

## МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## MYELOID TUMORS

### Прогностическое значение и корреляция динамики гиперэкспрессии гена *WT1* и мутации гена *NPM1* у пациентов с острым миелобластным лейкозом

### Prognostic Value and Correlation Between *WT1* Overexpression and *NPM1* Mutation in Patients with Acute Myeloblastic Leukemia

Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Е.Г. Овсянникова, С.О. Кузин, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммоева, В.В. Иванов, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Ю.В. Миролюбова, Т.С. Никулина, Ю.А. Алексева, А.Ю. Зарицкий

LL Girshova, IG Budaeva, EG Ovsyannikova, SO Kuzin, DV Motorin, RSh Badaev, DB Zammoeva, VV Ivanov, KV Bogdanov, OS Pisotskaya, YuV Mirolyubova, TS Nikulina, YuA Alekseeva, AYu Zaritskii

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

#### РЕФЕРАТ

#### ABSTRACT

**Актуальность.** Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) с мутацией *NPM1* составляет 30 % всех ОМЛ и характеризуется благоприятным прогнозом, за исключением случаев с мутацией *FLT3-ITD*. Несмотря на благоприятный прогноз, вероятность развития рецидивов у пациентов с мутацией *NPM1* может принципиально отличаться. В связи с этим все большую актуальность приобретает возможность оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) на фоне программной химиотерапии и на этапе последующего наблюдения. Такой подход позволит прогнозировать чувствительность опухолевого клона к химиотерапии.

**Background.** Acute myeloblastic leukemia (AML) with *NPM1* mutation amounts to 30 % of all AML and is characterized by good prognosis with the exception of cases with *FLT3-ITD* mutation. Despite the good prognosis, the likelihood of relapses in patients with *NPM1* mutation may significantly differ. Thus, the estimation of the minimal residual disease (MRD) after chemotherapy and during follow-up is becoming increasingly important. This approach will make it possible to predict the sensitivity of a tumoral clone to chemotherapy.

**Aim.** To evaluate the prognostic value of highly specific marker (*NPM1* mutation) and non-specific marker (*WT1* overexpression) of MRD, as well as to identify the correlation between the levels of *NPM1* and *WT1* at different stages of therapy and in the follow-up period.

**Цель.** Оценить результаты использования высокоспецифичного (мутации *NPM1*) и более универсального неспецифичного (гиперэкспрессия гена *WT1*) маркеров для оценки МОБ, а также выявить корреляцию в динамике изменений уровней *NPM1* и *WT1* на разных этапах терапии и после ее окончания в период наблюдения.

**Materials & Methods.** The research included 14 patients with AML. All patients had the *NPM1* mutation and *WT1* overexpression: 50 % of patients had additional molecular markers (*BAALC* overexpression, *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, and *MLL* mutations). Real-time PCR was used for long-term monitoring of *WT1* expression levels and *NPM1* mutation.

**Материалы и методы.** В исследование включено 14 пациентов с ОМЛ. У всех больных имели место мутация *NPM1* и гиперэкспрессия гена *WT1*. У 50 % пациентов обнаруживались дополнительные молекулярные маркеры (гиперэкспрессия *BAALC*, мутации *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, *MLL*). Представлен длительный мониторинг уровней гиперэкспрессии *WT1* и мутации *NPM1* методом ПЦР в режиме реального времени.

**Results.** The median decrease of *NPM1* levels after the induction therapy was 3 log. All patients had relapses, *NPM1* mutation, and lower rates of OS/RFS, which significantly correlated with prognostically negative molecular markers. There were no statistically significant differences in RFS in groups with the decrease of *WT1* expression level < 2 log and ≥ 2 log on day 28 of treatment. At the same time, the decrease of *WT1* expression by > 2 log was associated with significant differences in early relapses, which correlated with the decrease of *NPM1* levels (≥ and < than 3 log) is revealed. RFS rates were higher in patients with *WT1* expression level of < 100 per 10<sup>4</sup> copies *ABL* on day 28 and *WT1* of < 250 per 10<sup>4</sup> copies *ABL* on day 14 of treatment. *WT1* expression was significantly lower on days 14 and 28 in patients with *NPM1* decrease of ≥ 3 log on day 28. The decrease in *WT1* expres-

**Результаты.** Медиана редукции уровня *NPM1* после индукционной терапии составила 3 log. У всех пациентов данной группы развились рецидивы, присутствовала мутация *NPM1*, отмечались более низкие показатели общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ), что статистически значимо коррелирует с наличием прогностически неблагоприятных молекулярных маркеров. Не отмечено статистически значимых различий БРВ в группах с редукцией уровня экспрессии *WT1* < или ≥ 2 log

на 28-й день лечения. В то же время при редукции уровня экспрессии *WT1*  $\geq 2$  log выявлена статистически значимая разница в развитии раннего рецидива в зависимости от уровня снижения *NPM1* ( $\geq$  или  $< 3$  log). БРВ была более долгосрочной у пациентов с уровнем экспрессии *WT1*  $< 100/10^4$  копий *ABL* на 28-й день и *WT1*  $< 250/10^4$  копий *ABL* на 14-й день от начала терапии. Уровень экспрессии *WT1* был значительно ниже на 14-й и 28-й дни у пациентов с редукцией *NPM1*  $\geq 3$  log на 28-й день. Снижение экспрессии *WT1*  $< 100/10^4$  копий *ABL* на 28-й день чаще встречалось у пациентов с изолированной мутацией *NPM1* в отличие от больных с дополнительными неблагоприятными молекулярными маркерами.

**Заключение.** Уровень редукции *NPM1* после индукционной терапии может служить достоверным предиктором, влияющим на показатели БРВ и ОВ. Выявлена корреляция между степенью редукции *NPM1* и наличием дополнительных молекулярных маркеров. При сравнении универсального (гиперэкспрессия *WT1*) и высокоспецифичного (мутация *NPM1*) маркеров *NPM1* оказался более чувствительным маркером. В работе подтверждено прогностическое значение более низкого порогового уровня *WT1* на 28-й день лечения ( $100/10^4$  копий *ABL*) и впервые показано влияние на результаты терапии ранней оценки редукции экспрессии *WT1* на 14-й день индукционного курса.

**Ключевые слова:** острый миелобластный лейкоз, ОМЛ, *NPM1*, *WT1*, молекулярный мониторинг.

**Получено:** 22 февраля 2017 г.

**Принято в печать:** 26 мая 2017 г.

*Для переписки:* Ирина Гармаевна Будаева, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(931)351-07-06; e-mail: irina2005179@mail.ru

*Для цитирования:* Гиршова Л.Л., Будаева И.Г., Овсянникова Е.Г. и др. Прогностическое значение и корреляция динамики гиперэкспрессии гена *WT1* и мутации гена *NPM1* у пациентов с острым миелобластным лейкозом. Клиническая онкогематология. 2017;10(4):485–93.

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-485-493

sion of  $< 100$  per  $10^4$  copies *ABL* on day 28 was more common in patients with isolated *NPM1* mutation, compared to patients with additional negative molecular markers.

**Conclusion.** The decrease in *NPM1* levels after the induction therapy may serve as reliable prognostic marker of RFS and OS rates. New correlation between the degree of *NPM1* reduction and the presence of additional molecular markers was established. Highly specific (*NPM1* mutation) was shown to be more specific compared to non-specific markers (*WT1* overexpression). The research showed the predictive value of a lower limit level of *WT1* on day 28 of treatment ( $100$  per  $10^4$  copies *ABL*), and for the first time, the importance of the early assessment *WT1* expression reduction on day 14 of induction therapy.

**Keywords:** acute myeloblastic leukemia, AML, *NPM1*, *WT1*, molecular monitoring.

**Received:** February 22, 2017

**Accepted:** May 26, 2017

*For correspondence:* Irina Garmaevna Budaeva, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(931)351-07-06; e-mail: irina2005179@mail.ru

*For citation:* Girshova LL, Budaeva IG, Ovsyannikova EG, et al. Prognostic Value and Correlation Between *WT1* Overexpression and *NPM1* Mutation in Patients with Acute Myeloblastic Leukemia. Clinical oncohematology. 2017;10(4):485–93 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-485-493

## ВВЕДЕНИЕ

Биологическая гетерогенность острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) в сочетании с факторами риска, связанными с пациентом (возраст, тяжесть сопутствующих заболеваний, наличие предшествующего миелолипролиферативного заболевания или цитостатической терапии), обуславливают кардинальные отличия ответа на проводимую стандартную химиотерапию. Применяемые в настоящее время модели прогнозирования рисков преимущественно основаны на оценке кариотипа и выявлении молекулярных мутаций в дебюте заболевания. Созданная на этом основании цитогенетическая стратификация по группам риска позволяет прогнозировать вероятность достижения ремиссии и длительность ответа на терапию [1–2].

Однако отмечаемая в рамках отдельных цитогенетических групп риска вариабельность результатов терапии служит основанием для дальнейшего поиска

дополнительных факторов прогноза с целью обеспечить более персонализированную оценку риска. В связи с этим все большую актуальность приобретает возможность оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) на фоне программной химиотерапии и этапе последующего наблюдения, позволяющая прогнозировать чувствительность к химиопрепаратам опухолевого клона [3].

Существующие различные методы оценки МОБ, включая традиционную световую микроскопию, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), цитогенетические исследования (стандартное кариотипирование), мультипараметрическую проточную цитометрию, количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (ОТ-ПЦР) и секвенирование следующего поколения, различаются по чувствительности и специфичности [4]. Варианты количественной ПЦР, в частности ОТ-ПЦР, благодаря высокой чувствительности и надежности имеют преимущество перед

другими методами, поскольку они более надежны и могут быть легко стандартизованы. Более того, количественный анализ позволяет оценить повышение или понижение уровня экспрессии исследуемого гена в динамике. Эта методика была стандартизована при изучении нескольких молекулярных маркеров для клинической реализации в рамках программы Eurocore Against Cancer (EAC) [5], в т. ч. для количественной оценки гиперэкспрессии генов.

Одним из активно изучаемых маркеров оценки объема опухолевой массы ОМЛ является гиперэкспрессия гена *WT1*, выявляемая у 70–90 % больных ОМЛ в дебюте заболевания [6–8]. Ген *WT1* является транскрипционным фактором, локализуется на хромосомном участке 11p13 и экспрессируется в различных клетках, в т. ч. и нормальных клетках костного мозга (преимущественно CD34+) [9]. Согласно международным рекомендациям, пороговый уровень *WT1* стандартизован и составляет 250/10<sup>4</sup> копий *ABL* в костном мозге и 50/10<sup>4</sup> копий *ABL* в периферической крови [10]. В то же время опубликованы данные нескольких исследовательских групп, указывающие на потенциальное увеличение чувствительности при снижении порогового значения уровня экспрессии *WT1* (диапазон 90–170/10<sup>4</sup> копий *ABL*) [10–13]. Показано, что сохранение уровня экспрессии *WT1* выше порогового значения, а также редукция уровня *WT1* < 2 log ко времени достижения полной ремиссии коррелируют с высоким риском рецидива ОМЛ. Экспрессия гена *WT1* широко используется в качестве универсального маркера оценки опухолевой массы у пациентов с ОМЛ без специфических аномалий. Однако вопрос о чувствительности *WT1* как маркера МОБ в присутствии высокоспецифичных для лейкозного клона молекулярных аномалий (в т. ч. мутации *NPM1*) в настоящее время остается спорным.

Мутации гена *NPM1* — одни из наиболее частых генетических аномалий и определяются в 25–30 % всех ОМЛ и в 60–85 % ОМЛ с нормальным кариотипом [14, 15]. Ген *NPM1* локализуется на длинном плече хромосомы 5 в участке q35 [16]. *NPM1* представляет собой цитоплазматический белок с локализацией в ядрышке [17, 18]. Описано более 50 видов мутаций *NPM1*, но наиболее частой (80 %) является тип А — результат дупликации тетрауклеотида (TCTG) в положении 956–959 [15–19]. ОМЛ с мутацией *NPM1* характеризуется высоким уровнем бластных клеток в костном мозге [20], повышением активности лактатдегидрогеназы [21], гиперлейкоцитозом, отсутствием экспрессии CD34 [22], представлен чаще вариантом М4-М5 по FAB-классификации [23]. Согласно международным рекомендациям, он относится к благоприятной группе риска, за исключением вариантов сочетания с мутацией *FLT3*<sup>high</sup>. Последняя, в свою очередь, встречается в 30–40 % случаев ОМЛ с мутацией *NPM1* [2, 24, 25]. Несколько реже мутации *NPM1* сопутствуют мутации *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1* [26], гиперэкспрессия гена *BAALC* [27], экспрессия CD200 [28, 29] (рис. 1).

У 80 % и более больных ОМЛ с мутацией *NPM1* на фоне стандартной индукционной терапии достигаются полные ремиссии. Ответ длительно сохраняется при проведении консолидации цитарабином в вы-

соких дозах. Тем не менее более чем у 40 % из них в дальнейшем все же развиваются рецидивы, включая группу *NPM1/FLT3wt* [30].

Проведение аллогенной трансплантации костного мозга (аллоТКМ) в первой ремиссии не приводит к улучшению показателей общей выживаемости [31, 32]. Важное прогностическое значение имеет оценка уровня редукции *NPM1* после курса индукционной терапии. Однако оптимальный уровень к настоящему времени не определен. Значения в разных источниках варьируют от 3 до 5 log [14, 30, 33]. В настоящее время большинство исследователей рассматривают *NPM1* как высокоспецифичный [34–36] и стабильный маркер оценки МОБ [14, 37–41]. Тем не менее в отдельных наблюдениях отмечается утрата экспрессии мутации *NPM1* при рецидивах ОМЛ, что ставит под сомнение ее использование для мониторинга эффективности терапии. Так, в исследовании С. Papadaki и соавт. у 2 (9,5 %) из 21 пациента при рецидиве отсутствовал клон с мутацией *NPM1* [42].

Таким образом, стратегия по оценке МОБ остается не до конца определенной. С одной стороны, существует возможность мониторинга остаточной опухоли с помощью высокоспецифичных для ОМЛ маркеров, но с риском утраты ранее идентифицированного клона при рецидивах, с другой — оценка МОБ по универсальному [6–8], но менее специфичному уровню экспрессии *WT1* [43, 44] с допущением вероятности ложноотрицательного результата.

**Цель исследования** — оценить эффективность использования высокоспецифичного маркера *NPM1* и неспецифичного *WT1* для определения МОБ. Выявить корреляцию в динамике изменения уровней *NPM1* и *WT1* на разных этапах терапии и последующего наблюдения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с 2010 по 2017 г. в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России в исследование включено 14 пациентов (7 мужчин и 7 женщин) с диагнозом ОМЛ с мутацией *NPM1* и гиперэкспрессией *WT1* в возрасте 29–66 лет (медиана 49 лет). У 13 (92,9 %) пациентов был выявлен тип А мутации *NPM1*, у 1 — тип D.

Диагноз ОМЛ был установлен на основании стандартных цитологических и молекулярно-генетических исследований. Молекулярно-генетические исследования в дебюте заболевания, оценка достижения ремиссии и развития рецидивов проводились согласно критериям ELN в 2010 и 2017 гг. [16].

Мониторинг МОБ осуществлялся у 13 пациентов (у 1 — ремиссия не достигнута).

Характеристика пациентов приведена в табл. 1. Из 14 пациентов 7 (50 %) находились на лечении с впервые диагностированным ОМЛ, 7 (50 %) — с рецидивом заболевания.

Дополнительные молекулярно-генетические аномалии имелись у 7 пациентов. У 2 (28,5 %) больных выявлена гиперэкспрессия *BAALC* (> 4000/10<sup>4</sup> копий *ABL*), у 1 (14,2 %) — *MLL*, у 1 (14,2 %) — *DNMT3A* и у 3 (43,1 %) — *FLT3-ITD*. У всех пациентов отмечалась гиперэкспрессия *WT1*.



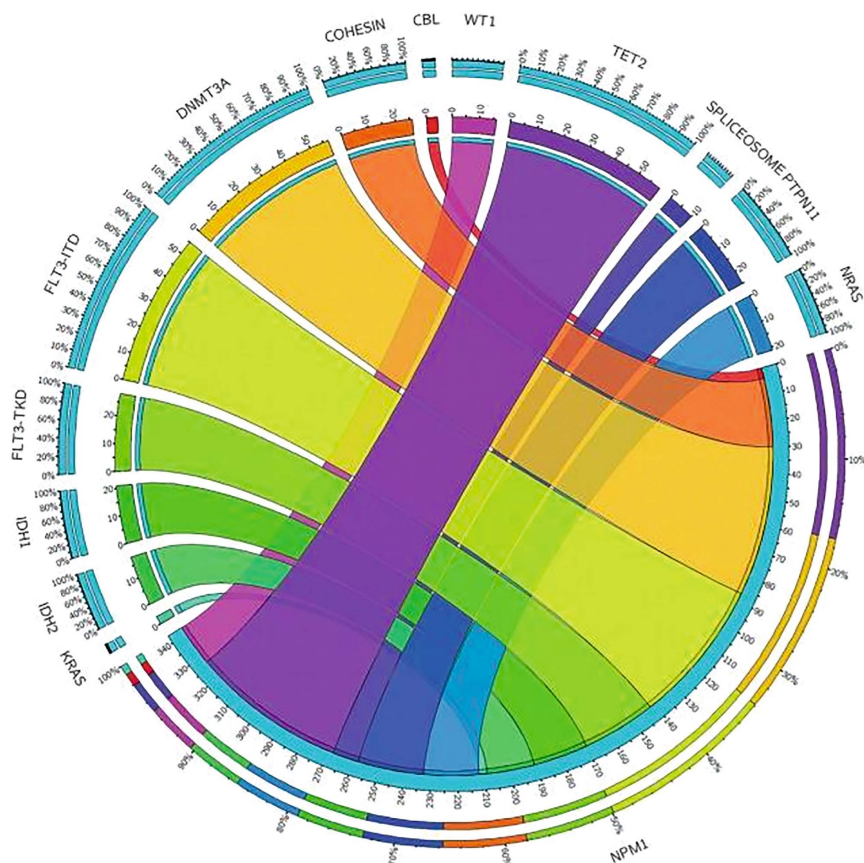


Рис. 1. Круговая диаграмма мутационного статуса группы пациентов с острым миелобластным лейкозом с мутацией *NPM1* (цит. по [26])

Fig. 1. Pie chart of mutations in patients with acute myeloblastic leukemia with *NPM1* mutation (from Ref. [26])

Медиана значений мутации *NPM1* составляла 612/копий *ABL* × 100 % (диапазон 174–9371,4/копий *ABL* × 100 %), *WT1* — 6714/10<sup>4</sup> копий *ABL* (диапазон 1078–14473/10<sup>4</sup> копий *ABL*).

В качестве индукции ремиссии пациентам проводилась стандартная химиотерапия в режиме «7+3», консолидация в режиме HDAC. При рецидивах назначалась терапия в режиме FLAG.

В дальнейшем аллоТКМ была выполнена 7 пациентам: 3 (42,9 %) — в первой ремиссии ОМЛ, 4 (57,1 %) — при рецидивах.

Чувствительность методики была определена после тестирования известных положительных образцов с пониженной экспрессией гена-мишени, которая составила 10,2 копии *NPM1*, что приблизительно соответствовало 0,008 нормализованной копии *NPM1* на 100 копий *ABL*. Для выделения РНК использовали набор реактивов QIAmp RNA kit (Qiagen). Количественный анализ экспрессии *WT1* проводили согласно стандартному протоколу, разработанному группой исследователей ЕАС с использованием набора реактивов ProfileQuant и термоциклера Rotor-Gene 6000. Верхняя граница нормальной экспрессии в костном мозге не превышала 250/10<sup>4</sup> копий *ABL*.

Статистическая обработка данных и построение кривых осуществлялись с использованием прикладных программ GraphPad Prism 6, SPSS 16.0 для Windows. Сравнительный анализ данных проводился путем построения таблиц сопряженности. Статистически значимыми считались различия с  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Полные ремиссии достигнуты у 13 (92,8 %) из 14 пациентов с ОМЛ, включенных в исследование. У 5 (38,5 %) из 13 пациентов с полной ремиссией в последующем диагностирован костномозговой рецидив. У всех больных при рецидивах ОМЛ выявлены те же мутации, что и ко времени установления диагноза. Медиана уровня редукции *NPM1* после курса индукционной терапии составила 3 log (диапазон 1–6 log). При редукции уровня *NPM1* ≥ 3 log показатели безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ) были статистически значимо лучше в сравнении с группой больных с редукцией уровня *NPM1* < 3 log ( $p = 0,0037$  и  $p = 0,0017$  соответственно) (рис. 2). В группах с редукцией более и менее 3 log медиана ОВ составила 53 и 6 мес. соответственно, БРВ — медиана не достигнута и 6 мес. соответственно.

Снижение уровня *NPM1* < 3 log статистически значимо коррелирует с наличием дополнительных молекулярных маркеров (83,3 vs 0 %;  $p = 0,0129$ ). В данной группе ранний рецидив (в течение 6 мес. после констатации полной ремиссии) развился у всех пациентов (100 vs 12,5 %;  $p = 0,016$ ). Наличие дополнительных молекулярных маркеров статистически значимо ухудшало показатели ОВ и БРВ ( $p = 0,0015$  и  $p = 0,0043$ ) (рис. 3).

Медиана уровня редукции *WT1* на 14-й день терапии составила 1 log, на 28-й день — 2 log (диапазон

Таблица 1. Характеристика пациентов

Пациент №	Пол	Возраст, лет	Статус	Гиперлейкоцитоз	CD34	<i>WT1</i> , копии/10 <sup>4</sup> копий <i>ABL</i>	<i>NPM1</i> , копии/ <i>ABL</i> × 100 %	Дополнительные молекулярные маркеры	Кариотип	Экстрamedулярные поражения
1	Ж	66	Первичный	-	-	14 479	663,9	-	46,XX	-
2	Ж	54	Первичный	+	-	6900	612	-	46,XX	-
3	М	58	Первичный	+	+	14 363	2127	<i>FLT3-ITD</i>	46,XY	-
4	М	46	Первичный	+	-	2565	375,2	<i>FLT3-ITD</i>	46,XY	+
5	Ж	61	Рецидив	-	-	1708	1396	<i>BAALC</i>	46,XX	-
6	М	49	Рецидив	+	-	9371	238,8	-	46,XY	-
7	М	64	Первичный	-	-	4652	620,7	-	46,XY	-
8	Ж	29	Первичный	+	-	1795	2037	<i>FLT3-ITD, DNMT3A</i>	46,XX	+
9	М	32	Первичный	-	-	910	524,8	-	46,XY	+
10	М	42	Рецидив	-	-	13 184	2283	<i>MLL</i>	46,XY, del(2)(p21)	+
11	Ж	42	Рецидив	+	+	12 585	391	-	46-47,XX, -8, add(9)(p22), -16, +mar1, mar2, mar3(12)	-
12	Ж	36	Рецидив	-	-	6950	381	-	46,XX	+
13	М	38	Первичный	-	-	2955,4	399	-	46,XY	-
14	Ж	55	Первичный	-	+	6529	557,9	<i>BAALC</i>	Нет роста	-

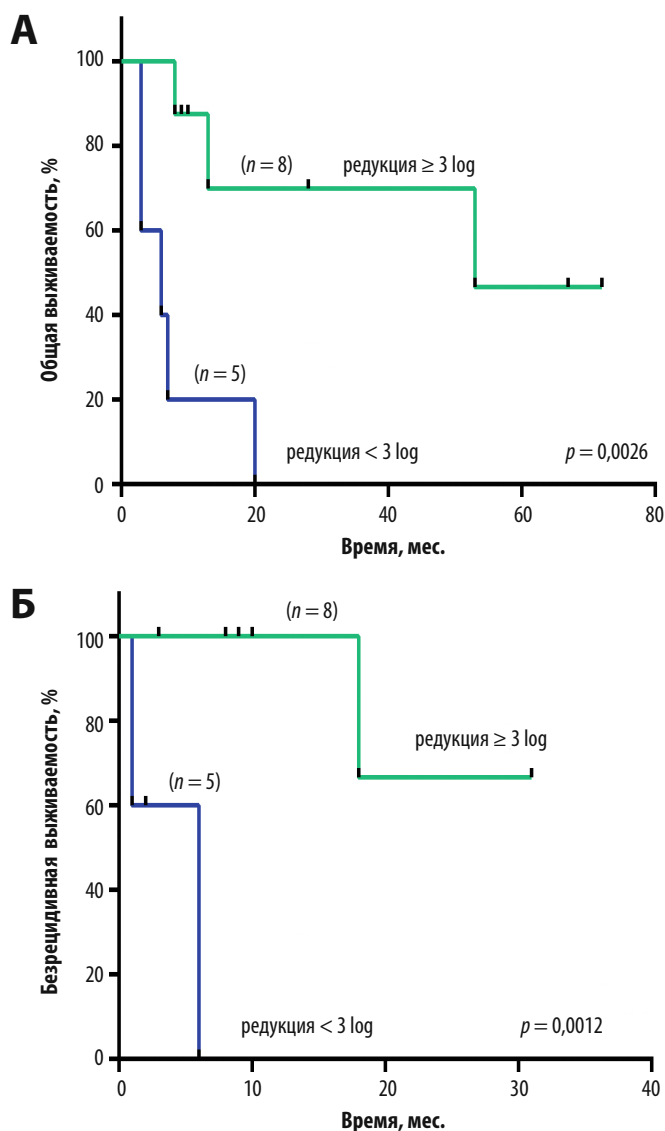


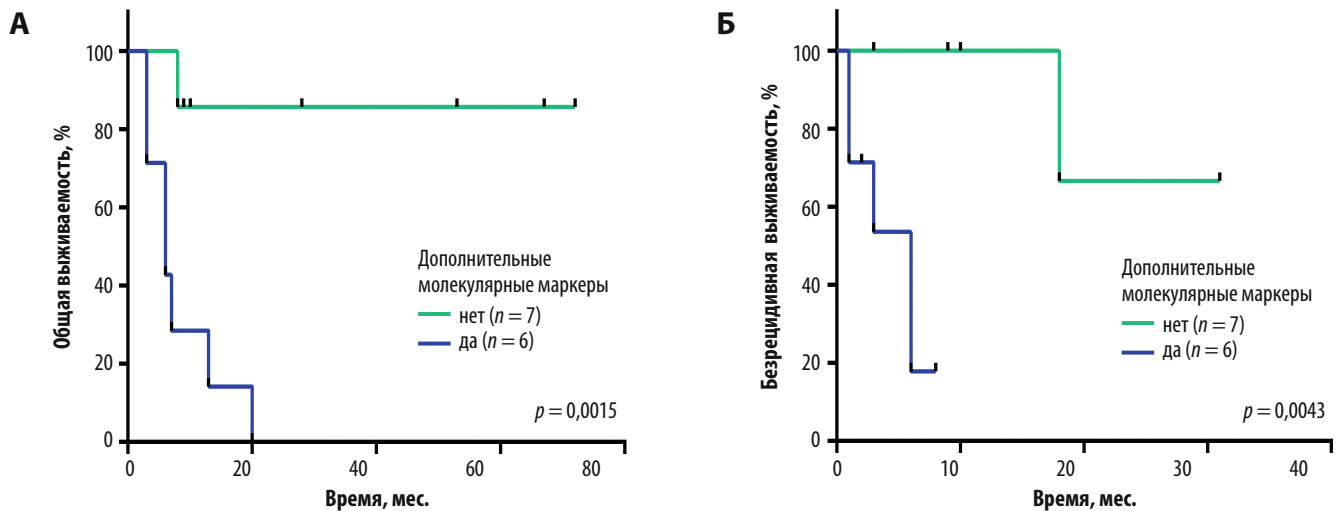
Рис. 2. Общая и безрецидивная выживаемость в группах с редукцией уровня *NPM1* ≥ или < 3 log

Fig. 2. Overall and relapse-free survival in groups with the decrease in *NPM1* of ≥ 3 log and < 3 log

1–3 log). Не отмечено существенных различий БРВ при снижении уровня *WT1* на 2 log и достижении нормальных значений на 28-й день. Однако БРВ была статистически значимо выше при уровне *WT1* < 100/10<sup>4</sup> копий *ABL* (80 vs 0 %; *p* = 0,02) на 28-й день и < 250/10<sup>4</sup> копий *ABL* на 14-й день (83,3 vs 33,3 %; *p* = 0,006) (рис. 4).

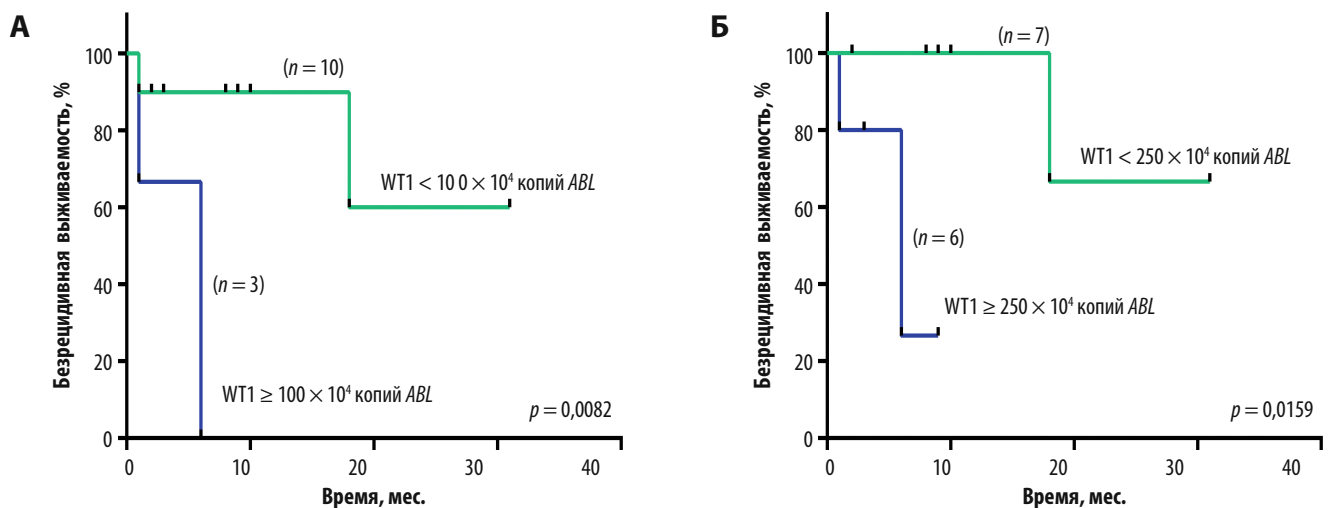
Средний уровень *WT1* был значительно ниже на 14-й и 28-й дни у пациентов с редукцией уровня *NPM1* ≥ 3 log на 28-й день (232,96 vs 1131,87/10<sup>4</sup> копий *ABL*, *p* < 0,05 и 40,75 vs 860,33/10<sup>4</sup> копий *ABL*, *p* < 0,05). Снижение экспрессии *WT1* < 100/10<sup>4</sup> копий *ABL* на 28-й день чаще встречалось у пациентов с изолированной мутацией *NPM1* в отличие от пациентов с дополнительными молекулярными маркерами (72,7 vs 27,3 %; *p* = 0,006).

Редукция уровня экспрессии *WT1* ≥ 2 log после курса индукции отмечалась у 71 % пациентов. Не отмечено статистически значимых различий БРВ в группах с редукцией уровня экспрессии *WT1* < или > 2 log на 28-й день индукционной терапии.



**Рис. 3.** Общая и безрецидивная выживаемость в группах с наличием или отсутствием дополнительных молекулярных маркеров (гиперэкспрессия *BAALC*, мутации *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, *MLL*)

**Fig. 3.** Overall and relapse-free survival in groups with or without additional molecular markers (*BAALC* overexpression, mutations *FLT3-ITD*, *DNMT3A* and *MLL*)



**Рис. 4.** Безрецидивная выживаемость пациентов в группах с различным уровнем экспрессии *WT1* на 14-й и 28-й дни индукционной терапии

**Fig. 4.** Relapse-free survival of patients with different levels of *WT1* expression on days 14 and 28

При этом у пациентов с редукцией уровня экспрессии *WT1*  $\geq 2$  log выявлена статистически значимая разница в сроке развития раннего рецидива в группах с различным уровнем снижения *NPM1* ( $\geq$  или  $< 3$  log). У всех пациентов с редукцией *WT1*  $\geq 2$  log и *NPM1*  $< 3$  log развились ранние рецидивы. В то же время ни у одного пациента со снижением *WT1*  $\geq 2$  log и *NPM1*  $\geq 3$  log не зарегистрировано рецидивов в течение 6 мес. ( $p = 0,04$ ).

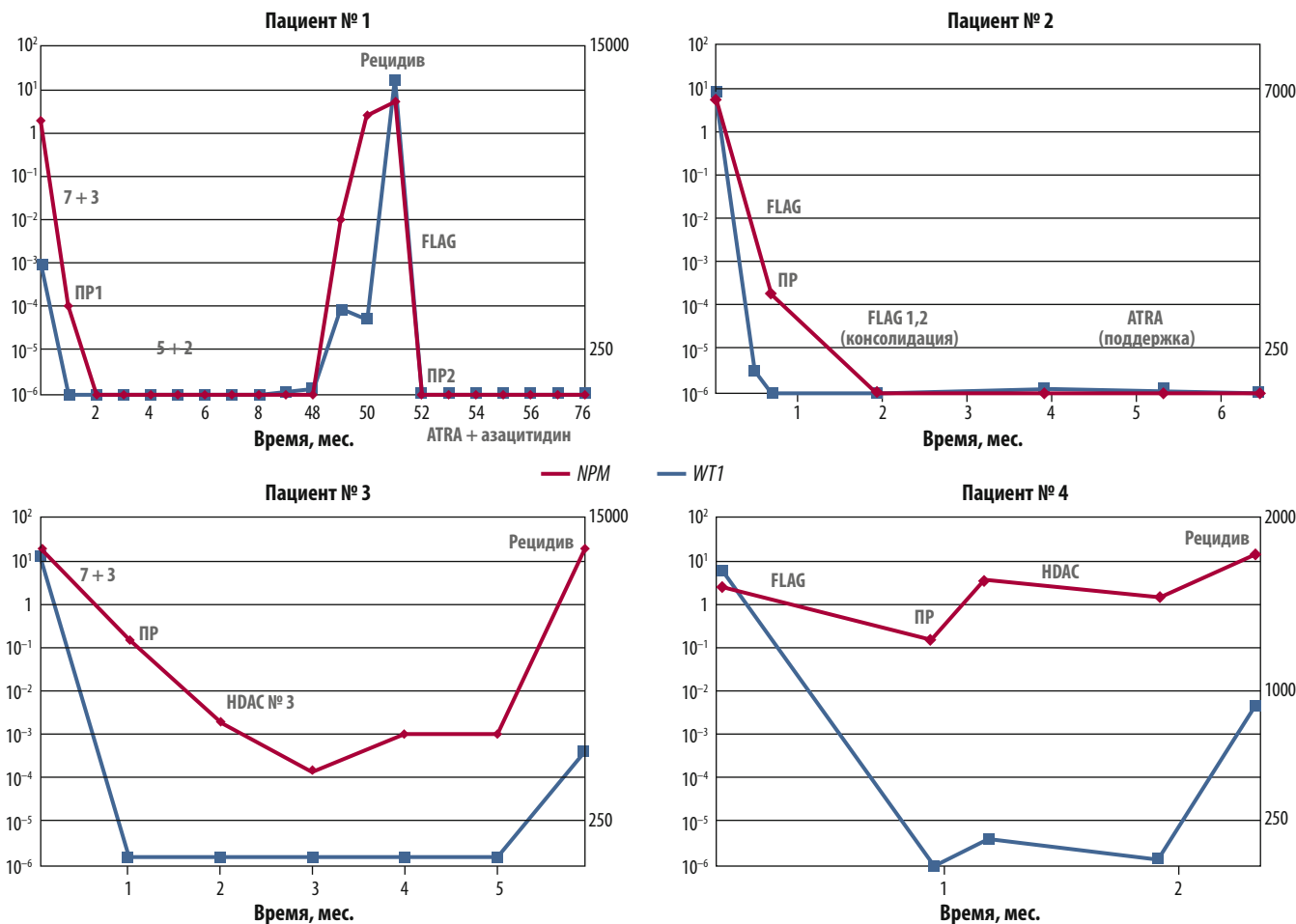
Таким образом, в этой когорте *NPM1* оказался более чувствительным маркером в отличие от *WT1*, что подтверждается и данными ранее проведенных исследований [37].

На рис. 5 представлена динамика и корреляция уровней *NPM1* и экспрессии *WT1* на различных этапах терапии у отдельных пациентов с наличием и отсутствием дополнительных молекулярных маркеров.

У пациентов № 1 и 2, не имевших дополнительных молекулярных маркеров, на момент достижения

полной ремиссии (ПР) после курса индукционной терапии отмечалась редукция уровня *NPM1*  $\geq 3$  log. На фоне консолидационной терапии у обоих больных достигнута ПР (МОБ-отрицательная), сохранявшаяся длительное время. В последующем у пациента № 1 развился поздний молекулярный и костномозговой рецидив ОМЛ (через 4 года) с достижением второй МОБ-отрицательной ПР. С целью индукции повторной ремиссии использовался режим FLAG. Длительность второй ремиссии составила 25 мес. и более.

Пациенты № 3 и 4 были с дополнительными молекулярными маркерами (мутация *FLT3-ITD*). На момент констатации ПР после курса индукционной терапии отмечалась редукция уровня *NPM1*  $< 3$  log при нормализации уровня экспрессии *WT1*. В дальнейшем на фоне проводимой высокодозной консолидационной терапии мутация *NPM1* сохранялась на уровне  $10^2$ - $10^{-1}$ , при этом уровень экспрессии *WT1* оставался в пределах нормальных значений ( $< 250/10^4$  копий



**Рис. 5.** Корреляция уровней *NPM1* и экспрессии *WT1* на различных этапах терапии у отдельных пациентов с ОМЛ

Схемы:

- 7+3 — цитарабин — 100 мг/м<sup>2</sup> в 1–7-й дни, даунорубин — 60 мг/м<sup>2</sup> в 1–3-й дни;
  - HDAC — цитарабин 1500 мг/сут 2 раза в день в 1, 3 и 5-й дни;
  - FLAG — флударабин 30 мг/м<sup>2</sup> в 1–5-й дни, цитарабин 2000 мг/м<sup>2</sup> в 1–5-й дни, филграстим 480 мкг за 1 день до начала противоопухолевой терапии и до нормализации абсолютного числа нейтрофилов;
  - ATRA — 15 мг/м<sup>2</sup> в 1–15-й дни, азацитидин 75 мг/м<sup>2</sup> в 1–7-й дни;
  - 5+2 — цитарабин 100 мг/м<sup>2</sup> в 1–5-й дни, даунорубин 45 мг/м<sup>2</sup> в 1–3-й дни.
- ПР — полная ремиссия.

**Fig. 5.** Correlation between *NPM1* and *WT1* expression in different stages of therapy in patients with AML

Therapy programs:

- 7+3 — cytarabine — 100 mg/m<sup>2</sup> on days 1–7, daunorubicin — 60 mg/m<sup>2</sup> on days 1–3;
  - HDAC — cytarabine 1500 mg twice a day on days 1, 3 and 5;
  - FLAG — fludarabine 30 mg/m<sup>2</sup> on days 1–5, cytarabine 2000 mg/m<sup>2</sup> on days 1–5, filgrastim from day 1 before the start of anticancer therapy to normalize the absolute number of neutrophils;
  - ATRA — 15 mg/m<sup>2</sup> on days 1–15, azacytidine 75 mg/m<sup>2</sup> on days 1–7;
  - 5+2 — cytarabine 100 mg/m<sup>2</sup> on days 1–5, daunorubicin 45 mg/m<sup>2</sup> on days 1–3.
- PR — complete remission.

*ABL*). У обоих пациентов развился ранний рецидив заболевания.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия все большее значение придается изучению МОБ при оценке результатов терапии ОМЛ. В рекомендациях ELN 2017 г. ответ на терапию включает оценку достижения МОБ-негативности [15]. Исследование МОБ после 1–2 курсов индукционной терапии позволяет выделить группу пациентов с высоким риском рецидивов ОМЛ [45, 46]. Как показывают данные ранее проведенных исследований и наши собственные наблюдения, уровень редукции

*NPM1* после курса индукционной терапии оказывает статистически значимое влияние на показатели БРВ и ОВ [18–47]. Быстрый и глубокий молекулярный ответ после курса индукции является более прогностически значимым, чем исходный уровень *NPM1*, и служит показателем чувствительности опухолевого клона к химиотерапии.

В ходе исследования выявлена корреляция между степенью редукции *NPM1* и наличием дополнительных молекулярных маркеров, таких как гиперэкспрессия *BAALC*, мутации *FLT3-ITD*, *DNMT3A*, *MLL*, что согласуется с данными ранее проведенных исследований [2, 24–27]. Однако весь спектр факторов, ухудшающих прогноз, в настоящее время неизвестен.



Вопрос о стабильности мутации *NPM1* (сохранение клона) при рецидиве остается спорным [14, 37–41]. В нашем исследовании у 5 из 13 пациентов с рецидивами ОМЛ имелась мутация *NPM1*. Эти данные соответствуют представлениям о стабильности сохранения исходного клона с мутацией *NPM1* при рецидивах заболевания.

Согласно данным различных исследовательских групп, снижение целевых пороговых уровней *WT1* повышает его прогностическую ценность [48]. В настоящем исследовании подтверждена прогностическая значимость порогового уровня *WT1* < 100/10<sup>4</sup> копий *ABL* на 28-й день. Кроме того, мы выявили прогностическое значение снижения *WT1* < 250/10<sup>4</sup> копий *ABL* на 14-й день индукционного курса.

При сравнении обоих маркеров *NPM1* оказался более чувствительным, чем *WT1*, что подтверждается данными ранее проведенных исследований [35].

Представленные результаты требуют подтверждения на более многочисленных группах больных. В последующем на этом основании может появиться возможность стратификации пациентов внутри группы ОМЛ с мутацией *NPM1*. Это позволит выделить пациентов, имеющих высокий риск развития рецидивов и требующих интенсификации терапии, включая выполнение аллогенной ТГСК (ТКМ) в более ранние сроки.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Л.Л. Гиршова, Е.Г. Овсянникова, А.Ю. Зарицкий.

**Сбор и обработка данных:** Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, С.О. Кузин.

**Анализ и интерпретация данных:** Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Е.Г. Овсянникова, С.О. Кузин.

**Подготовка рукописи:** Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева, Е.Г. Овсянникова.

**Предоставление материалов исследования:** Ю.В. Миролубова, К.В. Богданов, О.С. Писоцкая, Т.С. Никулина, Д.В. Моторин, Р.Ш. Бадаев, Д.Б. Заммиева, В.В. Иванов.

**Окончательное одобрение рукописи:** А.Ю. Зарицкий.

**Административная поддержка:** Ю.А. Алексева.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dohner H, Estey E, Amadori S, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel,

on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453–74. doi: 10.1182/blood-2009-07-235358.

2. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.

3. Yin C.C. Detection and molecular monitoring of Minimal residual diseases in acute myeloid leukemias. *J Mol Biomark Diagn*. 2012;3(2):1000e105–6. doi: 10.4172/2155-9929.1000e106.

4. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):460–71. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.100.

5. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318–57. doi: 10.1038/sj.leu.2403135.

6. Cilloni D, Gottardi E, de Micheli D, et al. Quantitative assessment of *WT1* expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002;16(10):2115–21. doi: 10.1038/sj.leu.2402675.

7. Cilloni D, Saglio G. Usefulness of quantitative assessment of *WT1* tumor suppressor gene expression in chronic myeloid leukemia patients undergoing imatinib therapy. *Semin Hematol*. 2003;40:37–41. doi: 10.1053/shem.2003.50040.

8. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al. The usefulness of monitoring *WT1* gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogeneic stem cell transplantation in acute type leukemia. *Blood*. 2003;101(5):1698–702. doi: 10.1182/blood-2002-06-1831.

9. Cilloni D, Messa F, Rosso V, et al. Increase sensitivity to chemotherapeutic agents and cytoplasmic interaction between *NPM* leukemic mutant and *NF-kappaB* in AML carrying *NPM1* mutations. *Leukemia*. 2008;22(6):1234–40. doi: 10.1038/leu.2008.68.

10. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5195–201. doi: 10.1200/jco.2009.22.4865.

11. Pozzi S, Geroldi S, Tedone E, et al. Leukemia relapse after allogeneic transplants for acute myeloid leukaemia: predictive role of *WT1* expression. *Br J Haematol*. 2013;160(4):503–9. doi: 10.1111/bjh.12181.

12. Grazia CD, Pozzi S, Geroldi S, et al. *WT1* Expression and Pre-emptive Immunotherapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia Undergoing an Allogeneic Hemopoietic Stem Cell Transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(7):1242–6. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.03.005.

13. Nomdedeu J, Hoyos M, Carricondo M, et al. Bone marrow *WT1* levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia*. 2013;27(11):2157–64. doi: 10.1038/leu.2013.111.

14. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual disease levels assessed by *NPM1* mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220–31. doi: 10.1182/blood-2009-03-213389.

15. Falini B, Nicoletti I, Martelli M, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (*NPMc+* AML): biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874–85. doi: 10.1182/blood-2006-07-012252.

16. Chang JH, Olson MO. Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 1990;265(30):18227–33.

17. Wang W, Budhu A, Forgues M, et al. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*. 2005;7(8):823–30. doi: 10.1038/ncb1282.

18. Ghandforoush NA, Chahardouli B, Rostami S, et al. Evaluation of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia with *NPM1* Marker. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2016;10(3):147–52.

19. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254–66. doi: 10.1056/NEJMoa041974.

20. Nafea D, Rahman MA, Boris D, et al. Incidence and prognostic value of *NPM1* and *FLT3* gene mutations in AML with normal karyotype. *Open Hematol J*. 2011;5(1):14–20. doi: 10.2174/1874276901105010014.

21. Schneider F, Hoster E, Unterhalt M, et al. *NPM1* but not *FLT3-ITD* mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2009;113(21):5250–3. doi: 10.1182/blood-2008-09-172668.

22. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740–6. doi: 10.1182/blood-2005-05-2164.

23. Schnittger S, Schoch C, Kern Q. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733–9. doi: 10.1182/blood-2005-06-2248.

24. Kronke J, Schlenk RF, Jensen KO, et al. Monitoring of minimal residual disease in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia: a Study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709–16. doi: 10.1200/JCO.2011.35.0371.

25. Gorin N-C, Labopin M, Meloni G, et al. Impact of *FLT3* ITD/*NPM1* mutation status in adult patients with acute myelocytic leukemia autografted in first remission. *Haematologica*. 2013;98(2):e12–4. doi: 10.3324/haematol.2012.064436.



26. Patel JL, Schumacher JA, Frizzell K, et al. Coexisting and cooperating mutations in *NPM1*-mutated acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* 2017;56:7–12. doi: 10.1016/j.leukres.2017.01.027.
27. Yoon J, Kim H, Shin S, et al. Implication of higher BAALC expression in combination with other gene mutations in adult cytogenetically normal AML. *Leuk Lymphoma*. 2013;55(1):110–20. doi: 10.3109/10428194.2013.800869.
28. Tiribellia M, Raspadorib D, Geromin A, et al. High CD200 expression is associated with poor prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, even in FIT3-ITD/*NPM1*+ patients. *Leuk Res*. 2017;58:31–8. doi: 10.1016/j.leukres.2017.04.001.
29. Damiani D, Tiribelli M, Raspadori D, et al. Clinical impact of CD200 expression in patients with acute myeloid leukemia and correlation with other molecular prognostic factors. *Oncotarget*. 2015;6(30):30212–21. doi: 10.18632/oncotarget.4901.
30. Hubmann M, Kohnke T, Hoster E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in *NPM1*-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014;99(8):1317–25. doi: 10.3324/haematol.2014.104133.
31. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740–6. doi: 10.1182/blood-2005-05-2164.
32. Röllig C, Bornhauser M, Kramer M, et al. Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Patients with *NPM1*-Mutated Acute Myeloid Leukemia: Results from a Prospective Donor Versus No-Donor Analysis of Patients After Upfront HLA Typing Within the SAL-AML 2003 Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(5):403–10. doi: 10.1200/JCO.2013.54.4973.
33. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2016;35(2):185–93. doi: 10.1200/JCO.2016.67.1875.
34. Kristensen T, Møller MB, Friis L, et al. *NPM1* mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to *WT1* expression. *Eur J Haematol*. 2011;87(5):400–8. doi: 10.1111/j.1600-0609.2011.01673.x.
35. Barragan E, Pajuelo JC, Ballester S, et al. Minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia by mutant nucleophosmin (*NPM1*): comparison with *WT1* gene expression. *Clin Chim Acta*. 2008;395(1–2):120–3. doi: 10.1016/j.cca.2008.05.021.
36. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (*NPM1*) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103–8. doi: 10.1038/sj.leu.2404149.
37. Paietta E. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia: coming of age. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;1:35–42. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.35.
38. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (*NPM1*) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747–54. doi: 10.1182/blood-2005-05-2168.
39. Dvorakova D, Racil Z, Jeziskova I, et al. Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with frequent and rare patient-specific *NPM1* mutations. *Am J Hematol*. 2010;85(12):926–9. doi: 10.1002/ajh.21879.
40. Chou WC, Tang JL, Wu SJ, et al. Clinical implications of minimal residual disease monitoring by quantitative polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia patients bearing nucleophosmin (*NPM1*) mutations. *Leukemia*. 2007;21(5):998–1004. doi: 10.1038/sj.leu.2404637.
41. Meloni G, Mancini M, Gianfelici V, et al. Late relapse of acute myeloid leukemia with mutated *NPM1* after eight years: evidence of *NPM1* mutation stability. *Haematologica*. 2009;94(2):298–300. doi: 10.3324/haematol.2008.000059.
42. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with *NPM1* mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. *Br J Haematol*. 2009;144(4):517–23. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07488.x.
43. Kayser S, Walter RB, Stock W, Schlenk RF. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia-current status and future perspectives. *Curr Hematol Malig Rep*. 2015;10(2):132–44. doi: 10.1007/s11899-015-0260-7.
44. Terre C, Rousselot P, Dombret H, et al. MRD assessed by *WT1* and *NPM1* transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. *Oncotarget*. 2014;5(15):6280–8. doi: 10.18632/oncotarget.2196.
45. Ommen HB, Schnittger S, Jovanovic JV, et al. Strikingly different molecular relapse kinetics in *NPM1c*, *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, and *CBFB-MYH11* acute myeloid leukemias. *Blood*. 2010;115(2):198–205. doi: 10.1182/blood-2009-04-212530.
46. Гиршова Л.Л., Овсянникова Е.Г., Кузин С.О. и др. Молекулярный мониторинг уровня транскрипта *RUNX1-RUNX1T1* при острых миелобластных лейкозах на фоне терапии. *Клиническая онкогематология*. 2016;9(4):456–64. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-4-456-464. (In Russ)
- [Girshova LL, Ovsyannikova EG, Kuzin SO, et al. Molecular Monitoring of *RUNX1-RUNX1T1* Transcript Level in Acute Myeloblastic Leukemias on Treatment. *Clinical oncohematology*. 2016;9(4):456–64. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-4-456-464. (In Russ)]
47. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2016;35(2):185–93. doi: 10.1200/JCO.2016.67.1875.
48. Rossi G, et al. Comparison between multiparameter flow cytometry and *WT1*-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res*. 2012;36(4):401–6. doi: 10.1016/j.leukres.2011.11.020.