

## ПАСПОРТ ПРОЕКТА

<b>НАЗВАНИЕ ПРОЕКТА:</b> Инновационные протокол лечения острых миелоидных лейкозов у детей		
<b>ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ПРОЕКТА:</b> 7 лет	<b>ДАТА НАЧАЛА:</b> 2016	<b>ДАТА ЗАВЕРШЕНИЯ:</b> 2023
<p><b>1. АННОТАЦИЯ ПРОЕКТА</b> Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) составляет 20% от всех острых лейкозов детей, заболеваемость составляет 0,5-0,7 на 100 тыс. детского населения в год. В России ежегодно ОМЛ диагностируется приблизительно у 170 детей. Причиной развития ОМЛ являются многоэтапные кооперирующие патогенные мутации в гемопоэтических клетках-предшественниках разного уровня зрелости, результатом которых является появление клона злокачественных аналогов миелоидных предшественников, характеризующегося неконтролируемой пролиферацией и прекращением линейно-специфичной гематологической дифференцировки. ОМЛ является не одним, а большой группой заболеваний, клиническая гетерогенность которых и чувствительность к тому или иному виду химиотерапии обусловлена разнообразием цитогенетических, молекулярно-биологических, метаболических и иммунологических характеристик лейкемических клеток. Анализ этих характеристик лежит в основе современной диагностики и классификации ОМЛ и, отчасти, дифференцированной терапии заболевания. Современные программы терапии ОМЛ основаны на применении интенсивной полихимиотерапии (ПХТ) и проведении аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) для пациентов группы высокого риска и, в отдельных ситуациях, для групп стандартного и промежуточного риска и зависят от биологических свойств лейкемических клеток и ответа на стандартную терапию. Единого протокола терапии ОМЛ у детей в РФ не существовало до 2018 года, когда специалистами НМИЦ ДГОИ был разработан и внедрен в клиническую практику протокол терапии ОМЛ – ОМЛ-MRD-2018. В настоящее время 51 клиника из 45 субъектов РФ участвует в данном проекте. Благодаря проведению инициальной диагностики в полном объеме всем пациентам с ОМЛ на базе НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева пациенты разделены на три группы (стандартного, промежуточного и высокого риска) и получают адаптированную терапию согласно группе риска.</p>		
<b>2. ЦЕЛЬ и ЗАДАЧИ ПРОЕКТА</b>		
<b>2.1. Цель</b> улучшить выживаемость детей с ОМЛ с помощью применения риск-адаптированной интенсивной химиотерапии и ранней аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток в зависимости от инициального цитогенетического/молекулярно-генетического риска и эффективности химиотерапии на основании минимальной резидуальной болезни после 2-х курсов терапии.		
<b>2.2. Задачи проекта</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Первичная (инициальная) диагностика ОМЛ согласно международным критериям с внедрением современных методов генетической диагностики (использование технологии NGS) для определения группы риска и выбора терапии</li><li>2. Обеспечение логистики био-образцов в НМИЦ ДГОИ в декретированные протоколом терапии сроки для инициального исследования и для мониторинга терапии</li></ol>		

3. Разработать своевременную маршрутизацию пациентов высокого риска в трансплантационные центры
4. Изучить спектр патогенных мутаций у детей с ОМЛ путем прямого секвенирования «кастомных панелей» генов (методом NGS)
5. Оценить эффективность и безопасность терапии по протоколу ОМЛ-MRD-2018 результаты выполнения терапии в федеральных и региональных клиниках

### **3. ЗНАЧИМОСТЬ ПРОЕКТА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ и ОБЩЕСТВА**

Современная генетическая диагностика ОМЛ позволит глубже понять профиль генетических поломок, приводящих к возникновению и развитию данного заболевания. Точная диагностика на старте терапии позволит отнести пациента в одну из групп риска и провести терапию согласно данному риску с или без проведения ТГСК, что позволит увеличить общую выживаемость детей с ОМЛ. Разработан протокол терапии и маршрутизации пациентов с ОМЛ, обеспечивающий тотальную доступность современной химиотерапии и аллогенной ТГСК. Показана необходимость дальнейшего усовершенствования прогностических систем на основе композитных критериев, включающих как инициальные данные, так и ответ на специфическую химиотерапию. Создана электронная база данных для проведения проспективного исследования.

#### **3.1. Ожидаемые результаты**

Внедрен новый современный риск адаптированный протокол терапии ОМЛ у детей в рамках – проспективного мультицентрового исследования – ОМЛ-MRD-2018. Мы ожидаем увеличение общей выживаемости пациентов с ОМЛ до 80-90% за счет своевременного начала риск-адаптивной терапии и проведения ТГСК в декретированные сроки для пациентов группы высокого риска.

### **5. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ (ИНТЕРВЕНЦИЙ) В ПРОЕКТЕ**

#### **5.1. Краткое описание методов**

##### **1. СТАНДАРТНОЕ КАРИОТИПИРОВАНИЕ и FISH**

Образцы костного мозга культивируют в среде RPMI-1640 с добавлением 20% телячьей эмбриональной сыворотки и 0,6% глутамин. Для остановки деления клеток на стадии метафазы используют инкубацию с колхицином. Далее клетки фиксируют и окрашивают красителем Райта. Метафазные хромосомы описывают согласно международной цитогенетической номенклатуре (ISCN-2020). Для подтверждения значимых для ОМЛ хромосомных aberrаций используют метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Транслокации оценивают с зондами к обоим генам-партнерам (абберантные хромосомы несут слитные сигналы). Для генов, имеющих несколько партнёров, используют зонды на разрыв. Для анализа используют суспензию ядер, зафиксированную для карiotипирования, либо мазки костного мозга; подсчитывают не менее 200 ядер.

##### **2. МЕТОД ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ-ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ОТ-ПЦР) в РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

Для анализа экспрессии химерных транскриптов, в том числе для мониторинга минимальной остаточной болезни, проводят полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Из клеток костного мозга выделяют РНК, проводят обратную транскрипцию и ПЦР с системами праймеров и проб к исследуемым химерным транскриптам. В реакцию включают позитивный и негативный контроли. Для оценки качества материала используют экспрессию контрольного гена ABL. В работу берут материал с экспрессией контрольного гена ABL не менее 10 тыс. копий в реакцию.

Количественную оценку копийности транскриптов проводят по коммерческим калибровочным стандартам и с нормализацией на экспрессию контрольного гена.

### **3. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ И ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ**

Для анализа мутаций в генах, значимых для миелоидных неоплазий, проводят секвенирование по Сэнгеру (для однонуклеотидных замен) и фрагментный анализ (для небольших делеций-инсерций). Из клеток костного мозга выделяют ДНК и проводят ПЦР-амплификацию исследуемого участка гена. Для секвенирования по Сэнгеру полученный ПЦР-продукт используют как матрицу для реакции с терминирующими дидезоксинуклеотидами, полученные фрагменты разделяют капиллярным электрофорезом в растворе. Для фрагментного анализа (ФА) исследуемый участок амплифицируют с праймером, конъюгированным с флуорофором, и определяют его размер капиллярным электрофорезом в растворе с высокой точностью. ФА служит для определения внутренних tandemных дупликаций в гене FLT3, являющихся важным прогностическим молекулярным маркером при ОМЛ, определения инсерций/делеций в гене GATA1.

### **4. NGS**

(ВПС, высокопроизводительное секвенирование), также называемое секвенированием следующего поколения, является новейшим методом для определения спектра мутаций. ВПС - это молекулярно-генетический метод, включающий несколько этапов: выделение и нормализацию ДНК, подготовку библиотеки ампликонов, собственно секвенирование на приборе Miseq (Illumina) по методу SBS (от sequencing by synthesis – секвенирование путем синтеза. В основе метода подготовки библиотеки ампликонов – полимеразно-цепная реакция (ПЦР), индексирование образцов для мультиплексирования и очистка и селекция ПЦР-продуктов на магнитных частицах. ВПС позволяет в короткие сроки проанализировать большое количество генов, участвующих в патогенезе ОМЛ, за счет глубины секвенирования позволяет выявить соматические мутации с низкой частотой варианта.

### **5. Методом цветной проточной цитометрии**

Для иммунофенотипирования костного мозга Диагностическое исследование профиля экспрессии антигенов позволяет как подтвердить диагноз ОМЛ, так и оценить aberrации иммунофенотипа, которые в дальнейшем используются для мониторинга МОБ.

### **5.2. Подразделения и учреждения, на базе которых будут проводиться работы по проекту в соединении с этапами проекта**

Все инициальные исследования – морфологическое, цитогенетическое, молекулярно-генетическое, иммунофенотипирование клеток костного мозга, а также определение минимальной резидуальной болезни (MRD) – выполняются в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России в рамках протокола ОМЛ-MRD-2018. Терапия пациентов проводится в 51 клинике из 45 регионов РФ, участвующих в данном исследовании, ТГСК проводится в 7 трансплантационных центрах.

Отделение детской гематологии/онкологии, боксированное отделение, отделение гематологии/онкологии старшего возраста и нейроонкологии, отделения ТГСК1 и ТГСК2 – НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, г. Москва; отделение детской онкологии №2 на базе ОДКБ, г. Екатеринбург. Центры участники протокола.

### **5.4. Группа реализации проекта (обоснование ролей и выбора научных сотрудников, привлекаемых для выполнения работ)**

ФИО сотрудника	Роль в проекте	Зона ответственности
Масчан А.А.	Главный исследователь	Своевременное выполнение всех этапов проекта

Новичкова Г.А.	Главный исследователь	Своевременное выполнение всех этапов проекта
Калинина И.И.	Со-исследователь, координатор протокола ОМЛ-MRD-2018	Связь с центрами участниками, маршрутизация пациентов в трансплантационные центры, анализ результатов исследования
Венёв Д.А.	Со-исследователь, координатор протокола ОМЛ-MRD-2018	Внесение данных в базу, анализ
Воронин К.А.	Статистик, IT-специалист	Разработка и поддержка программного обеспечения базы данных для протокола ОМЛ-MRD-2018
Савченкова Ю.В.	Логист протокола ОМЛ-MRD-2018	Маршрутизация био-образцов

**5.6. График реализации проекта** (в разрезе лет, этапов с указанием длительности этапов и наименованием этапов. В таблицу можно добавить строки при необходимости)

Год	Название этапа
2016-2018	программа «Первичная диагностика ОМЛ в РФ»
2018-2021	Протокол – ОМЛ-MRD-2018 - «Проспективное нерандомизированное многоцентровое клиническое исследование эффективности дифференцированной интенсивной химиотерапии трансплантации гемопоэтических стволовых клеток у пациентов до 18 лет с острым миелоидным лейкозом на основании значений минимальной детектируемой болезни» Доклады и обсуждения промежуточных результатов на профессиональных сообществах и конференциях
2022-2023	Анализ полученных результатов проведенного исследования, публикации

**Резюме**

ОМЛ злокачественное заболевание системы крови, которое встречается у детей очень редко. Современная терапия включает проведение 3-4-х курсов интенсивной ПХТ и ТГСК для группы высокого риска рецидива. Распределение пациентов на группы риска проводится в момент установления диагноза по совокупности проведенного генетического анализа, а также после оценки результатов терапии после двух курсов химиотерапии. На базе НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачёва был разработан и внедрен в практику протокол терапии ОМЛ-MRD-2018, применяемый в 52 клиниках РФ. Особенности протокола являются распределение пациентов на группы риска развития рецидива по данным проведенного обследования в дебюте заболевания всеми возможными современными методами исследования, а также для пациентов, плохо отвечающих на два курса химиотерапии, предусмотрен перевод в группу высокого риска с последующим проведением ТГСК. Благодаря точному распределению на группы риска дети получают адаптированную химиотерапию и при необходимости ТГСК. Отработана логистика реципиентов на ТГСК в трансплантационные центры в декретированные протоколом сроки. Также неоспорим вклад в изучение биологии самого заболевания на

основании проведенных генетических исследований, что в будущем возможно позволит применять таргетные препараты для лечения ОМЛ.

**Избранные публикации:**

- 1) Результаты терапии детей с острым миелоидным лейкозом и инициальным гиперлейкоцитозом по протоколу ОМЛ-ММ-2006  
Калинина И.И., Захаров Н.В., Венёв Д.А., Салимова Т.Ю., Петрова У.Н., Горонкова О.В., Байдильдина Д.Д., Сунцова Е.В., Садовская М.Н., Евсеев Д.А., Матвеев В.Е., Антонова К.С., Хамин И.Г., Дубровина М.Э., Ольшанская Ю.В., Зеркаленкова Е.А., Манджиева А.И., Балашов Д.Н., Шелихова Л.Н., Масчан М.А., Новичкова Г.А., Масчан А.А.  
Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии 2020. Том 19. №1, стр 9-17 <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2020-19-1-9-17>
- 2) Венёв Д.А., Калинина И.И., Салимова Т.Ю., Евсеев Д.А., Матвеев В.Е., Антонова К.С., Петрова У.Н., Байдильдина Д.Д., Новичкова Г.А., Масчан М.А., Масчан А.А. Результаты использования кладрибина у детей с острым миелоидным лейкозом при лечении по протоколу ОМЛ-ММ-2006. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2021;20(1):40-45. <https://doi.org/10.24287/1726-1708-2021-20-1-40-45>
- 3) Игнатова А.К., Калинина И.И., Венёв Д.А., Салимова Т.Ю., Евсеев Д.А., Садовская М.Н., Горонкова О.В., Матвеев В.Е., Петрова У.Н., Антонова К.С., Байдильдина Д.Д., Дубровная М.Э., Конюхова Т.В., Ольшанская Ю.В., Абрамов Д.С., Масчан М.А., Новичкова Г.А., Масчан А.А. Клинические особенности и прогностическая значимость экстрамедуллярного поражения у детей с острым миелоидным лейкозом. *Онкогематология*. 2021;16(1):10-22. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2021-16-1-10-22>
- 4) Учебное пособие. Диагностика и лечение острого миелоидного лейкоза у детей. Москва, 2021
- 5) I. Kalinina, O. Goronkova, D. Evseev, T. Salimova, Y. Olshanskaya, E. Zerkalenkova, M. Maschan, G. Novichkova, A. Maschan. HYPERLEUKOCYTOSIS IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA: A SINGLE-CENTER EXPERIENCE.  
Acute Leukemias XVII, Annals of Hematology, Volume 98, Supplement 1. Feb 2019, Poster №84.

**БЮДЖЕТ ПРОЕКТА,**

**50 млн руб. в год**

**СО-РУКОВОДИТЕЛИ****СО-РУКОВОДИТЕЛЬ 1**

ФИО: А. А. Масчан

Научные звания: д.м.н., профессор

Место работы: директор Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий  
НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева,Структурное подразделение по месту работы: НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева,  
Институт гематологии, иммунологии и клеточных технологий

Должность: заместитель генерального директора НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

**СО-РУКОВОДИТЕЛЬ 2**

ФИО: Г.А Новичкова

Научные звания: профессор

Место работы: НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

Структурное подразделение по месту работы: НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

Должность: генеральный директор

Телефон:

E-mail:

**СО-РУКОВОДИТЕЛЬ 3**

ФИО: И. И. Калинина

Научные звания:

Место работы: МИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева

Структурное подразделение по месту работы:

Должность: врач-гематолог

Телефон: 84952876570 доб 7425

E-mail: Irina.Kalinina@fccho-moscow.ru

РУКОВОДИТЕЛИ ПРОЕКТА

А. А. Масчан (  )Г. А. Новичкова (  )И. И. Калинина (  )