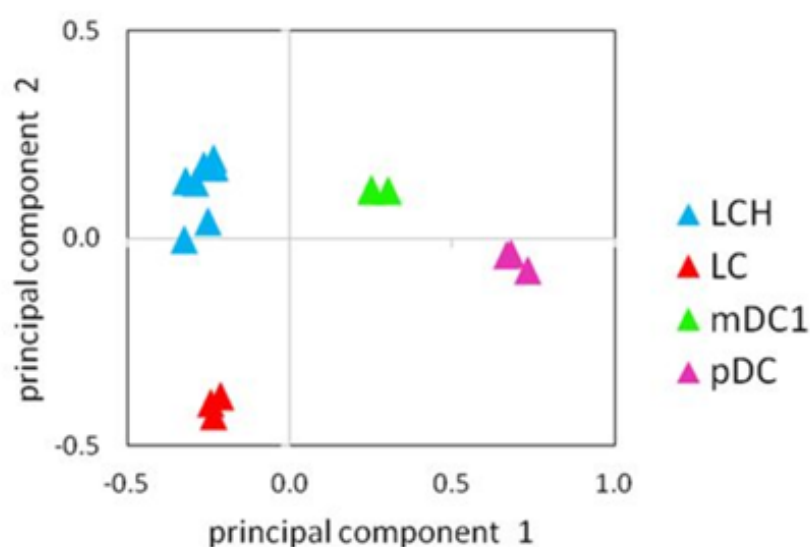


Рисунок 1 – Результат применения статистического метода главных компонент (principal component) для сравнения транскрипционных профилей различных клеточных популяций. Патологические гистиоциты (LCH) формируют отдельную от клеток Лангерганса (LC), миелоидных дендритных клеток (mDC) и плазмоцитарных дендрных клеток (pDC) популяцию [30]

Помимо различий на транскриптомном уровне, в ряде исследований было показано, что ПКЛ характеризуются сниженной экспрессией молекул адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), E-кадгерина и CD36, но большей экспрессией CD2, CD11b, CD11c, CD13, CD33, CD66c и CD300LF - маркеров миелоидной дифференцировки дендритных клеток. Кроме, того ПКЛ экспрессируют больше цитокинов и активнее взаимодействуют с Т-клетками [31].

В работе Eli L. Diamond, 2016, было проведено сравнение профилей экспрессии генов по данным РНК секвенирования 7 образцов очагов поражения ГКЛ и 6 образцов с другими гистиоцитарными заболеваниями, такими как болезнь Эрдгейма-Честера, ювенильная ксантогранулёма, болезнь Розаи-Дорфман. Было показано, что образцы опухоли ГКЛ отличаются, в первую очередь, по уровню экспрессии генов, специфичных для опухолевых CD207+ гистиоцитов и кодирующих белки, с помощью которых гистиоциты отличают гистологически (CD1a, CD1c, CD207). Кроме того, были высокоэкспрессированы гены, которые характерны для популяции миелоидных предшественников на поздних стадиях дифференцировки, популяции предшественников гранулоцитов и моноцитов (GMPs), а также некоторых генов, экспрессия которых характерна для дендритных клеток (*IRF7*, *RUNX3*, *GPR82*, и *CCR7*). Также в работе было показано, что профиль экспрессии зависит в том числе от драйверной мутации (*BRAF* V600E, *MAP2K1*, *ARAF*, перестройки, затрагивающие гены *BRAF* или *ALK*) [32].

В работе Florian Halbritter, 2019, был представлен подробный анализ клеточного и молекулярного состава очагов поражений при ГКЛ. Авторами было проведено секвенирование транскриптома единичных клеток 7 очагов ГКЛ. Были выделены кластеры различных клеточных популяций – Т и В лимфоцитов, Т регуляторных клеток, моноцитов/макрофагов, дендритных клеток и самих гистиоцитов. Также внутри популяции гистиоцитов были выделены субпопуляции клеток, различающихся по своему уровню дифференцировки и уровню экспрессии генов цитокинового сигналинга, хемотаксиса, интерферонового сигналинга, и было сделано предположение, что от индивидуальных различий в субпопуляциях гистиоцитов может зависеть клиническое течение заболевания [33].

Особенности транскриптома ПКЛ указывают на то, что воспалительный процесс играет ключевую роль в патогенезе ГКЛ. Тем не менее, обнаружение мутации *BRAF* V600E, часто встречающейся при этом заболевании, свидетельствует о его неопластической природе [4]. Поскольку ГКЛ сочетает признаки миелоидной неоплазии и воспалительного компонента, в классификации МКБ-10 это заболевание может быть кодировано как D76.0, что отражает его принадлежность к заболеваниям крови, но также может быть отнесено к злокачественным заболеваниям с кодом C96.0 [34].

После публикации работы М. Verres и соавт. (2014) было предложено новое понимание патогенеза ГКЛ, которое объясняло различные варианты течения заболевания. Исследование показало наличие мутации *BRAF* V600E в разных клеточных популяциях у пациентов с различной степенью системности заболевания. У пациентов с поражением органов риска мутация была обнаружена в миелоидных стволовых клетках CD34⁺ CD117⁺, а также во всех более дифференцированных популяциях (например, CD11c⁺ и CD14⁺). В то же время у пациентов с моносистемными поражениями мутация в клетках-предшественниках не была выявлена [35]. Эти данные позволили выдвинуть концепцию "заблудившегося миелоидного предшественника": уровень дифференцировки клеток, на котором происходит драйверная мутация и активация сигнального пути RAS/RAF – MEK – ERK, определяет системность поражения. Высокодифференцированные клетки, приобретшие мутацию на позднем этапе дифференцировки и мигрировавшие в ткани, остаются локализованными и вызывают ограниченные поражения. Напротив, если мутация возникает на уровне миелоидной стволовой клетки, это ведет к распространению патологического клона по всему организму и множественным поражениям, включая органы риска.

Однако, по последним данным Yanling Xiao и соавт. (2020), патологический клон обнаруживается в костном мозге как у пациентов с мультисистемными, так и с моносистемными формами заболевания. Различия в клинических проявлениях объясняются уровнем экспрессии мутантного аллеля в клетках-предшественниках, что, в свою очередь, приводит к различному соотношению клеточных популяций,

несущих мутацию, в костном мозге. В случае моносистемной формы гистиоцитоза количество патологических клеток-предшественников в костном мозге может быть настолько низким, что оно оказывается ниже порога чувствительности используемых методов детекции (Рисунок 2) [9].

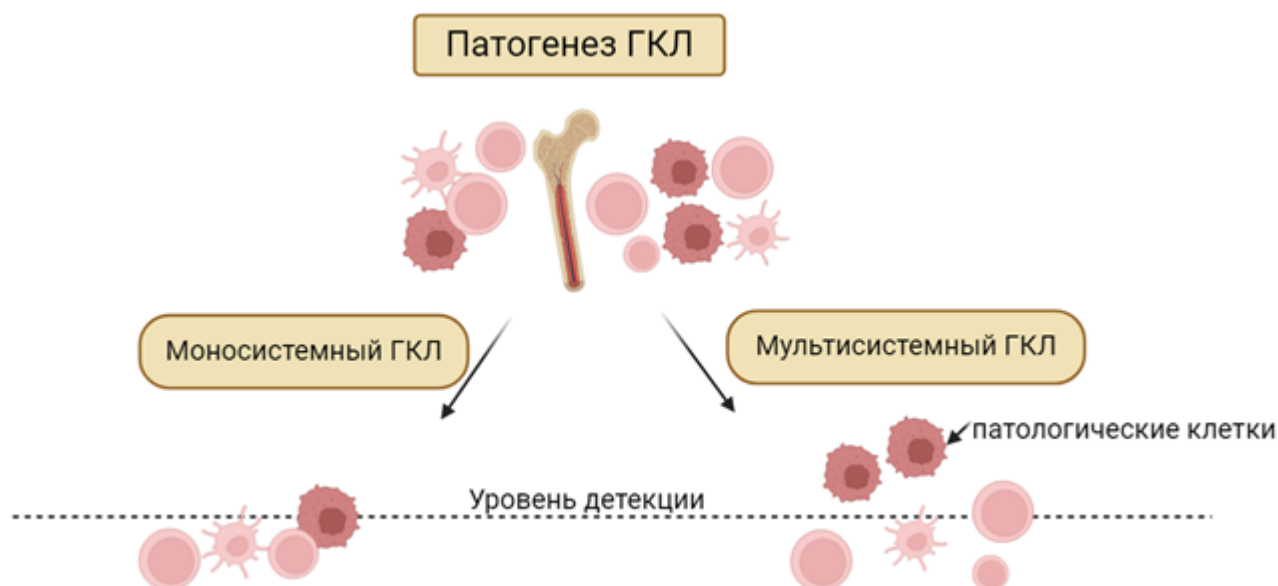


Рисунок 2 – Патологический клон (миелоидных предшественников) присутствует в КМ как при мультисистемных, так и при моносистемных формах ГКЛ. Адаптировано из [9]

В статье Vigenwald и соавт., 2021 [36] на модели генетически модифицированных мышей было показано, что экспрессия мутантного аллеля *BRAF* V600E в гемопоэтических предшественниках способна инициировать формирование очагов ГКЛ с тканевым распределением, аналогичным системному ГКЛ у человека. Также было выявлено, что патологические клетки находятся в состоянии так называемого клеточного старения (сенесценции), вызванного антиапоптотическим эффектом драйверной мутации. Мутантные клетки демонстрируют низкую пролиферативную способность и высокую склонность к дифференцировке в патогенные атипичные мононуклеары, которые накапливаются в тканях, выделяя цитокины SASP (сенесцентный ассоциированный секреторный фенотип). Также было показано, что экспрессия

BRAF V600E снижает экспрессию рецептора CCR7, что способствует накоплению патологических клеток в периферических тканях и образованию гранулематозных поражений.

Кроме «классических» гистиоцитарных поражений, примерно у 10% пациентов после системного ГКЛ развивается нейродегенеративная форма заболевания (ГКЛ-НД). В самых тяжёлых случаях наблюдаются прогрессирующие дисартрия, дисметрия и атаксия, которые значительно ухудшают качество жизни и могут привести к летальному исходу [37]. Причины ГКЛ-НД долгое время оставались неясными. Исторически считалось, что заболевание связано с аутоиммунным процессом, так как в биопсиях мозга не обнаруживали клеток CD207+, характерных для системного ГКЛ. Лечение, как правило, включало иммуномодулирующую терапию, например, внутривенные иммуноглобулины [38].

На мышинных моделях с мутацией *BRAF* V600E в гемопоэтических стволовых клетках было показано, что циркулирующие патологические клетки проникают в ткань мозга на поздних стадиях заболевания и способствуют разрушению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), увеличивая проницаемость для провоспалительных цитокинов и проникновение сенесцентных клеток в мозг. Патологические клетки дифференцируются в сенесцентные макрофаги, продуцирующие SASP-цитокины (например, IL-1, IL-6), которые усугубляют воспаление и разрушают структуру ГЭБ. Интересно, что использование сенолитиков, таких как навитоклакс, в сочетании с MEK-ингибиторами, может предотвратить накопление сенесцентных клеток и нейровоспаление [39].

На данный момент считается, что для предотвращения ГКЛ-НД важно достигать молекулярной негативности (отсутствия клеток *BRAF* V600E в периферической крови или КМ) после терапии. Пациенты с оставшимися *BRAF* V600E клетками остаются в группе риска развития ГКЛ-НД, даже если системные очаги заболевания исчезли.

1.3 Спектр мутаций при ГКЛ

Мутация *BRAF* V600E, по данным разных исследований, встречается в примерно 45-65% случаев ГКЛ [4–5; 40–43].

Ген *BRAF* (rapidly accelerated fibrosarcoma isoform B) кодирует белок, который участвует в пути митотической активации Ras-Raf-MEK-ERK [44]. Данный путь активируется внеклеточными сигналами, такими как гормоны, факторы роста и хемокины, которые распознаются внеклеточным доменом трансмембранных рецепторов (например, EGFR - epidermal growth factor receptor). Связывание лиганда активирует каскад последовательных реакций, в ходе которых посредством связывания молекул ГТФ активируются белки семейства Ras [45], что в свою очередь активирует белки семейства Raf (Raf-1, A-Raf и B-Raf) [46]. Белки Raf активируют киназу MEK (Mitogen activated protein kinase kinase), которая фосфорилирует и активирует ERK-киназу (extracellular signal-regulated kinase). Активированная ERK перемещается в ядро, где стимулирует транскрипцию генов, ответственных за клеточную пролиферацию и выживание клеток.

В 2002 году была обнаружена точечная соматическая мутация (с.1799T>A) в гене *BRAF*, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в позиции 600 (V600E). Эта мутация активирует мутантную BRAF-киназу и, соответственно, находящиеся далее в активационном каскаде киназы MEK1/2, что способствует подавлению апоптоза в мутантных клетках и их дифференцировке из миелоидных предшественников в атипичные мононуклеары [47].

BRAF состоит из трех консервативных доменов [48], а большая часть патогенных мутаций в гене *BRAF* находятся в области домена CR3 (Conserved region 3), который является каталитическим центром белка [49]. Этот домен включает два участка: N-участок, который связывает АТФ, и С-участок, который связывает субстратные белки. В N-участке находится Р-петля, стабилизирующая фосфатную группу АТФ, в то время как С-участок содержит активационную петлю, которая ограничивает активность каталитического центра, когда Р-петля не связана с АТФ [50]. Мутация в 600 кодоне, расположенном в активационной петле, нарушает взаимодействие Р-петли с активационной петлей, что предотвращает

блокировку каталитического центра в неактивном состоянии, и в итоге киназа становится постоянно активной [50].

Мутация *BRAF* V600E лежит в основе многих злокачественных процессов, таких как злокачественная меланома (60% пациентов) [51], колоректальный рак (порядка 10% пациентов) [52], волосатоклеточная лейкемия (около 30-50% пациентов) [53], немелкоклеточный рак легкого (6-8%) [54] и многих других, в том числе и ГКЛ (порядка 60% пациентов) [55].

Как и в случае других заболеваний, для которых характерна мутация *BRAF* V600E, при ГКЛ могут встречаться и другие мутации гена *BRAF*, например, *BRAF* T599A [55], V600D [56] или делеции в 12 экзоне *BRAF* [57].

Поскольку *BRAF* является частью сигнального пути RAS-RAF-МЕК- ERK, у пациентов, у которых не обнаружена мутация гена *BRAF*, драйверная соматическая мутация может присутствовать в других генах, кодирующих киназы этого сигнального пути (Рисунок 3). Примерно у 50% пациентов, не имеющих мутации *BRAF* V600E, были выявлены мутации во 2 и 3 экзонах гена *MAP2K1*, которые кодируют киназный домен или домен негативной регуляции, поэтому в результате мутации в этих регионах киназа приобретает конститутивную активность [58]. Кроме часто встречающихся при ГКЛ мутаций в генах *BRAF* и *MAP2K1*, с помощью полноэкзомного секвенирования были найдены мутации во многих других генах, участвующих в пути митотической активации, например, *ARAF*, *ERBB3*, *NRAS*, *KRAS* и др. [11]. Также есть единичные клинические случаи, описывающие мутации в генах *PIK3CA*, *KIT*, *HRAS*, *ERBB3* и др. [32].

Кроме того, в литературе описаны случаи ГКЛ, при которых в качестве драйверного молекулярного события идентифицированы редкие хромосомные перестройки, приводящие к образованию химерных транскриптов. Так, единичные публикации затрагивают влияние транскриптов *FAM73A::BRAF* и *PACSIN2::BRAF* [59] на развитие ГКЛ. Также в недавней публикации были описаны случаи ALK-позитивного ГКЛ [60].

За исключением вариантов в *BRAF* и *MAP2K1*, остальные драйверные события для ГКЛ являются редкими, в связи с чем формирование групп для анализа биологии и клинического течения на основе таких событий затруднено.

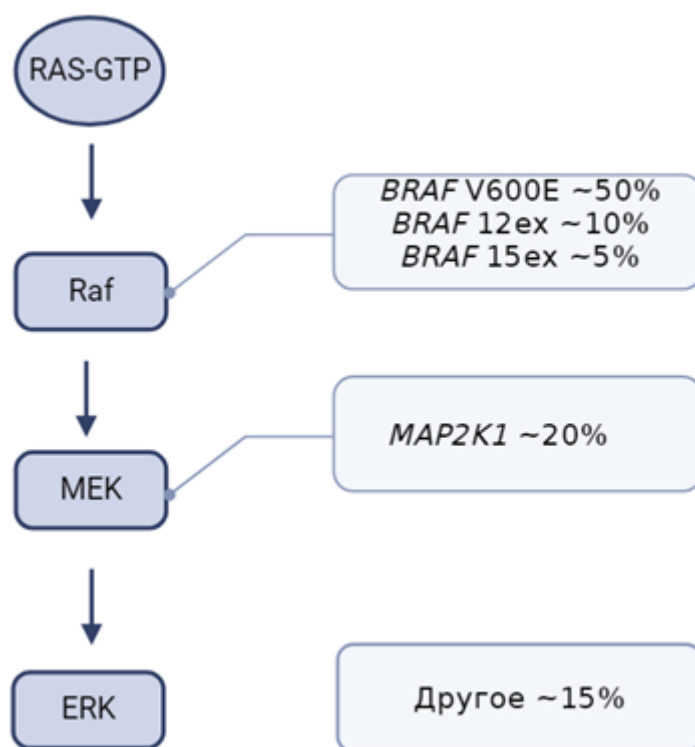


Рисунок 3 – Процентный вклад *BRAF* V600E и других мутаций в развитие ГКЛ согласно суммарным данным нескольких исследований [10; 61–63]

Во многих публикациях было показано, что наличие мутации *BRAF* V600E ассоциировано с более системным течением заболевания с вовлечением органов риска и кожными поражениями [64; 65]. Однако, у около 40% пациентов с ГКЛ драйверная мутация отличается от V600E. В случае невыявления *BRAF* V600E, наиболее подходящим методом поиска драйверной мутации является таргетное секвенирование нового поколения, причем с большой глубиной прочтения, так как аллельная нагрузка соматической мутации при ГКЛ может быть крайне низкой из-за инфильтрации очага поражения нормальными клетками.

Выявление драйверной мутации при ГКЛ помогает не только подобрать таргетную терапию, но и выявить факторы клинической гетерогенности

заболевания. В исследовании P. Kemps et al., 2023 был проведен поиск драйверных соматических мутаций в крупной педиатрической когорте. У большинства пациентов была обнаружена мутация *BRAF* V600E, которая была связана с более ранним дебютом заболевания, повышенным риском поражения органов риска, а также с кожными поражениями и очагами в костях, локализация которых увеличивает вероятность вовлечения в патологический процесс ЦНС. На втором месте по распространенности оказались мутации в 2 и 3 экзонах *MAP2K1*, которые были связаны с моносистемными поражениями костей. Кроме того, было установлено, что делеции в 12 экзоне *BRAF* ассоциированы с поражением лёгких. [10].

1.4 Лечение ГКЛ

Терапия ГКЛ не может быть универсальной из-за разнообразия клинических проявлений и различной системности заболевания. Лечение проводится в соответствии с актуальным протоколом международного гистиоцитарного сообщества — LCH-IV. Пациентам с промежуточным и высоким риском назначают системную комбинированную химиотерапию, тогда как моносистемные формы часто лечат локально [66].

Первая линия терапии согласно протоколу LCH-IV включает в себя два инициальных курса с применением винбластина (растительного ингибитора микротрубочек) и преднизолона (синтетического глюкокортикостероида) в течение 6 недель с проведением перерыва в течении недели и оценки ответа на терапию. Хотя этот протокол эффективен для большинства больных, он не предотвращает высокую частоту рецидивов у пациентов без поражения органов риска и имеет низкую эффективность в случаях вовлечения органов риска. При рефрактерных формах или рецидивах в качестве терапии второй линии используется препарат 2'-хлородеоксиаденозин (2-CdA), антагонист пуринов [43; 67]. Также в ряде публикаций описаны успешные результаты терапии пациентов высокого риска с резистентными формами ГКЛ комбинацией 2-CdA+Ara-C (Цитозин-Арабинозида) [68; 69].

Ассоциация наличия мутации *BRAF* V600E с тяжестью течения ГКЛ подтверждается, в том числе тем, что частота ответа на первую линию терапии с применением винбластина и стероидов среди пациентов с мутацией *BRAF* V600E ниже, чем среди пациентов с диким типом *BRAF* (78,1% и 96,7% соответственно, $p=0,001$). Терапия второй линии требуется 18,6% пациентам, в частности 63,6% пациентам с вовлечением органов риска [70].

Учитывая роль мутации *BRAF* V600E в патогенезе ГКЛ, для лечения пациентов с данной мутацией применяются препараты из ряда ингибиторов серинтреониновых киназ, действующих селективно на *BRAF* V600E. Препарат Вемурафениб, разработанный компанией Plexxiko, селективно ингибирует BRAF киназу с мутацией в 600 кодоне, и был впервые успешно применен для пациентов со злокачественной меланомой [71]. После чего препарат начали применять для терапии других заболеваний с соматическим драйвером *BRAF* V600E – например, болезни Эрджэйма – Честера, для которой, ввиду высокой эффективности, стал стандартом терапии [72].

Терапия вемурафенибом продемонстрировала высокую эффективность и у пациентов с рефрактерным течением ГКЛ. Однако основная сложность заключается в том, что после отмены препарата у большинства пациентов развивается рецидив. В настоящее время терапия ингибиторами BRAF является постоянной и жизненно необходимой, при этом не приводящей к полному излечению [73].

Безопасная отмена таргетного препарата является важной и актуальной проблемой, так как на данный момент растет число сообщений о нежелательных эффектах при длительном приеме вемурафениба. Так, например, на фоне его длительного приема происходит клональная эволюция заболевания и так называемое переключение клеточных линий – мутация *BRAF* V600E начинает детектироваться в CD3+ лимфоидной популяции, хотя и изначально ГКЛ патогенетически происходил из миелоидного ростка [74]. Кроме того, есть единичные сообщения о биологической эволюции болезни и развитии у пациента *BRAF* V600E+ ОМЛ [75]. Наибольшую обеспокоенность вызывает информация об

увеличении числа случаев поражений ЦНС у пациентов, которые длительное время принимают BRAF-ингибиторы (J. Donadieu и соавт., не опубликовано), а также отсутствие данных о долгосрочном побочном воздействии препарата на другие органы и системы. В исследовании Wilk et al., 2023 было показано, что циркулирующие *BRAF* V600E+ CD11a+ макрофаги способны проникать через гемато-энцефалический барьер и вызывать поражения ЦНС, что доказывает необходимость полной эрадикации патологического клона в результате применяемой терапии [35].

Принимая во внимание все вышеописанные факторы, касающиеся использования различных доз химиопрепаратов и приема ингибиторов, в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева для пациентов с *BRAF* V600E – позитивным ГКЛ был разработан исследовательский апробационный протокол NCT03585686: «Открытое исследование эффективности и безопасности применения вемурафениба в сочетании с комбинированной терапией цитарабином/2-хлордезоксиденозином у пациентов с гистиоцитозом из клеток Лангерганса с наличием мутации V600E в гене *BRAF*» [76]. Данный протокол делает попытку объединить эффективность и безопасность применения таргетной терапии вемурафенибом с возможностями химиотерапии к эрадикации патологического клона (в редуцированных, по сравнению с терапией спасения, дозах). Терапия в данном протоколе представлена суммарно 6 блоками химиотерапии, чередующимися с приемом таргетного препарата. Первые три блока включают в себя 2-CdA и Ara-C, последующие три блока проводятся в режиме моно 2-CdA. После четвертого блока химиотерапии прием таргетного препарата завершается и последующие два блока проводятся в моно режиме с приемом только 2-CdA. В начале терапии, затем перед блоком с моно 2-CdA, и в конце терапии выполняются костномозговые пункции с целью определения аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников (CD34+CD117+). Также, инициально и перед каждым блоком химиотерапии определяется аллельная нагрузка мутации в сцДНК.

Согласно результатам применения данного протокола, двухлетняя общая выживаемость составила 100% в обеих группах пациентов (MS RO+, N=18; MS

RO-, N=9). Двухлетняя безрецидивная выживаемость (RFS) для группы MS RO+ составила 82% (95%, ДИ 66-100%), медиана наблюдения составила 27 месяцев (максимальный срок наблюдения 54 месяца). Двухлетняя RFS в группе MS RO- составила 89% (95%, ДИ 71-100%), медиана наблюдения 31 месяц (максимальный период наблюдения 42 месяца) [77].

На сегодняшний день не существует общепринятого и достоверного биомаркера минимальной остаточной болезни (МОБ), что подчеркивает важность исследования аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* у пациентов с ГКЛ. Это может служить важным биомаркером МОБ и помочь в определении оптимальной длительности терапии таргетными препаратами. Молекулярно-генетическая диагностика является ключевым инструментом для понимания патогенеза и улучшения подходов к лечению ГКЛ, особенно учитывая гетерогенность заболевания и разнообразие его клинических проявлений. Быстрое и точное выявление генетических вариантов, ассоциированных с ГКЛ, открывает возможности для использования таргетных препаратов, что значительно повышает эффективность лечения и позволяет сделать терапию более персонализированной. Это, в свою очередь, способствует улучшению прогноза и повышению качества жизни пациентов.

1.5 Молекулярная диагностика ГКЛ

1.5.1 Виды биоматериала для диагностики драйверной соматической мутации

Согласно современным представлениям о патогенезе ГКЛ, драйверная соматическая мутация может быть обнаружена на различных стадиях дифференцировки клеток, включая ранние миелоидные предшественники в костном мозге. Поэтому мутация может быть выявлена в разных типах биоматериала, таких как популяция CD34+CD117+ миелоидных предшественников КМ, более дифференцированных CD1a+ HLA-DR+ патологических гистиоцитах, а также в биоптатах пораженных тканей. Однако получение этих типов биоматериала связано с инвазивными процедурами,

результаты биопсии зависят от квалификации специалиста, а также могут оказаться ложноотрицательными из-за высокой инфильтрации пораженных очагов нормальными клетками. В связи с этими ограничениями важно разрабатывать новые методы для анализа биомаркеров. Одним из таких методов является использование свободно-циркулирующей ДНК (сцДНК), которая может быть обнаружена в плазме или сыворотке крови [78].

Свободно-циркулирующая ДНК — это фракция ДНК, которая образуется при апоптозе или некрозе клеток. Внеклеточные фрагменты ДНК представляют собой короткие молекулы (100-500 пар нуклеотидов) [79]. Эти молекулы могут быть результатом разрушения клеток, происходящего в опухолях, а также вследствие травм, инфаркта миокарда, воспалительных процессов или даже интенсивной физической активности [80]. Двухцепочечные фрагменты ДНК часто обнаруживаются в значительных количествах в плазме или сыворотке крови пациентов. Хотя связь между уровнями циркулирующей ДНК и размером или локализацией первичной опухоли не была установлена, у пациентов с метастазами содержание сцДНК в плазме значительно выше. В сцДНК также выявлены мутации, характерные для ДНК опухолевых клеток, что подтверждает, что часть сцДНК имеет опухолевое происхождение [78; 81]. Анализ сцДНК может быть полезен для ранней диагностики заболеваний и оценки ответа опухоли на терапию. Использование сцДНК, выделенной из плазмы или сыворотки крови, позволяет обойти ограничения, связанные с анализом биоптатов, и изучить спектр мутаций в опухоли, даже если биопсийный материал недоступен. Кроме того, этот метод обеспечивает возможность мониторинга эффективности лечения, включая случаи после резекции опухоли. Благодаря короткому периоду полураспада молекул сцДНК (около двух часов) появляется возможность оценивать молекулярные изменения практически в реальном времени [82].

Исследование S. Héritier и соавт. (2017) продемонстрировало, что выявление мутации *BRAF* V600E в свободно циркулирующей ДНК может быть перспективным биомаркером для пациентов с ГКЛ. Обнаружение этой мутации в сцДНК связано с более тяжелым течением заболевания, включая поражение

органов риска, а также с повышенным риском рецидивов. Кроме того, изменения мутационного статуса сцДНК коррелируют с ответом на проводимую терапию [8].

В работе Lei Cui (2020) описаны подходы к мониторингу аллельной нагрузки *BRAF V600E* у пациентов с ГКЛ, получающих химиотерапию (согласно протоколу LCN-III). По их данным, отрицательные показатели аллельной нагрузки мутации в сцДНК коррелируют с большей безрецидивной выживаемостью, но в то же время у части пациентов с негативными значениями аллельной нагрузки наблюдается рецидив заболевания [83]. Это может быть связано с тем, что мутация *BRAF V600E* может обнаруживаться в нескольких клеточных популяциях (моноцитах, дендритных клетках, миелоидных предшественниках и др), вносящих различный вклад в потенциальный рецидив заболевания. В связи с этим, анализ отдельных клеточных популяций потенциально может быть более информативен, чем определение аллельной нагрузки в сцДНК.

1.5.2 Методы обнаружения соматических мутаций при ГКЛ

Обнаружение драйверной соматической мутации в сцДНК, клеточных популяциях или биоптатах может быть затруднено из-за преобладания ДНК без мутации в образце. Поскольку инфильтрат в очагах поражения состоит преимущественно из нормальных клеток, выделенная ДНК обычно представляет собой смесь нормальной и опухолевой ДНК, причем нормальная ДНК часто преобладает.

Показатель, характеризующий соотношение мутантного аллеля к аллелю без мутации, называется аллельной нагрузкой [84]. При ГКЛ она обычно низкая, что требует применения методов с высокой чувствительностью, способных выявить мутацию даже при минимальной аллельной нагрузке. Аналитическая чувствительность определяется как минимальный процент мутантного аллеля, который может быть достоверно выявлен данным методом.

Одним из стандартных методов обнаружения мутации *BRAF V600E*, а также вариантов во 2 и 3 экзонах гена *MAP2K1*, является прямое секвенирование по Сэнгеру, которое предварительно требует амплификации ДНК с использованием

ПЦР. Однако его чувствительность ограничена — метод позволяет достоверно определить мутацию только при аллельной нагрузке более 10-15% [85].

Для повышения чувствительности секвенирования по Сенгеру может применяться мутационно-специфическая ПЦР (мсПЦР), предназначенная для детекции аллелей с однонуклеотидными заменами, небольшими инсерциями или делециями. Этот метод достигает высокой специфичности за счет использования блокирующего олигонуклеотида, комплементарного последовательности дикого типа. Блокатор обладает высокой температурой денатурации, что препятствует амплификации ДНК дикого типа, но позволяет беспрепятственно амплифицировать мутантные аллели, если в целевом фрагменте присутствует мутация. Чувствительность мсПЦР составляет около 3% [86].

Однако в случаях, когда аллельная нагрузка мутации еще ниже, или при ограниченном количестве сДНК, мсПЦР может быть недостаточно эффективной. Для таких образцов оптимальным методом является цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), которая обладает еще более высокой чувствительностью и точностью.

Цифровая капельная полимеразная цепная реакция (Droplet Digital PCR, цкПЦР) представляет собой метод, основанный на разделении реакционной смеси, содержащей образец, на десятки тысяч микрокапель, в каждой из которых происходит независимая амплификация молекул ДНК. Это позволяет изолированно амплифицировать и анализировать ДНК-матрицы, определяя продукты ПЦР с высокой точностью [87].

Процесс цкПЦР включает три основных этапа: подготовка реакционной смеси и создание капель, проведение ПЦР, а затем считывание и интерпретация результатов (Рисунок 4) [88].

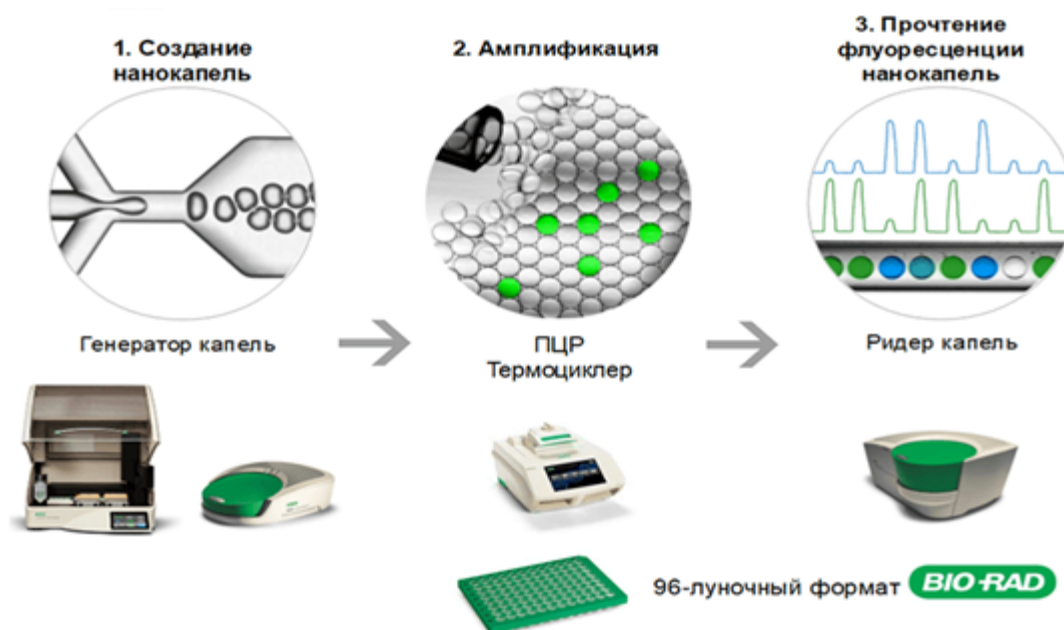


Рисунок 4 – Основные этапы дкПЦР [89]

Распределение целевой ДНК по каплям в процессе дкПЦР происходит случайным образом и подчиняется закону Пуассона. Благодаря этому нет необходимости разводить образец до концентрации, при которой каждая капля содержит либо 0, либо 1 копию ДНК-мишени. При обработке результатов учитываются случаи, когда в одной капле оказывается более одной копии мишени [90].

Аналитическая чувствительность дкПЦР напрямую связана с количеством ДНК, взятой в реакционную смесь. Чем больше количество ДНК в образце, тем меньшую аллельную нагрузку мутации метод способен обнаружить. По информации, предоставленной компанией Bio-Rad, производителем оборудования и реагентов для дкПЦР, чувствительность данного метода может достигать 0,002% (Рисунок 5) [84].

	ДНК в реакции, нг	Количество ДНК, копии/мкл	Эквивалент для гаплоидных геномов	Максимальная чувствительность
Максимально допустимое количество ДНК в реакции	400	6,060.6	121,212.1	0.002%
	350	5,303.0	106,060.6	0.003%
	300	4,545.5	90,909.1	0.003%
	250	3,787.9	75,757.6	0.004%
	200	3,030.3	60,606.1	0.005%
	150	2,272.7	45,454.5	0.007%
	100	1,515.2	30,303.0	0.010%
	75	1,136.4	22,727.3	0.013%
	50	757.6	15,151.5	0.020%
	40	606.1	12,121.2	0.025%
	33	500.0	10,000.0	0.030%
	25	378.8	7,575.8	0.040%
	20	303.0	6,060.6	0.050%
Очень низкое количество ДНК в реакции	15	227.3	4,545.5	0.066%
	10	151.5	3,030.3	0.099%
	5	75.8	1,515.2	0.198%
	1	15.2	303.0	0.99%
	0.5	7.6	151.5	1.98%
	0.1	1.5	30.3	9.90%
	0.01	0.2	3.0	99.00%

Рисунок 5 – Зависимость аналитической чувствительности метода цкПЦР от исходного количества ДНК в реакции [84]

Метод цкПЦР обладает значительными преимуществами перед стандартными методами ПЦР и секвенированием по Сэнгеру. Он отличается высокой чувствительностью и специфичностью благодаря возможности точного подсчета большого количества копий ДНК [91], а также позволяет определить абсолютное количество целевой ДНК в образце [92]. Количественная оценка аллельной нагрузки мутации осуществляется прямым подсчетом капель, содержащих или не содержащих ДНК-мишень, без необходимости использования калибровочных кривых [93]. Кроме того, цкПЦР демонстрирует меньшую восприимчивость к ингибиторам ПЦР. Это связано с тем, что молекулы ингибиторов равномерно распределяются по микрокаплям, и эффективность реакции в каждой капле зависит от того, содержатся ли в ней молекулы ингибитора и ДНК. Даже при наличии умеренного ингибирования ПЦР в отдельных каплях положительный сигнал сохраняется [91].

Эти свойства делают цкПЦР эффективным методом для анализа образцов с низким содержанием ДНК с мутацией на фоне значительного количества ДНК без мутации. Технология позволяет выявлять и мониторировать молекулярные изменения в опухоли как на этапе первичной диагностики, так и в ходе последующего лечения, а также использовать её для диагностики и оценки минимальной остаточной болезни (МОБ).

Однако, данные методики (секвенирование по Сенгеру, мсПЦР, цкПЦР) подходят только для выявления распространённых точечных мутаций, таких как *BRAF V600E*. В случае, когда у пациента не обнаружилось частые мутации в генах *BRAF* или *MAP2K1*, необходимо расширить круг поисков. Подходящим методом для этого является секвенирование нового поколения (NGS), позволяющее обнаружить другие мутации, вызывающие заболевание. Так как ГКЛ является редким заболеванием, готовых коммерческих панелей, включающих гены, мутации в которых описаны при ГКЛ, не разработано.

В то же время, молекулярно-генетическая диагностика предстает важнейшим инструментом для понимания патогенеза и оптимизации лечения ГКЛ, а также разработки подходов к применению таргетной терапии, которая может значительно повысить эффективность лечения. В связи с этим, в данной работе был разработан алгоритм для последовательного и эффективного молекулярно-генетического анализа.

Поскольку мутация *BRAF V600E* встречается в значительной части случаев ГКЛ и является мишенью для таргетной терапии, в качестве первого этапа молекулярно-генетической диагностики целесообразно выполнять определение статуса BRAF с помощью различных методов (секвенирование по Сенгеру, мутационно-специфическая ПЦР или цифровая капельная ПЦР). Также одна из диагностических перспектив связана с применением жидкостной биопсии. В данной работе была проведена оптимизация методики определения и мониторинга аллельной нагрузки *BRAF V600E* в различных видах биоматериала (в том числе сцДНК), что позволит более точно определять BRAF-статус при первичной

диагностике заболевания, а также использовать этот показатель для оценки эффективности терапии и показателя МОБ.

Для пациентов без мутации *BRAF* V600E была разработана кастомизированная таргетная NGS-панель, включающая гены, мутации в которых описаны при ГКЛ. Таргетное секвенирование, фокусирующееся на небольшом количестве значимых для ГКЛ генов, позволит добиться большой глубины прочтения таргетных регионов, что особенно важно для выявления мутаций при их низкой аллельной нагрузке. Для дальнейшего развития молекулярно-генетической диагностики также была исследована роль химерных транскриптов, выявляемых с помощью РНК-секвенирования, что поможет в случае отсутствия явных мутаций в ДНК обнаружить драйверы заболевания.

Помимо ключевой роли в назначении таргетной терапии, выявление соматического драйвера и его связи с определёнными типами гистиоцитарных поражений может иметь дополнительное клиническое значение. За исключением *BRAF* V600E, другие потенциальные мишени для мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ) и прогнозирования рецидива пока не определены. В этой связи идентификация соматического драйвера, вызвавшего заболевание, может быть использована для стратификации пациентов по группам риска и служить потенциальным маркером МОБ, что в перспективе откроет возможности для улучшения методов лечения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

Данное исследование состоит из нескольких этапов:

❖ Диагностический этап:

- анализ данных секвенирования по Сэнгеру, мсПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру или цифровой капельной ПЦР, с целью выявления мутации *BRAF* V600E (биоматериал – FFPE, КМ, сцДНК). Всего включено 230 пациентов.
- Поиск драйверной мутации с помощью таргетной NGS панели «Гистиоцитозы» - 80 пациентов.

❖ Научно-клинический этап:

- Поиск химерных транскриптов с помощью таргетного РНК-секвенирования – 7 пациентов.
- Анализ генотип-фенотипических корреляций – 131 пациент.
- Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников методом цифровой капельной ПЦР – 30 пациентов.

2.2 Характеристика пациентов

В период с 2017 по 2023 год была сформирована и описана выборка из 230 педиатрических пациентов с ГКЛ, направленных в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачёва, включающая 130 мальчиков и 100 девочек. Диагноз ГКЛ основывался на скоординированной интерпретации клинических и радиологических данных, а также подтверждался гистологически и иммуногистохимически. Медиана возраста пациентов составила 2 года (0 мес. – 207 мес.) на момент инициального исследования. Из них у 73 пациентов была установлена моносистемная форма заболевания (SS), у 84 – мультисистемная форма без поражения органов риска (MS RO-), у 73 – мультисистемная форма с поражением органов риска (MS RO+).

Для лечения пациентов использовали исследовательский апробационный протокол NCT03585686 «Открытое исследование эффективности и безопасности применения вемурафениба в сочетании с комбинированной терапией цитарабином/2-хлордезоксиденозином у пациентов с гистиоцитозом из клеток Лангерганса с наличием мутации V600E в гене BRAF» (30 пациентов), стратегия терапии которого предполагает интеграцию использования вемурафениба и низких доз цитозара и кладрибина.

Критерии включения в протокол были следующие:

- возраст от 0 до 18 лет
- иммуногистохимически подтвержденный диагноз ГКЛ
- поражение органов риска, вне зависимости от предыдущей линии терапии
- для пациентов без поражения органов риска - рецидив или прогрессия после как минимум предыдущих двух линий терапии
- подтвержденный BRAF-позитивный статус
- интервал QTc < 0,5 сек
- отсутствие сердечно-сосудистых заболеваний
- подписанное информированное согласие

Критерии исключения:

- антиаритмическая терапия
- электролитный дисбаланс
- QTc > 0,5 сек
- отсутствие информированного согласия

Активность заболевания оценивали по шкале DAS, описанной J. Donadieu et al., 2004 [94]. В соответствии с данной шкалой, баллы присваиваются на основе количества и степени поражения различных органов, а также наличия клинических симптомов. Эти баллы затем суммируются, чтобы получить итоговое значение DAS. Схема протокола и используемые дозы приведены на Рисунке 6.

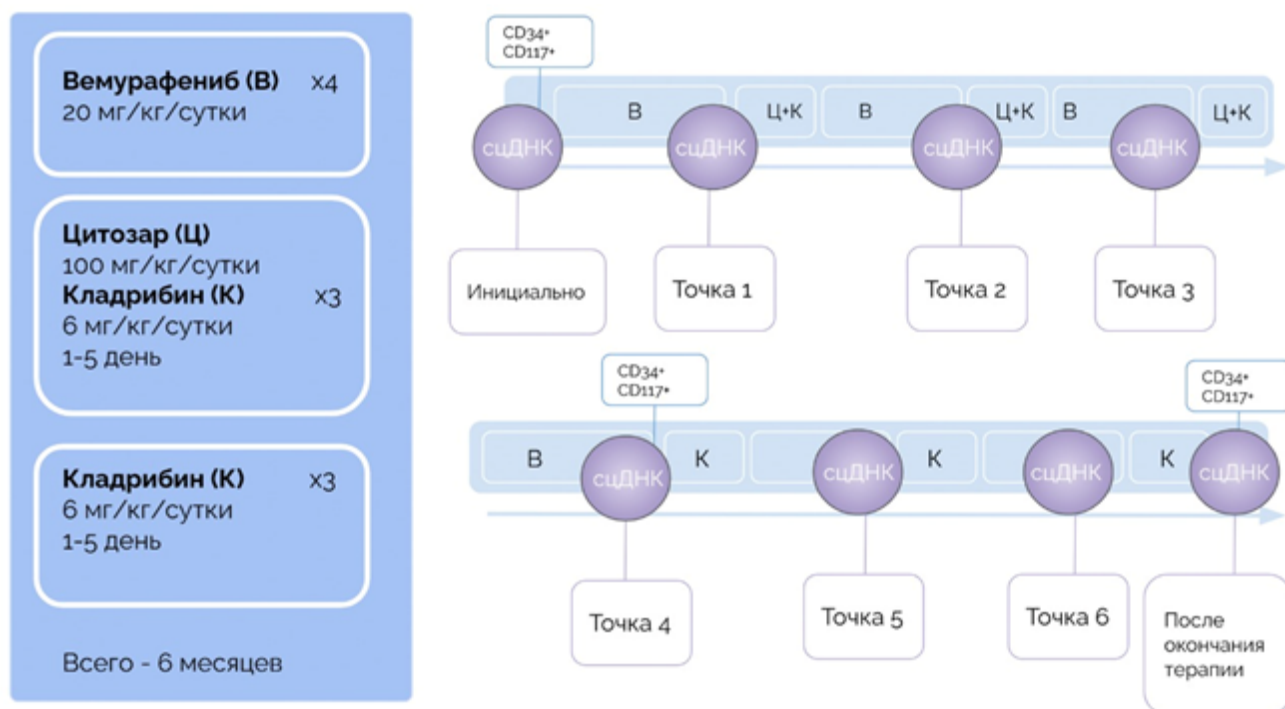


Рисунок 6 – Схема апробационного протокола NCT03585686

Протокол NCT03585686 предусматривает контрольные точки для возможной оценки МОБ: костномозговые пункции проводятся в начале терапии, перед блоком с моно 2-CdA и в конце лечения для оценки аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников (CD34+CD117+). Кроме того, аллельная нагрузка мутации в сцДНК измеряется на старте терапии и перед каждым блоком химиотерапии.

Остальные пациенты наблюдались в НМИЦ ДГОИ только с диагностической целью, либо получали лечение по стандартному протоколу LCH-IV [8] с или без последующей монотерапии вемурафенибом (BRAF-ингибитором) (200 пациентов).

2.3 Объекты исследования

1) Образцы биоптатов пораженных тканей, фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки. Для выделения ДНК использовался набор Parseq Magnetic FFPE (Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

2) Плазма крови объемом 4 мл. Для сбора и хранения периферической крови использовались специальные пробирки с консервантами,

предотвращающими лизис клеток и сохраняющими внеклеточную ДНК до 10 дней (Плазма Протект (Евроген, Россия) или Градбиомед (Россия)). Плазма выделялась после центрифугирования образцов при 10000 об/мин в течение 10 минут при 4 °С. Для выделения свободно циркулирующей ДНК использовался набор QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN, Нидерланды). Выделение выполняли с использованием колонок QIAamp Mini (QIAGEN, Нидерланды) на вакуумном коллекторе QIAvac 24 Plus. Колонки QIAamp Mini могут связывать фрагментированные нуклеиновые кислоты длиной до 20 пар оснований.

3) Популяция миелоидных предшественников костного мозга (CD34+ CD117+), гистиоцитов КМ (CD1a+ HLA-DR+) (Рисунок 7). Для выделения клеток выполнялась пункция костного мозга. Клетки выделяли при помощи клеточного сортера BD FACSAria III (BD Biosciences, США) с использованием панели флуоресцентно-меченых моноклональных антител: CD34 APC (BD Biosciences), CD117 PC5.5 (Beckman Coulter, США), HLA-DR Pacific Blue (Beckman Coulter), CD45 Krome Orange (Beckman Coulter), CD1a PE-Cy7 (Beckman Coulter).

Для выделения ДНК из клеточных популяций CD34+ CD117+ и CD1a+ HLA-DR+ использовался сорбентный метод с применением коммерческого набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ИЛС, Россия). Выделение ДНК из образцов костного мозга проводили с помощью станции выделения нуклеиновых кислот QIASymphony и набора QIASymphony DSP DNA Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды).

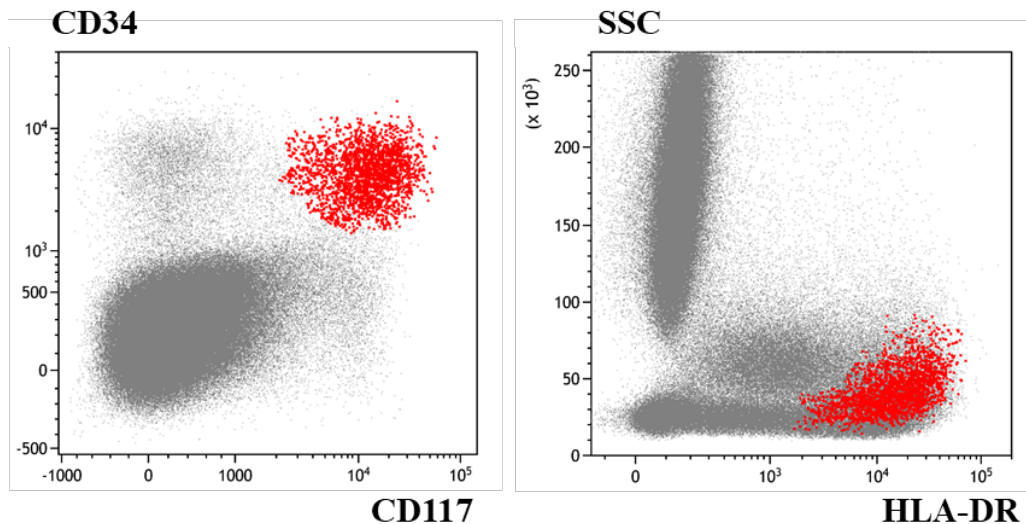


Рисунок 7 – Иммунофенотип, выбранный для сортировки миелоидных предшественников. Миелоидные предшественники обозначены красным цветом; остальные ядросодержащие клетки – серым. SSC – параметр бокового светорассеяния (англ. side scatter)

2.4 Инициальное определение мутации *BRAF V600E*

BRAF-позитивными считали пациентов, у которых на этапе первичной диагностики мутацию выявляли хотя бы в одном типе биоматериала (биоптате, КМ, выделенной из него популяция *CD34+*, сцДНК, популяции миелоидных предшественников *CD34+ CD117+*).

2.4.1 Постановка мсПЦР и секвенирования по Сэнгеру

После выделения ДНК проводилось измерение её концентрации и оценка качества с помощью прибора NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Оптимальными характеристиками считали концентрацию ДНК не менее 15 нг с соотношением A_{260}/A_{280} не менее 1,8 (соотношение оптической плотности раствора при длинах волн 260 и 280 нм, что соответствует максимуму поглощения растворов ДНК и белков).

Постановка мсПЦР проходила в термоциклере CFX96 touch (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Каждый образец анализировался в двух

пробирках: одна использовалась для амплификации только копий с мутацией за счет добавления олигонуклеотида-блокатора, а другая — для амплификации всех копий гена. Для секвенирования по Сэнгеру в каждую пробирку добавляли 1 мкл ДНК-матрицы (разбавленной до необходимой концентрации на основе результатов ПЦР), 4 мкл Master Mix (состоящего из 0,3 мкл BigDye, 1,05 мкл 5x Buffer, 2,65 мкл воды), и 1 мкл 10mM праймеров. Продукты амплификации очищались, а затем секвенировались с использованием секвенатора Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer.

2.4.2 Оценка и мониторинг аллельной нагрузки *BRAF* V600E методом цкПЦР

Для проведения цкПЦР использовали систему QX200 ddPCR System (Bio-Rad Technologies, Hercules, CA). Образцы анализировали в дубле. В каждой постановке в качестве положительного контроля использовали ДНК с подтвержденной секвенированием по Сэнгеру мутацией. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК без мутации и воду. Для генерации капель использовали прибор QX200 AutoDG, для подсчёта капель - QX200 Droplet Reader. Анализ результатов осуществляли с помощью программного обеспечения Quanta Soft, которое выдавало концентрацию ДНК-мишени в виде числа копий в микролитре.

Медиана количества сцДНК в реакции цкПЦР составила 3,2нг, а медиана полученных концентраций копий *BRAF* (суммарно V600E и аллеля без мутации) составила 48,4 копии/мкл (7,3–1013). Порог аналитической чувствительности метода определяли для каждого образца индивидуально, согласно таблице, представленной производителем и отражающей зависимость чувствительности метода от количества ДНК в реакции [11]. Таким образом, медиана порога чувствительности метода для сцДНК составила 0,35% (0,05–1,70).

В зависимости от клеточности образца и содержания в нем миелоидных предшественников, количество выделенных с помощью сортера клеток варьировалось от 7 тыс. до 223 тыс. (медиана 40 тыс.). Медиана количества ДНК, взятой в реакцию, составила 69,76 нг (медиана полученных концентраций копий

BRAF составила 1057 копии/мкл (22–5120)). Медиана порога аналитической чувствительности была рассчитана для каждого образца индивидуально и составила 0,015% (0,003–0,05). Все значения, которые были ниже индивидуально рассчитанного порога чувствительности рассматривались как негативные.

Аллельную нагрузку (или VAF – variant allele frequency) рассчитывали как отношение количества копий ДНК с мутацией в мкл к количеству копий ДНК без мутации (дикого типа), выраженную в процентах.

Аллельная нагрузка = $\frac{\text{количество копий ДНК с мутацией}}{\text{количество копий ДНК с мутацией} + \text{количество копий ДНК дикого типа}} * 100\%$ (Формула 1 — Расчет аллельной нагрузки).

Таким образом, всего на этапе диагностики было обследовано 230 пациентов. Для 90 пациентов статус *BRAF* устанавливали с помощью мСПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру образцов биоптата. У 22 пациентов исследовался как биоптат методом мСПЦР, так и КМ и выделенная из него популяция CD34+. У 37 пациентов исследовали только КМ и CD34+ секвенированием по Сенгеру. У 60 пациентов был исследован биоптат методом цкПЦР. Кроме того, для части пациентов статус *BRAF* устанавливали (21 пациент) или дополнительно верифицировали (101 пациент) методом цкПЦР образцов сцДНК.

Суммарные данные по количеству исследуемых образцов на этапе диагностики (определения *BRAF* статуса) представлены на Рисунке 8:



Рисунок 8 – Количество исследуемых образцов с помощью различных методов и цкПЦР на этапе первичной диагностики в различных видах биоматериала

Помимо инициального определения BRAF статуса, в рамках протокола, подразумевающего 8 контрольных точек мониторинга аллельной нагрузки в сцДНК и 3 контрольные точки мониторинга в популяции CD34+ CD117+, у 30 пациентов был проанализирован 291 образец сцДНК и 75 образцов CD34+ CD117+ (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Количество исследуемых образцов на этапе мониторинга аллельной нагрузки в рамках протокола NCT03585686

2.5 Постановка таргетной кастомизированной NGS-панели

Пациентам, у которых при первичной оценке молекулярного статуса мутация *BRAF* V600E не была выявлена, а также был доступен опухолевый биоматериал (N=80), проводилось секвенирование нового поколения (NGS) для идентификации драйверных мутаций.

Для этого использовали кастомизированную таргетную панель для ГКЛ, разработанную для поиска мутаций в генах, варианты в которых описаны в качестве драйверных событий при ГКЛ - *BRAF*, *ARAF*, *MAP2K1*, *MAP3K1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *KIT*, *ERBB3*, *KRAS*, *PIK3CD*, *HRAS*. Список генов, вошедших в регион

интереса, был составлен на основании анализа данных научной литературы [10,62-64].

Так как использование таргетной NGS панели направлено на выявление соматических мутаций, аллельная нагрузка которых может достигать крайне низких значений, важно правильно рассчитать количество образцов, которое можно взять в одну постановку, при этом обеспечив достаточную глубину прочтения таргетных регионов. С помощью специального программного обеспечения Sequencing Coverage Calculator, Illumina, было рассчитано оптимальное количество образцов в постановку – от 12 до 18 образцов, при средней глубине прочтения таргетных регионов 4000х.

Подготовка библиотек осуществлялась согласно инструкции производителя с помощью кастомизированной панели Qiaseq (Qiagen, Германия), основанной на ПЦР в качестве метода целевого обогащения фрагментов ДНК. Особенностью данного метода является то, что уникальные молекулярные баркоды (UMI) присоединяются к фрагментам ДНК еще до этапа амплификации в ходе ПЦР, таким образом сохраняя уникальность каждой исходной молекулы ДНК и позволяя исключить из анализа дубликаты ПЦР. Первым этапом данной постановки являлось измерение на флуориметре Qubit 3.0 концентраций ДНК всех пациентов, включенных в постановку, и доведение концентрации до значения 100 нг/в реакцию (в 16,75 мкл). Далее в плашке с разведённой ДНК проводили фрагментацию специальным ферментом, для этого готовили мастер-микс из реагентов, идущих в наборе (Fragmentation buffer, FERA Solution, Fragmentation Enzyme Mix). После внесения рабочей смеси проходил этап инкубации в амплификаторе в течение 45 минут на разных температурных режимах.

Следующим этапом являлось лигирование адаптеров IL-N716-N729 из набора Adapter Plate in QIAseq 96-Index I Set B при добавлении мастер-микса из 5х-Ligation Buffer, Ligation Solution и DNA Ligase. Работа проводилась на холодном планшете, а номера добавляемых адаптеров выбирали заранее во избежание повторения - каждому образцу ДНК пациента присваивалась уникальная пара адаптер-индекс (IL-N716-N729 и IL-S513-S522). По окончании лигирования

проводили очистку продукта лигазной реакции: в каждую лунку добавляли магнитные частицы, плашку переставляли на магнитный штатив, и после инкубации в лунки вносили 80%-ный этиловый спирт. Супернатант отбирали, после чего частицы высушивали, добавляли элюирующий буфер и отбирали супернатант, с которым далее проводили этап таргетного обогащения. Реакционную смесь готовили в соответствии с расчётами из 5x TEPCR buffer, QIAseq Targeted DNA Panel, HotStarTaq DNA Polymerase и IL-Forward Primer. После прохождения в амплификаторе программы таргетного обогащения вновь проводится ранее описанный этап отмывки магнитными частицами. Далее следовал этап универсальной ПЦР с добавлением индексов IL-S513-S522 в соответствии с заранее определённым порядком при помощи смеси из 5x UPCR Buffer, HotStarTaq DNA Polymerase и mQ. После очистки полученным библиотекам измеряли их концентрации на флуориметре Qubit 3.0 и их длины на Agilent 2200 TapeStation. В соответствии с полученными значениями библиотеки разводили до 4 нМ и пулировали. Картридж для секвенатора заранее размораживали в воде, библиотеки денатурировали раствором NaOH. Кастомные праймеры и денатурированные библиотеки вносили в указанные лунки картриджа. Анализ ДНК пациента проводили на платформе MiSeq Illumina (набор реагентов MiSeq V2 Reagent Kit 300 cycles (Illumina, США)) методом парно-концевого чтения. Средняя глубина прочтения составила 5107x, покрытие целевого региона 99% при глубине прочтения не менее 510x.

Обработка данных секвенирования включала выравнивание прочтений на геном hg19, определение вариантов с помощью алгоритмов анализа smcounter, mutec и GeneGlobe, а также собственных биоинформатических алгоритмов. Для компьютерной оценки патогенности найденных миссенс-вариантов применялись программы предсказания патогенности замен аминокислот (SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, UMD Predictor). Для компьютерного предсказания эффекта изменений в сайтах сплайсинга или прилежащих к сайту сплайсинга участках использованы программы MutationTaster, Human Splicing Finder, SpliceAI и NNSplice.

Для оценки клинической релевантности выявленных вариантов использованы база данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), The Human Genomics Community (VarSome), International Cancer Genome Consortium, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), а также литературные данные (PubMed).

Заключение о клинической значимости найденных вариантов дано с учетом руководства по оценке клинической значимости соматических генетических вариантов в опухолевой ткани [95], анализа литературы и баз данных соматических вариантов.

2.6 Выявление химерных транскриптов с помощью таргетного РНК-секвенирования

Все описанные в литературе случаи выявления химерных транскриптов у пациентов с ГКЛ носят единичный характер. После анализа результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования ДНК, была сформирована выборка пациентов, молекулярную причину заболевания у которых установить не удалось, но у которых удалось выделить из FFPE РНК подходящего для высокопроизводительного секвенирования качества (N=8). Для проведения высокопроизводительного секвенирования РНК была выбрана таргетная панель TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, США), включающая 507 фьюжн-ассоциированных генов, принимающих участие в патогенезе различных злокачественных новообразований. Особенности пробоподготовки данной панели позволяют работать с РНК относительно низкого качества, в том числе выделенной из FFPE.

В первую очередь для данных образцов оценивали количество выделенной РНК с помощью флуориметра Qubit 3.0. Медиана концентрации выделенной РНК составила 39,2 нг/мкл (22-630). Общее количество РНК, взятой для подготовки библиотек, составило 100 нг в реакцию. Далее, для проведения реакции обратной транскрипции, образцы РНК сначала фрагментировали, затем приступали к реакции синтеза первой цепи кДНК. К реакционной смеси FSA (смесь First Strand

Synthesis) добавляли актиномицин D, что предотвращало ДНК-зависимый синтез, одновременно обеспечивая РНК-зависимый синтез и улучшая специфичность цепи. Затем следовал этап синтеза второй цепи, в результате которого удалялась РНК матрица и получалась кДНК с тупыми концами. Продукт реакции очищали с помощью магнитных частиц, затем приступали к аденилированию 3' концов. Этот этап необходим чтобы предотвратить лигирование тупых концов ДНК-фрагментов друг с другом во время проведения лигирования адаптеров (так как на 3' конце адаптеров находится тимин, что обеспечивает его связывание с ДНК-фрагментами). После этапа лигирования адаптеров продукт очищали с помощью магнитных частиц и приступали к первой ПЦР, в ходе которой амплифицировались фрагменты, имеющие на своих концах лигированные адаптеры. После этого этапа концентрации полученных библиотек измеряли с помощью флуориметра Qubit (ThermoFisher, США), а их длины с помощью автоматического электрофореза 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, США). По результатам этой оценки, 3 образца не прошли контроль качества и выпали из дальнейшего анализа. Далее для оставшихся образцов проводили двухэтапную гибридизацию и отмывку с помощью стрептавидиновых магнитных частиц, с целью захвата зондами таргетных регионов библиотеки. После чего обогащенную библиотеку нарабатывали с помощью второй ПЦР реакции и очищали магнитными частицами. Полученным библиотекам также измеряли длины и концентрации (на этом этапе все образцы прошли контроль качества), после чего их пулировали до финальной концентрации библиотеки 4нМ. Анализ образцов проводили на платформе MiSeq Illumina методом парно-концевого чтения, с использованием MiSeq Reagent Kit v3 150 cycles. Первичную биоинформатическую обработку данных проводили с помощью алгоритма Arriba, аннотирующего РНК-фьюжены.

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы RStudio Server версии 1.3.959. и GraphPad Prism 10.2.3.

При сравнении трех выборок (уровня аллельной нагрузки в группах SS, MS RO-, MS RO+) использовали критерий Краскела-Уоллеса. Для проверки гипотезы о наличии связи между системностью заболевания и наличием мутации использовали точный тест Фишера. Значения показателя аллельной нагрузки в двух разных группах пациентов (MS RO+ и MS RO-) сравнивались с помощью теста Манна-Уитни. Значения снижения показателя аллельной нагрузки в двух разных точках у одной группы пациентов (MS RO+ либо MS RO-) сравнивались с помощью парного теста Манна-Уитни для односторонней альтернативы.

Для попарного сравнения групп пациентов с наиболее частыми выявленными мутациями (*BRAF* V600E, *BRAF* 12 экзон, *MAP2K1*) и выявления статистически значимых различий между ними (или их отсутствия) в клинических проявлениях, использовался точный критерий Фишера. По полученному уровню значения критерия устанавливалось, есть ли статистически значимые различия в поражении кожи, костей и лёгких при разных мутациях. При применении одновременно в одном контексте более одного статистического теста р-значения указывались с поправкой Бонферрони-Холма на множественность сравнений.

Различие пропорций исследовалось с помощью теста z-критерия Фишера.

Уровень статистической значимости принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Диагностический этап

3.1.1 Инициальная диагностика мутации *BRAF* V600E

Среди пациентов, инициальное исследование на наличие мутации *BRAF* V600E которым проводили методом мутационно-специфической ПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру образцов FFPE, BRAF-позитивными оказались 42 из 90 (47%). Среди пациентов, инициальное исследование которым проводили и в FFPE, и в костном мозге, и в CD34+ популяции, мутацию выявили хотя бы в одном из субстратов у 13 пациентов из 22 (59%). Среди 37 пациентов, инициальное исследование которым проводили методом прямого секвенирования по Сенгеру образцов костного мозга и популяции CD34+, BRAF-позитивными оказались 10 (27%). Кроме того, для 60 пациентов наличие мутации в биоптате определяли методом цкПЦР, из них 28 (47%) оказались с выявленной мутацией. Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Результаты инициального определения BRAF статуса в образцах биоптатов, КМ, CD34+ различными методами. Красные ячейки – *BRAF* V600E, зеленые – отсутствие мутации, серые – исследование не проводилось

	FFPE		FFPE +КМ		КМ, CD34+	
Сенгер	-		13	9	10	27
мсПЦР	42	48			-	
цкПЦР	28	32	-		-	

Помимо диагностики стандартными методами и выявления мутации в очагах поражения и в костном мозге, мутацию *BRAF* V600E на этапах инициального исследования определяли методом цкПЦР в сцДНК плазмы крови (N=122). Результаты представлены на Рисунке 10.

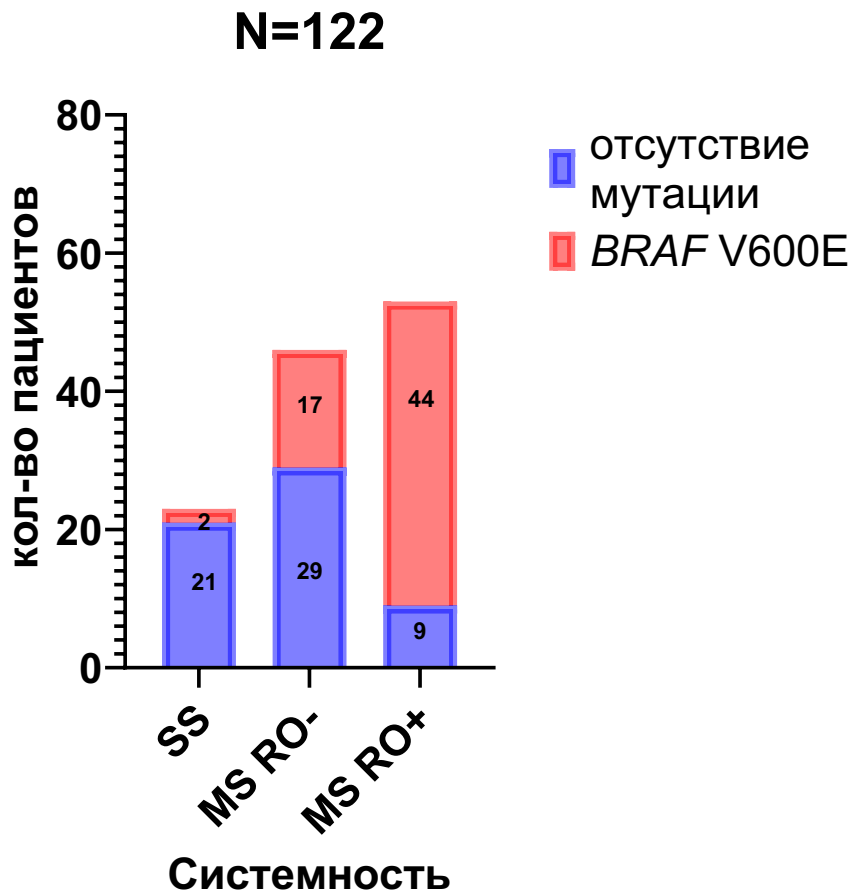


Рисунок 10 – Количество положительных (*BRAF* V600E) и отрицательных (отсутствие мутации) инициальных образцов сцДНК у пациентов с разной системностью заболевания

Доля образцов с мутацией среди пациентов с моносистемным поражением (SS) составила 9% (2 из 23), у пациентов с мультисистемными поражениями - 37% (17 из 46) и 83% (44 из 53) для MS RO- и MS RO+ соответственно. Таким образом, детекция мутации *BRAF* V600E в сцДНК ассоциирована с более системным течением заболевания ($p < 0,0001$; точный тест Фишера), что соответствует данным литературы [13].

Помимо инициальной диагностики мутации *BRAF* V600E, была также выполнена оценка уровня аллельной нагрузки этой мутации в сДНК среди различных групп (SS, MS RO-, MS RO+) *BRAF*-позитивных пациентов, чтобы определить, зависит ли её уровень от системности заболевания (Рисунок 11).

Инициальная аллельная нагрузка, N=63

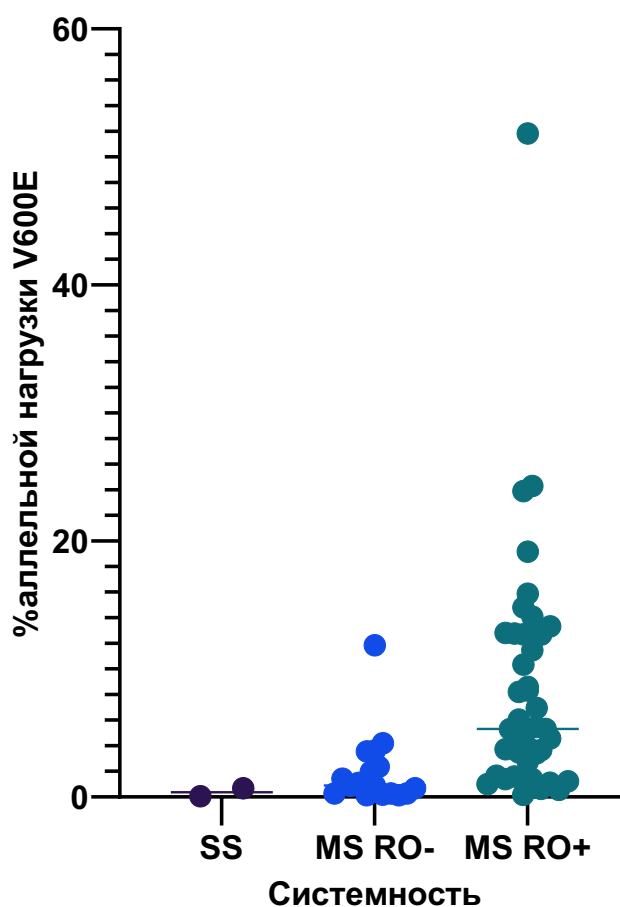


Рисунок 11 – Значения аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в инициальных (взятых до начала терапии) образцах сДНК плазмы крови у *BRAF*-позитивных пациентов с различной системностью заболевания

Так, в группе SS аллельная нагрузка в образцах с мутацией была низкой (0,11; 0,68), в группе MS RO- аллельная нагрузка возрастала (M = 0,89; 0,13 – 11,84), а в группе MS RO+ оказалась самой высокой (M = 5,31; 0,16 – 51,82) (p<0,0001, критерий Краскела-Уоллеса).

Так как потенциально с помощью жидкостной биопсии можно определить основную драйверную мутацию, с целью проверки возможности применения жидкостной биопсии вместо стандартной, были отобраны пациенты, у которых инициальное исследование до начала терапии проводилось и в образцах очагов поражения, фиксированных в формалине и залитых в парафиновый блок, и в сцДНК методом цкПЦР. Всего было отобрано 62 таких пациента. Из них у 36 пациентов BRAF-положительный статус совпадал по данным секвенирования биоптата и анализа цкПЦР в сцДНК. У четырех пациентов по данным анализа биоптата мутация не была выявлена, однако по данным цкПЦР сцДНК наблюдался достаточный для достоверной детекции уровень аллельной нагрузки мутации. У 22 пациентов в обоих видах биоматериала был констатирован BRAF-негативный статус. У одного пациента (с моносистемным монофокальным поражением лобной кости) мутация была обнаружена в биоптате очага поражения, но не выявлялась в сцДНК (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение выявляемости мутации *BRAF* V600E при инициальной диагностике с помощью жидкостной или стандартной биопсии. Выделенные желтым ячейки показывают расхождения в полученных разными методами результатах

	<i>BRAF</i> V600E в FFPE	Отсутствие мутации в FFPE
<i>BRAF</i> V600E в сцДНК на цкПЦР	36	4
Отсутствие мутации в сцДНК на цкПЦР	1	22

Для более глубокого изучения системности и патогенеза заболевания, помимо анализа сцДНК на этапе диагностики *BRAF* V600E, у 71 пациента была проведена оценка наличия мутации в популяции миелоидных предшественников костного мозга (CD34+ CD117+), так как данная популяция, согласно актуальной

теории патогенеза заболевания, является источником патологического клона. Результаты исследования инициальных образцов представлены на Рисунке 12.

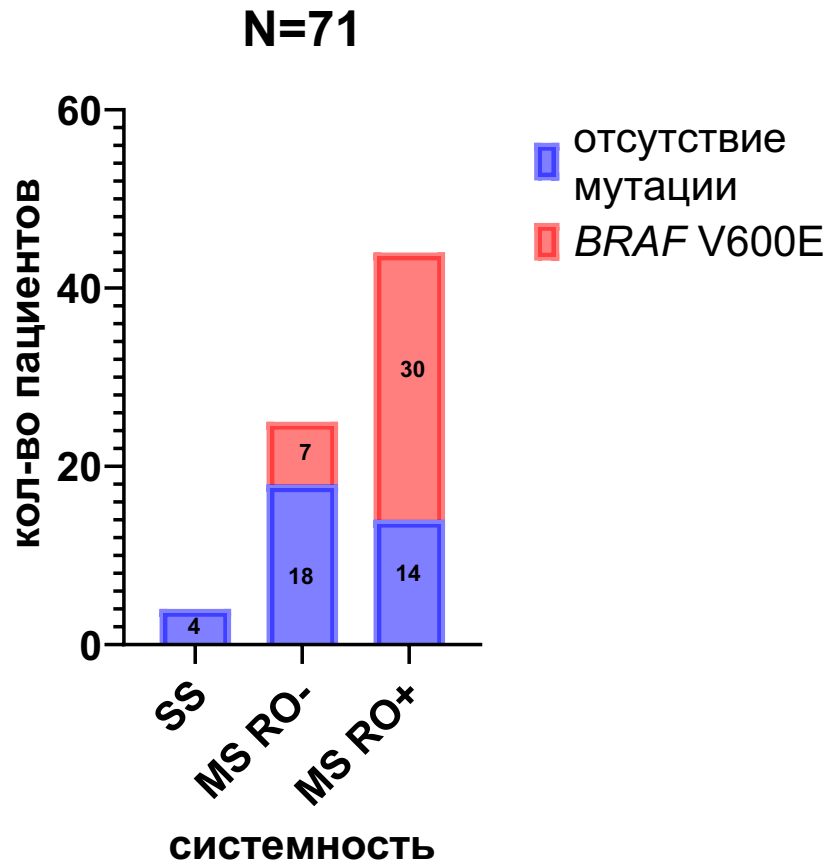


Рисунок 12 – Количество положительных (*BRAF* V600E) и отрицательных (отсутствие мутации) образцов популяции миелоидных предшественников у пациентов с разной системностью заболевания до начала терапии

Наибольшее количество образцов с детектируемой мутацией было выявлено в группе MS RO+ – 68% (30 из 44), в группе MS RO- – 28% (7 из 25), в группе SS мутация в миелоидных предшественниках не была обнаружена (0 из 4). Таким образом, наличие мутации *BRAF* V600E в популяции CD34+ CD117+ также ассоциировано с более тяжелым и распространенным течением заболевания ($p=0,0004$; точный тест Фишера).

При этом у 45 пациентов из 71 инициально мутацию определяли и в FFPE, и в популяции CD34+ CD117+. В 39 случаях статус *BRAF* совпадал в обоих видах

биоматериала, но у 6 пациентов мутация определялась в FFPE, при этом не выявлялась в миелоидных предшественниках. Кроме того, у всех пациентов, у которых проводилось определение мутации в отсортированной популяции миелоидных предшественников, также выполнялся анализ в сцДНК. Совпадение результатов было отмечено в 62 из 71 случая. У 9 пациентов мутация была обнаружена в сцДНК, но не выявлялась в отсортированной популяции миелоидных предшественников. Такое расхождение может быть связано с особенностями патогенеза заболевания и малым числом патологических клеток в КМ на ранних стадиях их дифференцировки.

В дополнение к анализу популяции миелоидных предшественников, у 36 пациентов при первичном исследовании была выделена популяция гистиоцитов CD1a+ HLA-DR+. Гистиоциты удалось выделить не у каждого пациента, которому проводили сортинг, так как в отличие от популяции миелоидных предшественников, данная популяция не столь многочисленна. Если при сортировке популяции миелоидных предшественников удавалось выделить в среднем 86568 ± 44264 клеток, то популяции гистиоцитов было значительно меньше - 3230 ± 1515 клеток. Всего из 36 образцов гистиоцитов 23 (63%) оказались с мутацией *BRAF* V600E. Стоит отметить, что у всех пациентов с наличием мутации в популяции гистиоцитов, была мультисистемная форма заболевания с поражением органов риска. Результаты определения мутации в популяции гистиоцитов совпадали со статусом *BRAF* в биоптате в 35 из 36 случаев. У одного пациента MS RO- с наличием мутации в биоптате в популяции гистиоцитов мутация не обнаружилась, что объясняется отсутствием клинически определяемого поражения КМ у этого пациента. Кроме того, медиана аллельной нагрузки у *BRAF*-позитивных пациентов в популяции гистиоцитов оказалась значительно выше, чем в выделенной из того же образца костного мозга популяции миелоидных предшественников – $M = 15,93$ (0,5 – 54,05) и $M=0,73$ (0 - 7,54) соответственно ($p < 0,001$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 13).

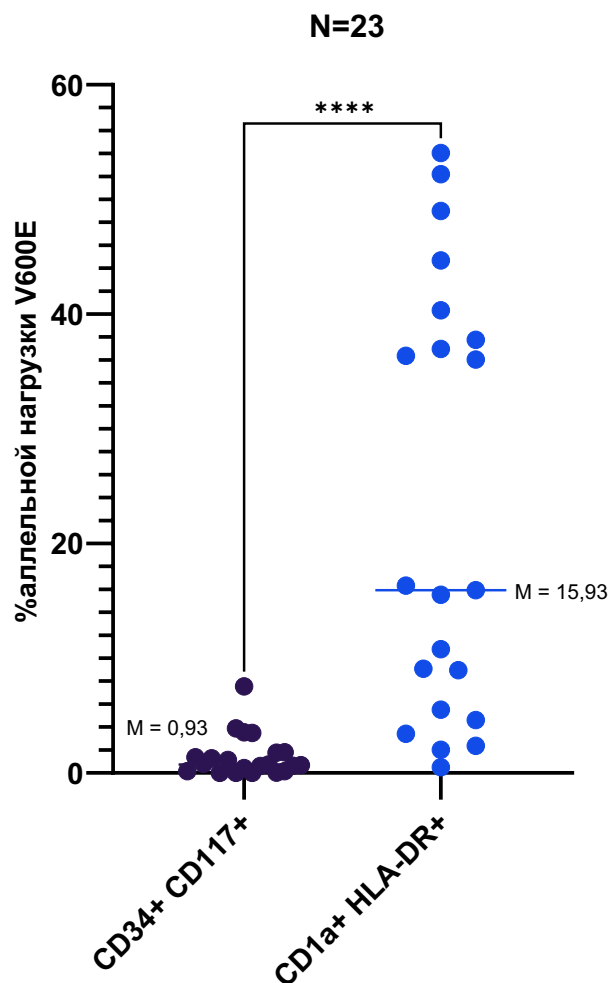


Рисунок 13 – Сравнение показателей аллельной нагрузки в инициальных образцах миелоидных предшественников и гистиоцитов у BRAF - позитивных пациентов (**** $p < 0,001$, критерий Манна-Уитни)

Помимо выявления мутации в различных субстратах, было проведено сравнение процентов выявляемости мутации при её инициальном определении различными методами. Процент BRAF- позитивных образцов был самым низким в случае применения метода прямого секвенирования по Сенгеру, что объясняется его самой низкой чувствительностью. Выявляемость как метода мсПЦР, так и цкПЦР в сравнении с секвенированием по Сенгеру оказалось значимо выше ($p=0,031$ и $p=0,018$ соответственно, z-критерий Фишера).

С целью наглядного сравнения методов определения мутации, а также принимая во внимание то, что определение её аллельной нагрузки в популяции

миелоидных предшественников является контрольной точкой МОБ в апробационном протоколе, было проведено сравнение эффективности выявления мутации в популяции CD34+ с помощью секвенирования по Сенгеру и цкПЦР для 29 пациентов. Методом секвенирования по Сенгеру только у 2 пациентов из 29 (7%) изначально была обнаружена мутация *BRAF* V600E, причем оба пациента входили в группу MS RO+. Результаты анализа тех же образцов с помощью цкПЦР отличаются - у 12 пациентов (41%) была обнаружена искомая мутация, включая двух пациентов, у которых мутация была обнаружена методом секвенирования по Сенгеру. Таким образом, метод цкПЦР обладает значимо более высокой диагностической эффективностью по сравнению со стандартным методом ($p=0,006$, z -критерий Фишера). В дальнейшем определение мутации обоими методами не проводилось, так как чувствительности секвенирования по Сенгеру была признана недостаточной для достоверного определения мутации.

В итоге, по результатам инициального исследования группы пациентов с ГКЛ, доля пациентов, имеющих мутацию *BRAF* V600E, составила 46% (105 из 230).

Доля образцов с мутацией среди пациентов с моносистемным поражением составила 27% (20 из 74), в то время как у пациентов с мультисистемными поражениями их доля оказалась выше: 37% (31 из 83) и 74% (54 из 73) для MS RO- и MS RO+ соответственно (Рисунок 14). Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие мутации *BRAF* V600E ассоциировано с более тяжелым и распространенным течением заболевания ($p<0,0001$; точный тест Фишера). При этом ассоциация наличия мутации с большей системностью заболевания сохраняется при анализе различных видов биоматериала, в том числе сцДНК и отсортированной популяции миелоидных предшественников КМ.

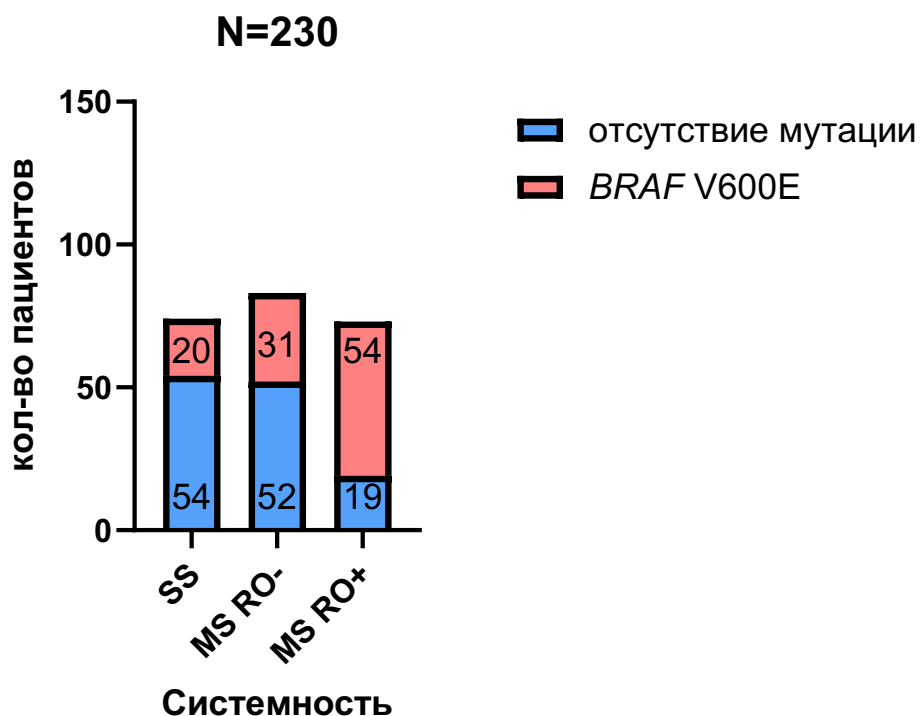


Рисунок 14 – Количество пациентов с разной системностью заболевания с положительным (*BRAF* V600E) и отрицательным (отсутствие мутации) *BRAF* статусом при инициальном исследовании

3.1.2 Выявление драйверных мутаций, отличных от V600E, с помощью таргетной NGS панели

По итогам инициального определения статуса *BRAF* была сформирована группа пациентов, у которых мутация V600E обнаружена не была, и в доступе в качестве исследуемого биоматериала был биоптат очага поражения (N=80). Для этих пациентов драйверные мутации искали с использованием таргетного высокопроизводительного секвенирования. Поскольку ГКЛ относится к редким заболеваниям, готовые коммерческие панели, охватывающие гены с описанными для этого заболевания мутациями, не были разработаны. Поэтому в ходе данной работы была составлена собственная кастомная NGS панель, подбор генов был выполнен основываясь на научных публикациях, посвященным генетике ГКЛ и других гистиоцитарных заболеваний.

Наиболее современной, полной и отвечающей схожим задачам работой является недавняя публикация коллаборативной европейской группы по изучению гистиоцитозов [10]. В данной работе в качестве NGS-панели представлен довольно широкий набор генов. Однако, при ближайшем рассмотрении результатов, обнаруженные мутации локализируются в уже хорошо известных генах *BRAF*, *MAP2K1*, *ARAF* и *KRAS*, а в 20% случаев мутации обнаружены не были.

Таким образом, из соображений ресурсоемкости и возможности сфокусироваться на анализе патогенетически значимых генов, было принято решение о сокращении количества генов, входящих в ГКЛ-специфическую панель:

- *BRAF*. Включение этого гена в панель является критически важным, даже учитывая предварительное исключение пациентов с верифицированной мутацией *BRAF* V600E, которая является наиболее часто встречающейся при ГКЛ. Во-первых, такая оценка позволяет верифицировать «*BRAF*-негативную» когорту и избежать ошибочного исключения *BRAF* V600E в биоматериале; во-вторых, научную важность представляют и другие мутации в гене *BRAF*: иные точковые мутации 15 экзона, делеции и дупликации 12 экзона [56; 63; 96].

- *MAP2K1*, *MAP3K1*. Роль данных генов в развитии гистиоцитарных патологий также установлена достаточно хорошо. При этом, исследовательская ценность включения этих генов тоже связана с недостатком данных о фенотипических особенностях течения заболеваний у таких пациентов [58; 97].

- *ARAF*. Мутации в данном гене также приводят к активации ERK, что характерно для нозологий гистиоцитарного характера [98]. Однако, частота встречаемости этих мутаций невысока, в связи с чем в настоящее время существует лишь не верифицированное подозрение об ассоциации с менее экстенсивными формами заболевания [10].

- *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*. Мутации в этих генах довольно редко встречаются при обычных формах гистиоцитоза, однако обнаруживаются при легочном ГКЛ у взрослых [99], Болезни Розаи-Дорфман [100] и, например, гистиоцитарной саркоме [101]. Несмотря на редкость, их обнаружение могло бы дополнить картину патогенеза гистиоцитоза.

- *PIK3CA, PIK3CD*. Мутации в данных генах носят редкий, казуистический характер при ГКЛ. Тем не менее, их присутствие в панели важно с точки зрения поиска новых вариантов, приводящих к заболеванию [32; 102].

- *ERBB3, KIT*. Мутации в этих генах описаны исключительно в работах по высокопроизводительному секвенированию образцов у взрослых с гистиоцитарными патологиями, однако включение подобных генов позволит сбалансировать панель и расширить ее фокус [63; 103].

Таким образом, был подобран сбалансированный пул генов, который, с одной стороны, позволяет оценить фенотипическую корреляцию с часто встречающимися вариантами, а с другой – выявить новые, не описанные ранее в литературе.

Качество и концентрации выделенных нуклеиновых кислот оценивали спектрофотометрически и флуориметрически. У 11 из 80 пациентов выделенная ДНК была недостаточного качества для постановки NGS. Из 69 пациентов, которым было выполнено NGS исследование, у 55 удалось выявить драйверный вариант.

В ходе исследования были обнаружены следующие варианты:

- *BRAF V600E* – у 7 пациентов (случаи с низкой аллельной нагрузкой, которые не удалось выявить стандартными методами (мПЦР и секвенированием по Сенгеру) при первичном анализе).

- У 18 пациентов были выявлены ранее описанные при гистиоцитозе из клеток Лангерганса делеции 15 нуклеотидов без сдвига рамки считывания в 12 экзоне гена *BRAF* [63]. Клиническая значимость данных вариантов была расценена как потенциально предиктивная (Tier II). При этом у двух пациентов мутация не была выявлена при первичной биоинформатической обработке данных, однако визуализировалась в геномном браузере IGV (Рисунок 15). В обоих случаях при анализе данных с учетом баркодов UMI было подтверждено, что варианты не являются ложноположительными.

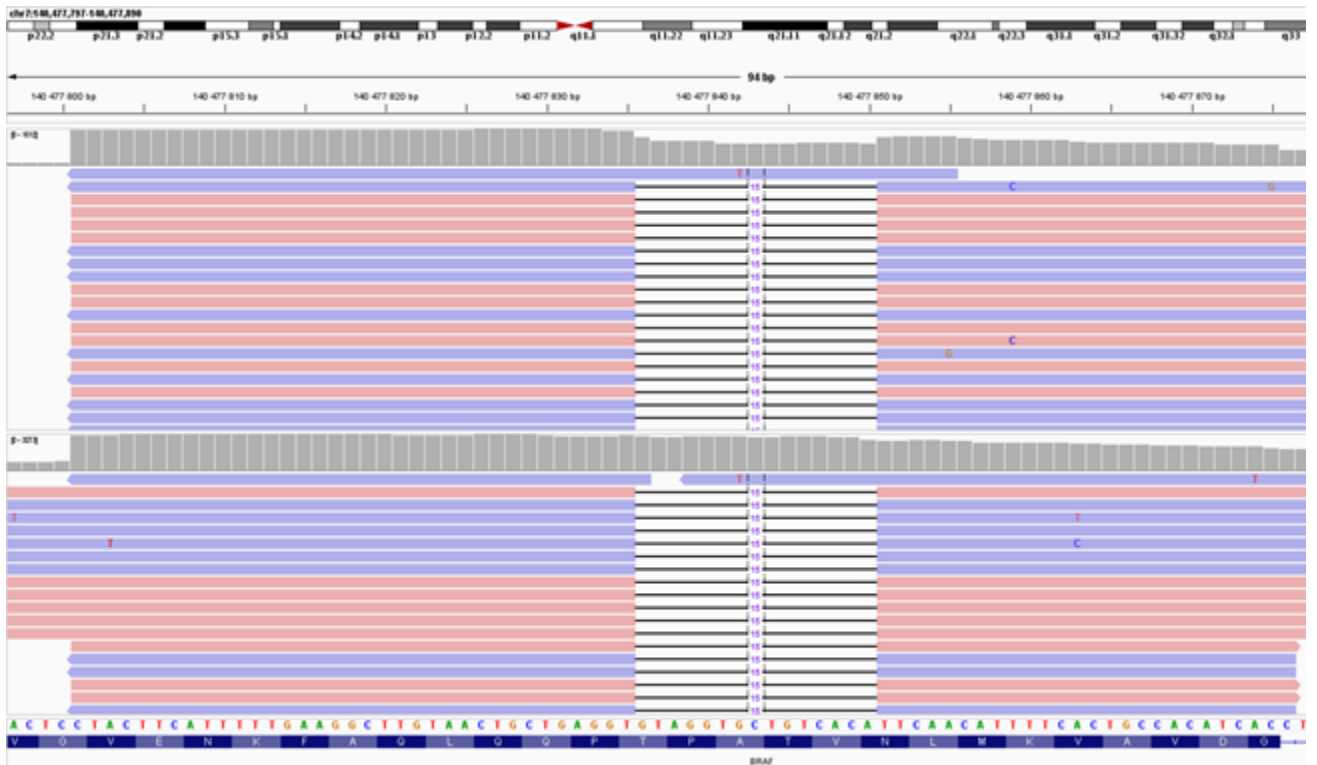


Рисунок 15 – Визуализация в геномном браузере IGV делеции 15 нуклеотидов в 12 экзоне гена *BRAF* у двух пациентов, у которых при первичной биоинформатической обработке данных мутация выявлена не была

- У 23 пациентов обнаружилась мутация в гене *MAP2K1*. Мутации в данном гене считаются вторыми по распространённости при гистиоцитозе после мутаций в гене *BRAF* [63]. 18 пациентов имели делеции без сдвига рамки считывания во втором экзоне гена *MAP2K1*. Также у двух пациентов были выявлены точечные миссенс замены во 2 экзоне, и у трех пациентов – делеция шести нуклеотидов без сдвига рамки считывания в 3 экзоне гена. Клиническая значимость данных вариантов была расценена как потенциально предиктивная (Tier IIС).

- У одного пациента была выявлена другая нуклеотидная замена в том же положении, что и в случае мутации *BRAF* V600E в 15 экзоне – *BRAF* с.1799Т>С, приводящая к замене аминокислоты р.(Val600Ala). Данный вариант, аналогично с мутацией V600E, приводит к конститутивной активности BRAF.

- У одного пациента в 3 экзоне гена *KRAS* обнаружена замена одного нуклеотида с.183A>C, приводящая к замене аминокислоты р.(Gln61His). Доля мутантного аллеля составила 22%. Данный вариант классифицируется как вариант с потенциально предиктивной клинической значимостью, встречается в базе данных соматических мутаций COSMIC (COSV55498802) и многократно описан в научной медицинской литературе как патогенный, в том числе при гистиоцитарной патологии (PMID: 35325867). У другого пациента была обнаружена известная патогенная мутация во втором экзоне гена *KRAS* с.38G>A, приводящая к замене аминокислоты р.(Gly13Asp). Данный вариант классифицируется также, как и описанный выше вариант в 3 экзоне, встречается в базе данных COSMIC (COSV55497388) и многократно описан в научной медицинской литературе.

- У одного пациента в 3 экзоне гена *NRAS* обнаружена замена одного нуклеотида с.181C>A, приводящая к замене аминокислоты р.(Gln61Lys). Доля мутантного аллеля составила 9%. Данный вариант встречается в базе данных соматических мутаций COSMIC (COSV54736310) и описан в научной медицинской литературе.

- У одного пациента была выявлена известная патогенная мутация в 3 экзоне гена *HRAS* с.182A>T, приводящая к замене аминокислоты р.(Gln61Leu). Данный вариант встречается в базе данных соматических мутаций COSMIC (COSV54236656) и многократно описан в научной медицинской литературе.

- Также у двух пациентов была обнаружена очень редкая соматическая мутация в сайте сплайсинга 12 экзона гена *BRAF* – дупликация 9 нуклеотидов с.1511_1517+2dupTACTCAGGT, приводящая к inserции трёх аминокислот - р.Arg506_Lys507insLeuLeuArg. Данный вариант не встречается в базе данных соматических мутаций COSMIC, однако описан в научной медицинской литературе при гистиоцитозе из клеток Лангерганса (PMID: 28679432).

- У 14 пациентов по результатам постановки NGS клинически значимые варианты выявлены не были. В некоторых случаях анализ с учетом UMI помогал исключить ложноположительные варианты. Например, при стандартной

биоинформатической обработке данных без учета UMI баркодов у одного пациента был выявлен известный потенциально клинически значимый вариант *NRAS* с.183 A>T, p.(Gln61His) с VAF=3% при глубине прочтения 956х (Рисунок 16).

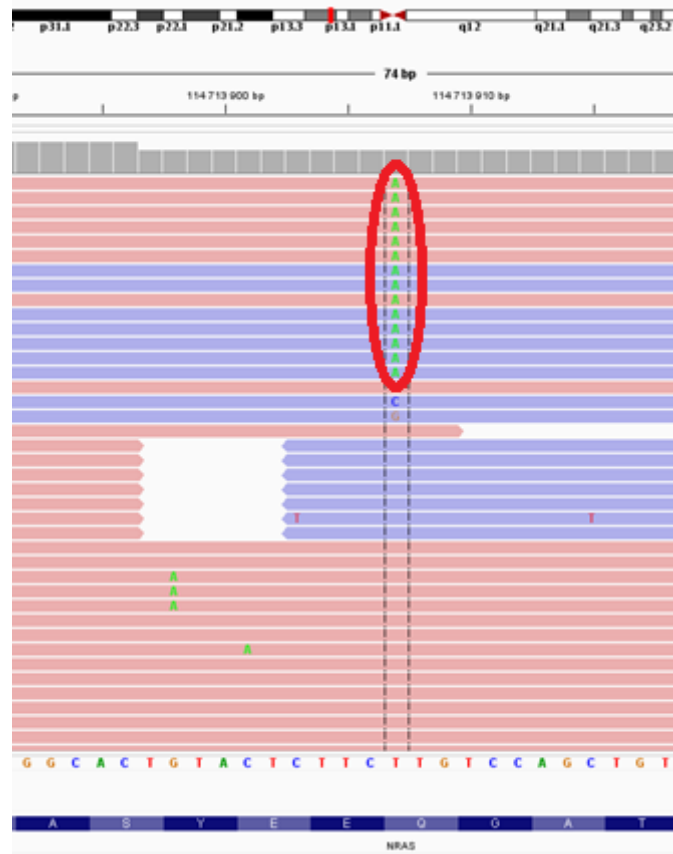


Рисунок 16 – Визуализация варианта *NRAS* с.183 A>T в геномном браузере IGV без учета баркодов UMI. Красным выделена замена, визуализирующаяся в 3% прочтений

Однако при последующем анализе с учетом UMI было установлено, что данный вариант является ложноположительным, так как определяется не во всех рядах с одинаковым баркодом (следовательно, отсутствует в исходной молекуле и скорее всего является ошибкой секвенирования) (Рисунок 17).

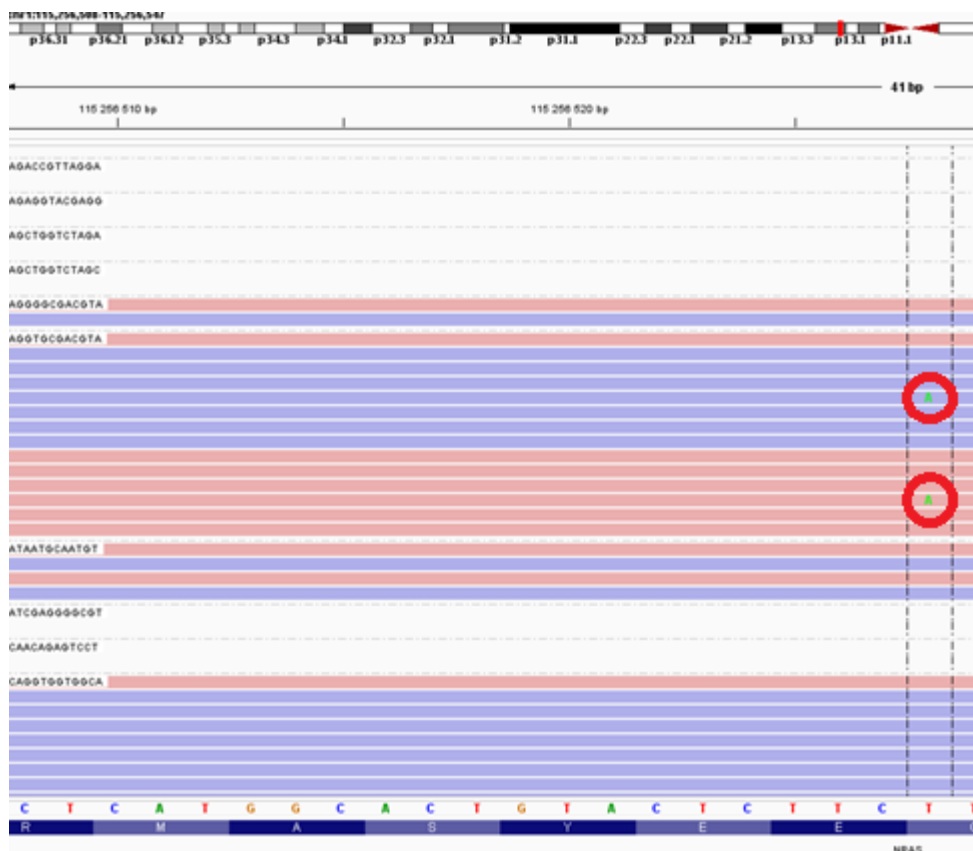


Рисунок 17 – Визуализация варианта *NRAS* с.183 *A>T* в геномном браузере IGV с учетом баркодов UMI. Красным обведена замена, визуализирующаяся не во всех прочтениях с одинаковым UMI

Подробный список выявленных вариантов, а также их геномные координаты, типы варианта, COSMIC id и клиническая значимость представлены в Таблице 3:

Таблица 3 – Перечень выявленных с помощью таргетной кастомизированной NGS панели вариантов

Ген ¹	Вариант и его координаты:		Экзон/ интрон	Тип варианта	COSMIC ID ²	Клиническая значимость варианта ³
	Геном (hg19)	CDS, белок				
<i>BRAF</i>	chr7:140453136 A>T	с.1799T>A p.(Val600Glu) p.(V600E)	Ex 15	миссенс	COSV56056643	Высокая предиктивная (IA)

Продолжение Таблицы 3						
Ген ¹	Вариант и его координаты:		Экзон/ интрон	Тип варианта	COSMIC ID ²	Клиническая значимость варианта ³
	Геном (hg19)	CDS, белок				
<i>BRAF</i>	chr7:140453136 A>G	c.1799T>C p.(Val600Ala) p.(V600A)	Ex 15	миссенс	COSV56065204	Высокая предиктивная (IA)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727442- 66727457del	c.159_173del p.(Phe53_Gln58delins Leu) p.(p.F53_Q58delinsL)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61072289	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727456- 66727470del	c.173_187del p.(Gln58_Glu62del) p.(Q58_E62del)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61072149	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727454- 66727468del	c.171_185del p.(Gln58_Glu62del) p.(Q58_E62del)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61069638	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727452- 66727466del	c.168_182del p.(Lys57_Gly61del) p.(K57_G61del)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61072263	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727453- 66727467del	c.169_183del p.(Lys57_Gly61del) p.(K57_G61del)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	-	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727451- 66727465del	c.167_181del p.(Gln56_Gly61delins Arg) p.(Q56_G61delinsR)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61070031	Потенциально предиктивная (IC)
<i>MAP2K1</i>	chr15:66727449- 66727463del	c.165_179del p.(Gln56_Val60del) p.(Q56_V60del)	Ex 2	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV100198747	Потенциально предиктивная (IC)

Продолжение Таблицы 3						
Ген ¹	Вариант и его координаты:		Экзон/ интрон	Тип варианта	COSMIC ID ²	Клиническая значимость варианта ³
	Геном (hg19)	CDS, белок				
MAP2K1	chr15:66727451 A>C	c.167A>C p.(Gln56Pro) p.(Q56P)	Ex 2	Миссенс	COSV61068787	Потенциально предиктивная (IC)
MAP2K1	chr15:66729094- 66729099del	c.303_308del p.(Glu102_Ile103del) p.(E102_I103del)	Ex 3	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61068468	Потенциально предиктивная (IC)
MAP2K1	chr15:66729106- 66729111del	c.314_319del p.(Pro105_Ile107delins Leu) p.(P105_I107delinsL)	Ex 3	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV61074688	Потенциально предиктивная (IC)
BRAF	chr7:140477836- 140477850del	c.1458_1472del p. (Thr486_Asn491delinsLys) p.(N486_T491delinsK)	Ex 12	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV56440733	Потенциально предиктивная (IC)
BRAF	chr7:140477837- 140477851del	c.1457_1471del p.(Asn486_Pro490del) p.(N486_P490del)	Ex 12	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV56100024	Потенциально предиктивная (IC)
BRAF	chr7:140477839- 140477853del	c.1455_1469del p. (Leu485_Pro490delinsPhe) p.(L485_P490delinsF)	Ex 12	Делеция без сдвига рамки считывания	COSV104608678	Потенциально предиктивная (IC)
BRAF	chr7:140477789- 140477789dup	c.1511_1517+2dup p.(Arg506_Lys507insLeu LeuArg)	Ex 12	Дупликация	-	Потенциально предиктивная (IC)
KRAS	chr12: 25380275 T>G	c.183A>C p.(Gln61His) p.(Q61H)	Ex 3	Миссенс	COSV55498802	Потенциально предиктивная (IID)

Продолжение Таблицы 3						
Ген ¹	Вариант и его координаты:		Экзон/ интрон	Тип варианта	COSMIC ID ²	Клиническая значимость варианта ³
	Геном (hg19)	CDS, белок				
<i>KRAS</i>	chr12:25398284 C>A	c.35G>T p.(Gly12Val) p.(G12V)	Ex2	Миссенс	COSV55497419	Потенциально предиктивная (IID)
<i>NRAS</i>	chr1:115256530 G>T	c.181C>A p.(Gln61Lys) p.(Q61K)	Ex 3	Миссенс	COSV54736310	Потенциально предиктивная (IID)
<i>HRAS</i>	chr11:534286 C>T	c.37G>A p.(Gly13Ser) p.(G13S)	Ex 2	Миссенс	COSV54236730	Потенциально предиктивная (IID)

Примечания: ¹названия генов даны по HUGO Gene Nomenclature Committee ²приведены идентификаторы вариантов в базе данных COSMIC ³генетические варианты, влияющие на прогноз заболевания, верификацию диагноза или маркеры чувствительности к препаратам молекулярно-направленной терапии на основании рекомендаций Американского Общества Клинической Онкологии. *BRAF* – транскрипт NM_004333.6, ENST00000646891.2; *MAP2K1* – транскрипт NM_002755.4, ENST00000307102.10; *KRAS* – транскрипт NM_033360.4, ENST00000256078.4; *NRAS* транскрипт NM_002524.5, ENST00000369535.4; *HRAS* транскрипт NM_005343.4, ENST00000311189.7. Средняя глубина прочтения таргетных регионов – 5107x

Итоговое распределение драйверных мутаций в исследуемой выборке пациентов представлено на Рисунке 18.

Таким образом, по результатам диагностического этапа в представленной выборке пациентов у 160 из 230 удалось выявить драйверный вариант. У части пациентов (56 из 230) поиск драйверного события с помощью NGS не проводился

ввиду отсутствия подходящего биоматериала (биоптата), однако по результатам инициального исследования в сцДНК или популяции миелоидных предшественников был установлен BRAF-негативный статус. При этом BRAF-позитивными оказались 49% пациентов, что соотносится с данными мировой литературы [3]. Стоит отметить, что количество таких пациентов увеличилось по сравнению с результатами инициального исследования по установлению BRAF статуса, в связи с низкой аллельной нагрузкой мутации в образцах и большей чувствительностью таргетного NGS секвенирования с большой глубиной прочтения по сравнению со стандартными методами выявления мутации.

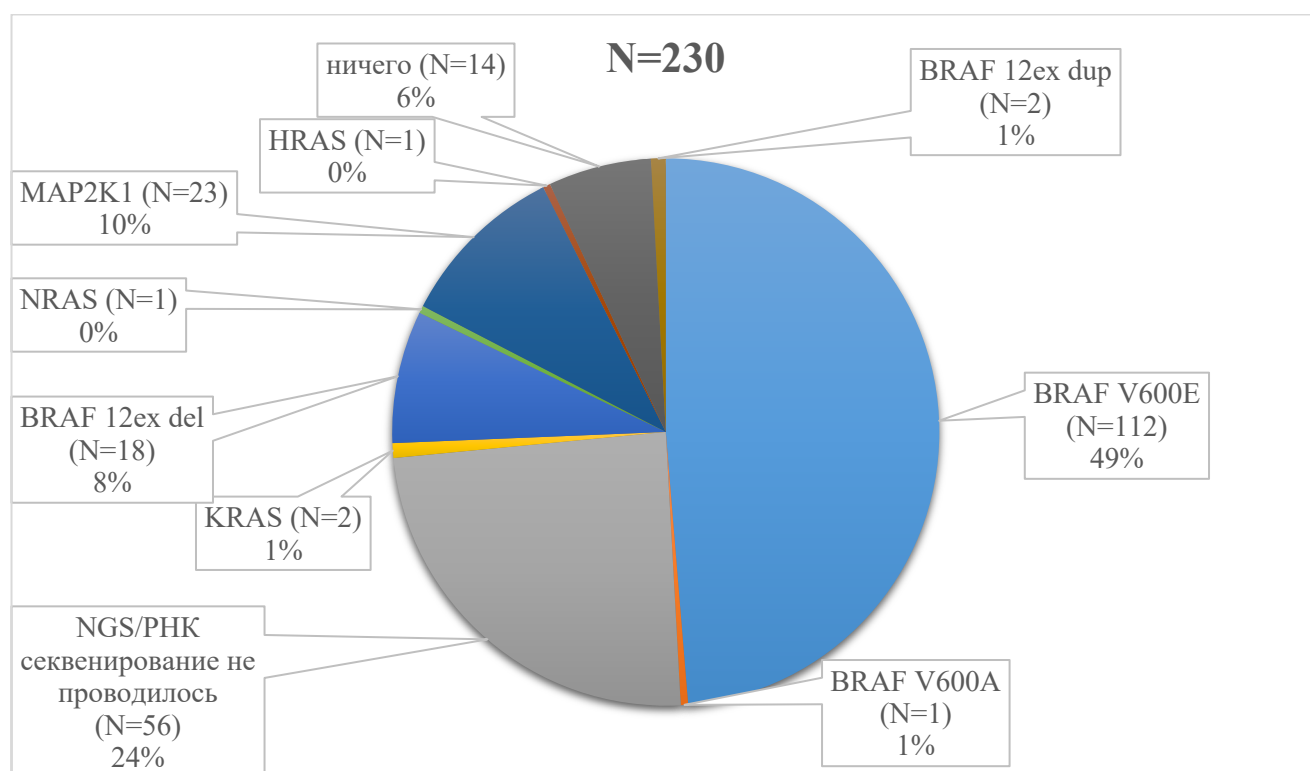


Рисунок 18 – выявленные в данной выборке драйверные соматические мутации. Группе пациентов (56 человек) NGS не проводилось. В данной группе по результатам инициального исследования мутация *BRAF* V600E обнаружена не была, однако в дальнейшем постановка NGS не проводилась (ввиду низкого качества выделенной из блока ДНК (N=11), а также недоступности опухолевого биоматериала (N=45))

Разработанная таргетная NGS панель охватывает большинство известных генетических событий при гистиоцитозе и исключает редкие варианты, что повышает её эффективность. Эффективность панели составила 79,7% (из 69 пациентов выявлены мутации у 55). Помимо *BRAF V600E*, частыми оказались варианты во 2 и 3 экзонах *MAP2K1* и делеции в 12 экзоне *BRAF*.

Пациентам, у которых после диагностического этапа молекулярная причина не была найдена, дальнейший поиск можно продолжить с помощью РНК секвенирования, так как драйвером может являться химерный транскрипт. Кроме того, у данных пациентов мутация может находиться в генах или регионах, не покрытых кастомной NGS панелью. В таком случае можно использовать более расширенные панели, однако необходимо учитывать, что в таком случае метод может быть неоптимальными для поиска соматических мутаций, особенно при их низкой аллельной нагрузке. Для проведения данного анализа предпочтительнее будет использовать свежий биоптат, а не FFPE, а также секвенировать с наибольшей возможной глубиной прочтения.

3.2 Научно-клинический этап

3.2.1 Поиск химерных транскриптов с помощью таргетного РНК-секвенирования

Пациентам, у которых методом высокопроизводительного секвенирования ДНК драйверная мутация обнаружена не была, был проведен поиск химерных транскриптов методом высокопроизводительного секвенирования РНК с помощью таргетной панели TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, США) (N=12).

Следует учитывать, что наличие химерных транскриптов при гистиоцитозах описывается как крайне редкое явление [60; 63], и их выявление может быть ограничено несколькими факторами. Во-первых, число исследованных пациентов невелико, ввиду редкости заболевания и довольно эффективной выявляемостью соматического драйвера секвенированием ДНК. Во-вторых, РНК-секвенирование требует биоматериала высокого качества, так как его деградация или низкое количество может существенно повлиять на результаты.

В исследуемой выборке пациентов с ГКЛ у трёх пациентов были обнаружены перестройки, затрагивающие ген ALK, что подтверждает значимость РНК-секвенирования в молекулярной диагностике ГКЛ. У одного пациента с мултисистемным ГКЛ реаранжировка ALK была ранее выявлена цитогенетически (методом FISH), после чего подтверждена с помощью секвенирования РНК – была выявлена перестройка *KIF5B::ALK* (Рисунок 19).

У одного из трёх пациентов с выявленными ALK-перестройками наблюдалось интрамедуллярное объемное образование грудного отдела спинного мозга. Молекулярно-генетическая диагностика изначально проводилась с целью подтверждения/исключения диагноза срединной диффузной глиомы, не в рамках данного исследования. По результатам секвенирования РНК была также выявлена перестройка *KIF5B::ALK*, не являющаяся характерным драйверным событием для предполагаемого диагноза. В связи с этим, было проведено дополнительное иммуногистохимическое исследование, а также изучен профиль метилирования ДНК, что по совокупности данных позволило сформулировать диагноз ALK-позитивного ГКЛ с изолированным поражением ЦНС. Таким образом, данные секвенирования РНК позволили уточнить диагноз, а также изменить тактику терапии и назначить пациентам таргетные препараты (кризотиниб, лорлатиниб). Исходя из полученных данных, а также согласно публикации P. Kemps et. al., 2019 [60], ALK-реаранжировки являются одними из наиболее распространенных среди редких перестроек у пациентов с ГКЛ, а также имеют важное клиническое значение. В связи с этим, возможно, целесообразно проводить первичную оценку наличия ALK-реаранжировок с использованием метода FISH, который является более доступным и рутинным диагностическим инструментом, позволяющим быстро идентифицировать пациентов, потенциально чувствительных к ингибиторам ALK.

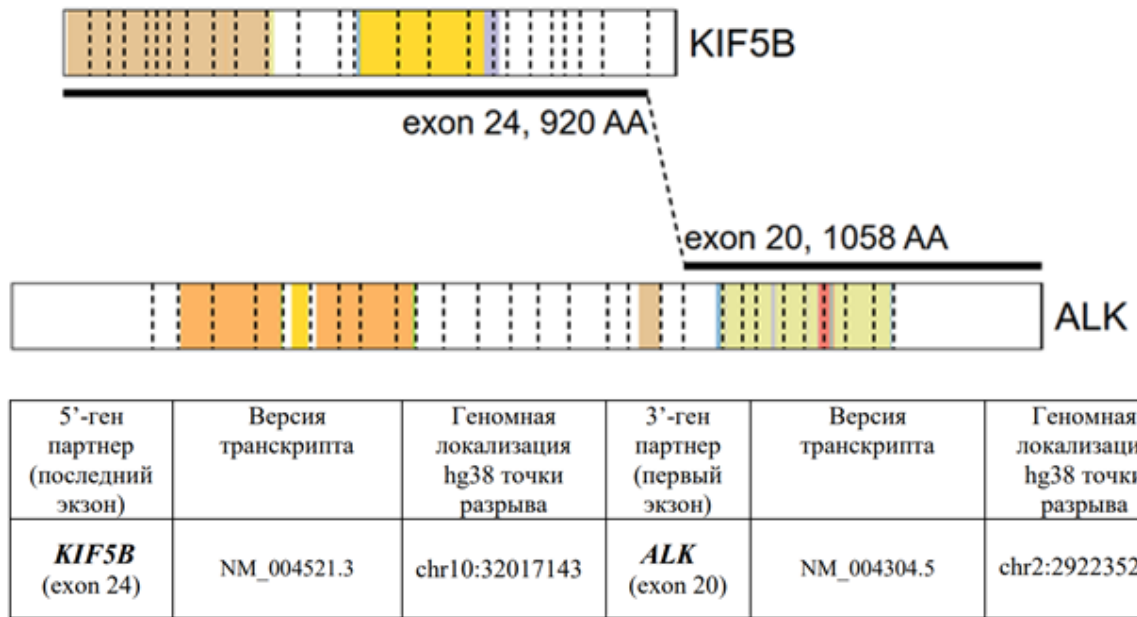


Рисунок 19 – Выявленная с помощью таргетного секвенирования РНК перестройка *KIF5B::ALK*

3.2.2 Анализ генотип-фенотипических корреляций

Молекулярно-генетический анализ показал, что среди пациентов с ГКЛ наиболее часто встречались драйверные мутации *BRAF* V600E, миссенс-мутации или делеции без сдвига рамки считывания во 2 и 3 экзонах гена *MAP2K1*, а также делеции без сдвига рамки считывания в 12 экзоне гена *BRAF*. Для дальнейшего анализа клинических особенностей заболевания было проведено сравнение между этими тремя группами пациентов.

Распределение пациентов в зависимости от мутационного статуса и системности заболевания представлено на Рисунке 20:

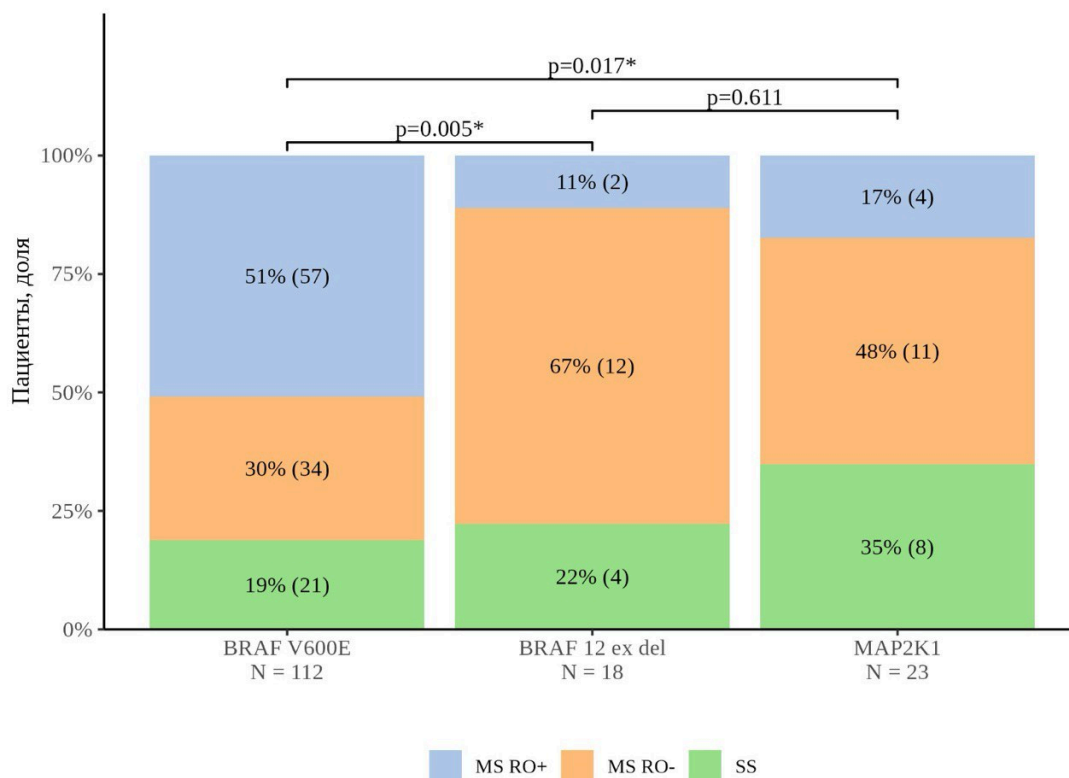


Рисунок 20 – Системность поражения при различных мутациях, характерных для ГКЛ. Всего 153 пациентов, из них *BRAF V600E*- 112 человек, *BRAF* делеции 12 экзона - 18 человек, *MAP2K1*-23 человека. *точный тест Фишера с поправкой Бонферрони-Холма

Статистически значимые различия в системности поражения выявлены при сравнении групп пациентов с мутацией *BRAF V600E* и с делециями в 12 экзоне гена *BRAF*, а также между пациентами с мутациями *BRAF V600E* и *MAP2K1* ($p=0,005$ и $p=0,017$ соответственно). В то же время, между группами с делециями в 12 экзоне *BRAF* и мутациями в *MAP2K1* значимых различий не наблюдается ($p=0,611$), что подтверждает сделанный ранее вывод об ассоциации мутации *BRAF V600E* с большей системностью ГКЛ.

Среди указанных трёх групп пациентов с различными драйверными мутациями также проводили попарное сравнение клинических проявлений (поражение кожи, костей и лёгких). В анализ вошли только пациенты с доступной подробной выпиской, согласно которой можно было оценить наличие поражений

кожи, костей и легких. Данные по очагам поражения у пациентов с ГКЛ представлены в Таблице 4:

Таблица 4 – Распределение очагов поражения у пациентов с различными мутациями

	<i>BRAF</i> V600E	<i>BRAF</i> 12 ex del	<i>MAP2K1</i>
Кожа	51	8	6
Кости	71	14	21
Легкие	22	9	8
Всего пациентов	90	18	23

На Рисунке 21 представлено попарное сравнение поражений кожи среди трёх групп пациентов.

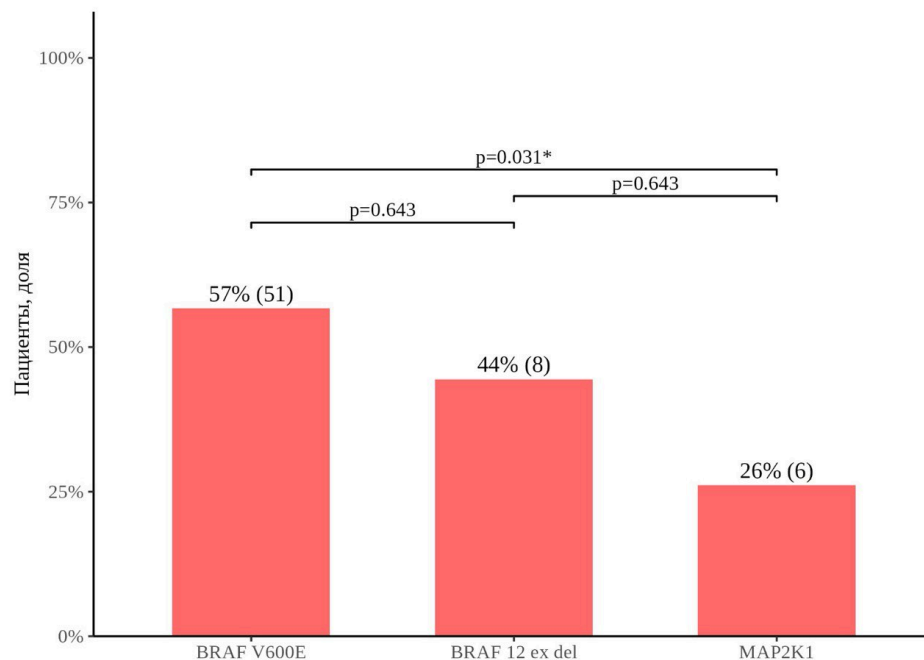


Рисунок 21 – Поражение кожи у пациентов с ГКЛ и разными драйверными мутациями. *точный тест Фишера с поправкой Бонферрони-Холма

Анализ данных выявил статистически значимые различия в частоте кожных поражений между группами с мутациями *BRAF* V600E и *MAP2K1* ($p=0,031$). При этом различий между группами с *BRAF* V600E и делециями в 12 экзоне *BRAF*, а также между группами с делециями в 12 экзоне *BRAF* и *MAP2K1*, не обнаружено.

Анализ частоты поражений костей среди трёх групп пациентов не показал статистически значимых различий ($p>0,05$) (Рисунок 22).

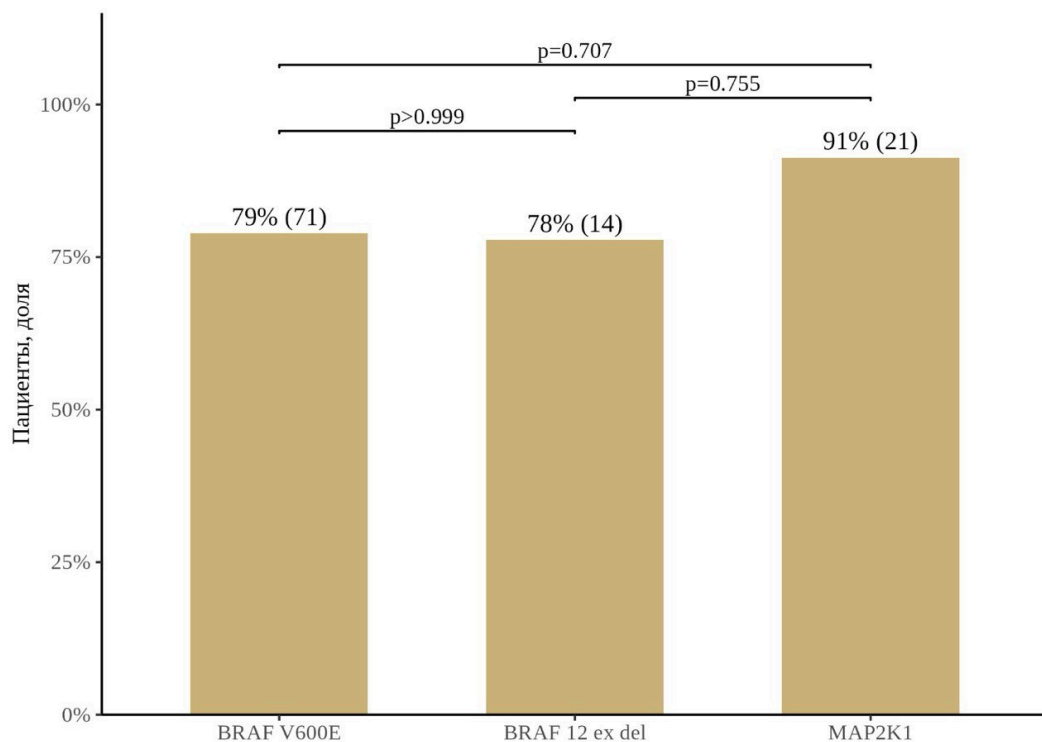


Рисунок 22 – Поражение костей у пациентов с ГКЛ и разными драйверными мутациями. *точный тест Фишера с поправкой Бонферрони-Холма

Значимых различий в поражениях лёгких также не было выявлено, однако стоит учесть малый размер выборки пациентов с мутациями *BRAF* 12ex del и *MAP2K1* (Рисунок 23).

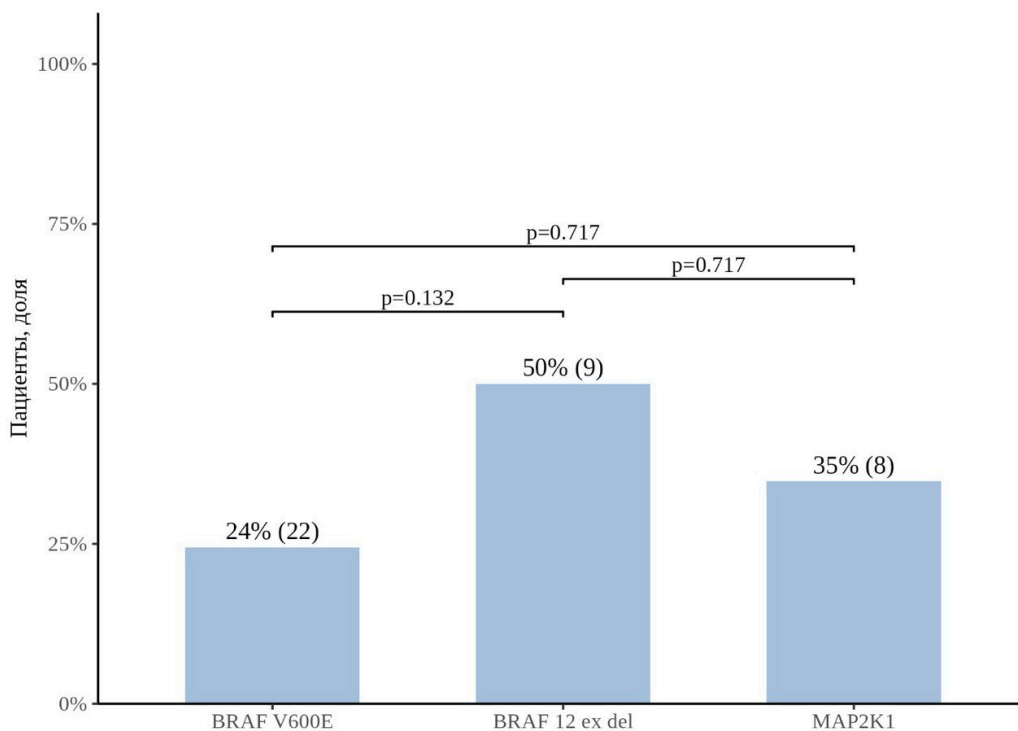


Рисунок 23 – Поражение лёгких у пациентов с ГКЛ и разными драйверными мутациями. *точный тест Фишера с поправкой Бонферрони-Холма

3.2.3 Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников

Плазма крови для оценки аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сцДНК была собрана у 30 пациентов на разных этапах лечения и после его завершения в соответствии с протоколом NCT03585686.

Результаты мониторинга аллельной нагрузки представлены в Таблице А1 (в приложении) и на Рисунке 24.

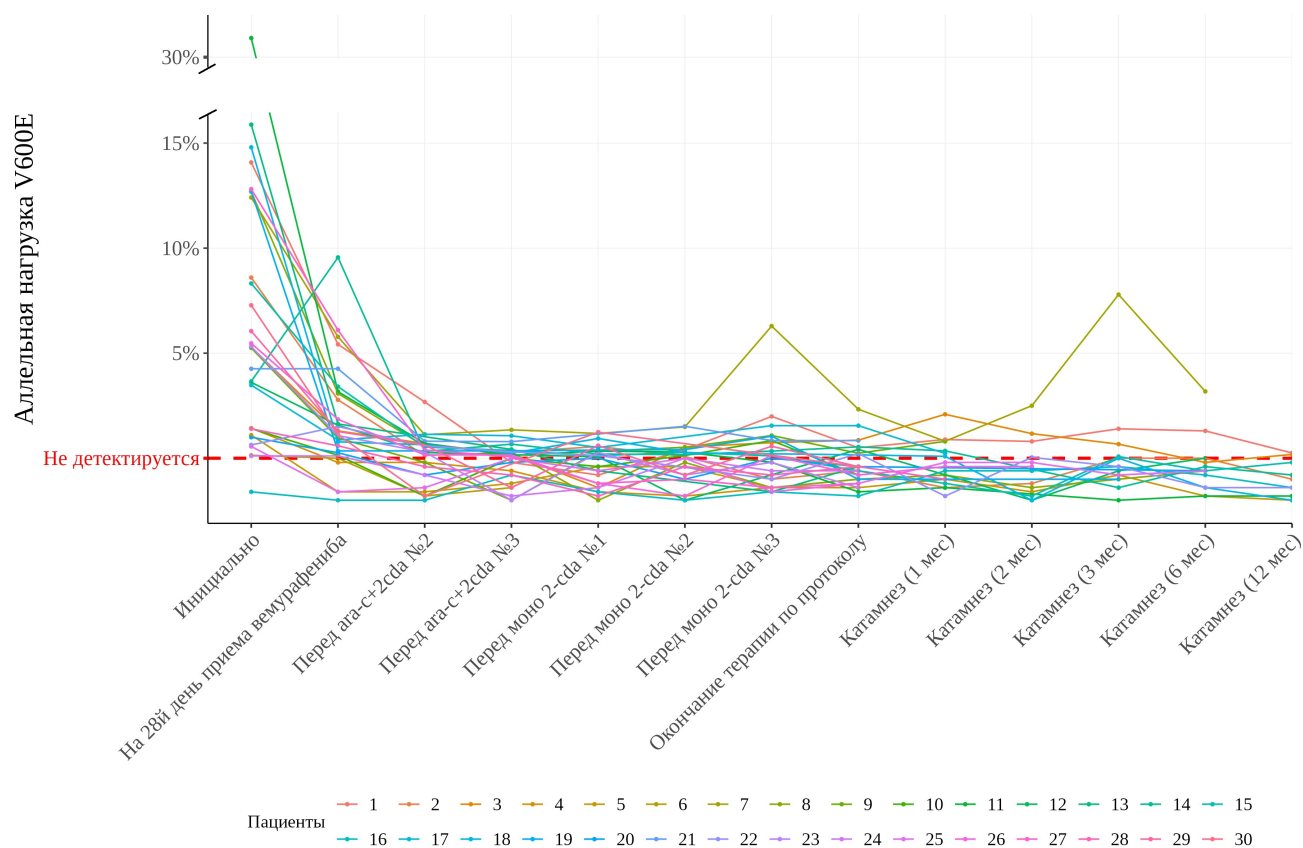


Рисунок 24 – Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E в сДНК у пациентов на протоколе NCT03585686

В инициальной точке медиана аллельной нагрузки в сДНК среди пациентов MS RO+ (22 пациента из 30) составила 5,76% (0,56–30,91%), тогда как в группе MS RO- медиана была значительно ниже и составила 1,25% (0–8,6%), ($p=0,006$).

Снижение аллельной нагрузки в сДНК отражало эффективность терапии вемурафенибом: медиана аллельной нагрузки *BRAF* V600E в сДНК на 28-й день составила 1,4% (0–9,56%) и 0,06% (0–2,78%) в группах MS RO+ и MS RO- соответственно, а изменение аллельной нагрузки в группе MS RO+ составила 4,54% (-5,9% – 27,74%), в группе MS RO- 0,95% (0% – 5,82%). Полученные данные говорят о том, что аллельная нагрузка значимо снижается в обеих группах ($p < 0,001$ и $p=0,018$ соответственно), в то же время пациенты из группы MS RO- после индукционной фазы протокола имеют более низкую аллельную нагрузку мутации по сравнению с группой RO+ ($p=0,01$).

Эффективность индукционной фазы протокола также отражалась и по шкале активности заболевания DAS. Так, в группе пациентов MS RO+ медиана DAS до начала протокола составила 15 (6-24), в группе MS RO – 4 (1-6) ($p < 0,001$). После индукции вемурафенибом, помимо снижения аллельной нагрузки мутации, также снижался и показатель DAS, однако при этом показатель все ещё оставался выше в группе MS RO+: – 2 (0-2) и 0 (0-1) в группе MS RO- ($p = 0,037$).

После 3 курсов Ara-C + 2-CdA (перед первым курсом монотерапии 2-CdA) показатели МОБ снизились у всех пациентов. В группе MS RO+ снижение составило 5,47% (0,5% -30,57%), в группе MS RO- 1,4% (0% - 8,04%), ($p < 0,001$ и $p = 0,018$ соответственно). Таким образом, после этапа интенсивной химиотерапии значимых различий по показателю аллельной нагрузки *BRAF* V600E в сДНК между группами не наблюдалось – в группе MS RO+ медиана составила 0,13% (0–1,24%), в группе MS RO- - 0% (0–0,56%), ($p = 0,2$). Показатели DAS составили 0 баллов у всех пациентов.

Так как оба показателя (аллельная нагрузка и DAS) отражали эффективность проводимой терапии, было сделано предположение о корреляции их изменений (между инициальной точкой и перед моно 2-CdA №1). Анализируемые показатели снижения значений от инициального уровня до точки перед моно 2-CdA №1 представлены на Рисунке 25:

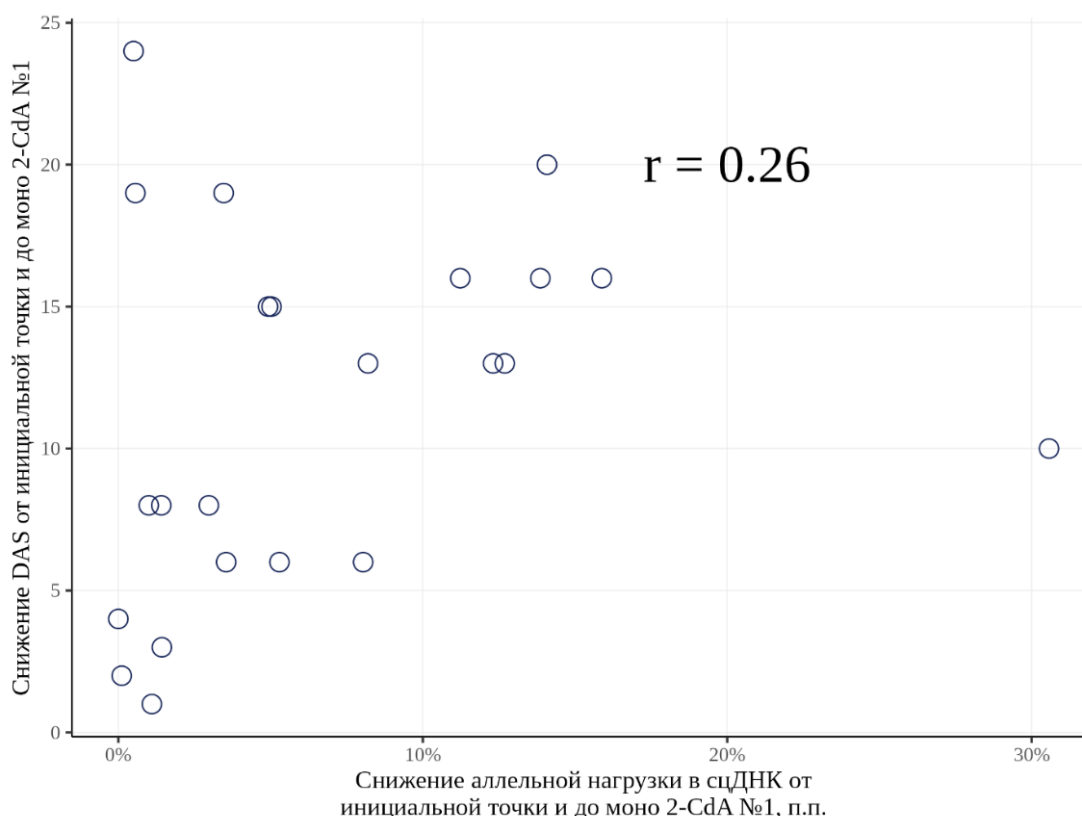


Рисунок 25 – Корреляция снижения показателей DAS и аллельной нагрузки в сцДНК (снижение показателей оценивалось относительно инициальной точки и перед моно 2-CdA №1). п.п. – процентные пункты. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,26

Мониторинг аллельной нагрузки *BRAF* V600E на различных этапах терапии и после её завершения продемонстрировал, что у большинства пациентов наблюдается прогрессивное снижение данного показателя, что отражает снижение активности заболевания. У некоторых пациентов аллельная нагрузка становится недетектируемой, тогда как у других сохраняется на низком уровне. Выделяется пациент номер 7, у которого после завершения лечения сохранялась относительно высокая аллельная нагрузка. Этот пациент стал единственным, у кого после окончания терапии по протоколу развился системный рецидив с вовлечением органов риска.

Согласно одной из гипотез патогенеза ГКЛ, персистенция миелоидных предшественников с мутацией *BRAF* V600E может быть источником рецидива

заболевания. В связи с этим, помимо наблюдения за изменением аллельной нагрузки мутации в сцДНК, проводился её мониторинг в популяции миелоидных предшественников, которые, вероятно, являются предшественниками патологического клона. Костномозговая пункция осуществлялась в трёх контрольных точках в соответствии с протоколом. Всего было исследовано 75 образцов от 30 пациентов. Результаты мониторинга аллельной нагрузки приведены в Таблице А2 (в приложении) и на Рисунке 26.

Мониторинг аллельной нагрузки *BRAF V600E* в популяции миелоидных предшественников у пациентов на протоколе

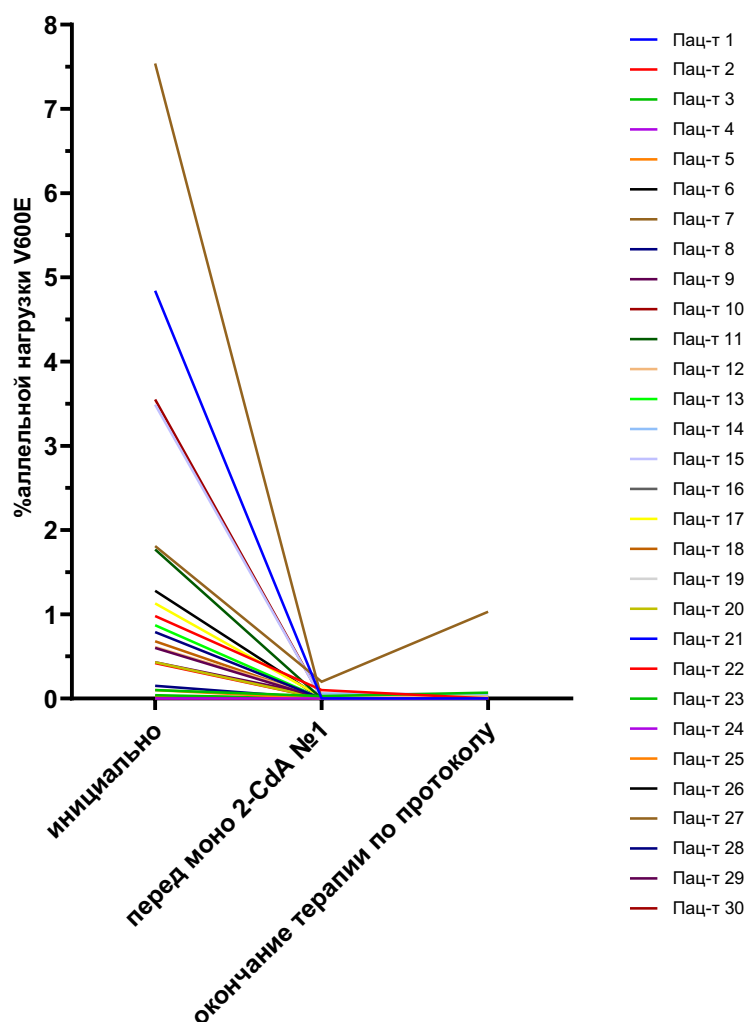


Рисунок 26 – Мониторинг аллельной нагрузки мутации *BRAF V600E* в популяции миелоидных предшественников у пациентов на протоколе NCT03585686

В инициальной точке медиана аллельной нагрузки в миелоидных предшественниках в группе пациентов MS RO+ составила – 0,83% (0–7,54%). В группе MS RO- медиана аллельной нагрузки была ниже и составила 0,05% (0–0,98%) ($p=0,009$). Как и в случае мониторинга МОБ в сцДНК, уровень аллельной нагрузки мутации в популяции миелоидных предшественников снижался после трех курсов Ara-C 2-CdA – изменение аллельной нагрузки в группе MS RO+ составило 0,79% (0%–7,54%), ($p<0,001$); в группе MS RO-, однако, изменения были не значимы 0,1% (0%–0,88%), ($p=0,05$), что объясняется инициально низким уровнем нагрузки в данной группе. В итоге аллельная нагрузка после блоков интенсивной химиотерапии составила 0% (0–0,2%) в группе MS RO+ и 0% (0–0,1%) в группе MS RO-, статистически значимых различий между двумя группами не наблюдалось ($p>0,9$).

Корреляция снижения показателя аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников и снижения активности заболевания по шкале DAS оказалась выше, чем при аналогичном сравнении показателя в сцДНК (Рисунок 27):

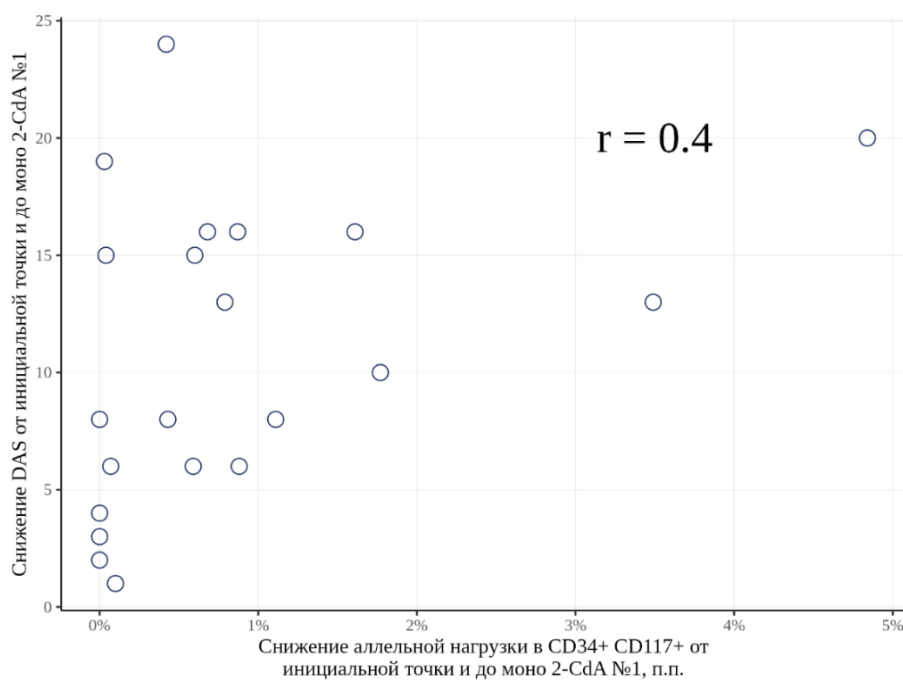


Рисунок 27 – Корреляция снижения показателей DAS и аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников (снижение показателей оценивалось

относительно инициальной точки и перед моно 2-CdA №1). п.п. – процентные пункты. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,4

После окончания терапии по протоколу финальную пункцию КМ проводили не у всех пациентов. Среди обследованных в этой точке пациентов почти у всех аллельная нагрузка была равна нулю, либо детектировалась на крайне низком уровне. Особое внимание следует обратить на пациента №7, который стал единственным, у кого после завершения протокола развился системный рецидив с вовлечением органов риска. У этого пациента в последней контрольной точке была зафиксирована самая высокая аллельная нагрузка мутации, составившая 1,03%.

Хотя данный апробационный протокол продемонстрировал свою эффективность [77], у некоторых пациентов продолжает сохраняться аллельная нагрузка мутации в сцДНК или популяции CD34+ CD117+. Но при этом персистенция остаточной аллельной нагрузки не обязательно будет свидетельствовать о рецидиве заболевания, так как её поддержание может быть связано с резидуальными патологическими клетками в тканях или клетками, не участвующими в патогенезе заболевания (например, CD3+). На данный момент не существуют однозначных клинических критериев для оценки рецидива заболевания по уровню аллельной нагрузки в сцДНК или в различных клеточных популяциях. Но особое внимание стоит уделить мониторингу аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников костного мозга, так как это может быть более точным индикатором остаточного патологического клона как потенциального источника рецидива заболевания.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Обсуждение результатов инициального определения BRAF статуса

Мутация *BRAF* V600E является наиболее часто встречающимся молекулярным соматическим драйвером, и, помимо этого, валидированной мишенью для эффективной таргетной терапии ГКЛ. Поэтому первичная молекулярно-генетическая диагностика в первую очередь включает определение статуса BRAF. По результатам инициального исследования статуса BRAF среди пациентов с ГКЛ 46% (105 из 230) имели мутацию *BRAF* V600E. Мутация была обнаружена у 27% пациентов с моносистемным поражением, у 37% пациентов MS RO-, и 74% MS RO+. Ассоциация мутации с системностью заболевания сохраняется при анализе различных типов биоматериала, включая сцДНК и миелоидные предшественники костного мозга.

Для обнаружения мутации *BRAF* V600E применяют метод прямого секвенирования по Сэнгеру, аналитическая чувствительность которого составляет 10-15%. Также данный метод наиболее чувствителен к наличию различных ингибиторов ПЦР, в связи с этим с помощью секвенирования по Сэнгеру определяли мутацию лишь в образцах КМ и выделенной из него популяции CD34+, но не в FFPE, отличающихся наличием примесей ПЦР-ингибиторов, а также низким качеством и высокой фрагментированностью выделенной ДНК. По результатам секвенирования по Сэнгеру наглядно видно, что в образцах, исследованных данным методом, % выявляемости мутации является самым низким (27%) и не соотносится с доказанной частотой встречаемости мутации *BRAF* V600E при ГКЛ, что объясняется самой низкой чувствительностью данного метода. Сравнение с другими методами определения мутации также показало, что данный метод не является оптимальным для выявления соматических мутаций, особенно в случае ГКЛ, когда аллельная нагрузка может достигать крайне низких значений за счет инфильтрации очагов поражения клетками без мутации.

Для улучшения чувствительности секвенирования по Сэнгеру используется мсПЦР, чувствительность которой составляет 3%. Тем не менее, чувствительности

мутационно-специфичной ПЦР может быть недостаточно для анализа образцов с низкой аллельной нагрузкой мутации. Для преодоления этих ограничений оптимальным решением является метод цкПЦР, который обеспечивает высокую чувствительность и специфичность благодаря индивидуальному подсчету множества копий ДНК. В публикации Heritier S. et al., 2017 впервые было описано применение цкПЦР для определения аллельной нагрузки *BRAF V600E* в сцДНК у пациентов с ГКЛ [8]. Этот показатель является многообещающим биомаркером, так как наличие мутации *BRAF V600E* ассоциировано с системностью заболевания, о чем говорят также и полученные в результате настоящего исследования данные. Помимо самого наличия мутации, уровень её аллельной нагрузки также отражает системность патологического процесса. Эти различия, вероятно, связаны с тем, что при более выраженной распространенности заболевания наблюдается усиленная пролиферация, диссеминация и клеточная гибель ПКЛ, что ведет к увеличению общей массы клеток и, как следствие, повышению доли апоптотической мутантной ДНК в плазме крови.

При этом аллельная нагрузка в сцДНК лишь косвенно свидетельствует о наличии патологического очага. В отличие от этого, анализ популяции CD34+ CD117+ позволяет оценить наличие мутации в клетках-предшественниках, которые играют ключевую роль на начальных этапах патогенеза заболевания. Как и в случае с сцДНК, наличие мутации в этой клеточной популяции связано с более выраженной системностью заболевания. Следует отметить, что выявление мутации *BRAF V600E* не всегда коррелирует с клинически определяемым поражением костного мозга. Например, у пациентов с мультисистемными поражениями, но без вовлечения органов риска, мутацию в миелоидных предшественниках обнаружили у 7 из 25 человек. Эти результаты подтверждают современное понимание патогенеза ГКЛ: активирующая мутация обнаруживается на уровне миелоидных стволовых клеток, независимо от распространенности заболевания [7]. Кроме того, более высокая аллельная нагрузка мутации в отсортированной популяции гистиоцитов (CD1a+ HLA-DR+) косвенно может указывать на то, что гистиоциты являются ведущим звеном патогенеза и играют ключевую роль в поражении

костного мозга при гистиоцитозе. Однако, в связи с тем, что гистиоциты являются относительно малочисленной клеточной популяцией и чаще всего их удается выделить в достаточном для достоверного анализа количестве только у пациентов в активном заболевании и с поражением костного мозга, определение и мониторинг аллельной нагрузки мутации в данной популяции не несет диагностической значимости, несмотря на то, что по результатам инициального исследования у 97% пациентов (35 из 36) статус BRAF совпал в биоптате и в популяции гистиоцитов.

Стандартом определения статуса BRAF тем не менее остается определение мутации в биоптатах очагов поражения, в которых ранее диагноз был подтвержден гистологически и иммуногистохимически. Чтобы повысить эффективность анализа, в том числе образцов с низким содержанием ПКЛ или наличием ПЦР-ингибиторов, следует использовать метод цкПЦР, который обладает большей чувствительностью по сравнению со стандартными методами определения мутации.

Альтернативой определению мутации в биоптате опухоли может служить жидкостная биопсия. В целом по результатам данного исследования можно сказать, что анализ сцДНК с использованием цкПЦР подтвердил данное предположение, так как в 92% (57 из 62) проанализированных случаев BRAF статус в сцДНК и в биоптате совпадал, ещё в 6% случаев (4 из 62) с помощью жидкостной биопсии удалось выявить мутацию, не детектируемую при анализе обычного биоптата. Это объясняется разной чувствительностью методов определения мутации, а также тем, что при проведении биопсии (особенно очагов с высокой инфильтрацией нормальными клетками) может произойти недостаточный захват опухолевых мутантных клеток, в то время как жидкостная биопсия может более точно отражать общий мутационный статус пациента. Для пациентов с мультисистемными поражениями (52 из 62) жидкостная биопсия обладала 100% чувствительностью. Из 10 пациентов с моносистемными поражениями у 2 BRAF-положительный статус совпал в биоптате и по результатам жидкостной биопсии, у 7 везде определялся BRAF – негативный статус. И всего у одного пациента с помощью жидкостной биопсии мутацию выявить не удалось, в то время как в

биоптате мутация была обнаружена. Данному пациенту с моносистемным монофокальным поражением лобной кости была проведена полная резекция очага поражения, в результате чего и был получен биоматериал. В процессе оперативного вмешательства могло произойти высвобождение циркулирующей неопухолевой ДНК в результате травматического воздействия на ткани [104]. Вследствие этого усложняется детекция опухолевой ДНК на фоне повышенного уровня общей сцДНК. Кроме того, сцДНК обладает относительно коротким периодом полураспада, составляющим примерно 2 часа, и в результате хирургической резекции опухоли уровень опухолевой сцДНК довольно резко уменьшается [105]. Таким образом, для локализованных очагов небольшого размера определение циркулирующей опухолевой ДНК может оказаться не самым оптимальным методом установления BRAF статуса. Поэтому, несмотря на то, что жидкостная биопсия предполагает значительные преимущества, такие как высокая чувствительность метода и удобство забора биоматериала, в некоторых случаях (локализованный очаг, забор крови при резекции опухоли и тд) результат стоит подтверждать стандартными методами. Дальнейшее расширение выборки (особенно за счет пациентов с моносистемными поражениями, сложными локализациями очагов поражения) позволит более точно определить диагностическую чувствительность метода (на данный момент на небольшой выборке составляющую 90%) в отношении таких пациентов и уточнить место жидкостной биопсии в молекулярной диагностике ГКЛ.

4.2 Обсуждение результатов секвенирования таргетной NGS панели

Для дальнейшего молекулярно-генетического профилирования пациентов с ГКЛ использовали постановку кастомной таргетной NGS панели. Анализ частоты встречаемости различных мутаций при гистиоцитарных патологиях позволил составить кастомизированную таргетную NGS панель, включающую в себя 11 генов (*BRAF*, *ARAF*, *MAP2K1*, *MAP3K1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *KIT*, *ERBB3*, *KRAS*, *PIK3CD*, *HRAS*). Данный набор генов покрывает большинство известных и описанных на данный момент генетических событий при гистиоцитозе, при этом

не включает заведомо редкие и маловероятные варианты, с целью максимального повышения эффективности данной панели. На момент проведения исследования эффективность панели составила 79,7% (у 55 пациентов из 69 секвенированных удалось выявить каузативный вариант). У 11 пациентов биоматериал был недостаточного для постановки NGS качества. Было отмечено, что у всех этих пациентов НК выделялась из костного материала. Зачастую такой биоматериал непригоден для анализа (что можно объяснить особенностями пробоподготовки FFPE из костной ткани). В связи с этим, для молекулярно-генетического анализа методом NGS по возможности стоит отдавать предпочтения другим видам биоматериала, отличным от костного.

Стоит отметить, что использование в методике пробоподготовки библиотек и последующей биоинформатической обработки данных баркодов уникальных молекул (UMI) обладает рядом преимуществ по сравнению со стандартными алгоритмами, направленными на поиск генетических вариантов без их учёта. Так как аллельная нагрузка мутации в образцах ГКЛ может быть крайне низкой, очень важно отличать ложноположительные результаты (возникающие вследствие ошибок секвенирования или контаминации) от истинно положительных результатов с низким VAF. В случае секвенирования без использования UMI все значимые генетические находки с низким VAF необходимо подтверждать, например, с помощью глубокого секвенирования целевого ПЦР фрагмента, либо с помощью цкПЦР со специфичными к данному варианту флуоресцентными зондами.

Несмотря на то, что в постановку NGS брали образцы, в которых *BRAF* V600E при инициальном исследовании не выявлялся, анализ NGS данных показал, что данная мутация может встречаться в очагах гистиоцитарных поражений в очень низком количестве (1-2%), при медиане глубины прочтения 8269x и подтвержденным с учетом UMI истинно положительным статусом. Таким образом, данное наблюдение говорит о необходимости использования наиболее чувствительных методов для выявления мутаций при ГКЛ. В случае *BRAF* V600E альтернативным методом может служить цкПЦР. Также с помощью цкПЦР можно

определить абсолютное количество копий ДНК с мутацией и без, что позволяет точно рассчитать аллельную нагрузку мутации.

Помимо *BRAF* V600E, с помощью NGS была обнаружена мутация *BRAF* V600A. Данная замена также классифицируется как вариант с высокой клинической значимостью, так как таргетный препарат вемурафениб действует на все замены 600 кодона *BRAF*. Варианты в 600 кодоне, отличные от V600E, невозможно выявить с помощью используемого в данной работе набора на цкПЦР, так как там используются зонды, специфичные к замене с. 1799 T>A. Подходящим методом может являться мультиплексная ПЦР в режиме реального времени, мсПЦР с последующим секвенированием по Сенгеру, либо применение специфичных к этой замене зондов для цкПЦР. Однако для достижения большей чувствительности и возможности детектировать различные варианты в 600 и соседних кодонах (например, небольшие инсерции и делеции) – целесообразно использовать метод таргетного NGS секвенирования.

Вторым наиболее частым драйверным событием в гене *BRAF* оказались делеции в 12 экзоне. Данные мутации затрагивают β 3- α C – домен, который координирует движения двух структурных элементов белка *BRAF*, необходимых для активации киназы [63]. Данные молекулярные находки имеют большое значение для определения дальнейшей тактики лечения, так как известно, что пациенты с мутациями в 12 экзоне *BRAF* не отвечают на таргетные *BRAF*-ингибиторы, несмотря на то, что драйверная мутация затрагивает один и тот же ген. Стоит отметить, что у двух пациентов с данной мутацией при первичном биоинформатическом анализе данных, мутация не была обнаружена, однако, при анализе данных в геномном браузере IGV, делеция визуализировалась в низком проценте ридов (0,7% и 9%, при глубине прочтения 3140x и 4618x соответственно) и являлась достоверной с учетом UMI. Это объясняется высокими примесями нормальных клеток иммунной системы в очагах гистиоцитарных поражений.

Также наиболее распространенными оказались мутации в гене *MAP2K1* (делеции без сдвига рамки считывания во 2 или 3 экзонах, а также точечные миссенс замены во 2 экзоне). Все данные мутации описаны в научной медицинской

литературе при гистиоцитозе из клеток Лангерганса. Они локализованы в киназном домене белка и оказывают активирующее влияние на его функцию [58]. Так как мутации в гене *MAP2K1* являются вторыми по частоте после мутаций гена *BRAF*, при инициальном исследовании, до проведения высокопроизводительного таргетного секвенирования, некоторым пациентам помимо установления статуса *BRAF*, также исследовали 2 и 3 экзоны *MAP2K1* методом прямого секвенирования по Сенгеру. В том числе, двум пациентам с обнаруженной с помощью NGS мутацией *MAP2K1*, было проведено инициальное секвенирование по Сенгеру, которое, однако, мутацию не выявило. По результатам NGS, медиана аллельной нагрузки мутаций в гене *MAP2K1* составила 5% (1-15%), что объясняет невыявляемость данной мутации методом секвенирования по Сенгеру, и подчёркивает необходимость поиска мутаций в данном гене именно с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования.

Кроме того, были выявлены и описаны редкие для гистиоцитоза молекулярные события. Например, дупликация в сайте сплайсинга 12 экзона *BRAF*, доказанно влияющая на фосфорилирование ERK сигнального пути [96]. Согласно анализу литературных данных, выявленный вариант является всего третьим случаем обнаружения такой мутации в мире. В статье описаны 2 случая моносистемного ГКЛ с поражением костей. У пациента из нашей выборки также наблюдались множественные мультифокальные костные поражения. В статье также приведены данные функционального исследования: инсерция трёх аминокислот (p.Arg506_Lys507insLeuLeuArg) локализована в N-концевой части киназного домена *BRAF*, ответственного за связывание АТФ. Известно, что небольшие делеции в 12 экзоне, локализованные вблизи этой области (и часто встречающиеся и в нашей выборке), индуцируют активацию ERK сигнального пути, что позволяет предположить, что эта новая мутация также может иметь схожее функциональное влияние. С помощью иммуногистохимии авторами статьи было показано, что CD1a⁺ мутантные гистиоциты содержат в цитоплазме большое количество фосфорилированной формы ERK, что также было подтверждено с помощью вестерн-блоттинга. Далее в статье оценивали функциональное влияние

этой мутации на передачу сигналов BRAF - клетки HEK293 трансфецировали конструкциями, содержащие BRAF дикого типа, *BRAF* V600E или *BRAF* с.1511_1517 + 2dup. Экспрессия кДНК *BRAF* с.1511_1517 + 2dup, но не *BRAF* дикого типа, приводила к значительному увеличению фосфорилирования ERK, что доказывает gain of function механизм данной мутации. Важно отметить, что пациенты с данным вариантом не отвечают и на таргетный ингибитор BRAF вемурафениб, и на MEK- ингибиторы. Фосфорилирование сигнального пути ERK при данной мутации удалось снизить только с помощью ингибитора BRAF нового поколения - PLX8394 [96].

Оставшиеся выявленные мутации в генах *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*, несмотря на то что являются хорошо изученными и часто встречающимися при различных злокачественных новообразованиях патогенными вариантами, носят единичный характер в контексте патогенеза ГКЛ, в связи с чем классифицируются как варианты с потенциально предиктивным значением.

Если рассматривать всю изучаемую выборку целиком, данные по встречаемости различных драйверных событий сходятся с данными научной литературы. Так, встречаемость *BRAF* V600E составила 49%, что соотносится с данными литературы по распространённости данной мутации у пациентов с ГКЛ [4]. Вторыми по распространённости оказались варианты в гене *MAP2K1*. Также отдельную группу составили пациенты с делециями в 12 экзоне *BRAF*. Несмотря на частую встречаемость (суммарно мутации в 15 экзоне *BRAF* и 2 и 3 экзонах *MAP2K1* встречаются почти в 60% случаев ГКЛ), с целью достижения большей чувствительности и большего охвата возможных вариантов в этих генах, для их выявления целесообразно использовать метод таргетного NGS.

4.3 Обсуждение результатов анализа генотип-фенотипических корреляций

Проведённое молекулярное профилирование позволило выполнить анализ генотип-фенотипических корреляций. Попарное сравнение групп пациентов с наиболее распространёнными мутациями (*BRAF* V600E, *BRAF* делеции в 12 экзоне,

MAP2K1) подтвердило некоторые описанные ранее генотип-фенотипические корреляции. Так, в нашей выборке также удалось подтвердить, что наличие мутации *BRAF V600E* ассоциировано с более системным течением заболевания с вовлечением органов риска. Кроме того, мутация *BRAF V600E* значимо чаще вызывает кожные поражения в сравнении с группой пациентов с мутациями *MAP2K1*. При анализе данных по наличию костных поражений и поражению лёгких статистически значимых различий между группами выявлено не было.

Согласно литературным данным, делеции в 12 экзоне *BRAF* ассоциированы с поражением легких, а мутации в *MAP2K1* – с моносистемными костными поражениями [10]. Отсутствие значимой ассоциации в нашем исследовании в полной мере не указывает на ее отсутствие, так как может быть связано с недостаточно объемом выборки для выявления статистически значимых различий.

Фенотипическая гетерогенность вариантов течения ГКЛ указывает на множество факторов, влияющих на патогенез, и пока невозможно однозначно связать подтип онкогенной мутации с клиническим течением заболевания. В отличие от других онкогематологических патологий, гистиоцитоз из клеток Лангерганса демонстрирует широкий спектр клинических проявлений и значительную гетерогенность. Хотя не все мутации можно прямо ассоциировать с фенотипическими или биологическими особенностями заболевания, генетическое исследование важно как для дальнейшего изучения взаимосвязей с клиническими проявлениями ГКЛ, так и для выбора оптимальной терапии. С развитием таргетной терапии становится критически важным точно идентифицировать соматические драйверные мутации у пациентов, которые могут получить пользу от применения ингибиторов *BRAF* или *MEK*. Помимо ключевой значимости при назначении таргетной терапии, выявление соматического драйвера и его корреляций с определенными типами гистиоцитарных поражений может иметь и другое важное клиническое значение. Помимо *BRAF V600E*, другие потенциальные мишени для мониторинга МОБ и предсказания рецидива отсутствуют. В связи с этим, определение соматического драйвера, вызвавшего заболевание, можно использовать для стратификации пациентов по группам риска, а также в качестве

потенциального маркера МОБ, что в последующем позволит улучшить подходы к терапии заболевания.

4.4 Обсуждение результатов мониторинга аллельной нагрузки в сцДНК и популяции миелоидных предшественников

Явным преимуществом использования сцДНК в качестве биоматериала является то, что забор крови представляет собой малоинвазивную процедуру, которую можно проводить в любое время, что позволяет осуществлять динамическое наблюдение за молекулярными изменениями в очагах поражения. Согласно исследованиям J. Donadieu и соавт., аллельная нагрузка *BRAF* V600E в сцДНК связана с исходной тяжестью заболевания и прогрессивно снижается в ходе терапии [73], что открывает возможности для использования данного показателя в качестве биомаркера МОБ. В рамках апробационного протокола NCT03585686 было предусмотрено 8 точек мониторинга этого показателя. Медиана аллельной нагрузки в инициальной точке протокола была выше у пациентов с вовлечением органов риска, что соответствует описанным в данной работе результатам об ассоциации уровня аллельной нагрузки мутации и системности заболевания. Индукционная терапия вемурафенибом привела к очень резкому снижению аллельной нагрузки мутации и показателя активности заболевания по шкале DAS в течение довольно короткого периода времени (28 дней) в обеих группах пациентов (RO+ и RO-), что подчеркивает эффективность и многократно описанный «драматический» клинический эффект применения данного препарата у пациентов с мутацией *BRAF* V600E. Однако, несмотря на высокую эффективность, терапия вемурафенибом не является излечивающей, о чем свидетельствуют литературные данные [106], а также тот факт, что в результате терапии у многих пациентов аллельная нагрузка снижается, но не всегда достигает нуля и продолжает персистировать на низком уровне. Выделяется пациент номер 7, у которого после завершения протокола сохранялась относительно высокая аллельная нагрузка мутации. Данный пациент оказался единственным, развившим системный рецидив с вовлечением органов риска после окончания терапии по

протоколу. В то же время, остаточная персистенция аллельной нагрузки в сцДНК не всегда указывает на рецидив заболевания, поскольку низкий уровень аллельной нагрузки мутации после завершения терапии может поддерживаться за счет оставшихся патологических клеток в тканях или клеток гемопоэза, не вовлеченных в патогенез заболевания (например, Т-лимфоцитов). Наличие таких клеток не обязательно ведет к системному рецидиву заболевания. В связи с этим, однозначных клинических критериев – показателей возможного рецидива по значению аллельной нагрузки в сцДНК пока установить невозможно.

При этом вопрос безопасной отмены таргетного препарата является наиболее актуальным, в связи с нежелательными эффектами продолжительного приема вемурафениба. Например, так называемое переключение клеточных линий – рост аллельной нагрузки в лимфоидной популяции CD3+. Патогенетическая значимость этого явления пока не определена, ведь мутантные CD3+ клетки напрямую не задействованы в известных механизмах патогенеза заболевания [74]. Среди нежелательных эффектов длительного приема вемурафениба наибольшие опасения вызывают поражения ЦНС, развивающиеся в следствие способности оставшихся патологических макрофагов проникать через ГЭБ [39]. Наиболее точным показателем наличия остаточного патологического клона является определение аллельной нагрузки мутации в популяции миелоидных предшественников CD34+CD117+ костного мозга. Кроме того, принимая во внимание современную концепцию патогенеза заболевания, и тот факт, что системный рецидив может возникнуть из оставшегося патологического клона в костном мозге, мониторинг МОБ в данной популяции может являться многообещающим биомаркером. В апробационный протокол NCT03585686 было включено 3 пункции КМ – изначально, перед поддерживающими блоками моно-2-CdA и после окончания протокола. По аналогии с уровнем аллельной нагрузки в сцДНК, у всех пациентов после приема вемурафениба аллельная нагрузка и DAS резко снижались в обеих группах (MS RO+ и MS RO-).

Однако корреляционный анализ не показал значительной связи между снижением DAS и снижением аллельной нагрузки в сцДНК или популяции

миелоидных предшественников между инициальной точкой протокола и точкой перед моно-2CdA №1. Этот результат может быть обусловлен тем, что воспалительный компонент, играющий ключевую роль в патогенезе ГКЛ, в значительной степени поддерживается клетками без мутации, инфильтрирующими очаги поражения. Таким образом, даже небольшое количество мутантных клеток (и, соответственно, не самый высокий уровень аллельной нагрузки) могут приводить к выраженным клиническим проявлениям и высоким показателям DAS. Следовательно, шкала DAS и аллельная нагрузка отражают различные патофизиологические аспекты заболевания, что может объяснить отсутствие выраженной корреляции между ними.

По окончании протокола у большинства пациентов удалось достичь показателя аллельной нагрузки 0, либо крайне низких значений. Пациент 7, после завершения протокола имевший самую высокую аллельную нагрузку в сцДНК, также имел самый высокий показатель в популяции миелоидных предшественников. За период наблюдения у этого пациента было зафиксировано рефрактерное течение заболевания, связанное с проявлением симптомов реактивации на фоне терапии цитозаром и кладрибином. В связи с этим было решено возобновить терапию BRAF-ингибитором, что привело к полному ответу. Ответ на лечение сохранялся несколько месяцев, однако через год терапии BRAF-ингибитором, появились признаки реактивации заболевания. Учитывая схожие симптомы при начальной фазе заболевания, сохранение мутации *BRAF* V600E в сцДНК и популяции миелоидных предшественников, а также адекватную концентрацию вемурафениба в крови, было выдвинуто предположение о развитии резистентности к терапии BRAF-ингибиторами из-за возникновения субклональной мутации в клетках Лангерганса. К сожалению, второе событие установить не удалось (в связи с низким качеством анализируемого биоматериала и малым количеством в нём патологических клеток), но добавление к терапии MEK-ингибитора траметиниба привело к быстрому регрессу всех имеющихся симптомов. Данный случай позволяет усомниться в эффективности долгосрочного приема вемурафениба, подчеркивает потенциальную прогностическую значимость

показателя аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников КМ, а также демонстрирует необходимость дополнительных исследований для изучения новых возможностей терапии.

Подобная гетерогенность течения и широкий спектр клинических проявлений ГКЛ указывает на множество факторов, влияющих на его патогенез. Определение генетического варианта имеет значение для поиска связей с клиническими проявлениями и выбора таргетной терапии. Кроме того, определенный соматический драйвер можно использовать в качестве маркера МОБ, по аналогии с алгоритмом мониторинга аллельной нагрузки *BRAF* V600E, что поможет улучшить подходы к лечению. Эффективность применения таргетной терапии при ГКЛ подчеркивает необходимость быстрого и эффективного молекулярно-генетического анализа. Так как примерно у половины пациентов с ГКЛ (в том числе в описанной в этой работе выборке) драйвером является *BRAF* V600E, первым этапом диагностики является установление *BRAF*-статуса, причем наиболее оптимально данное исследование проводить с помощью высокочувствительного метода цкПЦР, обладающего большей диагностической чувствительностью по сравнению со стандартными методами. Для пациентов без мутации *BRAF* V600E необходимо также продолжить поиск соматического драйвера. Применение таргетной NGS панели показало высокую эффективность (79,7%). Однако, в случае ГКЛ, ограничивающим фактором является то, что заболевание является довольно редким, а методы высокопроизводительного секвенирования с точки зрения экономических и временных ресурсов оптимально работают только с пулом пациентов. В связи с этим, может увеличиваться время, необходимое на таргетное NGS исследование для пациентов с ГКЛ. Одним из вариантов решения этой проблемы может являться централизация молекулярно-генетической диагностики ГКЛ в рамках одного или нескольких референс-центров. Кроме того, для пациентов, у которых драйвер не был обнаружен с помощью таргетного секвенирования, или с целью объединения пулов пациентов с различными диагнозами для более быстрой молекулярно-генетической диагностики, можно использовать методы непредвзятого генетического анализа –

такие как полногеномное секвенирование или секвенирование РНК. Однако данные методы являются неоптимальными для поиска соматических мутаций, особенно при их низкой аллельной нагрузке. Также большое значение имеет качество анализируемого биоматериала – например, парафиновые блоки из костной ткани, в связи с особенностями пробоподготовки обычно обладают низким качеством выделенной НК. Наиболее подходящим биоматериалом является свежий образец биоптата, однако для его использования необходима возможность быстрой гистологической оценки материала и выделения НК, либо криоконсервации образца до получения результатов гистологического заключения.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетическая диагностика играет ключевую роль в понимании патогенеза и оптимизации лечения ГКЛ. Гетерогенность течения заболевания и разнообразие клинических проявлений подчеркивают важность определения генетических вариантов, связанных с заболеванием, и, как следствие, применения соответствующих таргетных препаратов, показывающих высокую эффективность при ГКЛ.

В результате данной работы была отобрана, охарактеризована и профилирована по молекулярному статусу большая группа пациентов с ГКЛ (230 пациентов), а также был разработан алгоритм последовательного молекулярно-генетического анализа. Поскольку мутация *BRAF* V600E встречается в примерно половине случаев ГКЛ и при этом является мишенью для таргетной терапии, после гистологического и иммуногистохимического подтверждения диагноза первым и наиболее быстрым этапом молекулярно-генетической диагностики должен быть поиск этой мутации различными методами (секвенированием по Сенгеру, мутационно-специфической ПЦР или цифровой капельной ПЦР). Для повышения точности инициальной диагностики *BRAF* статуса целесообразно использовать метод цкПЦР, который обладает наибольшей диагностической чувствительностью, но при этом не отличается от стандартных методов ни по длительности или сложности проведения исследования, ни его стоимости.

При этом в данном исследовании было показано, что жидкостная биопсия (выявление мутации в сцДНК с помощью цкПЦР) демонстрирует 98% диагностическую чувствительность, что делает её потенциальной альтернативой стандартной биопсии при инициальном определении *BRAF* статуса (помимо отдельных случаев несистемных монофокальных очагов поражения).

При выявлении мутации *BRAF* V600E, её аллельная нагрузка, измеренная с помощью цкПЦР (в свободно-циркулирующей ДНК или популяции миелоидных предшественников костного мозга) является маркером минимальной остаточной болезни. В ходе данной работы было показано, что этот показатель отражает

эффективность проводимой терапии (в частности, эффект от приема таргетного препарата вемурафениба). Вопрос безопасной отмены таргетного препарата остается одним из наиболее актуальных в терапии ГКЛ, так как длительный прием вемурафениба ассоциирован с возможными негативными эффектами (нейродегенерацией, переключением клеточных линий, формированием резистентности, а также органотоксичностью). С целью последовательного мониторинга и возможности сравнения и оценки показателей аллельной нагрузки мутации, их определение проводится в рамках исследовательского апробационного протокола NCT03585686, объединяющим эффективность и безопасность применения таргетной терапии с возможностями химиотерапии к эрадикации патологического клона. Однако небольшой объем выборки, общая успешность применения данной схемы и низкая частота рецидивов не позволяют сделать выводы об уровне аллельной нагрузки, позволяющим безопасно отменить терапию. Включение этой методики в более широкий круг клинических протоколов лечения позволит валидировать её клиническое значение и уточнить пороговые показатели аллельной нагрузки, при которых можно безопасно прекратить терапию. Это, в свою очередь, повысит персонализированность подходов в лечении и улучшит прогноз для пациентов.

Для пациентов с BRAF-позитивным статусом известна ассоциация с более системным течением гистиоцитоза, что подтверждается и результатами данного исследования. При этом около 50% пациентов имеют другие драйверные мутации, каждая из которых носит довольно редкий характер. В связи с этим, для пациентов, у которых не обнаружена мутация *BRAF V600E*, была разработана собственная кастомизированная таргетная NGS панель, в которую включены гены, мутации в которых описаны при ГКЛ (*BRAF, ARAF, MAP2K1, MAP3K1, NRAS, PIK3CA, KIT, ERBB3, KRAS, PIK3CD, HRAS*). Панель является эффективным методом для молекулярно-генетического анализа образцов пациентов, у которых при инициальном исследовании мутация *BRAF V600E* выявлена не была. Данная панель фокусируется на наиболее патогенетически значимых для ГКЛ генах, а более таргетное секвенирование с большой глубиной прочтения особенно важно

при поиске соматического драйвера ГКЛ, ввиду зачастую низкой аллельной нагрузки мутации. В результате анализа данных панели удалось охарактеризовать группу BRAF-негативных пациентов, выявить как довольно частые для гистиоцитоза варианты (делеции 12 экзона *BRAF*, варианты во 2 и 3 экзонах *MAP2K1*), так и редко встречающиеся при ГКЛ патогенные варианты в *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*.

Согласно данным литературы, соматическим драйвером при ГКЛ может являться химерный транскрипт, обнаружить который можно только с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК. Несмотря на то, что в данном исследовании на небольшой выборке пациентов химерные транскрипты обнаружены не были, важно продолжить исследования в этом направлении и включать данное исследование в молекулярно-генетический анализ пациентов без явного соматического драйвера, выявленного на уровне ДНК.

В результате применения совокупности методов молекулярно-генетической диагностики, в представленной выборке пациентов у 70% пациентов (160 из 230) удалось выявить каузативный вариант. Для части пациентов необнаружение драйвера связано с отсутствием или недостаточным качеством биоматериала, в связи с чем таргетное секвенирование не проводилось. У пациентов, у которых после таргетного и РНК секвенирования не были обнаружены каузативные варианты, мутации могут находиться в генах или регионах, которые не охватываются кастомной NGS-панелью. В таком случае поиск драйвера может быть продолжен с помощью более расширенной таргетной панели, однако стоит учитывать, что в случае уменьшения глубины прочтения таргетных регионов метод становится менее эффективен для выявления соматических мутаций при их низкой аллельной нагрузке. Для таких исследований предпочтительно использовать свежий биоптат вместо FFPE и проводить секвенирование с максимальной глубиной прочтения. Для пациентов без частых для ГКЛ каузативных вариантов такой алгоритм последовательной молекулярно-генетической диагностики может занимать довольно длительное время. С целью снижения временных и экономических затрат оптимальнее работать с пулом пациентов, что делает

необходимым создание референс-центров для централизованной молекулярно-генетической диагностики ГКЛ. Это позволит улучшить эффективность диагностики и сократить время, необходимое для проведения NGS-исследования.

Краткая схема алгоритма представлена на Рисунке 28:

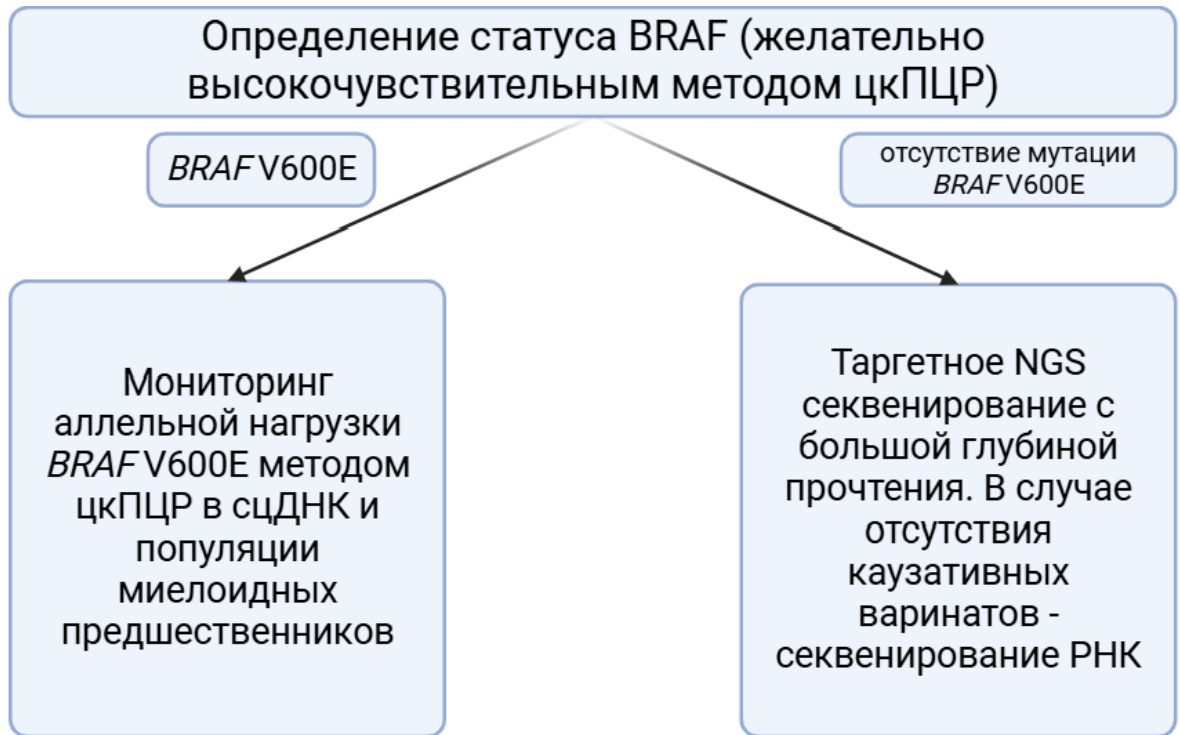


Рисунок 28 – Алгоритм молекулярно-генетической диагностики гистиоцитоза из клеток Лангерганса

Кроме того, проведённая работа позволила впервые описать генотип-фенотипические корреляции у российских пациентов с различными драйверными мутациями при ГКЛ: наличие мутации *BRAF* V600E ассоциировано с более системным течением гистиоцитоза, а также с кожными поражениями. Значимых клинико-геномных ассоциаций с поражением костей и легких выявлено не было. Помимо ключевой значимости при назначении таргетной терапии, выявление соматического драйвера и его корреляций с определенными типами гистиоцитарных поражений может помочь в стратификации пациентов по группам риска, а также для поиска новых потенциальных маркеров МОБ.

5.1 Перспективы дальнейшего развития темы исследования

Перспективы дальнейшего развития исследования связаны с расширением возможностей молекулярно-генетической диагностики для пациентов с ГКЛ. Разработка алгоритма последовательного молекулярного анализа, включающего поиск *BRAF* V600E и других драйверных мутаций, позволяет оптимизировать диагностику и терапию заболевания. Расширение исследуемой выборки пациентов позволит продолжить выявление генотип-фенотипических корреляций при мутациях, отличных от *BRAF* V600E, что может способствовать стратификации пациентов по группам риска и уточнению прогностических факторов. С учетом высокой значимости молекулярного мониторинга МОБ в оценке эффективности лечения и прогнозировании исходов заболевания, перспективным направлением является адаптация методики мониторинга аллельной нагрузки для других драйверных мутаций, таких как, например, делеции в 12 экзоне *BRAF* или мутации в *MAP2K1*. Дальнейшая валидация этих подходов в рамках клинических протоколов позволит усовершенствовать методы контроля терапии, снизить риск рецидивов и повысить эффективность лечения пациентов с ГКЛ.

ВЫВОДЫ

1. Цифровая капельная ПЦР является наиболее эффективным методом определения мутации *BRAF* V600E у пациентов с ГКЛ, так как метод обладает более высокой диагностической чувствительностью по сравнению с секвенированием по Сенгеру, а также способен выявлять даже крайне низкие значения аллельной нагрузки мутации.

2. Использование сцДНК для оценки аллельной нагрузки мутации *BRAF* V600E методом цкПЦР на этапе диагностики продемонстрировало высокую конкордантность (98%) со стандартными методами выявления мутации в FFPE, что подтверждает возможность применения данного подхода в качестве альтернативы инвазивной биопсии для инициального определения *BRAF* статуса у пациентов с ГКЛ.

3. Разработанная методика мониторинга аллельной нагрузки в различных видах биоматериала (сцДНК из плазмы крови; ДНК из отсортированных популяций миелоидных гемопоэтических предшественников костного мозга) эффективна для оценки данного показателя как биомаркера активности ГКЛ и эффективности проводимой терапии. Снижение аллельной нагрузки в сцДНК отражает эффективность терапии вемурафенибом - медиана изменения аллельной нагрузки в группе MS RO+ составила 4,54%, в группе MS RO- 0,95%. После 3 курсов Ara-C + 2-CdA (перед моно 2-CdA №1) показатели также снизились – в группе MS RO+ снижение составило 5,47%, в группе MS RO- 1,4%. Уровень аллельной нагрузки мутации в популяции миелоидных предшественников также снижался после трех курсов Ara-C 2-CdA – изменение аллельной нагрузки в группе MS RO+ составило 0,79%, в группе MS RO- 0,1%.

4. Диагностическая эффективность разработанной кастомной таргетной NGS панели, фокусирующейся на патогенетически значимых для ГКЛ генах, составила 79,7%. С помощью данной панели были выявлены как более частые для ГКЛ драйверные мутации, отличные от *BRAF* V600E (23 пациента с вариантами в *MAP2K1*, 18 пациентов с делециями 12 экзона *BRAF*), так и редкие для ГКЛ

варианты (например, дупликация в сайте сплайсинга 12 экзона *BRAF*, или часто встречающиеся при других злокачественных новообразованиях варианты в *HRAS*, *NRAS*, *KRAS*). В результате секвенирования РНК у трёх пациентов была обнаружена перестройка *KIF5B::ALK*.

5. Проведённый анализ генотип-фенотипических корреляций показал, что мутация *BRAF* V600E ассоциирована с более системным течением гистиоцитоза с вовлечением органов риска, а также преобладает у пациентов с кожными поражениями.

6. Последовательная молекулярно-генетическая диагностика ГКЛ должна включать инициальное определение *BRAF* статуса (наличие или отсутствие мутации *BRAF* V600E наиболее чувствительным методом цкПЦР). В случае обнаружения мутации *BRAF* V600E, следует проводить мониторинг её аллельной нагрузки для оценки эффективности терапии. В случае *BRAF* отрицательного статуса, поиск соматического драйвера целесообразно проводить методом таргетного высокопроизводительного секвенирования с большой глубиной прочтения. При невыявлении драйверных вариантов по результатам таргетного ДНК секвенирования, дальнейший поиск можно продолжить с помощью секвенирования РНК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При первоначальной оценке статуса BRAF у пациентов с гистиоцитозом из клеток Лангерганса необходимо использовать высокочувствительные методы, такие как цифровая капельная ПЦР из-за зачастую низкого содержания мутантных клеток в образцах.

2. Жидкостная биопсия является альтернативой стандартной биопсии, что позволяет избежать инвазивных процедур. Однако, в случаях локализованных моносистемных монофокальных поражений результаты следует дополнительно верифицировать стандартной биопсией.

3. В рамках разработки новых терапевтических протоколов следует оценивать эффективность лечения с помощью мониторинга аллельной нагрузки как в сцДНК, так и в популяции миелоидных предшественников костного мозга, которые могут быть источником патологического клона.

4. Пациентам без мутации *BRAF* V600E необходимо продолжить поиск драйверной соматической мутации с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования с большой глубиной прочтения. В качестве биоматериала не рекомендуется использовать костную ткань. При анализе данных следует учитывать вероятно низкую аллельную нагрузку мутации и подтверждать истинность генетических находок либо с помощью баркодов UMI, либо альтернативными методами.

5. В случае невыявления мутации с помощью таргетного секвенирования ДНК, поиск драйверного события должен быть продолжен с помощью РНК секвенирования.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГКЛ – гистиоцитоз из клеток Лангерганса

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

МКБ – международная классификация болезней

МОБ – минимальная остаточная болезнь

мсПЦР – мутационно-специфичная ПЦР

ПКЛ – патологические клетки Лангерганса

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК –рибонуклеиновая кислота

сцДНК – свободно-циркулирующая ДНК

цкПЦР – цифровая капельная ПЦР

ЦНС – центральная нервная система

BRAF - rapidly accelerated fibrosarcoma isoform B (быстро распространяющаяся фибросаркома, изоформа B)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (база данных)

DAS - Disease Activity Score (индекс активности заболевания)

EGFR - epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста)

ЕpCAM – Epithelial cell adhesion molecule (молекула клеточной адгезии эпителия)

ERK - extracellular signal-regulated kinase (внеклеточная регулируемая сигналом киназа)

GRB2 - Growth factor receptor-bound protein 2 (связанный с рецептором фактора роста белок 2)

HS – Histiocyte Society (гистиоцитарное сообщество)

LC – Langerhans cells (клетки Лангерганса)

LCH – Langerhans cell histiocytosis (гистиоцитоз из клеток Лагерганса)

MAPK - mitogen-activated protein kinase (митоген-активируемая протеинкиназа)

mDC – myeloid dendritic cells (миелоидные дендритные клетки)

MEK – MAPK-extracellular regulated kinase (киназа митоген-активируемой протеинкиназы)

MHC - major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)

MS RO- - мультисистемные поражения без вовлечения органов риска

MS RO+ - мультисистемные с поражением органов риска

NGS – Next Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)

pDC – plasmacytoid dendritic cells (плазмацитоидные дендритные клетки)

Ras – Retrovirus Associated DNA Sequences (ретровирус-ассоциированные последовательности)

SS – моносистемные поражения

UMI - Unique Molecular Identifier (баркоды уникальных молекул)

VAF – variant allele frequency (частота альтернативного аллеля)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Румянцев, А. Г. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению гистиоцитоза из клеток Лангерганса / А. Г. Румянцев, А. А. Масчан. – 2014. – URL: (дата обращения: 07.04.2024).
2. Lipscomb, M. F. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease / M. F. Lipscomb, B. J. Masten // *Physiol Rev.* – 2002. – Vol. 82. – P. 97-130.
3. Langerhans'-Cell Histiocytosis (Histiocytosis X) -- A Clonal Proliferative Disease / C. L. Willman, L. Busque, B. B. Griffith et al. // *New England Journal of Medicine.* – 1994. – Vol. 331. – № 3. – P. 154-160.
4. Recurrent BRAF mutations in Langerhans cell histiocytosis / G. Badalian-Very, J. A. Vergilio, B. A. Degar et al. // *Blood.* – 2010. – Vol. 116. – № 11. – P. 1919-1923.
5. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. / M.-L. Berres, K. P. H. Lim, T. Peters et al. // *The Journal of experimental medicine.* – 2014. – Vol. 211. – № 4. – P. 669-683.
6. Frequent BRAFV600E mutation has no effect on tumor invasiveness in patients with Langerhans cell histiocytosis / R. Wei, Z. Wang, X. LI et al. // *Biomedical Reports.* – 2013. – Vol. 1. – № 3. – P. 365-368.
7. Harmon, C. M. Langerhans Cell Histiocytosis A Clinicopathologic Review and Molecular Pathogenetic Update / C. M. Harmon, N. Brown // *Arch Pathol Lab Med.* – 2015. – Vol. 139. – P. 1211-1214.
8. Circulating cell-free BRAFV600E as a biomarker in children with Langerhans cell histiocytosis / S. Héritier, Z. Hélias-Rodzewicz, H. Lapillonne et al. // *British Journal of Haematology.* – 2017. – Vol. 178. – № 3. – P. 457-467.
9. Bone marrow-derived myeloid progenitors as driver mutation carriers in high- And low-risk Langerhans cell histiocytosis / Y. Xiao, A. G. S. Van Halteren, X. Lei et al. // *Blood.* – 2020. – Vol. 136. – № 19. – P. 2188-2199.
10. Clinicogenomic associations in childhood Langerhans cell histiocytosis: an international cohort study / P. G. Kemps, T. C. E. Zondag, H. B. Arnardóttir et al. // *Blood Advances.* – 2023. – Vol. 7. – № 4. – P. 664-679.

11. Unraveling the Molecular Basis of Langerhans and Non-Langerhans Cell Histiocytic Neoplasms through Whole Exome Sequencing / B. Durham, J. Ma, E. Kim et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – № 21. – P. 1887-1887.
12. Hand, A. Polyuria and tuberculosis / A. Hand // *Arch Pediatr*. – 1893. – Vol. 10. – P. 673-675.
13. Hancock, P. E. Hand-Schüller-Christian Syndrome. / P. E. Hancock // *Proceedings of the Royal Society of Medicine*. – 1939. – Vol. 32. – № 11. – P. 1386-1388.
14. MacKelvie, A. A. Letterer-siwe disease / A. A. MacKelvie, W. W. Park // *Archives of Disease in Childhood*. – 1950. – Vol. 25. – № 121. – P. 93-98.
15. Lichtenstein, L. Eosinophilic granuloma of bone: With report of a case. / L. Lichtenstein, H. L. Jaffe // *The American journal of pathology*. – 1940. – Vol. 16. – № 5. – P. 595-604.3.
16. L Lichtenstein. Chondrosarcoma of bone / L Lichtenstein, H L Jaffe // *Am J Pathol*. – 1943. – Vol. 19. – № 4. – P. 553-589.
17. L. Lichtenstein. Histiocytosis X; Integration of Eosinophilic Granuloma of Bone, Letterer-Siwe Disease, and Schüller-Christian Disease as Related Manifestations of a Single Nosologic Entity / L. Lichtenstein // *AMA Arch Pathol*. – 1953. – Vol. 56. – № 1. – P. 84-102.
18. Birbeck, M. S. An Electron Microscope Study of Basal Melanocytes and High-Level Clear Cells (Langerhans Cells) in Vitiligo / M. S. Birbeck, A. S. Breathnach, J. D. Everall // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1961.
19. Nezelof, C. Histiocytosis X: Histogenetic arguments for a Langerhans cell origin / C. Nezelof, F. Basset, M. F. Rousseau // *Biomedicine*. – 1973.
20. Skin Biopsy Diagnosis of Langerhans Cell Neoplasms / J. Teruya-Feldstein, S. Sanchez-Sos. // *Skin Biopsy - Diagnosis and Treatment*. – 2013.
21. Incidence of Langerhans cell histiocytosis in children: A population-based study / H. Stålemark, E. Laurencikas, J. Karis et al. // *Pediatric Blood & Cancer*. – 2008. – Vol. 51. – № 1. – P. 76-81.
22. Langerhans cell histiocytosis in neonates / M. Minkov, H. Prosch, M. Steiner et al. // *Pediatric Blood and Cancer*. – 2005. – Vol. 45. – № 6. – P. 802-807.

23. Writing Group of the Histiocyte Society. Histiocytosis syndromes in children / Writing Group of the Histiocyte Society. // *Lancet*. – 1987. – Vol. 8526. – № 1. – P. 208-209.
24. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages / J.-F. Emile, O. Abla, S. Fraitag et al. // *Blood*. – 2016. – Vol. 127. – № 22. – P. 2673-2681.
25. Krooks, J. Langerhans cell histiocytosis in children: History, classification, pathobiology, clinical manifestations, and prognosis / J. Krooks, M. Minkov, A. G. Weatherall // *Journal of the American Academy of Dermatology*. – 2018. – Vol. 78. – № 6. – P. 1035-1044.
26. Langerhans cell histiocytosis (LCH): guidelines for diagnosis, clinical work-up, and treatment for patients till the age of 18 years. / R. Haupt, M. Minkov, I. Astigarraga et al. // *Pediatric blood & cancer*. – 2013. – Vol. 60. – № 2. – P. 175-84.
27. Mizumoto, N. CD1a and langerin: Acting as more than Langerhans cell markers / N. Mizumoto, A. Takashima // *Journal of Clinical Investigation*. – 2004.
28. Moulon, C. A potential role for CD1a molecules on human epidermal langerhans cells in allogeneic T-cell activation / C. Moulon, J. Péguet-Navarro, D. Schmitt // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1991. – Vol. 97. – № 3. – P. 524-528.
29. Valladeau, J. Langerin/CD207 Sheds Light on Formation of Birbeck Granules and Their Possible Function in Langerhans Cells / J. Valladeau, C. Dezutter-Dambuyant, S. Saeland // *Immunologic Research*. – 2003. – Vol. 28. – № 2. – P. 93-107.
30. Notch is active in Langerhans cell histiocytosis and confers pathognomonic features on dendritic cells / C. Hutter, M. Kauer, I. Simonitsch-Klupp et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 120. – № 26. – P. 5199-5208.
31. Cell(s) of Origin of Langerhans Cell Histiocytosis / M. Collin, V. Bigley, K. L. McClain, C. E. Allen // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2015. – Vol. 29. – № 5. – P. 825-838.
32. Diverse and Targetable Kinase Alterations Drive Histiocytic Neoplasms / E. L. Diamond, B. H. Durham, J. Haroche et al. // *Cancer discovery*. – 2016. – Vol. 6. – № 2. – P. 154-165.

33. Epigenomics and Single-cell Sequencing Define a Developmental Hierarchy in Langerhans Cell Histiocytosis Europe PMC Funders Group / F. Halbritter, M. Farlik, R. Schwentner et al. // *Cancer discovery*. – 2019. – Vol. 9. – № 10. – P. 1406-1421.
34. МКБ 10 - Международная классификация болезней 10-го пересмотра. – URL: <https://mkb-10.com/> (дата обращения: 23.01.2025).
35. BRAF-V600E expression in precursor versus differentiated dendritic cells defines clinically distinct LCH risk groups. / M.-L. Berres, K. P. H. Lim, T. Peters et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2014. – Vol. 211. – № 4. – P. 669-683.
36. BRAFV600E-induced senescence drives Langerhans cell histiocytosis pathophysiology / C. Bigenwald, J. Le Berichel, C. M. Wilk et al. // *Nature medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 5. – P. 851-861.
37. Evaluation and treatment of Langerhans cell histiocytosis patients with central nervous system abnormalities: Current views and new vistas / E. A. Yeh, J. Greenberg, O. Abla et al. // *Pediatric blood & cancer*. – 2018. – Vol. 65. – № 1.
38. Neuropathology of CNS disease in Langerhans cell histiocytosis / N. Grois, D. Prayer, H. Prosch, H. Lassmann // *Brain : a journal of neurology*. – 2005. – Vol. 128. – № Pt 4. – P. 829-838.
39. Circulating senescent myeloid cells infiltrate the brain and cause neurodegeneration in histiocytic disorders / C. M. Wilk, F. Cathomas, O. Török et al. // *Immunity*. – 2023. – Vol. 56. – № 12. – P. 2790.
40. Oncogene-induced senescence distinguishes indolent from aggressive forms of pulmonary and non-pulmonary Langerhans cell histiocytosis / M. Chilosi, F. Facchetti, A. Calio et al. // *Leuk. Lymphoma. Informa Healthcare*. – 2014. – Vol. 55. – № 11. – P. 2620–2626.
41. High prevalence of BRAF V600E mutations in Erdheim-Chester disease but not in other non-Langerhans cell histiocytoses / J. Haroche, F. Charlotte, L. Arnaud et al. // *Blood*. – 2012. – Vol. 120. – № 13. – P. 2700–2703.
42. BRAF V600E expression in langerhans cell histiocytosis: Clinical and immunohistochemical study on 25 pulmonary and 54 extrapulmonary cases / A.C. Roden, C. Anja, H. Xiaowen et al.// *American Journal of Surgical Pathology*. – 2014. – Vol. 38.

– № 4. – P. 548–551.

43. Масчан М. А. Молекулярно-генетическая диагностика и дифференцированная терапия гистиоцитарных пролиферативных заболеваний у детей : Дис. докт. мед. наук 14.01.08, 14.01.21 / М. А. Масчан. – Москва – 2011. – 278 с.

44. Roskoski, R. RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation / R. Roskoski // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2010. – Vol. 399. – № 3. – P. 313-317.

45. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1 / N. Zarich, J. L. Oliva, N. Martínez et al. // *Molecular Biology of the Cell*. – 2006. – Vol. 17. – № 8. – P. 3591-3597.

46. Ras activation of the Raf kinase: Tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade / J. Avruch, A. Khokhlatchev, J. M. Kyriakis et al. // *Recent Progress in Hormone Research*. – 2001. – Vol. 56. – P. 127-155.

47. BRAFV600E-induced senescence drives Langerhans cell histiocytosis pathophysiology / C. Bigenwald, J. Le Berichel, C. M. Wilk et al. // *Nature medicine*. – 2021. – Vol. 27. – № 5. – P. 851.

48. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase / R. E. Cutler, R. M. Stephens, M. R. Saracino, D. K. Morrison // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95. – № 16. – P. 9214-9219.

49. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF / P. T. C. Wan, M. J. Garnett, S. M. Roe et al. // *Cell*. – 2004. – Vol. Vol. – № 6. – P. 855-867.

50. Hanks, S. K. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1 / S. K. Hanks, T. Hunter // *The FASEB Journal*. – 1995. – Vol. 9. – № 8. – P. 576-596.

51. Dhomen, N. BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma / N. Dhomen, R. Marais // *Hematology/Oncology Clinics of North America*. – 2009. – Vol. 23. – № 3. – P. 529-545.

52. Barras, D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update / D. Barras //

Biomarkers in Cancer. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 9-12.

53. Real-time PCR-based analysis of BRAF V600E mutation in low and intermediate grade lymphomas confirms frequent occurrence in hairy cell leukaemia / M. Ewalt, S. Nandula, A. Phillips et al. // Hematological Oncology. – 2012. – Vol. 30. – № 4. – P. 190-193.

54. Giopanou, I. RAS and BRAF in the foreground for non-small cell lung cancer and colorectal cancer: Similarities and main differences for prognosis and therapies / I. Giopanou, A. Pintzas. // Critical Reviews in Oncology/Hematology. – 2020. – Vol. 146.

55. B-RAF mutant alleles associated with langerhans cell histiocytosis, a granulomatous pediatric disease / T. Satoh, A. Smith, A. Sarde et al. // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 4.

56. Identification of the V600D mutation in Exon 15 of the BRAF oncogene in congenital, benign langerhans cell histiocytosis / R. Kansal, L. Quintanilla-Martinez, V. Datta et al. // Genes Chromosomes and Cancer. – 2013. – Vol. 52. – № 1. – P. 99-106.

57. Genetic landscape of adult Langerhans cell histiocytosis with lung involvement / F. Jouenne, S. Chevret, E. Bugnet et al. // European Respiratory Journal. – 2020. – Vol. 55. – № 2.

58. High prevalence of somatic MAP2K1 mutations in BRAF V600E-negative Langerhans cell histiocytosis / N. A. Brown, L. V. Furtado, B. L. Betz et al. // Blood. – 2014. – Vol. 124. – № 10. – P. 1655-1658.

59. Novel activating BRAF fusion identifies a recurrent alternative mechanism for ERK activation in pediatric Langerhans cell histiocytosis / S. Zarnegar, B. H. Durham, P. Khattar et al. // Pediatric blood & cancer. – 2018. – Vol. 65. – № 1.

60. ALK-positive histiocytosis: a new clinicopathologic spectrum highlighting neurologic involvement and responses to ALK inhibition / P. G. Kempes, J. Picarsic, B. H. Durham et al. // Blood. – 2022. – Vol. 139. – № 2. – P. 256-280.

61. Allen, C. E. Langerhans-cell histiocytosis / C. E. Allen, M. Merad, K. L. McClain // New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 379. – № 9. – P. 856-868.

62. Molecular and clinicopathologic characterization of pediatric histiocytoses / Z.

- Hélias-Rodzewicz, J. Donadieu, N. Terrones et al. // *American Journal of Hematology*. – 2023. – Vol. 98. – № 7. – P. 1058–1069.
63. Alternative genetic mechanisms of BRAF activation in Langerhans cell histiocytosis / R. Chakraborty, T. M. Burke, O. A. Hampton et al. // *Blood*. – 2016. – Vol. 128. – № 21. – P. 2533-2537.
64. BRAF V600E Mutation: A Significant Biomarker for Prediction of Disease Relapse in Pediatric Langerhans Cell Histiocytosis / E. Ozer, A. Sevnicek, D. Ince et al. // *Pediatric and Development Pathology*. – 2019. – Vol. 22. – № 5. – P. 449–455.
65. Использование цифровой капельной полимеразной цепной реакции для молекулярной диагностики и мониторинга ответа на терапию при гистиоцитозе из клеток Лангерганса с мутацией BRAF V600E / Д.С. Осипова, Е.В. Райкина, Э.И. Людовских и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2023. – Т. 22. – № 1. – С. 12-20.
66. Solitary Langerhans cell histiocytosis of skull and spine in pediatric and adult patients / S. K. Lee, T. Y. Jung, S. Jung et al. // *Child's Nervous System*. – 2014. – Vol. 30. – № 2. – P. 271-275.
67. Использование 2-хлордеоксиаденозина в терапии пациентов с гистиоцитозом из клеток Лангерганса / Г. Солопова, Г. Новичкова, А. Масчан и др. // *Онкогематология*. – 2010. – Т. 5. – № 3. – С. 8–15.
68. Cladribine and cytarabine in refractory multisystem Langerhans cell histiocytosis: results of an international phase 2 study / J. Donadieu, F. Bernard, M. Van Noesel et al. // *Blood*. – 2015. – Vol. 126. – № 12. – P. 1415.
69. Reduced doses of cladribine and cytarabine regimen was effective and well tolerated in patients with refractory-risk multisystem Langerhans cell histiocytosis / D. A. Rosso, D. Amaral, A. Latella et al. // *British Journal of Haematology*. – 2016. – Vol. 172. – № 2. – P. 287-290.
70. BRAF Mutation Correlates With High-Risk Langerhans Cell Histiocytosis and Increased Resistance to First-Line Therapy / S. Héritier, J. F. Emile, M. A. Barkaoui et al. // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2016. – Vol. 34. – № 25. – P. 3023-3030.

71. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma / G. Bollag, P. Hirth, J. Tsai et al. // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – № 7315. – P. 596-599.
72. Dramatic efficacy of vemurafenib in both multisystemic and refractory Erdheim-Chester disease and Langerhans cell histiocytosis harboring the BRAF V600E mutation / J. Haroche, F. Cohen-Aubart, J. F. Emile et al. // *Blood*. – 2013. – Vol. 121. – № 9. – P. 1495-1500.
73. Vemurafenib for Refractory Multisystem Langerhans Cell Histiocytosis in Children: An International Observational Study. / J. Donadieu, I. A. Larabi, M. Tardieu et al. // *Journal of clinical oncology*. – 2019. – Vol. 37. – № 31. – P. 2857-2865.
74. Lineage switching of the cellular distribution of BRAFV600E in multisystem Langerhans cell histiocytosis / P. Milne, S. Bomken, O. Slater et al. // *Blood advances*. – 2023. – Vol. 7. – № 10. – P. 2171-2176.
75. Development of BRAFV600E-positive acute myeloid leukemia in a patient on long-term dabrafenib for multisystem LCH / M. Salek, N. Oak, M. Hines et al. // *Blood advances*. – 2022. – Vol. 6. – № 8. – P. 2681-2684.
76. Vemurafenib combined with cladribine and cytarabine results in durable remission of pediatric BRAF V600E-positive LCH / D. Evseev, D. Osipova, I. Kalinina et al. // *Blood Advances*. – 2023. – Vol. 7. – № 18. – P. 5246-5257.
77. The results of a study on the effectiveness and safety of treatment with vemurafenib and cytarabine/2-chloro-2'-deoxyadenosine combination in patients with Langerhans cell histiocytosis with BRAFV600E mutation / E. I. Lyudovskikh, D. A. Evseev, D. S. Osipova et al. // *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*. – 2024. – Vol. 23. – № 1. – P. 37-44.
78. Schwarzenbach, H. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients / H. Schwarzenbach, D. S. B. Hoon, K. Pantel // *Nature Reviews Cancer*. – 2011. – Vol. 11. – № 6. – P. 426-437.
79. Fragment Length of Circulating Tumor DNA / H. R. Underhill, J. O. Kitzman, S. Hellwig et al. // *PLoS Genetics*. – 2016. – Vol. 12. – № 7.
80. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and

- Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells / S. Jahr, H. Hentze, S. Englisch, et al. // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61. – №1.
81. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy / S. A. Leon, B. Shapiro, D. M. Sklaroff et. al. / *Cancer Research*. – 1977. – Vol. 37. – №3. – P. 646-450.
82. Diaz, L. A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA / L. A. Diaz, A. Bardelli // *J Clin Oncol*. – 2014. – Vol. 32. – P. 579-586.
83. Circulating cell-free BRAF V600E during chemotherapy is associated with prognosis of children with Langerhans cell histiocytosis / L. Cui, L. Zhang, H. H. Ma et al. // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105. – № 9. – P. e444.
84. Bio-Rad. Rare Mutation Detection Best Practices Guidelines / Bio-Rad. – URL: (дата обращения: 01.04.2024).
85. Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques / A. Rohlin, J. Wernersson, Y. Engwall et al. // *Human Mutation*. – 2009. – Vol. 30. – № 6. – P. 1012-1020.
86. Евроген. «Инсайдер NRAS KRAS BRAF» инструкция к применению. – URL: <https://evrogen.ru/molmed-products/Insider/Insider/> (дата обращения: 31.03.2024).
87. Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens / I. Gutiérrez-Aguirre, N. Rački, T. Dreo, M. Ravnikar // *Methods in Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 1302. – P. 331-347.
89. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция. – URL: <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia> (дата обращения: 16.04.2020).
90. Measuring Digital PCR Quality: Performance Parameters and Their Optimization / A. Lievens, S. Jacchia, D. Kagkli et al. // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 5.
91. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations / C. A. Milbury, Q. Zhong, J. Lin et al. // *Biomolecular Detection and Quantification*. – 2014. – Vol. 1. – № 1. – P. 8-22.
92. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material / L. Deprez, P. Corbisier,

- A. M. Kortekaas et al. // *Biomolecular Detection and Quantification*. – 2016. – Vol. 9. – P. 29-39.
93. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases / H. Li, R. Bai, Z. Zhao et al. // *Bioscience Reports*. – 2018. – Vol. 38. – № 6.
94. A new clinical score for disease activity in Langerhans cell histiocytosis / J. Donadieu, C. Piguet, F. Bernard et al. // *Pediatric Blood and Cancer*. – 2004. – Vol. 43. – № 7. – P. 770-776.
95. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists / M. M. Li, M. Datto, E. J. Duncavage et al. // *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. – 2017. – Vol. 19. – № 1. – P. 4-23.
96. New somatic BRAF splicing mutation in Langerhans cell histiocytosis / S. Héritier, Z. Hélias-Rodzewicz, R. Chakraborty et al. // *Molecular cancer*. – 2017. – Vol. 16. – № 1.
97. Nelson D.S. et al. MAP2K1 and MAP3K1 mutations in Langerhans cell histiocytosis // *Genes. Chromosomes Cancer*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2015. Vol. 54, № 6. P. 361–368.
98. Somatic activating ARAF mutations in Langerhans cell histiocytosis / D. S. Nelson, W. Quispel, G. Badalian-Very et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 123. – № 20. – P. 3152-3155.
99. Recurrent NRAS mutations in pulmonary Langerhans cell histiocytosis / S. Mourah, A. How-Kit, V. Meignin et al. // *The European respiratory journal*. – 2016. – Vol. 47. – № 6. – P. 1785-1796.
100. Mutually exclusive recurrent KRAS and MAP2K1 mutations in Rosai-Dorfman disease / S. Garces, L. J. Medeiros, K. P. Patel et al. // *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* – 2017. – Vol. 30. – № 10. – P. 1367-1377.
101. Genomic profiling of primary histiocytic sarcoma reveals two molecular subgroups / C. Egan, A. Nicolae, J. Lack et al. // *Haematologica*. – 2020. – Vol. 105. – № 4. – P. 951-960.

102. Common cancer-associated PIK3CA activating mutations rarely occur in Langerhans cell histiocytosis / S. Héritier, R. Saffroy, N. Radosevic-Robin et al. // *Blood*. – 2015. – Vol. 125. – № 15. – P. 2448–2449.
103. Frequent KIT mutations in skin lesions of patients with BRAF wild-type Langerhans cell histiocytosis / B. Tóth, N. Kiss, J. Hársing et al. // *Virchows Archiv*. – 2020. – Vol. 477. – № 5. – P. 749-753.
104. The effect of surgical trauma on circulating free DNA levels in cancer patients-implications for studies of circulating tumor DNA / T. V. Henriksen, T. Reinert, E. Christensen et al. // *Molecular oncology*. – 2020. – Vol. 14. – № 8. – P. 1670-1679.
105. Diaz, L. A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA / L. A. Diaz, A. Bardelli // *Journal of Clinical Oncology*. – 2014. – Vol. 32. – № 6. – P. 579.
106. Vemurafenib provides a rapid and robust clinical response in pediatric Langerhans cell histiocytosis with the BRAF V600E mutation but does not eliminate low-level minimal residual disease per ddPCR using cell-free circulating DNA / D. Evseev, I. Kalinina, E. Raykina et al. // *International Journal of Hematology*. – 2021. – Vol. 114. – № 6. – P. 725-734.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Показатели мониторинга аллельной нагрузки *BRAF V600E* в сДНК у пациентов на протоколе. (Пустые ячейки – исследование не проводилось. За 0 или негативный образец принимаются значения, оказавшиеся ниже индивидуально рассчитанного порога аналитической чувствительности)

	инициально	на 28й день приема вемурафениба	перед Ага-С+2CdA №2	перед Ага-С+2CdA №3	перед моно 2- CdA №1	перед моно 2- CdA №2	перед моно 2- CdA №3	окончание терапии по протоколу	катамнез (1 мес)	катамнез (2 мес)	катамнез (3 мес)	катамнез (6 мес)	катамнез (12 мес)
Пац-т 1 RO+	14,08	5,42	2,68	0	0	0,4	1,99	0,5	0,89	0,8	1,4	1,3	0,25
Пац-т 2 RO-	8,6	2,78	0,13	0,28	0,56	0,08	0	0	0	0	0	0	0
Пац-т 3 RO+	5,29	1,3	0,7	0,2	0	0,53	0,74	0,86	2,09	1,17	0,67	0	0,18
Пац-т 4 RO-	1,43	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
Пац-т 5 RO-	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пац-т 6 RO-	0,14	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Пац-т 7 RO+	12,41	5,78	1,12	1,35	1,18	1,49	6,29	2,33	0,81	2,5	7,79	3,18	-

Продолжение Таблицы А1													
	инициально	на 28й день приема вемурафениба	перед Ага-С+2CdA №2	перед Ага-С+2CdA №3	перед моно 2-CdA №1	перед моно 2-CdA №2	перед моно 2-CdA №3	окончание терапии по протоколу	катамнез (1 мес)	катамнез (2 мес)	катамнез (3 мес)	катамнез (6 мес)	катамнез (12 мес)
Пац-т 8 RO+	12,69	3,08	0,57	0,29	0	0	0	0	0	0	-	0	-
Пац-т 9 RO+	5,25	0,96	0	0	0,33	0,52	1,08	0,24	0,8	-	-	-	-
Пац-т 10 RO+	1,41	0,14	0	0	0	0,13	0,84	0	-	-	-	-	-
Пац-т 11 RO+	30,91	3,17	0,71	0,13	0,34	0,29	0	0	0	-	0	0	0
Пац-т 12 RO-	3,61	1,57	0,27	-	0,07	0	-	0,42	-	0	0	0	-
Пац-т 13 RO+	15,88	1,63	-	0,42	0	-	0	0	-	-	-	-	-
Пац-т 14 RO+	3,66	9,56	0,32	0,67	0,2	0,17	0,34	0,54	0,35	-	0	0	0
Пац-т 15 RO+	8,32	3,41	0,53	0,37	0,12	0,28	0,11	0	0	0	0,08	0	0
Пац-т 16 RO-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пац-т 17 RO+	3,48	0,87	1,14	1,07	0,51		1,55	1,55	0,23	-	-	-	-

Продолжение Таблицы А1

	инициально	на 28й день приема вемурафениба	перед Ага- C+2CdA №2	перед Ага- C+2CdA №3	перед моно 2- CdA №1	перед моно 2-CdA №2	перед моно 2-CdA №3	окончание терапии по протоколу	катамнез (1 мес)	катамнез (2 мес)	катамнез (3 мес)	катамнез (6 мес)	катамнез (12 мес)
Пац-г 18 RO+	14,8	0,78	0,64	0,24	0,94	0,26		0,16	0,09	0	0	0	0
Пац-г 19 RO+	12,7	0,35	-	0,35	0,39	0,41	1,05	0	-	-	0	-	-
Пац-г 20 RO+	1	0,26	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	-
Пац-г 21 RO+	4,26	4,26	0,81	0,79	-	1,52	0,84	0,84	-	-	-	-	-
Пац-г 22 RO+	0,63	1,51	0,59	0,3	0,13		0	0,22	0	0,04	0	0	0
Пац-г 23 RO+	5,31	1,08	0,29	0	0,28	0	0	0	-	-	-	-	-
Пац-г 24 RO-	0,11	0,11	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
Пац-г 25 RO+	0,56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Пац-г 26 RO+	5,47	1,85	0,16	0,15	0	0	0,13	0	0	0	-	-	-
Пац-г 27 RO+	12,81	6,1	0,39	0,07	0	0	0	0	-	-	-	-	-

Продолжение Таблицы А1													
	инициально	на 28й день приема вемурафениба	перед Ага-С+2СdА №2	перед Ага-С+2СdА №3	перед моно 2-СdА №1	перед моно 2-СdА №2	перед моно 2-СdА №3	окончание терапии по протоколу	катамнез (1 мес)	катамнез (2 мес)	катамнез (3 мес)	катамнез (6 мес)	катамнез (12 мес)
Пац-г 28 RO-	1,4	0,59	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Пац-г 29 RO+	6,05	1,27	0,63	0	0,6	0	0,57	0	-	-	-	-	-
Пац-г 30 RO+	7,28	1,12	0	-	1,24	-	-	0	-	-	-	-	-

Таблица А2 – Показатели мониторинга аллельной нагрузки в популяции миелоидных предшественников у пациентов на протоколе. (Пустые ячейки – исследование не проводилось). За 0 или негативный образец принимаются значения, оказавшиеся ниже индивидуально рассчитанного порога аналитической чувствительности

	Инициально	Перед моно 2-CdA №1	Окончание терапии по протоколу
Пац-т 1	4,84	0	0
Пац-т 2	0,98	0,1	0
Пац-т 3	0,1	0,03	0,07
Пац-т 4	0	0	0
Пац-т 5	0,1	0	0
Пац-т 6	0	-	-
Пац-т 7	1,81	0,2	1,03
Пац-т 8	0,79	0	0
Пац-т 9	0,6	0	0
Пац-т 10	0	0	0
Пац-т 11	1,77	0	0
Пац-т 12	0,61	0,02	0,02
Пац-т 13	0,87	0	0,01
Пац-т 14		0,06	0,05
Пац-т 15	3,49	0	0
Пац-т 16	0	0	0
Пац-т 17	1,13	0,02	0,03
Пац-т 18	0,68	0	0
Пац-т 19	-	0,05	-
Пац-т 20	0,43	0	-
Пац-т 21	2,18	-	-
Пац-т 22	0,42	0	0
Пац-т 23	0,04	0	-
Пац-т 24	0	0	-
Пац-т 25	0,03	0	-
Пац-т 26	1,28	0	-

Продолжение Таблицы А2			
	Инициально	Перед моно 2-CdA №1	Окончание терапии по протоколу
Пац-г 27	7,54	0	-
Пац-г 28	0,15	0	-
Пац-г 29	0,43	0,03	0,03
Пац-г 30	3,55	0	-