

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОБЛАСТНОМ ЛЕЙКОЗЕ**¹К. Т. Бобоев, ²С. К. Эгамова, ¹Н. Р. Латипова**¹Республиканский специализированный научный – практический медицинский центр гематологии МЗ РУз., Ташкент, Узбекистан²Бухарский государственный медицинский институт, Бухара, Узбекистан**Ключевые слова:** острый миелобластный лейкоз, биомаркеры, генные мутации, экспрессия белка.**Таянч сўзлар:** ўткир миелобластли лейкоз, биомаркерлар, ген мутациялари, оксиллар экспрессияси.**Keywords:** acute myeloid leukemia, biomarkers, gene mutations, protein expression.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным острым лейкозом у взрослых. Патофизиология этого заболевания только начинает пониматься на клеточном и молекулярном уровне, и в настоящее время цитогенетические маркеры являются наиболее важными для риска стратификации и лечения больных ОМЛ. Однако с появлением новых технологий, обнаружение других молекулярных маркеров, таких как точечные мутации, указывает на то, что болезнь приближается. Последние данные показывают, что выявление новых биомаркеров ОМЛ способствуют лучшему пониманию молекулярной основы заболевания, значительно полезны при скрининге, диагностике, прогнозировании и мониторинге ОМЛ, а также как возможность прогнозирования реакции каждого человека на лечение. Этот обзор обобщает наиболее важные молекулярные (генетические, эпигенетические и белковые) биомаркеры связаны с острым миелобластным лейкозом и обсуждает их клиническое значение с точки зрения прогнозирования рисков, диагностики и прогноза.

ЎТКИР МИЕЛОБЛАСТЛИ ЛЕЙКОЗДА МОЛЕКУЛЯР БИОМАРКЕРЛАР**¹Қ. Т. Бобоев, ²С. Қ. Эгамова, ¹Н. Р. Латипова**¹Ўз Республика ССВ Республика ихтисослаштирилган гематология илмий – амалий тиббиёт маркази, Тошкент, Ўзбекистон²Бухоро давлат тиббиёт институти, Бухоро, Ўзбекистон

Ўткир миелобластли лейкоз (ЎМЛ) энг кўп катталарда учрайдиган ўткир лейкоз ҳисобланади. Ушбу касалликнинг патофизиологияси хужайра ва молекуляр даражада ўрганила бошланди ва ҳозирги вақтда цитогенетик маркерлар ЎМЛ билан касалланиш хавфини аниқлаш ва даволаш учун энг муҳим диагностик усулдир. Бироқ янги технологияларнинг пайдо бўлиши билан бошқа молекуляр маркерлар, масалан, нуктали мутацияларнинг кашф этилиши касалликни эрта аниқлашда ёрдам бермоқда. Олинган маълумотлар шуни кўрсатдики, ЎМЛ учун янги биомаркерларни аниқлаш касалликнинг молекуляр асосларини яхшироқ тушунишга ёрдам беради, скрининг, диагностика ва кузатишда, шунингдек ҳар бир инсоннинг даволанишга жавобини прогноз қилишда аҳамиятга эга. Ушбу шарҳда ЎМЛ билан бўлган энг муҳим молекуляр (генетик, эпигенетик ва оксил) биомаркерлар сарҳисоб қилинади ва уларнинг клиник аҳамиятини диагностик ва прогнозлаш нуктаи назаридан муҳокама қилинади.

MOLECULAR BIOMARKERS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA**¹K. T. Boboev, ²S. K. Egamova, ¹N. R. Latipova**¹Republican specialized scientific - practical medical center of hematology, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan²Bukhara state medical Institute, Bukhara, Uzbekistan

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia in adults. The pathophysiology of this disease is only beginning to be understood at the cellular and molecular level, and cytogenetic markers are currently the most important for risk stratification and treatment of AML patients. However, with the advent of new technologies, the discovery of other molecular markers, such as point mutations, indicates that the disease is approaching. Recent data show that the identification of new biomarkers for AML contributes to a better understanding of the molecular basis of the disease, is significantly useful in screening, diagnosis, prognosis and monitoring of AML, as well as the ability to predict the response of each person to treatment. This review summarizes the most important molecular (genetic, epigenetic, and proteinaceous) biomarkers associated with acute myeloid leukemia and discusses their clinical relevance in terms of risk prediction, diagnosis, and prognosis.

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой злокачественное клональное заболевание, характеризующееся изменениями и низким производством здоровых кроветворных клеток; эти изменения подавляют дифференцировку клеток и вызывают пролиферацию или накопление бластов [7]. Диагностика ОМЛ основана на анализе костного мозга и периферической крови. Конкретный диагноз подтверждается иммунофенотипированием и

цитохимией, поиск активности миелопероксидазы в blastax или по иммунофенотипированию поверхности типа молекул, таких как CD123, CD45, CD34, CD38 и др. [5]. Из-за генетического происхождения заболевания, есть некоторые общие цитогенетические нарушения, которые часто встречаются в ОМЛ, такие как t (8; 21), t (15; 17), инверсия 16, трисомия 8 и удаление частей или всех хромосом 5 или 7. У некоторых пациентов обычно обнаруживаются хромосомные транслокации, связанные с перестройками критических областей протоонкогенов, которые генерируют аномальный гибридный белок—это обычно фактор транскрипции или белок, участвующий во внутриклеточном росте клеток и пути передачи сигналов дифференцировки, что, в свою очередь, увеличивает вероятность злокачественного преобразования. Некоторыми примерами мутированных генов являются основной связывающий фактор, ретиноевая кислота рецептор- α (RAR- α), семейство генов HOX, MLL, среди других. Другие онкоген-активирующие мутации это те, которые влияют на FLT3, KIT, N-RAS, FES, FOS, GATA-1, JUN B, MPL, MYC, p53, PU.1, RB, WT1, WNT, NPM1 и CEPBA [8]. Несмотря на обширные исследования, которые были проведены для поиска прогностических биомаркеров, ОМЛ все еще остается проблемой. Заболевание с очень изменчивым прогнозом и высокой смертностью: 5-летняя общая выживаемость меньше 50%, а у пожилых пациентов только 20% выживают через 2 года после постановки диагноза [7]. В настоящее время, цитогенетические результаты и молекулярные аномалии при диагностике считаются наиболее важными прогностическими факторами и позволяют прогнозировать частоту полной ремиссии, безрецидивную выживаемость, риск рецидива и общей выживаемости [1]. В текущих клинических руководствах по ОМЛ выделяются три группы: цитогенетического риска: благоприятный, средний и низкий риск [1]. В группу благоприятного риска входят пациенты с любой из следующих аномалий: t (8; 21), t (15; 17), inv (16) и t (16), а также пациенты с нормальной цитогенетикой, сопровождающиеся мутацией NPM1 при отсутствии FLT3-ITD или изолированная двуаллельная мутация CEPBA [1,2]. У этих пациентов полная ремиссия. Показатель более 90%, а общая выживаемость 60%. В группу низкого риска входят следующие аномалии кариотипа: inv (3), t (3; 3), t (6; 9), -5, 5q-, -7, 7q- или сложные кариотипы. В эту группу входят также пациенты с нормальной цитогенетикой с мутацией FLT3-ITD. Эти пациенты имеют высокую частоту резистентности к лечению во время индукционной химиотерапии, с повышенной вероятностью рецидива, а также низкая безрецидивная выживаемость и общая выживаемость, в диапазоне от 5-15%. Последняя группа пациентов, самая многочисленная (около 45% взрослых пациентов с ОМЛ), имеет нормальный кариотип и считаются подверженными промежуточному риску. Оптимальные терапевтические стратегии для этих пациентов все еще в значительной степени неясны и исход лечения неоднороден. Молекулярная стратификация риска для этой последней группы может быть возможна посредством молекулярного анализа генов, таких как NPM1, FLT3, MLL и CEPBA, а также изменений в уровнях экспрессии BAALC, MN1, ERG и AF1q [1]. Недавно Pavaamani и соавторы опубликовали исследование, в котором участвовало больше чем 1500 пациентов с ОМЛ. Они секвенировали 111 важных генов в патофизиологии болезни и смогли определить новую систему классификации для ОМЛ, основанную на наличии определенных мутаций соматических драйверов [6]. Эта геномная классификация не только доказала влияние на прогноз, но также включает 85% пациентов по сравнению с только 52% с текущая классификацией ВОЗ. Эта система классификации имеет важные клинические последствия; как есть основанный на фундаментальных мутациях, вызывающих заболевание, он гораздо более точен как потенциальный инструмент для стратификации риска. Наконец, существуют новые методы лечения, которые нацелены на определенные генетические дефекты. Выявление этих генетических дефектов позволяет проводить эффективное индивидуальное лечение различных подтипов ОМЛ [6]. Некоторые из генов, в которых были идентифицированы мутации, и которые коррелируют с патофизиологическими процессами при ОМЛ или могут иметь прогностическое значение. Хромосомные перестройки в 11q23 связаны с педиатрической, взрослой и терапевтической связанными лейко-

зами и привело к открытию гена лейкемии смешанного происхождения (MLL). MLL или Смешанная Линейная Лейкемия - это гистоновая метилтрансфераза, которая играет роль в эпигенетической регуляции транскрипции, и имеет решающее значение для эмбрионального развития и кроветворения. Этот ген принадлежит к семейству триторакс-группы, которая участвует в метилировании гистона H3 на остатке лизина 4 (H3K4), что связано с положительной регуляцией экспрессии генов. MLL - это большой мультидоменный белок, широко распространенный, который экспрессируется в гемопоэтических клетках, включая стволовые и прогениторные популяции. Текущие данные свидетельствуют о том, что, хотя MLL имеет домены, которые могут напрямую связывать ДНК, это взаимодействие может также происходить через взаимодействия с другими ДНК-связывающими белками, такими как менин. Ген MLL оказывает лейкемогенный эффект только после слияния с широким спектром генов-партнеров, включая AF4, AF9, ENL, AF10 и ELL. Слияния MLL составляют > 70% острых лимфолейкозов (ОЛЛ) у детей и от 35 до 50% острого миелоидного лейкоза у детей (ОМЛ). В целом, пациенты с перестройками MLL имеют плохой прогноз и обрабатываются в соответствии с протоколами высокого риска, однако это может варьироваться в зависимости от транслокационного партнера [7]. Базовый фактор связывания (CBF) ОМЛ цитогенетически характеризуется как t(8; 21), так и inv(16) / t(16; 16), которые генерируют слитые гены RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO) и CBFBMYH11 соответственно [8]. CBF-AML является одним из наиболее распространенных цитогенетических подтипов ОМЛ, так как t(8; 21) и inv(16) вместе составляют около 15–20% взрослых новых случаев ОМЛ, преимущественно у молодых пациентов. Острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ) составляет 10–15% острого миелоидного лейкоза. t(15; 17) (q24; q21), который кодирует слитый белок под названием PML-RARA, является отличительной чертой ОПЛ, и присутствует примерно в 98% случаев [9]. Ген RARA отображается в 17q21 и кодирует рецептор, принадлежащий ядерному гормону суперсемейства рецепторов, которое активирует транскрипцию в присутствии своего лиганда, ретиноевой кислоты (RA), чтобы вызвать много генов-мишеней, участвующих в дифференцировке. Белок RARA образует гетеродимер с RXRA (белок рецептора ретиноида X), чтобы сформировать транскрипцию активатор, связывающий RARE (элементы ответа на ретиноевую кислоту) [8].

FLT3 - это мембранно-связанный рецептор с внутренним тирозинкиназным доменом, экспрессируемый в гемопоэтических клетках-предшественниках, которые регулируют дифференцировку и пролиферацию этих клеток. FLT3 существует в мономерном, нефосфорилированном состоянии. Когда рецептор связывается с FLT-лиганд (FL), рецептор подвергается гомодимеризации. Это димеризация рецептора активирует домен тирозинкиназы, что приводит к фосфорилированию различных сайтов в внутриклеточный домен, который, в свою очередь, вызывает набор и активацию некоторых белков, приводя к каскаду реакций фосфорилирования, которые завершаются активацией путей передачи сигнала киназы MAP, STAT и АКТ / PI3. FLT3-ITD наблюдается примерно у 30-40% больных ОМЛ. Несколько исследований показали, что мутации FLT3 тесно связаны с плохим прогнозом и более высоким числом бластов у пациентов с ОМЛ, предполагая, что эти мутации участвуют в прогрессировании заболевания.

Нуклеофосмин (NPM1) представляет собой белок-шаперон, который перемещается между ядром и цитоплазмой, и участвует в нескольких функциях, таких как сборка рибосомного белка и транспорт, контроль удвоения центросомы и регуляция опухолевого супрессора ARF. Мутации NPM называют мутациями NPM1c и вызывают изменения в C-концевой области белка. Это предотвращает правильное складывание и изменяет его ядершковую локализацию. Мутации NPM1c приводят к цитоплазматической неправильной локализации обоих мутант и белка WT. Это изменение в субклеточном расположении нарушает нормальные NPM1 функции, включая неправильную локализацию и стабилизацию критических белков, таких как Регулятор TP53 p14ARF и приводит к трансформации [1,11]. Молекулярные изменения этого гена присутствуют с высокой частотой в ОМЛ пациенты, в

пределах 25-53%, чаще встречаются у пациентов с нормальным кариотипом (между 46-67%). Большинство исследований показывают, что мутации NPM1 положительно влияют на исход пациентов с ОМЛ, только если они не связаны с мутациями FLT3-ITD. Эта группа пациентов демонстрирует полную ремиссию примерно в 85% случаев, без признаков заболелания выживаемость от 50 до 60%, а общая выживаемость около 50%. Эти статистические данные выше, чем у пациентов с сопутствующими мутациями NPM1 и FLT3- ITD.

Подобно мутациям NPM1, генетические изменения SEBPА (связывание ССААТ / энхансера белок альфа) также, по-видимому, коррелируют с улучшенным прогнозом. SEBPА кодирует транскрипционный фактор, который ингибирует пролиферацию и поэтому считается опухолевым супрессором гена. В кроветворной ткани SEBPА экспрессируется исключительно в миеломоноцитарных клетках. Мутации в этом гене были зарегистрированы у 7-11% пациентов с ОМЛ, из которых примерно 45% имеют одну мутацию SEBPА и 55% имеют двойную мутацию SEBPА. У пациентов с двойной мутацией мало риск мутации FLT3 / ITD и является взаимоисключающим с мутацией NPM1. SEBPА группа пациентов с двойной мутацией имеет лучшую общую выживаемость в 8 лет, по сравнению с те с одиночной мутацией, или те, которые имеют дикий тип. Это преимущество теряется в присутствии FLT3 / ITD [2,5].

Ген TP53 кодирует белок, называемый опухолевым белком p53. Это ДНК-связывающий белок который действует как супрессор опухолей. Он реагирует на различные клеточные стрессы, чтобы вызвать остановку клеточного цикла, апоптоз и восстановление ДНК. При ОМЛ большинство мутаций TP53 связано с изменениями отдельных нуклеотидов, из которых переходы (65,9%) встречаются чаще, чем трансверсии (34,1%). Миссенс мутации являются наиболее частыми, сопровождаемые сдвигом кадров и бессмысленными мутациями. Переделка TP53 самый важный прогностический фактор при остром миелобластном лейкозе со сложным кариотипом (СК-ОМЛ), который включает множественные неродственные цитогенетические аномалии в одном кариотипе. Исследование с использованием мутационного скрининга TP53 и геномных профилирований у 234 пациентов с СК-ОМЛ, мутации TP53 обнаружены в 60% случаев и потеря TP53 у 40% пациентов. Мутации TP53 также чаще встречаются при остром миелоидном лейкозе, связанном с лечением, чем при болезни de novo. Тем не менее, кажется, что цитотоксическая терапия не вызывает непосредственно мутации TP53. Недавно Вонг и его коллеги секвенировали геномы 22 пациентов связаны с терапией ОМЛ и показал, что общее количество соматических одонуклеотидных вариантов p53 и процент трансверсий, связанных с химиотерапией, были аналогичны таковым с de novo ОМЛ. В заключение, изменения в TP53 являются показателем плохого прогноза как для СК-ОМЛ, так и для связанных с терапией ОМЛ. Пациенты с изменениями TP53, как правило, старше и демонстрируют значительно ниже показатели полной ремиссии, худшие, без событий, без рецидивов, и в целом выживание [11].

Гены ДНК-метилтрансферазы 3 (DNMT3A и DNMT3B) кодируют метилтрансферазы, которые катализируют присоединение метильной группы к цитозинового остатку динуклеотида CpG; поэтому они играют важную роль в метилировании ДНК и регуляции молчания генов процессы. Функция DNMT3A участвует в обновлении гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и миелоидной дифференцировки. Мутации DNMT3A обнаруживаются при миелоидных злокачественных новообразованиях. Последние данные обнаружили регуляторную роль DNMT3A в ткани тропизма и ограничение размножения миелоидных предшественников in vivo [4]. Мутации DNMT3A присутствуют в прелейкемических ГСК и это считается ранним событием в ОМЛ, в противном случае эти мутации могут сохраняться в предшественниках CD34 + и зрелых клетках.

Гены IDH1 и IDH2 кодируют НАДФ-зависимую изоцитратдегидрогеназу, расположенную в цитозоль и митохондрии соответственно. Они катализируют декарбоксилирование изоцитрата в альфа-кетоглутарат в цикле лимонной кислоты; этот альфа-кетоглутарат используется белками ТЕТ при деметилировании гистонов. Все мутации IDH1 / 2 являются

гетерозиготными и обычно воздействуют на аргинин, присутствующий в каталитическом процессе фермента; аргинин 132 в IDH1 и аргинин 140 или 172 в IDH2. Мутантные ферменты приобретают неоморфную функцию, способную преобразовывать альфа-кетоглутарат в 2-гидроксиглутарат, который является предполагаемым онкометаболитом, и ингибирует активность TET2 [4]. Анализ экспрессии генов образцы мутанта ОМЛ IDH1 / 2 также продемонстрировал, что 77% (23/30) оцененных генов были репрессированы, что согласуется с наблюдаемым гиперметилированием необходимости разработки и стандартизации методов, которые могут выявить эти изменения в стандартных скрининговых тестах на ОМЛ [4].

TET (Ten-Eleven translocation) белки связаны с функцией деметилирования ДНК путем превращения 5-метилцитозина (5мс) в 5-гидроксиметилцитозин (5 мкс), с последующей заменой 5-формилцитозина на 5-карбоксилцитозин и окончательной стадией деметилирования с помощью ДНК-гликозилаз-опосредованной эксцизионной репарации. Мутации в белки TET1 и TET2 сообщаются при различных миелоидных злокачественных новообразованиях. TET1 является активированной при лейкемии с перестройкой MLL и недавно была обнаружена онкогенная роль TET1. Мутации TET2 являются взаимоисключающими с мутациями IDH1 / 2 и приводят к аномальной гематопозитической дифференцировке. Кроме того, мутации TET2 вызывают нарушение процесса миелоидной дифференцировки, и связаны с пониженным уровнем 5 мкс, предполагая критическую роль этого белка в трансформации миелоида. Недавние исследования показали, что инактивация TET2 присутствует в предлейкозных ГСК у человека и связано с клональной экспансией, поэтому является ранним событием лейкемогенеза.

Выводы. Таким образом, в будущем, трехсторонний подход, включающий генетическую, эпигенетическую и протеомную перспективы помогут создать более полную картину основных патофизиологических процессов, вовлеченных в заболевание, и, следовательно, приведут к выявлению различных типов потенциальных биомаркеров, которые можно комбинировать для значительного улучшения диагностики, прогноз или мониторинг острого миелоидного лейкоза, а также облегчение принятия решений и сокращение расходов на здравоохранение.

Использованная литература:

1. Dawson M.A., Gudgin E.J. - Recurrent mutations, including NPM1c, activate a BRD4-dependent core transcriptional program in acute myeloid leukemia - *Leukemia* – 2014-28(2)-p-311–20.
2. Green C.L., Koo K.K. - Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. - *J Clin Oncol* -2010-28(16)-2739–p-47.
3. Lu C., Ward P.S.- IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation - *Nature* 2012- 483(7390) – p -474.
4. Mayle A., Yang L. - DNMT3 a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation - *Blood* - 2015;125(4)- p - 629–38.
5. Mosna F., Gottardi M.- Modeling of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia - *Stem Cells Int* – 2016.
6. Papaemmanuil E., Gerstung M. - Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia - *N Engl J Med* – 2016- p-358
7. Parikh S.A., Jabbour E. - Adult Acute Myeloid Leukemia Adult Acute Myeloid Leukemia" Introduction Epidemiology, Etiology, and Risk Factors - *MD Anderson Manual of Medical Oncology* -2014 – p-1–8.
8. Ponnusamy K., Kohrs N. - RUNX1/ETO blocks selectin-mediated adhesion via epigenetic silencing of PSGL-1 – *Oncogenesis* – 2015-p -146.
9. Shigeto S., Matsuda K. - Rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia with the PML-RARA fusion gene using a combination of droplet-reverse transcription-polymerase chain reaction and instant-quality fluorescence in situ hybridization - *Clin Chim Acta* – 2016-453- p -38–41.
10. Volpe G., Clarke M. - Regulation of the FLT3 Gene in Haematopoietic Stem and Early Progenitor - *Cells. PLoS One* – 2015-10(9) – p- 257-260.
11. Wong T.N., Ramsingh G.- Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia - *Nature* – 2015- 518(7540) - p -552.