



DOI 10.34883/PI.2021.7.4.007
УДК 616.155.194.7:575.224.22]-092-053.2

Емельянова И.В., Углова Т.А., Мигас А.А., Быданов О.И., Алейникова О.В.
Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии
и иммунологии, Минск, Беларусь

Yemialyanava I., Uglova T., Migas A., Bydanau O., Aleinikova O.
Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
Minsk, Belarus

Клиническое значение генетических мутаций при приобретенной апластической анемии у детей

Clinical Significance of Genetic Mutations
in Acquired Aplastic Anemia in Children

Резюме

Полное экзомное секвенирование позволило выявить у 55,2% пациентов детского возраста с тяжелой приобретенной апластической анемией соматические мутации. Общая выживаемость пациентов, имеющих мутации на момент постановки диагноза и получивших иммуносупрессивную терапию, ниже, чем среди пациентов, не имеющих мутаций ($75\pm 9\%$ и $81\pm 8\%$ соответственно). Общая выживаемость пациентов, имеющих мутации в генах, предполагающих иммунологическую дисрегуляцию, ниже ($60\pm 22\%$), чем среди пациентов с другими молекулярно-генетическими изменениями ($80\pm 9\%$) и пациентов с отсутствием мутаций ($81\pm 8\%$). Наиболее неблагоприятную группу составляют пациенты с мутациями в генах MSH3 и POLE_POLD, их общая выживаемость составила 0% и $33\pm 27\%$ соответственно. Наличие мутаций не влияет на достижение гематологического ответа на 64-й и 180-й дни иммуносупрессивной терапии.

Ключевые слова: приобретенная апластическая анемия, экзомное секвенирование, мутации, общая выживаемость, дети.

Abstract

Complete exome sequencing (NGS) revealed somatic mutations in 55.2% of pediatric patients with severe acquired aplastic anemia. The overall survival rate for patients with mutations at the time of diagnosis and receiving immunosuppressive therapy is lower than for patients without mutations ($75\pm 9\%$ and $81\pm 8\%$, respectively). The overall survival of patients with mutations in genes suggesting immunological dysregulation is lower ($60\pm 22\%$) than patients with other molecular genetic changes ($80\pm 9\%$) and patients without mutations ($81\pm 8\%$). The most unfavorable group consists of patients with mutations in the MSH3 and POLE_POLD genes, their overall survival rate was 0% and $33\pm 27\%$, respectively. The presence of mutations does not affect the achievement of the hematological response on days 64 and 180 of immunosuppressive therapy.

Keywords: acquired aplastic anemia, exome sequencing, mutations, overall survival, children.

■ ВВЕДЕНИЕ

Приобретенная апластическая анемия (ПАА) – это орфанное жизнеугрожающее заболевание, характеризующееся панцитопенией в периферической крови и аплазией костного мозга вследствие иммуноопосредованного повреждения полипотентных стволовых клеток [1–3] и изменения их микроокружения [4]. Частота в детской популяции составляет от 0,7 до 6,8 на миллион населения в год в зависимости от региона, при этом в Азии в 2–3 раза выше, чем в Европе и Северной Америке [3, 5–12]. Алгоритм терапии ПАА включает в себя трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) от родственного HLA-совместимого донора, а при его отсутствии – иммуносупрессивную терапию (ИСТ), базирующуюся на основных патогенетических механизмах развития ПАА, а именно на иммунологически опосредованных процессах, приводящих к истощению пула гемопоэтических стволовых клеток и их микроокружения, нарушению пролиферативного потенциала ГСК [13]. Однако частота и качество гематологического ответа на ИСТ существенно варьируются, а отдаленные результаты остаются непрогнозируемыми в связи с рецидивами ПАА и риском клональных осложнений (миелодиспластический синдром (МДС), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)). На качество восстановления кроветворения и риск клональной эволюции при проведении ИСТ могут оказывать влияние серьезные внутренние дефекты резидуальных стволовых клеток (мутации, пролиферативный стресс и др.) [14, 15]. Выявление этих дефектов будет способствовать определению альтернативной терапевтической стратегии, и в частности ранней аллогенной ТГСК от неродственного донора.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовались образцы костного мозга (КМ), взятые при постановке диагноза, 58 пациентов в возрасте до 18 лет с тяжелой ПАА (тПАА), находившихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии в 1997–2018 гг. Диагноз тПАА основывался на модифицированных критериях Camitta 1976 [16, 17]. Все пациенты не имели морфологических признаков МДС, конституциональных нарушений костномозгового кроветворения.

Полное экзомное секвенирование выполнялось в лаборатории департамента генетики Исследовательского института медицинской экологии Нагойского университета, Япония.

Пролиферативная активность клеток костного мозга (количество колониеобразующих единиц гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ) и бурс-образующих единиц эритроидного ряда (БОЕ-Э)) определялась в лаборатории клеточных биотехнологий и цитотерапии Республиканского научно-практического центра детской онкологии, гематологии и иммунологии, Беларусь.

11 пациентам из 58 (19%) с выявленными молекулярно-генетическими изменениями (ИМГС) и неизвестным молекулярно-генетическим статусом (НМГС) в качестве 1-й линии терапии проведена аллогенная ТГСК от совместимого родственного донора. 46 пациентам проведена ИСТ (1 пациент умер до начала ИСТ и в исследование не включался). Из 46 пациентов, получивших ИСТ, у 24 детей (52,2%) выявлены



молекулярно-генетические изменения в образцах КМ, взятых при постановке диагноза (группа ИМГС), у 22 (47,8%) мутации не были выявлены (группа НМГС).

Для статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel и R-statistics 3.2.0. Сравнение показателей крови и костного мозга производилось с помощью теста Манна – Уитни. Различия между группами пациентов оценивали по критерию χ^2 . Статистически значимым считалось различие при $P < 0,05$. Прогностическое значение некоторых показателей определялось с помощью ROC-анализа в соответствии с площадью под кривой (AUC). При $AUC > 0,6$ диагностическую ценность показателя считали правомочной.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

У 32 из 58 пациентов детского возраста с тПАА (55,2%) в общей совокупности выявлены соматические мутации в 43 генах: IL21R, CASP10, LYST, FAS, ADA2, XIA, FANCB, FANCC, SOS1, NBN, RUNX1, ACD, TERT, POLD1, MSH3, BRCA2, POLE, ATR, BRCA1, MSH2, RAD54L, MSH6, MLH1, MLH3, ATM, NABP2, NEIL1, HCL51, NLR4, NLRP3(12), TREX1, NCF1, SLC6A8, RECQL4, EFHC2, IRAK4, PLCG2, MBD5, NLRP3, PMM2, G6PD, G6PC, TMLHE.

При этом у 14 из 32 пациентов (44%) выявлены мутации в 1 гене, у 18 детей (56%) имелись мутации в 2 генах и более.

По своим клинико-лабораторным данным пациенты ИМГС и НМГС на момент постановки диагноза не различались (табл. 1).

Общая выживаемость пациентов, получивших алло-ТГСК, как в группе с ИМГС, так и в группе с НМГС составила 100%.

Иная картина наблюдалась у пациентов, получивших ИСТ: общая выживаемость пациентов группы ИМГС была ниже, чем у пациентов группы НМГС ($75 \pm 9\%$ и $81 \pm 8\%$ соответственно). Наличие или отсутствие соматических мутаций не оказало значимого влияния на достижение гематологического ответа на 64-й и 180-й дни ИСТ ($p = 0,2424$ и $p = 0,5364$ соответственно).

Таблица 1

Характеристика клинико-лабораторных данных пациентов с ИМГС и НМГС на момент постановки диагноза

Table 1
Characteristics of clinical and laboratory data of patients with positive (PMGS) and negative (NMGS) molecular genetic status at the time of diagnosis

Признаки	Пациенты с ИМГС (n=32)	Пациенты с НМГС (n=26)	p
Медиана возраста (лет)	9 (2–19)	9 (2–19)	1
Пол: мужской/женский	1:1 (16/16)	5,5:1 (22/4)	0,0058
Гемоглобин, г/л; 0 день; Ме (колебания)	75 (59–109)	79 (44–94)	0,7782
Ретикулоциты, $\times 10^9$ /л; 0 день; Ме (колебания)	4,43 (0–27,24)	2,69 (0–26,28)	0,3873
Тромбоциты, $\times 10^9$ /л; 0 день; Ме (колебания)	25 (0–115)	17,5 (1–42)	0,3476
Нейтрофилы, $\times 10^9$ /л; 0 день; Ме (колебания)	252 (0–1073)	114,5 (0–775)	0,2326
КОЕ-ГМ, $\times 10^5$; 0 день; Ме (колебания)	0 (0–12)	0 (0–2)	0,6552
КОЕ-ГМ_РФ, $\times 10^5$; 0 день; Ме (колебания)	0 (0–50)	1 (0–24)	0,3165
БОЕ-Э, $\times 10^5$; 0 день; Ме (колебания)	0 (0–4)	0 (0–8)	0,3858
БОЕ-Э_РФ, $\times 10^5$; 0 день; Ме (колебания)	0 (0–12)	0 (0–8)	0,2861

У 1 пациента в группе ИМГС, получившего ИСТ, в последующем развился острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) и у 1 – миелодиспластический синдром (МДС). Пациент с ОМЛ имел на момент постановки диагноза мутацию в гене POLD1. POLD1 – это ген, кодирующий субъединицу ДНК-полимеразы дельта, белкового комплекса, который играет важную роль в репликации и репарации ДНК. Мутации в этом гене выявляются при раке толстой кишки, раке кожи и раке желудка [18].

Пациентка с МДС на момент постановки диагноза имела мутацию в гене ADA2. На фоне ИСТ через 2 года у нее были выявлены клональные изменения – моногенные мутации в гене RANX1. Следует отметить, что клинические проявления мутации ADA2, приводящие к дефициту аденозиндезаминазы 2 (ADA2), разнообразны и включают рецидивирующую лихорадку, различные цитопении, иммунодефицит и недостаточность костного мозга. Мутационный статус не коррелирует с типом заболевания. Единственным эффективным методом лечения недостаточности костного мозга с мутацией ADA2 является ТГСК [19]. Данный случай наглядно демонстрирует значение факта выявления мутаций у пациентов с тПАА.

С целью определения клинического значения различных идентифицированных генетических мутаций у детей с тПАА мы выделили 2 группы пациентов. В 1-ю группу (n=6) объединили пациентов, имеющих мутации в генах, предполагающих иммунологическую дисрегуляцию (IL21R, CASP10, LYST, FAS, ADA2, XIAP), во 2-ю (группа 2, n=24) – имеющих мутации в генах, участвующих в репарации ДНК (FANCB, FANCC, SOS1, NBN, RUNX1, ACD, TERT, POLD1, MSH3, BRCA2, POLE, ATR, BRCA1, MSH2, RAD54L, MSH6, MLH1, MLH3, ATM, NABP2, NEIL1) (табл. 2).

Общая выживаемость пациентов с тПАА, у которых при полном экзомном секвенировании были найдены гены, предполагающие иммунологическую дисрегуляцию (группа 1), была ниже ($60\pm 22\%$), чем у остальных пациентов с ИМГС ($80\pm 9\%$) и у пациентов с НМГС ($81\pm 8\%$). Только у одного пациента этой группы выделена мутация в одном гене, у остальных – сочетанные.

Общая выживаемость пациентов группы 2 составила $71\pm 11\%$ и была ниже, чем у других пациентов с ИМГС ($86\pm 13\%$) и у пациентов с НМГС ($81\pm 8\%$). У 9 пациентов этой группы выявлены мутации только в одном гене (мономутация). Общая выживаемость пациентов этой группы, имеющих мономутацию, была значительно ниже ($56\pm 17\%$) по сравнению с пациентами, которые имели сочетание мутаций ($86\pm 12\%$). Обращает

Таблица 2
Характеристика идентифицированных генетических мутаций

Table 2
Characteristics of the identified genetic mutations

Название		Мутации в генах
Гены, предполагающие иммунологическую дисрегуляцию	Группа 1	IL21R, CASP10, LYST, FAS, ADA2, XIAP
Мутация в генах, участвующих в репарации ДНК	Группа 2	FANCB, FANCC, SOS1, NBN, RUNX1, ACD, TERT, POLD1, MSH3, BRCA2, POLE, ATR, BRCA1, MSH2, RAD54L, MSH6, MLH1, MLH3, ATM, NABP2, NEIL1



на себя внимание то, что общая выживаемость пациентов, имевших мутацию в гене ATR, составила 100%, а у пациентов, имевших мутацию в гене MSH3, – 0%. Общая выживаемость пациентов с мутациями в генах POLE_POLD1 составила $33 \pm 27\%$ и была достоверно ниже ($p=0,0093$), чем у пациентов, не имеющих данных нарушений ($81 \pm 9\%$) (рис. 1).

Мы объединили пациентов, имеющих мутации в генах MSH3 и POLE_POLD1, в группу высокого риска (HRG). Общая выживаемость данной группы пациентов составила $33 \pm 19\%$ и была достоверно ниже ($p=0,0029$) по сравнению с пациентами, не имеющими мутаций в данных генах ($89 \pm 7\%$) (рис. 2).

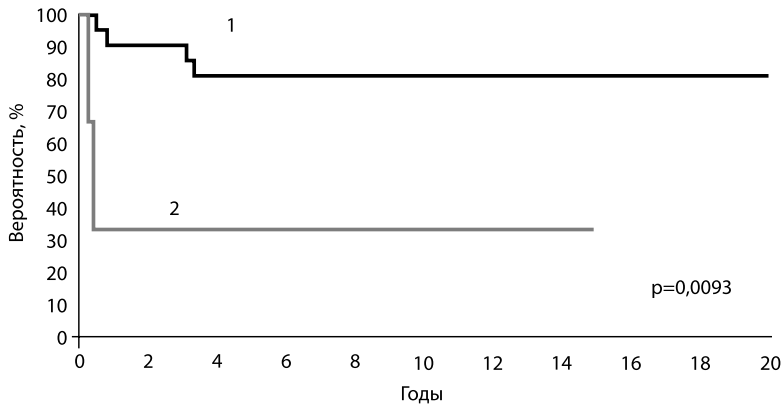


Рис. 1. Общая выживаемость (ОВ) пациентов с выявленными мутациями в генах POLE_POLD и без них

Примечания: 1 – ОВ с POLE_POLD–; $n=21$; 17 живы; $81 \pm 9\%$; 2 – ОВ с POLE_POLD+; $n=3$; 1 жив; $33 \pm 27\%$.

Fig. 1. Overall survival (OS) of patients with identified mutations in the POLE_POLD genes and without them

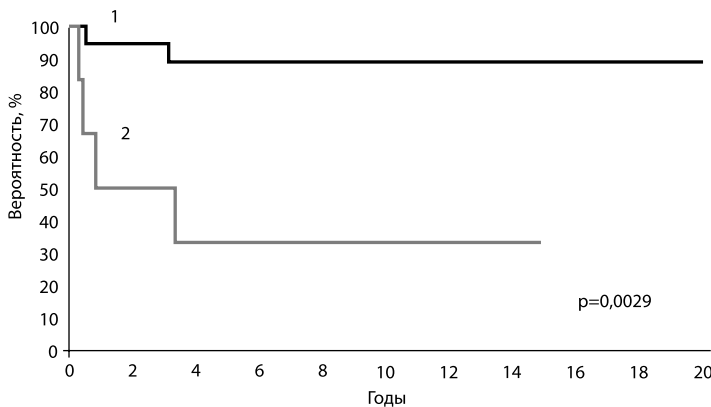


Рис. 2. Общая выживаемость (ОВ) пациентов группы HRG по сравнению с остальными пациентами с ИМГС

Примечания: 1 – пациенты HRG–; $n=19$; 16 живы; $89 \pm 7\%$; 2 – HRG+ (MSH3 + POLE_POLD1); $n=5$; 2 живы; $33 \pm 19\%$.

Fig. 2. Overall survival (OS) of HRG patients compared to other patients with IMHS

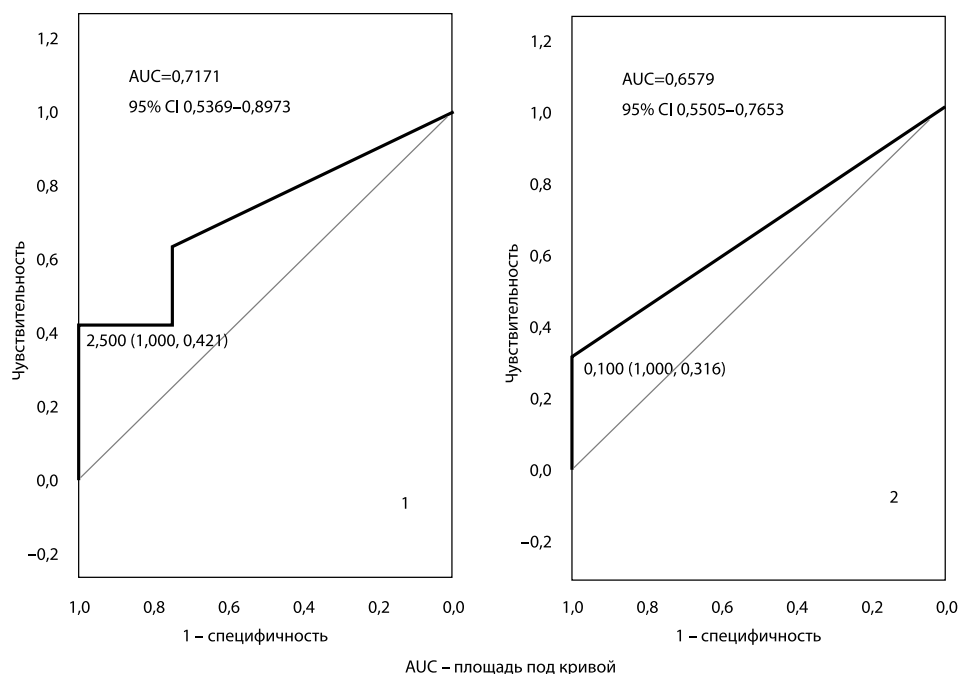


Рис. 3. Прогностическая значимость количества КОЕ-ГМ (1) и количества БОЕ-Э (2) в среде с РФ на момент диагноза (ROC-анализ)

Fig. 3. Prognostic significance of the number of Baseline CFU-GM RF (1) and the number of BFU-GM RF (2) (ROC-analysis)

Был проведен анализ лабораторных данных (уровень тромбоцитов, гемоглобина, абсолютное число гранулоцитов и абсолютное число ретикулоцитов) и пролиферативной активности клеток костного мозга (количество колониеобразующих единиц гранулоцитов и моноцитов (КОЕ-ГМ) и бурс-образующих единиц эритроидного ряда (БОЕ-Э) в среде с ростовыми факторами и без них) на момент постановки диагноза у пациентов групп ИМГС и НМГС, но в вышеперечисленных показателях обеих групп достоверных различий не выявлено. Однако следует отметить, что при количестве КОЕ-ГМ ниже $2,5 \times 10^5$ и количестве БОЕ-Э ниже $0,1 \times 10^5$ в среде с ростовыми факторами необходимо исключить наличие мутаций в генах MSH3, POLE и POLD (рис. 3).

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение полного экзомного секвенирования у пациентов с тПAA имеет существенное значение для стратификации пациентов с целью определения наиболее рациональной терапии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.



■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Young N.S. (2006) *Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. The Education Program of the American Society of Hematology*, pp. 72–77.
2. Maciejewski J.P., O'Keefe C., Gondek L., Tiu R. (2007) Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clons. *Folia histochemica et cytobiologica*, vol. 45, pp. 5–14.
3. Yong N.S., Scheinberg P., Calado R.T. (2008) Aplastic Anemia. *Curr Opin Hematol*, vol. 15, iss. 3, pp. 162–168.
4. Medinger M., Drexler B., Lengerke C. (2018) Pathogenesis of acquired aplastic anemia and the role of the bone marrow microenvironment. *Front Oncol*, vol. 8, pp. 1–10.
5. Kojima S. (2017) Why is the incidence of aplastic anemia higher in Asia? *Expert Rev Hematol*, vol. 10, pp. 277–279.
6. Kaufman D.W., Kelly J.P., Issaragrisil S., Laporte J.R., Anderson T., Levy M., Shapiro S., Young N.S. (2006) Relative incidence of agranulocytosis and aplastic anemia. *Am J Hematol*, vol. 81, pp. 65–67.
7. Ohara A. (2008) Japan national registry of aplastic anemia in children, clinical features and prognosis. *Japanese J Pediatr Hematol*, vol. 22, pp. 53–56.
8. Jeong D.C., Chung N.G., Kang H.J. (2011) Epidemiology and clinical long-term outcome of childhood aplastic anemia in Korea for 15 years: retrospective study of the Korean Society of Pediatric Hematology Oncology (KSPHO). *J Pediatr Hematol Oncol*, vol. 33, pp. 172–178.
9. Novichkova G.A. (2009) *Immunosuppressivnaya terapiya i transplantaciya gemopoieticheskikh stvolovyykh kletok v lechenii detej s priobretennoy aplasticheskoj anemiej* [Immunosuppressive therapy and hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of children with acquired aplastic anemia] (PhD Thesis), M.
10. Beskrovnaya O.L. (2004) *Kliniko-epidemiologicheskaya harakteristika aplasticheskikh i gemoliticheskikh anemij u detej i podrostkov primorskogo kraja* [Clinical and epidemiological characteristics of aplastic and hemolytic anemias in children and adolescents of the Primorye Territory] (PhD Thesis), Vladivostok.
11. Kugejko T.B., Bydanov O.I. (2018) Priobretennaya aplasticheskaya anemiya u detej v Respublike Belarus': epidemiologiya i etiologiya [Acquired aplastic anemia in children in the Republic of Belarus: epidemiology and etiology]. *Voprosy gematologii/onkologii i immunopatologii v pediatrii*, vol. 17, no 1, pp. 29–36.
12. Kamio T., Etsuro I., Ohara A., Kosaka Y., Tsuchida M., Yagasaki H., Mugishima H. (2011) Relapse Of Aplastic Anemia In Children After Immunosuppressive Therapy: A Report from the Japan childhood aplastic anemia study group. *Haematologica*, vol. 96, pp. 814–819.
13. Sakaguchi H., Nishio N., Hama A. (2014) Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*, vol. 99, pp. 1312–1316.
14. Afable M.G. (2011) SNP array-based karyotyping: differences and similarities between aplastic anemia and hypocellular myelodysplastic syndromes. *Blood*, vol. 117, pp. 6876–6884.
15. Scheinberg P., Chen J. (2013) Aplastic anemia: What have we learned from animal models and from the clinic. *Seminars in Hematology*, vol. 50 (2), pp. 156–164.
16. Camitta B.M., Storb R., Thomas E.D. (1982) Aplastic anemia (first of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med*, vol. 306, pp. 645–652.
17. Camitta B.M., Storb R., Thomas E.D. (1982) Aplastic anemia (second of two parts): pathogenesis, diagnosis, treatment, and prognosis. *N Engl J Med*, vol. 306, pp. 712–718.
18. Palles C. (2013) Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature Genet*, vol. 45, pp. 136–144.
19. Meyts I., Aksentijevich I. (2018) Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2): Updates on the Phenotype, Genetics, Pathogenesis, and Treatment. *Journal of Clinical Immunology*, vol. 38, pp. 569–578.

Подана/Submitted: 12.10.2021

Принята/Accepted: 05.11.2021

Контакты/Contacts: dzamiko-koba@mail.ru