

Исследование активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах взрослых

К.И. Зарубина, Е.Н. Паровичникова, В.Л. Сурин, О.С. Пшеничникова, О.А. Гаврилина, Г.А. Исинова, В.В. Троицкая, А.Н. Соколов, И.В. Гальцева, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Т.Н. Обухова, А.Б. Судариков, В.Г. Савченко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

Резюме

Цель. Изучение активирующих мутаций генов (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CRLF2*) сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) у взрослых больных, включенных в российские многоцентровые исследования.

Материалы и методы. В многоцентровое исследование включены 119 взрослых пациентов с впервые установленным В-ОЛЛ. Исследование носило проспективный и ретроспективный характер. Группа с *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ составила 93 больных (48 женщин и 45 мужчин от 17 до 59 лет, медиана возраста – 31 год), им проводили терапию по протоколам ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2016. Медиана наблюдения составила 19 мес (1–119). В группу с *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ включены 26 пациентов (16 женщин и 10 мужчин от 23 до 78 лет, медиана возраста – 34 года). Лечение проводили по протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2012 в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Медиана наблюдения составила 23 мес (4–120). Молекулярный анализ активирующих мутаций для генов *NRAS*, *KRAS* (сигнальный путь RAS/RAF/MEK/ERK) и генов *JAK2*, *CRLF2* (сигнальный путь JAK/STAT) проводился методом секвенирования по Сэнгеру. Внутренние tandemные повторы (ITD) гена *FLT3* – рецепторной внутриклеточной тирозинкиназы, приводящие к запуску целого каскада реакций, относящихся к различным сигнальным путям, включая RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT, исследованы методом фрагментного анализа. Экспрессию белка CRLF2 оценивали методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Активирующие мутации в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3* обнаружены у 22 (23,6%) больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ. В общей сложности выявлено 23 мутации в генах *NRAS* ($n=9$), *KRAS* ($n=12$), *FLT3* ($n=2$), что статистически значимо чаще, чем при *BCR-ABL1*-позитивном В-ОЛЛ, где мутации этих генов не выявлены ни у одного больного ($p=0,007$). Частота обнаружения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ сопоставима – 12,9% (12 из 93) и 9,7% (9 из 93) соответственно ($p=0,488$). У одного больного выявлено одновременно 2 мутации в гене *KRAS* (в кодонах 13 и 61). Мутацию *FLT3*-ITD детектировали в 3,5% (2 из 57) случаев *BCR-ABL1*-негативных В-ОЛЛ. У больных *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ мутацию *FLT3*-ITD не оценивали. Нарушения в сигнальном каскаде JAK/STAT обнаружены у 4 (4,3%) больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ. Они представлены миссенс-мутациями гена *JAK2* ($n=3$) и гиперэкспрессией CRLF2 ($n=2$), у одного больного обнаружены одновременно гиперэкспрессия CRLF2 и мутация в гене *JAK2*. В гене *CRLF2* мутации не выявлены. У больных *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ мутаций гена *JAK2* не выявлено. При анализе демографических и клинико-лабораторных показателей между группами больных с мутациями и без таковых статистически значимых различий не получено. В анализируемых группах больных долгосрочные результаты терапии в зависимости от наличия мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* не различались. Также не показано значимых отличий в скорости достижения негативного статуса минимальной остаточной болезни между пациентами с активирующими мутациями и без в контрольные сроки протокола (на 70, 133 и 190-й день).

Заключение. Активирующие мутации генов *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* не влияют на долгосрочные результаты терапии и скорость достижения негативного статуса минимальной остаточной болезни у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ при применении протоколов российского многоцентрового исследования.

Ключевые слова: В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, *BCR-ABL1*-позитивный В-ОЛЛ, *BCR-ABL1*-негативный В-ОЛЛ, сигнальные пути, активирующие мутации генов *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CRLF2*.

Для цитирования: Зарубина К.И., Паровичникова Е.Н., Сурин В.Л. и др. Исследование активирующих мутаций генов сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT при В-клеточных острых лимфобластных лейкозах взрослых. *Терапевтический архив*. 2020; 92 (7): 31–42. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000772

Detection of activating mutations in RAS/RAF/MEK/ERK and JAK/STAT signaling pathways

K.I. Zarubina, E.N. Parovichnikova, V.L. Surin, O.S. Pshenichnikova, O.A. Gavrulina, G.A. Isinova, V.V. Troitskaia, A.N. Sokolov, I.V. Gal'tseva, N.M. Kapranov, Yu.O. Davydova, T.N. Obukhova, A.B. Sudarikov, V.G. Savchenko

National Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Issue. The study of activating mutations (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CRLF2* genes) of RAS/RAF/MEK/ERK and JAK/STAT signaling pathways in B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) in adult patients which are included in Russian multicenter clinical trials.

Materials and methods. Within the multicenter study there were 119 adult patients included with *de novo* B-ALL. The study was considered as prospective and retrospective. The group with *BCR-ABL1*-negative B-ALL consisted of up to 93 patients (45 male and 48 female, at the age of 17 to 59, the median age – 31), they were treated according to the protocols ALL-2009, ALL-2016. The median follow-up lasted for 19 months (1–119). The group with *BCR-ABL1*-positive B-ALL with up to 26 patients (10 male and 16 female, at the age of 23 to 78, the median age 34 years) was included in the study as well. The treatment was carried out according to the protocols ALL-2009 and ALL-2012 in combination with tyrosine kinase inhibitors. The median follow-up lasted for 23 months (4–120). The molecular analysis of activating mutations in *NRAS*, *KRAS* genes (RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway) and *JAK2*, *CRLF2* genes (JAK/STAT signaling cascade) was performed via Sanger sequencing. The internal tandem duplications (ITDs) in *FLT3* gene were studied by fragment analysis. The evaluation of CRLF2 expression was fulfilled via flow cytometry.

Results. Activating mutations in *NRAS*, *KRAS*, *FLT3* genes were found in 22 (23.6%) patients with *BCR-ABL1*-negative B-ALL. In total, 23 mutations were revealed in the *NRAS* ($n=9$), *KRAS* ($n=12$), and *FLT3* ($n=2$) genes, according to statistics that was significantly more frequent than with *BCR-ABL1*-positive B-ALL, these genes mutations were not identified in patients ($p=0.007$).

The frequency of mutations detection in *KRAS* and *NRAS* genes in patients with *BCR-ABL1*-negative B-ALL was comparable as 12.9% (12 of 93) to 9.7% (9 of 93), respectively ($p=0.488$). One patient was simultaneously revealed 2 mutations in the *KRAS* gene (in codons 13 and 61). *FLT3*-ITD mutations were detected in 3.5% (2 of 57) cases of *BCR-ABL1*-negative B-ALL. In patients with *BCR-ABL1*-positive B-ALL *FLT3*-ITD mutations were not assessed. Violations in the JAK/STAT signaling cascade were detected in 4 (4.3%) patients with *BCR-ABL1*-negative B-ALL. They were represented by the missense mutations of *JAK2* gene ($n=3$) and the overexpression of *CRLF2* ($n=2$); in one patient were detected the overexpression of *CRLF2* and a mutation in *JAK2* gene simultaneously. No mutations were found in *CRLF2* gene. In patients with *BCR-ABL1*-positive B-ALL no *JAK2* mutations were detected. As long as analyzing demographic and clinical laboratory parameters between groups of patients with and without mutations, there were no statistically significant differences obtained. In the analyzed groups of patients, long-term therapy results did not differentiate according to the mutations presence in *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* genes. Also, substantive differences were not shown in the rate of the negative status achievement of the minimum residual disease between patients with and without activating mutations in the control points of the protocol (on the 70th, 133rd and 190th days).

Conclusion. *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* activating mutations do not affect the long-term results of the therapy and the rate of the negative status achievement of the minimum residual disease in patients with *BCR-ABL1*-negative B-ALL treated by the Russian multicenter clinical trials.

Keywords: *B-cell acute lymphoblastic leukemia*, *BCR-ABL1-positive B-ALL*, *BCR-ABL1-negative B-ALL*, *signaling pathways*, *activating mutations of NRAS, KRAS, FLT3, JAK2, CRLF2 genes*.

For citation: Zarubina K.I., Parovichnikova E.N., Surin V.L., et al. Detection of activating mutations in RAS/RAF/MEK/ERK and JAK/STAT signaling pathways. *Therapeutic Archive*. 2020; 92 (7): 31–42. DOI: 10.26442/00403660.2020.07.000772

Алло-ТГСК – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Ауто-ТГСК – трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток

БРВ – безрецидивная выживаемость

В-ОЛЛ – В-клеточный острый лимфобластный лейкоз

ВРР – вероятность развития рецидива

ГДФ – гуанозин-5'-дифосфат

ГТФ – гуанозин-5'-трифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИТК – ингибиторы тирозинкиназ

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МОБ – минимальная остаточная болезнь

ОВ – общая выживаемость

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СЦИ – стандартное цитогенетическое исследование

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

BCR-ABL1 – патологический химерный ген, образованный в результате транслокации путем слияния генов *BCR* и *ABL1*

BRAF – ген, кодирующий белок серин/треонин-киназу В-Raf

CDKN2A/B – гены, кодирующие белки, ингибирующие циклинзависимые киназы семейств INK4A и INK4B

CREBBP – ген, кодирующий CREB-связывающий белок

CRLF2 – ген, кодирующий подобный цитокиновым рецепторам фактор 2

EBF1 – ген, кодирующий транскрипционный фактор EBF1

FISH – флуоресцентная гибридизация *in situ*

FLT3 – *fms*-подобная тирозинкиназа 3

GNEF – гуанин-нуклеотид-обменные факторы

HRAS – трансформирующий онкоген, который вызывает опухоли при заражении вирусом саркомы Харви

IGH-CRLF2 – химерный ген, возникающий вследствие транслокации *CRLF2* в хромосомный район 14q32

IKZF1 – ген ДНК-связывающего белка Икарос

IL7R – ген, кодирующий рецептор интерлейкина-7

ITD – внутренние тандемные повторы

JAK/STAT – сигнальный путь передачи сигнала с рецепторов цитокинов

JAK1, JAK2 – янус-киназы рецепторов цитокинов

KRAS – трансформирующий онкоген, который вызывает опухоли при заражении вирусом саркомы Кирстен

NRAS – гомолог вирусного онкогена RAS нейробластомы

NT5C2 – ген, кодирующий цитозольную 5'-нуклеотидазу

P2RY8-CRLF2 – химерный ген, возникающий вследствие фокальной делеции участка псевдоаутосомного региона PAR1 на X или Y-хромосоме

PAX5 – ген, кодирующий транскрипционный фактор Pax-5

PTPN11 – ген, кодирующий протеин-тирозин-фосфатазу нерцепторного типа 11

RAS – семейство генов, кодирующих малые G-белки (малые ГТФазы)

RAS/RAF/MEK/ERK – сигнальный каскад митогенативируемой протеинкиназы

RBI – ген ретинобластомы 1

TBL1XR1 – трансдудин (бета)-подобный 1 X-связанный рецептор 1

TP53 – ген-онкосупрессор с молекулярным весом 53 kD

WT – дикий тип гена

Введение

В-клеточные острые лимфобластные лейкозы (В-ОЛЛ) представляют собой крайне гетерогенную в отношении биологических свойств группу злокачественных заболеваний системы крови, характеризующихся неконтролируемой пролиферацией предшественников В-лимфоцитов в костном мозге, периферической крови и других органах [1, 2]. Применение методов массивного параллельного секвенирования (полноэкзомное и транскриптомное секвенирование) позволяет проводить детальные исследования генома, которые вместе с профилированием экспрессии генов в значительной степени расширяют понимание патогенеза острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ). Многочисленные исследования последних лет с применением описанных подходов позволили определить спектр соматических мутаций в генах, вовлеченных в многочисленные сигнальные пути [3]. В частности, у больных В-ОЛЛ соматические мутации выявлены

в генах лимфоидной дифференцировки В-клеток (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*), сигнальных путей RAS (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *PTPN11*) и JAK/STAT (*JAK1*, *JAK2*, *IL7R*, *CRLF2*), генах, участвующих в регуляции клеточного цикла, и онкосупрессоров (*TP53*, *RBI*, *CDKN2A/B*), а также в генах неканонических сигнальных путей (*CREBBP*, *NT5C2*, *TBL1XR1*) [4, 5].

Нарушение регуляции сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK часто сочетается с выявлением соматических активирующих мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *PTPN11* и *BRAF*, определяющих активность этого сигнального пути.

Три гена *RAS* кодируют 4 высокомолекулярных белка массой 21 кДа: HRAS, NRAS, KRAS4A и KRAS4B, причем 2 последних – продукты альтернативного сплайсинга. Все эти белки мембраносвязанные и относятся к семейству малых G-белков (малые ГТФазы), имеющих соответствующую каталитическую (ГТФазную) активность. Они являются сигнальными переключателями молекулами, которые существуют

в 2 различных структурно-функциональных конформациях: связанные с гуанозин-5'-трифосфатом – ГТФ (активные) или связанные с гуанозин-5'-дифосфатом – ГДФ (неактивные) [6, 7].

Связывание лиганда с рецептором на клеточной поверхности создает внутриклеточные сайты для адаптерных молекул и сигнальных белков, например для Shc (Src-гомологичные коллагеновые белки), Grb2 (рецептор фактора роста, связанный с протеином-2), тирозиновой протеинфосфатазы SHP-2, которые рекрутируют и активируют гуанин-нуклеотид-обменные факторы (GNEF), такие как SOS1 и SOS2, RasGRFS1, RasGRFS2 и RasGRP1-RasGRP4 [8]. GNEF способствуют переходу из ГДФ-связанного состояния в ГТФ-связанное (активное). При связывании с ГТФ белок принимает конформацию, которая способствует активации нижестоящих эффекторов. Таким образом, RAS соединяет внеклеточные стимулы с внутриклеточными сигнальными сетями.

Активность белков RAS регулируется белками GAPs (белки-активаторы ГТФазной активности), которые ускоряют реакцию гидролиза ГТФ до ГДФ и высвобождение связанного фактора GNEF, опосредуя таким образом инактивацию белков RAS. Белки RAS с активирующими миссенс-мутациями нечувствительны к GAP и постоянно

пребывают в активном состоянии. Таким образом, процесс активации сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK становится непрерывным, что приводит к чрезмерной пролиферативной активности клетки и как следствие – инициации опухолевых процессов.

Активирующие мутации в генах семейства RAS описаны примерно у 15% больных В-ОЛЛ [9, 10]. Однако зачастую проведенные исследования ограничивались определенными подтипами заболевания (например, группами высокого риска), или были технически ограничены в чувствительности метода (не учитывались субклональные мутации), или же рассматривались мутации только в контексте геномных исследований, но не изучалось их прогностическое значение у больных ОЛЛ [11–15]. Все это свидетельствует о неоднозначности представлений относительно прогностического значения мутаций в генах семейства RAS у взрослых больных В-ОЛЛ.

Недавние исследования показали, что мутации в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3* и *PTPN11* сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK чаще наблюдаются в рецидиве заболевания (34–38% случаев) и являются фактором неблагоприятного прогноза [15, 16]. Продемонстрировано, что RAS-мутантные клоны, обнаруживаемые в рецидиве заболевания, уже существовали в виде небольших субклонов у больных *de novo* В-ОЛЛ [17–19]. Интересен факт, что в некоторых случаях при рецидивах мутантные клоны RAS сохранялись или появлялись, тогда как в других аналогичные клоны, присутствовавшие при первичной диагностике, замещены популяциями RAS дикого типа, что предполагает возможность как положительной, так и отрицательной селекции в клональной эволюции RAS-мутантных ОЛЛ. Исследование К. Oshima и соавт. (2016 г.) показало, что лимфоциты с мутациями в генах RAS проявляют устойчивость к действию метотрексата, но при этом высокочувствительны к винкристину. Эти результаты подчеркивают ключевую роль химиотерапевтической селекции как центрального механизма клональной эволюции при рецидивировании ОЛЛ, а также демонстрируют ранее не признанную двойственную роль мутаций в генах RAS в качестве факторов, влияющих как на чувствительность, так и на устойчивость к химиотерапии [16].

Янус-киназа 2 (JAK2) является членом семейства рецепторных тирозинкиназ и опосредует внутриклеточную передачу сигналов при активации цитокиновых рецепторов, в которых отсутствует собственный тирозинкиназный домен, таких как подобный цитокиновым рецепторам фактор 2. Связывание лигандов (тимусный стромальный лимфопоэтин – TSLP для CLRF2) индуцирует димеризацию целей цитокиновых рецепторов, что приводит к активации белков JAK2 посредством перекрестного фосфорилирования. Далее JAK2 активирует белки STAT (преобразователи сигналов и активаторы транскрипции), которые после димеризации мигрируют в ядро и индуцируют транскрипцию генов, участвующих в дифференцировке и пролиферации гемопоэтических клеток [20].

Активирующие мутации гена JAK2 описаны у 7% больных В-ОЛЛ из группы высокого риска и 18–28% детей с В-ОЛЛ и синдромом Дауна [21, 22]. Мутации генов *JAK1* и

Сведения об авторах:

Паровичникова Елена Николаевна – д.м.н., проф., рук. отд. химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и ТКМ. ORCID: 0000-0001-6177-3566

Сурин Вадим Леонидович – исполняющий обязанности рук. лаб. генной инженерии. ORCID: 0000-0002-1890-4492

Пшеничникова Олеся Сергеевна – к.б.н., ст. науч. сотр. лаб. генной инженерии. ORCID: 0000-0001-5752-8146

Гаврилина Ольга Александровна – к.м.н., врач-гематолог, ст. науч. сотр. отд-ния интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром. ORCID: 0000-0002-9969-8482

Исинова Галина Александровна – к.м.н., врач-гематолог отд-ния интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром. ORCID: 0000-0003-2763-5391

Троицкая Вера Витальевна – к.м.н., зав. отд-нием интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром. ORCID: 0000-0002-4827-8947

Соколов Андрей Николаевич – к.м.н., ст. науч. сотр. отд-ния интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром. ORCID: 0000-0003-1494-7978

Гальцева Ирина Владимировна – к.м.н., зав. лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга. ORCID: 0000-0002-8490-6066

Капранов Николай Михайлович – медицинский физик, лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга. ORCID: 0000-0002-6512-910x

Давыдова Юлия Олеговна – врач клинической лабораторной диагностики, лаб. иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга. ORCID: 0000-0001-5932-0285

Обухова Татьяна Никифоровна – к.м.н., зав. лаб. карииологии. ORCID: 0000-0003-1613-652X

Судариков Андрей Борисович – д.б.н., зав. научно-клинической лаб. молекулярной гематологии. ORCID: 0000-0001-9463-9187

Савченко Валерий Григорьевич – акад. РАН, д.м.н., проф., дир. ORCID: 0000-0001-8188-5557

Контактная информация:

Зарубина Ксения Игоревна – аспирант, врач-гематолог отд-ния интенсивной высокодозной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром. E-mail: ksenijazarubina@mail.com; ORCID: 0000-0003-2947-6398

JAK2 затрагивают высококонсервативные позиции киназного и псевдокиназного доменов и приводят к конститутивной активации *JAK/STAT*-сигнального пути независимо от активации цитокиновых рецепторов [23, 24]. Наиболее часто встречающейся соматической вариацией у больных В-ОЛЛ является R683G, замена аргинина на глицин в позиции 683 псевдокиназного домена [22]. В спектроскопических экспериментах показано, что Arg683 играет важную роль в сохранении компактной структуры псевдокиназного JH2-домена, а замена R683G нарушает эту структуру и приводит к значительному увеличению фосфорилирующей активности белка [25].

С мутациями в генах *JAK* с высокой частотой сочетаются делеции в генах *IKZF1* (*IKAROS*) и *CDKN2A/B* [21]. Кроме того, активирующие мутации генов *JAK* тесно связаны с нарушениями регуляции гена, подобного цитокиновому рецептору фактора 2 (*CRLF2*-cytokine receptor-like factor 2), а именно его перестройками с образованием химерных генов *IGH-CRLF2* и *P2RY8-CRLF2* и высокой экспрессией *CRLF2* [26]. Изначально считалось, что гиперэкспрессия *CRLF2* обусловлена образованием описанных химерных генов [27]. Однако позднее продемонстрировано, что примерно в 20% случаев гиперэкспрессия *CRLF2* связана с наличием дополнительных копий *CRLF2* в геноме [28]. Кроме того, в гене *CRLF2* описаны активирующие мутации [29].

Клиническое значение мутаций в генах *JAK* показано в исследовании С. Mullighan и соавт. (2009 г.), которые установили, что при их наличии профиль экспрессии генов сходен с наблюдаемым при *BCR-ABL1*-подобном педиатрическом ОЛЛ, и они, как правило, сочетаются с неблагоприятным прогнозом заболевания [21].

Активация сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и *JAK/STAT* может быть опосредована внутренними тандемными повторами в гене внутриклеточной рецепторной тирозинкиназы *FLT3* [30, 31]. Несмотря на то, что мутации гена *FLT3* являются достаточно распространенным событием при острых миелоидных лейкозах (частота детекции около 20%), они описаны лишь у небольшого числа пациентов с ОЛЛ [32, 33]. Основная часть исследований по изучению частоты мутации *FLT3*-ITD при ОЛЛ проводилась у детей. Наиболее часто мутации *FLT3*-ITD (20–25% случаев) описаны у больных ОЛЛ с гиперплоидным кариотипом, перестройкой гена *MLL* (mixed-lineage leukemia), а также при острых лейкозах со смешанным фенотипом [34]. Мутация *FLT3*-ITD приводит к независимой от лиганда димеризации и неконтролируемой активации рецептора и вызывает бесконтрольную пролиферацию клеток [31].

Клиническое значение активирующих мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CRLF2* у больных, которым проводили терапию по протоколам российских многоцентровых исследований, неизвестно. Ранее в наших исследованиях при использовании принципов цитостатического воздействия, применяемых в протоколах ОЛЛ-2009, ОЛЛ-2012 и ОЛЛ-2016, нам не удалось подтвердить неблагоприятное влияние на исход заболевания ряда молекулярно-генетических маркеров, таких как делеции гена *IKZF1* и *CDKN2* (p16), которые в зарубежных исследованиях определены как факторы плохого прогноза [35–37]. Связано это, вероятнее всего, с тем, что разные протоколы, основанные на разных принципах цитостатического воздействия, формируют разные факторы риска.

С учетом всего описанного изучение биологической и клинической роли мутаций *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CRLF2* у взрослых больных В-ОЛЛ при проведении химио-

терапии по протоколам российских многоцентровых исследований является актуальной задачей.

Материалы и методы

В исследование включены 119 взрослых пациентов с впервые установленным В-ОЛЛ. Среди них группа с *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ составила 93 больных (48 женщин и 45 мужчин от 17 до 59 лет, медиана возраста – 31 год): 62 пациента, включенные в исследование с ноября 2016 г. по ноябрь 2019 г., получали лечение по протоколу ОЛЛ-2016, 31 пациенту лечение проводили по протоколу ОЛЛ-2009 с августа 2009 г. по август 2016 г. Медиана наблюдения составила 18 мес (1–119). В группу с *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ включены 26 пациентов (16 женщин и 10 мужчин от 23 до 78 лет, медиана возраста 34 года), им проводили лечение по протоколам ОЛЛ-2009 ($n=3$) и ОЛЛ-2012 ($n=23$) в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) с февраля 2010 г. по октябрь 2019 г. Медиана наблюдения составила 23 мес (4–120).

Дизайн исследования ОЛЛ-2009 (ClinicalTrials.gov NCT01193933) неоднократно представлен ранее [38–40]. Новый исследовательский протокол ОЛЛ-2016 (ClinicalTrials.gov NCT03462095) стартовал с ноября 2016 г., в нем сохранены основные принципы протокола ОЛЛ-2009. Ключевыми отличиями от прежней программы являются отсутствие высокодозной консолидации, а также централизованный мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ) методом многоцветной проточной цитофлуориметрии [41]. Протокол ОЛЛ-2012 основан на протоколе ОЛЛ-2009, отличие его заключается в деэскалации химиотерапевтического воздействия и включении в программу ИТК [42].

Диагноз ОЛЛ устанавливали на основании клинических и лабораторных исследований согласно критериям Классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения 2016 г. [43].

Всем больным в дебюте заболевания выполняли стандартное цитогенетическое исследование (СЦИ), а также флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) на интерфазных ядрах для диагностики транслокаций t(9;22)(q34;q11) и t(4;11)(q21;q23). Ряду больных проводили FISH-исследования для выявления делеции 9p21, интрахромосомной амплификации хромосомы 21, делеции TP53/17p13, транслокаций с вовлечением локуса гена *ETV6/12p13* и *IGH/14q32*.

Спектр цитогенетических нарушений у больных *BCR-ABL1*-негативными и *BCR-ABL1*-позитивными В-ОЛЛ представлен в табл. 1. Стоит отметить, что у 2 больных с нормальным кариотипом по данным СЦИ при FISH-исследовании выявлена делеция гена *CDKN2A/9p21* в одном случае биаллельная, в другом – моноаллельная. У 2 больных, СЦИ которым не выполняли, при FISH-исследовании в одном случае выявлена биаллельная делеция *CDKN2A/9p21*, а в другом – транслокация с вовлечением региона 11q23.

Исследование клиренса МОБ методом многоцветной проточной цитофлуориметрии выполнено 62 пациентам с *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ. Из них 53 пациентам проводили терапию по протоколу ОЛЛ-2016, 9 больным – по протоколу ОЛЛ-2009. Исследование МОБ химерного транскрипта *BCR-ABL1* у больных *BCR-ABL1*-позитивными В-ОЛЛ проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Всем больным *de novo* *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ до начала терапии оценивали экспрессию *CRLF2* методом многоцветной проточной цитофлуориметрии, а также прово-

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика 119 пациентов, включенных в исследование

Показатель	В-ОЛЛ	
	BCR-ABL1-негативный ОЛЛ, n (%)	BCR-ABL1-позитивный ОЛЛ, n (%)
Число пациентов	93	26
ИФТ-вариант острого лейкоза		
Ранний пре-В (В1)	18 (19)	2 (8)
Общий В (ВII)	60 (65)	23 (88)
Пре-В (ВIII)	11 (12)	1 (4)
Смешанный (В/миелоидный)	4 (4)	0
Исходная группа риска по ОЛЛ-2009		
Стандартная	33 (35)	–
Высокая	60 (65)	–
Нормальный кариотип	32 (34,4)	6 (23)
Нет митозов	14 (15)	6 (23)
Цитогенетические аберрации	47 (50)	14 (54)
Структурные цитогенетические аберрации		
Транслокация с вовлечением региона 11q23	7 (8,6)	1 (3,8)
Транслокация с вовлечением региона 11q23 в составе комплексного кариотипа	2 (2,15)	0
t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX	2 (2,15)	0
CDKN2A/9p21	5 (5,4)	0
iAMP21	1 (1)	0
Транслокация с вовлечением локуса гена ETV6/12p13	2 (2,15)	0
Транслокация с вовлечением локуса гена IGH/14q32	1 (1)	0
Делеция TP53/17p13	1 (1)	1 (3,8)
Численные цитогенетические аберрации		
Гиперплоидия (более 46 хромосом)	12 (12,9)	1 (3,8)
Гипоплоидия (менее 46 хромосом)	4 (4,3)	5 (19)
Моносомия 7	4 (4,3)	3 (11,5)
Комплексные нарушения кариотипа, n	15 (16)	2 (7,6)
Молекулярные нарушения		
Делеция IKZF1	12/85 (14)	6/12 (50)
Медиана возраста (диапазон), лет	31 (17–59)	34 (23–78)
Лейкоциты, медиана (диапазон), ×10 ⁹ /л	8,1 (0,4–812)	43,1 (2,8–412,8)
ЛДГ, медиана (диапазон), Ед/л	839 (200–20062)	1294 (508–5451)
Бластные клетки		
В костном мозге (диапазон), %	80,6 (6,8–100)	86 (31,6–96,8)
В периферической крови (диапазон), %	22 (0–95)	70 (8–94)
Спленомегалия	65/88 (73,9)	18/24 (75)
Гепатомегалия	57/86 (66,3)	21/24 (87,5)
Нейролейкемия	10/87 (11,5)	4/25 (16)
Образование переднего средостения	4/87 (4,6)	0

Примечание. Здесь и далее в табл. 2: дробные значения означают, что в случае данных параметров выборка неполная. Числитель дроби обозначает число больных с определенным признаком, знаменатель – размер выборки.

дили анализ внутригенных делеций гена *IKZF1* и внутренних tandemных повторов (ITD) гена *FLT3*. У больных *de novo* BCR-ABL1-позитивным В-ОЛЛ проводили анализ только внутригенных делеций гена *IKZF1*.

Для анализа мутаций в генах *NRAS*, *KRAS* (экзоны 2, 3 и 4), *JAK2* (экзоны 14, 16 и 20), *CRLF2* (экзоны 2, 6), ведущих к aberrантной активации соответствующих белков, применяли секвенирование по Сэнгеру. Олигонуклеотидные прай-

меры, которые использовали в работе для ПЦР-амплификации и секвенирования фрагментов генов, разработаны специально для данного исследования на базе лаборатории генной инженерии (ФГБУ «НМИЦ гематологии») и синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Полученные последовательности сопоставлялись с соответствующими референсными последовательностями из базы NCBI (*NRAS* – EU332857, *KRAS* – NG_007524, *JAK2* –

NG_009904, *CRLF2* – NG_034237). При анализе последовательностей использовали программный пакет BioEdit [44]. Молекулярные исследования проводились вслепую относительно клинических данных.

Всем больным *de novo* *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ выполняли анализ мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *CRLF2*. Больным *de novo* *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ до начала терапии выполняли анализ мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*. Оценка мутационного статуса гена *CRLF2* и его экспрессии не проводилась.

Статистический анализ осуществляли с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 23 и GraphPad Prism 6 (GraphPadSoftware, Inc.). Перед проверкой различий средних значений выборок проводили тест Шапиро–Уилка на нормальность распределения (отличным от нормального считали распределение при уровне значимости $p < 0,05$). Проверку статистической значимости различий средних выборок с нормальным распределением выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента, для выборок с ненормальным распределением применяли критерий Манна–Уитни. Для проверки независимости качественных признаков использовали χ^2 -критерий Пирсона или точный критерий Фишера (если в таблицах сопряженности ожидаемые значения меньше 5), независимыми считали признаки при $p < 0,05$. Анализ общей выживаемости (ОВ), безрецидивной выживаемости (БРВ), вероятности развития рецидива (ВРР) проводили методом Каплана–Мейера, статистическую значимость различий между кривыми выживаемости в группах определяли с помощью теста log-rank. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У 22 (23,6%) больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ обнаружено 23 мутации в генах сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK [*NRAS* ($n=9$), *KRAS* ($n=12$), *FLT3* ($n=2$)]. Частота обнаружения мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* сопоставима и составила 12,9% (12 из 93) и 9,7% (9 из 93) соответственно ($p=0,488$). У одного больного выявлено одновременно 2 мутации в гене *KRAS* (в кодонах 13 и 61). У больных *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ мутации описанных генов не выявлены. Мутацию *FLT3*-ITD детектировали в 3,5% (2 из 57) случаев. У больных *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ мутацию *FLT3*-ITD не оценивали.

Нарушения в генах *KRAS* и *NRAS* во всех случаях представлены миссенс-мутациями. В гене *NRAS* найдено 5 различных вариантов (G12D – 3 случая, G12C – 1, G12S – 1, G13D – 3, Q61H – 1), в гене *KRAS* – 7 вариантов (G12D – 5 случаев, G12A – 1, G12V – 1, G13D – 1, Q61L – 1, A146T – 2, K117N – 1). Анализ частоты встречаемости мутаций в различных кодонах генов *NRAS* и *KRAS* показал, что чаще всего мутации детектируются в кодонах 12 и 13 – в 16 случаях из 21 (76%). Среди мутаций *NRAS* в 3 случаях они клональные и в 6 субклональные. Клональные мутации в гене *KRAS* определены у 5 больных, у остальных 7 они субклональные. Распределение мутаций внутри генов представлено на **рис. 1 (см. на цветной вклейке)**.

У 4 (4,3%) больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ обнаружены нарушения в сигнальном каскаде JAK/STAT. Они представлены миссенс-мутациями гена *JAK2* ($n=3$) и гиперэкспрессией *CRLF2* ($n=2$). В одном случае наблюдались одновременно гиперэкспрессия *CRLF2* и мутация в гене *JAK2*. В гене *CRLF2* ни у кого из 70 обследованных пациентов мутации не выявлены. Мутации гена *JAK2* выявлены у 3,4% (у 3 из 89) больных: R683G, D873N и L892V. Две обнаружен-

ные мутации субклональные, одна носила клональный характер. Распределение мутаций гена *JAK2* представлено на **рис. 1**. Мутации гена *CRLF2* и экспрессию *CRLF2* в группе больных *BCR-ABL1*-позитивным В-ОЛЛ не оценивали.

Примечательно, что у 3 пациентов с *BCR-ABL1*-негативным ОЛЛ молекулярные нарушения обнаружены одновременно в 2 сигнальных каскадах RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT: гиперэкспрессия *CRLF2*, мутации *NRAS* (Q61H) и *JAK2* (D873N); гиперэкспрессия *CRLF2* и мутация *KRAS* (G12V); сочетание мутаций в генах *KRAS* (G12D) и *JAK2* (L892V).

Таким образом, общее число больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ, у которых определяется активация сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK (вследствие наличия мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*) и/или JAK/STAT (вследствие наличия мутаций гена *JAK2* или гиперэкспрессии *CRLF2*), составляет 23 (24,7%). У больных *BCR-ABL1*-позитивным ОЛЛ не выявлено ни одной из анализируемых мутаций, в связи с чем мы не оценивали их биологическое и клиническое значение.

Корреляции с клинико-лабораторными характеристиками (возраст, пол, инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$, активность лактатдегидрогеназы – ЛДГ > 750 Ед/л, спленомегалия, нейролейкемия) в зависимости от обнаружения активирующих мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3* сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT у больных *BCR-ABL1*-негативным ОЛЛ не установлено. Также не наблюдалось взаимосвязи между наличием активирующих мутаций и группой риска (**табл. 2**).

Эффективность лечения проанализирована у всех 93 больных В-клеточным *BCR-ABL1*-негативным ОЛЛ и представлена в **табл. 3**. Статистически значимых различий между 2 группами не наблюдалось. Из группы больных без мутаций трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) выполнена 10 (14,3%) пациентам, из них 2 больным во второй ремиссии заболевания, и 1 больному выполнена трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК). Медиана времени до ТГСК в первой ремиссии заболевания составила 9 (6,8–12,1) мес. Из группы с мутациями алло-ТГСК выполнена 2 (8,6%) больным, одному из которых во второй ремиссии заболевания. Ауто-ТГСК в группе лиц с мутациями не проводилась.

Долгосрочные результаты терапии (5-летние показатели ОВ, БРВ и ВРР) у больных *BCR-ABL1*-негативными В-ОЛЛ не имели статистически значимых различий в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3*. ОВ больных с мутациями ($n=23$) составила 64,8%, а без мутаций ($n=70$) – 65,3% ($p=0,721$); **рис. 2, а (см. на цветной вклейке)**. БРВ больных с мутациями ($n=19$) составила 62,7%, а без мутаций ($n=60$) – 60,4% ($p=0,48$); **рис. 2, б (см. на цветной вклейке)**. В группе больных с мутациями в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3* наблюдался один очень поздний рецидив через 57 мес, в группе без мутаций – 2, через 70 и 54 мес. ВРР 29,7 и 35,5% соответственно ($p=0,223$); **рис. 2, в (см. на цветной вклейке)**.

Исследование клиренса МОБ методом многоцветной проточной цитофлуориметрии выполнено 62 пациентам с *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ, среди которых 14 (22,5%) больных с активирующими мутациями в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3*, остальные 48 (77,5%) без мутаций. Не показано статистически значимых отличий в скорости достижения МОБ-негативного статуса между больными с активирующими мутациями в генах *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3* и без мутаций на 70, 133 и 190-й день протокола (**рис. 3, а, см. на цветной вклейке**). Значения МОБ на 133-й день терапии

Таблица 2. Исходные демографические и клинико-лабораторные показатели у пациентов с активирующими мутациями генов NRAS, KRAS, JAK2 и FLT3 и без мутаций (WT)

Показатель	BCR-ABL1-негативный В-ОЛЛ		
	WT, n (%)	Мутации генов NRAS, KRAS, JAK2 и FLT3, n (%)	p
Число пациентов	70 (75,3)	23 (24,7)	
Возраст			
≤30 лет	29 (41)	12 (52)	0,368
>30 лет	41 (59)	11 (48)	
Возраст, медиана, (минимум-максимум)	32,5 (19–59)	27 (17–56)	0,050
Мужчины	33(47)	11(48)	0,95
Женщины	37(53)	12(52)	5
Инициальный лейкоцитоз			
>30×10 ⁹ /л	13 (18,5)	5 (22)	0,765
ИФТ-вариант острого лейкоза			
Ранний пре-В (В1)	16 (23)	2 (8,75)	0,131
Общий В (ВII)	42 (60)	18 (78)	
Пре-В (ВIII)	10 (14)	1 (4,5)	
Смешанный (В/миелоидный)	2 (3)	2 (8,75)	
Гепатомегалия	42/64 (66)	15/22 (68)	0,827
Спленомегалия	48/66 (73)	17/22 (77)	0,675
Нейролейкемия	7/66 (11)	3/21 (14)	0,698
Образование переднего средостения	3/67 (4,4)	1/21 (4,8)	0,99
Повышение активности ЛДГ>750 Ед/л	36/65 (55)	11/22 (50)	0,662
Экспрессия CD34	60/69 (87)	17/20 (85)	0,727
Экспрессия CD13	24/69 (35)	8/20 (40)	0,669
Экспрессия CD33	20/69 (29)	6/20 (30)	0,930
Экспрессия 2 миелоидных маркеров CD13, CD33	13/69 (19)	3/20 (15)	0,99
Экспрессия CD117	1/69 (1,45)	1/20 (5)	0,4
Экспрессия CD15	8/69 (11,6)	2/20 (10)	0,99
Экспрессия CD NG2	6/69 (8,7)	0/20	0,33
Экспрессия CD56	6/69 (8,7)	3/20 (15)	0,414
Экспрессия CD11c	0/69 (0)	1/20 (5)	0,224
Экспрессия CD2	1/69 (1,45)	2/20 (10)	0,125
Экспрессия CD7	1/69 (1,45)	0/20	0,99
Исходная группа риска по ОЛЛ-2009			
Стандартная (n=33)	23 (33)	10 (43)	0,356
Высокая (n=60)	47 (67)	13 (57)	
Нормальный кариотип	23 (33)	9 (39)	0,279
Нет митозов	13 (18,5)	1 (4,5)	
Цитогенетические аберрации	34 (48,5)	13 (56,5)	
Структурные цитогенетические аберрации			
Транслокация с вовлечением региона 11q23	8 (11,4)	0	0,193
Транслокация с вовлечением региона 11q23 в составе комплексного кариотипа	2 (2,9)	0	0,99
t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX	2 (2,9)	0	0,99
CDKN2A/9p21	2 (2,9)	3 (13)	0,094
iAMP21	1 (1,45)	0	0,99
Транслокация с вовлечением локуса гена ETV6/12p13	2 (2,9)	0	0,99
Транслокация с вовлечением локуса гена IGH/14q32	1 (1,45)	0	0,99
Делеция TP53/17p13	0	1 (4,35)	0,247

Таблица 2. Исходные демографические и клинико-лабораторные показатели у пациентов с активирующими мутациями генов *NRAS*, *KRAS*, *JAK2* и *FLT3* и без мутаций (WT) (Окончание)

Показатель	BCR-ABL1-негативный В-ОЛЛ		
	WT, n (%)	Мутации генов <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>JAK2</i> и <i>FLT3</i> , n (%)	<i>p</i>
Численные цитогенетические аберрации			
Гиперплоидия (более 46 хромосом)	7 (10)	5 (22)	0,162
Гипоплоидия (менее 46 хромосом)	4 (5,7)	0	0,568
Моносомия 7	4 (5,7)	0	0,568
Комплексные нарушения кариотипа	10 (14,3)	5 (22)	0,513
Делеция <i>IKZF1</i>	9/63 (14,2)	3/22 (13,6)	0,99

Примечание. WT – дикий тип гена.

Таблица 3. Эффективность лечения пациентов с наличием или отсутствием активации сигнальных путей (WT)

Показатель	BCR-ABL1-негативный В-ОЛЛ		
	WT, n (%)	Мутации генов <i>NRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>JAK2</i> и <i>FLT3</i> , n (%)	<i>p</i>
Число пациентов	70 (75,3)	23 (24,7)	
Ремиссия	60 (86)	19 (83)	0,718
После предфазы	11 (18)	0	
После I фазы индукции	43 (72)	18 (95,5)	0,07
После II фазы индукции	6 (10)	1 (4,5)	6
Рефрактерность	7 (10)	2 (8,7)	0,855
Летальность в индукции	3 (4,3)	2 (8,7)	0,416
Смерть в ремиссии	4 (5,7)	3 (13)	0,358
Число рецидивов	15 (21)	2 (8,7)	0,171

значимо различались между группами ($p=0,0437$), в группе с мутациями значения МОБ ниже, чем в группе больных без мутаций (рис. 3, б, см. на цветной вклейке). Вероятным объяснением этого феномена является чувствительность лимфобластов с мутациями в генах *RAS* к винкристину, который, согласно протоколам ОЛЛ-2009 и ОЛЛ-2016, назначают во время I фазы индукции и первой консолидации до 133-го дня.

Обсуждение

Активация сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK имеет большое значение в патогенезе ОЛЛ и опосредована активирующими миссенс-мутациями, делециями и транслокациями большого числа генов, кодирующих ГТФазы, рецепторные тирозинкиназы, фосфатазы и убиквитинлигазы. Каскад активируется в ответ на множество внеклеточных стимулов и передает сигналы от клеточной поверхности к ядерным и цитоплазматическим мишеням, играя тем самым ключевую роль в различных клеточных процессах, в том числе в пролиферации, апоптозе и дифференцировке [45].

Цель исследования – оценить мутационный статус генов, кодирующих сигнальные молекулы описанного каскада, таких как рецепторная тирозинкиназа *FLT3* и компоненты этого пути белки *NRAS* и *KRAS*. Активирующие мутации в генах семейства *RAS*, кодирующих малые ГТФазы, описаны примерно у 15% больных В-ОЛЛ [9, 10].

В нашем исследовании активирующие мутации в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3* сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK обнаружены у 22 (23,6%) больных BCR-ABL1-негативным В-ОЛЛ. В общей сложности выявлено 23 мутации в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*. У одного больного обнаружено одновременно 2 мутации в гене *KRAS*. Частота обнаружения мутаций

в генах *KRAS* и *NRAS* сопоставима 12,9% (12 из 93) и 9,7% (9 из 93) соответственно, что согласуется с данными исследований зарубежных авторов [9, 10]. В то же время нами не продемонстрировано корреляции между наличием мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* и определенными цитогенетическими нарушениями.

Мутации в генах *RAS* в большинстве случаев (кроме одного) взаимоисключающие (т.е. детектировали одну мутацию либо в гене *KRAS*, либо в гене *NRAS*), что указывает на тот факт, что мутации, активирующие этот сигнальный путь, исключают необходимость повторного мутационного события, иными словами, для активации сигнального каскада достаточно одной мутации, что подчеркивает важность сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK в патогенезе ОЛЛ.

У одного больного выявлены одновременно 2 мутации гена *KRAS* (в кодонах 13 и 61). Согласно литературным данным, множественные мутации в гене *KRAS* встречаются редко, около 2% случаев, и описаны в основном при колоректальном раке [46]. Это явление подчеркивает существование внутриопухлевой генетической гетерогенности.

Отсутствие активирующих мутаций генов *NRAS* и *KRAS* при BCR-ABL1-позитивном В-ОЛЛ подтверждает сомнению факт, что активация RAS представляет собой универсальный механизм, реализующийся в процессе канцерогенеза различных опухолей [47, 48]. Наш анализ 26 больных BCR-ABL1-позитивным ОЛЛ указывает на наличие определенного типа опухоли, в которой активирующие мутации генов *NRAS* и *KRAS* не найдены. Поэтому мы сделали вывод, что мутации кодонов 12, 13, 61, 117 и 146 генов *NRAS* и *KRAS* не участвуют либо крайне редко участвуют в патогенезе BCR-ABL1-позитивного ОЛЛ. Кроме того, с биологической

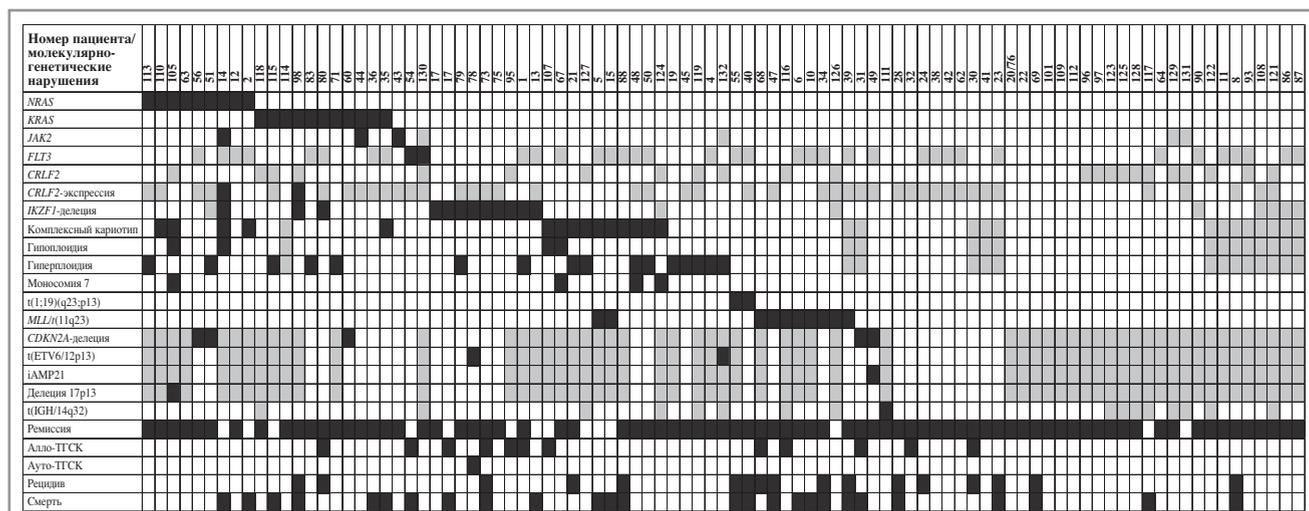


Рис. 4. Молекулярно-генетические нарушения у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ.

Примечание. Любое молекулярно-генетическое изменение и событие обозначены черным цветом. К молекулярно-генетическим изменениям относятся: активирующие мутации генов *NRAS*, *KRAS*, *JAK2*, *FLT3*, гиперэкспрессия *CRLF2*, делеция *IKZF1* и перечисленные цитогенетические нарушения. К событиям относятся: достижение ремиссии, выполнение алло-ТГСК или ауто-ТГСК, рецидив и смерть. Белым цветом обозначено отсутствие признака, серым – отсутствие информации о признаке. Алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ауто-ТГСК – аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

точки зрения факт отсутствия активирующих мутаций генов *NRAS* и *KRAS* объясняется наличием первичного хромосомного нарушения, а именно транслокации $t(9;22)(q34;q11)$, инициирующего процесс лейкемогенеза и исключающего необходимость второстепенных мутационных событий.

При анализе спектра типов мутаций генов *NRAS* и *KRAS* при *BCR-ABL1*-негативном В-ОЛЛ мутации G12D ($n=8$) и G13D ($n=4$) наиболее частые, составили 38 и 19% соответственно (см. рис. 3 на цветной вклейке). Остальные мутации представлены примерно в равном соотношении (4,7–9,4%). Полученные результаты соответствуют данным, представленным в работах других исследователей [10].

Внутренние тандемные повторы гена *FLT3* сигнального каскада RAS/RAF/MEK/ERK выявлены у 2 больных, что составило 3,5%. Случай обнаружения *FLT3*-ITD у одного из этих больных и особенности течения *FLT3*-ITD-позитивного В-ОЛЛ описан нами ранее [49]. Частота обнаружения *FLT3*-ITD, по данным литературы, у больных ОЛЛ крайне низка. В работе S. Kobold и соавт. приведены данные, суммирующие результаты 7 исследований, сообщающих о больных *FLT3*-ITD-позитивным ОЛЛ. Из 1634 пациентов с ОЛЛ внутренние тандемные повторы выявлены только у 14 больных [50].

Нарушения в сигнальном каскаде JAK/STAT нами обнаружены у 4 (4,3%) больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ. Они представлены миссенс-мутациями гена *JAK2* ($n=3$) и гиперэкспрессией *CRLF2* ($n=2$). Всего в гене *JAK2* выявлены 3 миссенс-мутации (R683G, D873N и L892V) у 3 (3,4%) больных. Согласно литературным данным мутации нерецепторной тирозинкиназы *JAK2*, приводящие к aberrантной активации JAK/STAT-сигнального каскада, ассоциированного с синдромом Дауна, встречаются с частотой приблизительно 20% [22]. Исследования у детей, больных ОЛЛ без синдрома Дауна, детектировали мутации генов *JAK* в 10% случаев, которые относились к категории высокого риска [21, 51]. Наиболее часто встречающейся мутацией гена *JAK2* у больных В-ОЛЛ является мутация R683G псевдокиназного домена [22]. Невысокая частота обнаружения мутаций в гене *JAK2* в нашей работе, вероятно всего, объясняется характеристи-

ками исследуемой выборки: в отличие от ранее опубликованных работ, описывающих случаи В-ОЛЛ только высокого риска и *BCR-ABL1*-подобные ОЛЛ у детей [11, 52–54], наша когорта включала больных всех групп риска в возрасте от 18 до 55 лет.

С мутациями в гене *JAK2* тесно связаны нарушения гена, кодирующего подобный цитокиновым рецепторам фактор 2, – *CRLF2*, и делеции гена *IKZF1*. Приблизительно у 1/2 пациентов, у которых обнаружены изменения *CRLF2*, также выявляют мутации *JAK*, особенно в гене *JAK2* в положении R683 [29].

Мы проводили оценку гиперэкспрессии и мутационного статуса гена *CRLF2* только у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ. Получены следующие результаты: в гене *CRLF2* мутации не выявлены, а гиперэкспрессию *CRLF2* определяли в 4% случаев (2/50). Полученные результаты в целом соответствуют результатам зарубежных коллег, по данным которых нарушения гена *CRLF2* обнаруживаются у 5–15% детей с В-ОЛЛ, не ассоциированным с синдромом Дауна [27, 29].

В нашем исследовании у 3 пациентов с *BCR-ABL1*-негативным ОЛЛ молекулярные нарушения обнаружены одновременно в 2 сигнальных каскадах RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT. Гиперэкспрессия *CRLF2* в 1 из 2 случаев ассоциирована с мутацией гена *JAK2* R683G, кроме того, у этого же пациента определялись делеция гена *IKZF1* и мутация гена *NRAS* Q61H. На рис. 4 (см. комментарии к рисунку) представлен спектр молекулярно-цитогенетических нарушений больных В-ОЛЛ, включенных в исследование, описанному пациенту соответствует номер 14. Второй случай гиперэкспрессии *CRLF2* ассоциирован с делецией гена *IKZF1* и мутацией гена *KRAS* G12V, что соответствует пациенту под номером 98. Сочетание мутаций *KRAS* G13D и *JAK2* L892V выявлено у пациента под номером 44 (см. рис. 4). Таким образом, ассоциация нескольких мутаций различных генов предполагает, что в процессе лейкемогенеза участвуют генетические нарушения, затрагивающие множество внутриклеточных сигнальных каскадов, что обуславливает агрессивное течение заболевания.

Мы не выявили корреляции наличия мутаций в генах сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT с клинико-лабораторными характеристиками, включающими возраст, пол, инициальный лейкоцитоз выше $30 \times 10^9/\text{л}$, ЛДГ > 750 Ед/л, спленомегалию, нейролейкемию.

Среди *BCR-ABL1*-негативных В-ОЛЛ ни у одного пациента с активирующими мутациями генов *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* не обнаружено перестройки региона 11q23 (локуса гена *MLL*), t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1, интрахромосомной амплификации *iAMP21*. По данным литературы, мутации в генах *NRAS*, *KRAS* с высокой частотой детектируются при массивной гиперпloidии, т.е. в группе, характеризующейся благоприятным прогнозом, и в подгруппах высокого риска, в частности у больных с гиподиплоидным кариотипом [11, 13, 18, 55, 56]. Кроме этого, мутации генов *KRAS*, *NRAS* описаны у 6% больных *BCR-ABL1*-подобным ОЛЛ [57, 58]. В нашем исследовании гиперпloidный кариотип определялся у 25% больных с мутациями в генах *NRAS* и *KRAS*, что не противоречит данным литературы.

Мутации в генах сигнального каскада JAK/STAT, обуславливающие возможную чувствительность к ингибиторам JAK2, мутации в генах сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK и гиперэкспрессия белка CRLF2 являются диагностическими критериями *BCR-ABL1*-подобного ОЛЛ. Для диагностики этого варианта заболевания используют несколько подходов, к которым относятся:

- 1) выявление *BCR-ABL1*-подобного профиля экспрессии генов;
- 2) выявление химерных генов с участием тирозинкиназ, цитокинов и цитокиновых рецепторов методом мультиплексной ПЦР, FISH или секвенированием нового поколения (транскриптомный анализ или таргетные панели);
- 3) секвенирование по Сэнгеру или таргетное секвенирование для мутаций генов сигнального каскада JAK/STAT и RAS/RAF/MEK/ERK (для наиболее часто встречающихся мутаций, таких как R683G в гене *JAK2*, применяют метод аллельной дискриминации в ходе ПЦР в реальном времени);
- 4) для идентификации делеций и вставок используют метод фрагментного анализа с последующим секвенированием по Сэнгеру;
- 5) экспрессию белка CRLF2 оценивают методом проточной цитофлуориметрии.

Таким образом, диагностические инструменты (фрагментный анализ, секвенирование по Сэнгеру, проточная цитофлуориметрия), использованные в ходе исследования, позволяют интегрировать данные о молекулярно-генетических нарушениях, происходящих на различных уровнях сигнальных каскадов JAK/STAT и RAS/RAF/MEK/ERK, и выделять генотипы, соответствующие *BCR-ABL1*-подобному варианту заболевания. Суммируя выявленные молекулярно-генетические нарушения, можно сделать вывод, что генотип у больных 14, 98, 80 и 44, представленных на рис. 4, соответствует *BCR-ABL1*-подобному ОЛЛ. Клиническое течение заболевания у указанных пациентов (за исключением 44-го), также носило рефрактерно-рецидивирующий характер, свойственный *BCR-ABL1*-подобному ОЛЛ [59].

Полученные нами результаты не показали какого-либо клинического значения активирующих мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ при выполнении терапии по протоколам Российской исследовательской группы. В то же время создается впечатление о том, что в ряде случаев при сочетании нескольких молекулярных нарушений активирующие мутации ассоциированы с более агрессивным течением *BCR-ABL1*-негатив-

ного В-ОЛЛ. С другой стороны, на настоящее время это всего лишь единичные наблюдения, что затрудняет оценку клинической значимости этого феномена.

Клиническое значение активирующих мутаций пути RAS/RAF/MEK/ERK исследовано большим числом авторов, однако результаты исследований во многом противоречивы и, по-видимому, в основном зависят от выбранной подгруппы. В нескольких исследованиях, включая самый большой анализ, проведенный на больных педиатрической группы [60], не продемонстрировано какого-либо значительного влияния мутаций генов RAS на выживаемость больных, в то же время существуют сообщения, где мутации в генах *NRAS* и *KRAS* определены как независимый фактор неблагоприятного прогноза [61]. Влияние мутаций *FLT3* широко изучалось при остром миелоидном лейкозе, однако не совсем ясно, влияют ли мутации гена *FLT3* на эффективность терапии у пациентов с ОЛЛ [13, 18]. В нашем исследовании, учитывая небольшое число больных, у которых выявлены мутации *FLT3-ITD* (всего 2), для последующего анализа мы сгруппировали их с мутациями *NRAS* и *KRAS*, учитывая их принадлежность к сигнальному каскаду RAS/RAF/MEK/ERK.

Мутации в гене *JAK2* ввиду их малочисленности ($n=3$) также оценивали в одной группе с мутациями *NRAS* и *KRAS*. Из 3 больных с мутацией в гене *JAK2* только у одного течение заболевания носило рефрактерный характер, 2 других живы в ремиссии. Таким образом, на данном этапе нашего исследования сложно оценить прогностическую значимость мутаций в гене *JAK2*. В то же время в литературе представлены данные, которое абсолютно четко указывают на то, что наличие мутации в сигнальном каскаде JAK/STAT (в том числе в гене *JAK2*) независимо от профиля экспрессии генов или сопутствующих цитогенетических перестроек, позволяет выделять группу взрослых больных В-ОЛЛ, характеризующуюся плохими показателями ОБ и БРВ [62].

Заключение

Несмотря на то, что значимость активирующих мутаций генов *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2* у больных *BCR-ABL1*-негативным В-ОЛЛ при лечении по протоколам Российской исследовательской группы не обнаружена, знание о наличии или отсутствии описанных aberrаций позволяет лучше понимать биологию опухолевого процесса. Особое значение это приобретает в случае развития рецидива или рефрактерного течения заболевания. Обнаружение активирующих мутаций в генах сигнальных каскадов RAS/RAF/MEK/ERK и JAK/STAT позволяет обоснованно выбрать соответствующий ИТК, который в сочетании с иммунотерапией биспецифическим антителом блинатумомабом увеличивают эффективность терапии в случае развития рецидива или рефрактерного течения заболевания [63–66].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №19-315-90094.

Благодарность участникам многоцентрового исследования ОЛЛ-2016: К.Д. Капланову (Волгоград), Т.С. Константиновой (Екатеринбург), Е.А. Борисенковой (Калуга), Е.С. Фокиной (Киров), О.С. Самойловой и М.Е. Гришунинной (Нижегород), О.Ю. Барановой и А.С. Антиповой (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»), Л.В. Гавриловой (Саранск), Е.Е. Зининой (Сургут), В.А. Лапину (Ярославль).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(4):407-16. doi: 10.3324/haematol.2015.141101
- Программное лечение заболеваний системы крови: сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови. Под ред. В.Г. Савченко. М.: Практика, 2012; с. 289-342 [Programmnoe lechenie zabolovanij sistemy krovi: sbornik algoritmov diagnostiki i protokolov lecheniya zabolovanij sistemy krovi. In: VG Savchenko eds. Moscow: Praktika; 2012; p. 289-342 (In Russ.)].
- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881). doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4
- Harrison CJ. Key pathways as therapeutic targets. *Blood*. 2011;118(11):2935-6. doi: 10.1182/blood-2011-07-362723
- Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:118-25. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.118
- Herrmann C. Ras-effector interactions: after one decade. *Current Opinion in Structural Biology*. 2003;13(1):122-9. doi: 10.1016/s0959-440x(02)00007-6
- Arcaro A. The Small GTP-binding Protein Rac Promotes the Dissociation of Gelsolin from Actin Filaments in Neutrophils. *J Biol Chem*. 1998;273(2):805-13. doi: 10.1074/jbc.273.2.805
- Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in Developmental Disorders and Cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):295-308. doi: 10.1038/nrc2109
- Ward AF, Braun BS, Shannon KM. Targeting Oncogenic Ras Signaling in Hematologic Malignancies. *Blood*. 2012;120(17):3397-406. doi: 10.1182/blood-2012-05-378596
- Neri A, Knowles DM, Greco A, et al. Analysis of RAS oncogene mutations in human lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9268-72. doi: 10.1073/pnas.85.23.9268
- Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2011;118(11):3080-7. doi: 10.1182/blood-2011-03-341412
- Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2015;47(6):672-6. doi: 10.1038/ng.3301
- Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al. The Genomic Landscape of Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(3):242-52. doi: 10.1038/ng.2532
- Andersson AK, Ma J, Wang J, et al. The Landscape of Somatic Mutations in Infant MLL-rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias. *Nat Genet*. 2015;47(4):330-7. doi: 10.1038/ng.3230
- Ma X, Edmonson M, Yergeau D, et al. Rise and Fall of Subclones From Diagnosis to Relapse in Pediatric B-acute Lymphoblastic Leukaemia. *Nat Commun*. 2015;6:6604. doi: 10.1038/ncomms7604
- Oshima K, Khiabanian H, Silva-Almeida AC, et al. Mutational Landscape, Clonal Evolution Patterns, and Role of RAS Mutations in Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):11306-11. doi: 10.1073/pnas.1608420113
- Irving J, Matheson E, Minto L, et al. Ras Pathway Mutations Are Prevalent in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Confer Sensitivity to MEK Inhibition. *Blood*. 2014;124(23):3420-30. doi: 10.1182/blood-2014-04-531871
- Case M, Matheson E, Minto L, et al. Mutation of Genes Affecting the RAS Pathway Is Common in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*. 2008;68(16):6803-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0101
- Irving J, Matheson E, Minto L, et al. Ras Pathway Mutations Are Prevalent in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Confer Sensitivity to MEK Inhibition. *Blood*. 2014;124(23):3420-30. doi: 10.1182/blood-2014-04-531871
- Smith CA, Fan G. The Saga of JAK2 Mutations and Translocations in Hematologic Disorders: Pathogenesis, Diagnostic and Therapeutic Prospects, and Revised World Health Organization Diagnostic Criteria for Myeloproliferative Neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39(6):795-810. doi: 10.1016/j.humpath.2008.02.004
- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK Mutations in High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9414-8. doi: 10.1073/pnas.0811761106
- Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet*. 2008;372(9648):1484-92. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61341-0
- Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-13. doi: 10.1038/ncr.2012.347
- Chen E, Staudt LM, Green AR. Janus kinase deregulation in leukemia and lymphoma. *Immunity*. 2012;36(4):529-41. doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.017
- Li F, Guo HY, Wang M, et al. The Effects of R683S (G) Genetic Mutations on the JAK2 Activity, Structure and Stability. *Int J Biol Macromol*. 2013;60:186-95. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.029
- Herold T, Schneider S, Metzeler KH, et al. Adults With Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia Frequently Have IGH-CRLF2 and JAK2 Mutations, Persistence of Minimal Residual Disease and Poor Prognosis. *Haematologica*. 2017;102(1):130-8. doi: 10.3324/haematol.2015.136366
- Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. Rearrangement of CRLF2 Is Associated With Mutation of JAK Kinases, Alteration of IKZF1, Hispanic/Latino Ethnicity, and a Poor Outcome in Pediatric B-progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2010;115(26):5312-21. doi: 10.1182/blood-2009-09-245944
- Schmäh J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, et al. Molecular Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia With High CRLF2 Gene Expression in Childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2017;64(10). doi: 10.1002/pbc.26539
- Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated Expression of Cytokine Receptor Gene, CRLF2, Is Involved in Lymphoid Transformation in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 2009;114(13):2688-98. doi: 10.1182/blood-2009-03-208397
- Choudhary C, Müller-Tidow C, Berdel WE, Serve H. Signal Transduction of Oncogenic FLT3. *Int J Hematol*. 2005;82(2):93-9. doi: 10.1532/IJH97.05090
- Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, et al. Tandem-duplicated FLT3 Constitutively Activates STAT5 and MAP Kinase and Introduces Autonomous Cell Growth in IL-3-dependent Cell Lines. *Oncogene*. 2000;19(5):624-31. doi: 10.1038/sj.onc.1203354
- Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911-8.
- Rombouts WJ, Blokland I, Löwenberg B, Ploemacher RE. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the FLT3 gene. *Leukemia*. 2000;14(4):675-83. doi: 10.1038/sj.leu.2401731
- Armstrong SA, Look AT. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(26):6306-15. doi: 10.1200/JCO.2005.05.047
- Пискунова И.С., Обухова Т.Н., Паровичникова Е.Н. и др. Прогностическое значение делеции локуса гена CDKN2a/9p21 у взрослых пациентов с Ph-негативным острым лимфобластным лейкозом на терапии по протоколу ОЛЛ-2009. *Онкогематология*. 2017;12(3):17-24 [Piskunova IS, Obukhova TN, Parovichnikova EN, et al. CDKN2a/9p21 deletion is not a poor prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia patients treated according to protocol RALL-2009. *Oncogematologiya*. 2017;12(3):17-24 (In Russ.)]. doi: 10.17650/1818-8346-2017-12-3-17-24
- Пискунова И.С., Обухова Т.Н., Паровичникова Е.Н. и др. Структура и значение цитогенетических перестроек у взрослых больных Ph-негативным острым лимфобластным лейкозом. *Терапевтический архив*. 2018;90(7):30-7 [Piskunova IS, Obukhova TN, Parovichnikova EN, et al. Structure and importance of cytogenetic rearrangements in adult patients with Ph-negative acute lymphoblastic leukemia. *Therapeutic Archive*. 2018;90(7):30-7 (In Russ.)]. doi: 10.26442/terarkh201890730-37
- Басхаева Г.А., Паровичникова Е.Н., Бидерман Б.В. и др. Роль мутаций гена IKZF1 при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе у взрослых больных, получающих лечение по протоколам российского многоцентрового исследования. *Гематология и трансфузиология*. 2018;63(1):16-30 [Bashaeva GA, Parovichnikova EN, Biderman BV, et al. The role of IKZF1 gene mutations in cellular acute lymphoblastic leukemia in adult patients receiving treatment under russian multicenter rese-

- arch protocols. *Gematologiya i Transfuziologiya*. 2018;63(1):16-30 (In Russ.). doi: 10.25837/HAT.2018.80..1.002
38. Паровичникова Е.Н., Клясова Г.А., Исаев В.Г. и др. Первые итоги терапии Ph-негативных острых лимфобластных лейкозов взрослых по протоколу Научно-исследовательской группы гематологических центров России ОЛЛ-2009. *Терапевтический архив*. 2011;83(7):7-11. [Parovichnikova EN, Kliasova GA, Isaev VG, et al. Pilot results of therapy of adult Ph-negative acute lymphoblastic leukemia according to the protocol of Research Group of Russian Hematological Centers ALL-2009. *Therapeutic Archive*. 2011;83(7):7-11 (In Russ.)].
 39. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Промежуточные результаты по лечению острых Ph-негативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных [итоги Российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)]. *Онкогематология*. 2014;9(3):6-15 [Parovichnikova EN, Troitskaya VV, Sokolov AN, et al. Interim results of the Ph-negative acute lymphoblastic leukemia treatment in adult patients [results of Russian research group of ALL treatment (RALL)]. *Oncohematology*. 2014;9(3):6-15 (In Russ.)]. doi: 10.17650/1818-8346-2014-9-3-6-15
 40. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Острые В-лимфобластные лейкозы взрослых: выводы из российского проспективного многоцентрового исследования ОЛЛ-2009. *Терапевтический архив*. 2017;89(7):10-7 [Parovichnikova EN, Troitskaya VV, Sokolov AN, et al. Adult B-cell acute lymphoblastic leukemias: Conclusions of the russian prospective multicenter study ALL-2009. Ostrye V-limfoblastnyye leykozuy vzroslykh: vyvody iz rossiiskogo prospektivnogo mnogotsentrovogo issledovaniya OLL-2009. *Therapeutic Archive*. 2017;89(7):10-7 (In Russ.)]. doi: 10.17116/terarkh2017897 10-17
 41. Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г. Российские многоцентровые исследования по лечению острых лейкозов. *Терапевтический архив*. 2019;91(7):4-13 [Parovichnikova EN, Savchenko VG. Russian multicenter clinical trials in acute leukemias. *Therapeutic Archive*. 2019;91(7):4-13 (In Russ.)]. doi: 10.26442/00403660.2019.07.000325
 42. Гаврилина О.А., Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В. и др. Результаты ретроспективного многоцентрового исследования терапии больных Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом по протоколам российской исследовательской группы. *Гематология и трансфузиология*. 2017;62(4):172-80 [Gavrilina OA, Parovichnikova EN, Troitskaya VV, et al. The results of the retrospective multicentre study of the therapy of Ph-positive acute lymphoblastic leukemia according to the protocols of the Russian research group. *Gematologiya i Transfuziologiya*. 2017;62(4):172-80 (In Russ.)]. doi: 10.18821/0234-5730-2017-62-4-172-180
 43. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544
 44. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95-8.
 45. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(11):761-74. doi: 10.1038/nrc3106
 46. Macedo MP, Andrade L, Coudry R, et al. Multiple Mutations in the *Kras* Gene in Colorectal Cancer: Review of the Literature With Two Case Reports. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(10):1241-8. doi: 10.1007/s00384-011-1238-0
 47. Barbacid M. Ras Genes. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:779-827. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004023
 48. Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res*. 1988;195(3):255-71. doi: 10.1016/0165-1110(88)90004-8
 49. Зарубина К.И., Паровичникова Е.Н., Басхаева Г.А. и др. Трудности диагностики и терапии Ph-подобных острых лимфобластных лейкозов: описание 3 клинических случаев. *Терапевтический архив*. 2018;90(7):110-7 [Zarubina KI, Parovichnikova EN, Baskhaeva GA, et al. Diagnostics and Treatment Challenges of Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia: A Description of 3 Clinical Cases. *Therapeutic Archive*. 2018;90(7):110-7 (In Russ.)]. doi: 10.26442/terarkh2018907110-117
 50. Kobold S, Kılıç N, Scharlaur J, et al. FLT3 – ITD Positive Acute Lymphocytic Leukemia, Does It Impact on Disease's Course? *Turk J Haematol*. 2010;27(2):133-4. doi: 10.5152/tjh.2010.18
 51. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, et al. Identification of Novel Cluster Groups in Pediatric High-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia With Gene Expression Profiling: Correlation With Genome-Wide DNA Copy Number Alterations, Clinical Characteristics, and Outcome. *Blood*. 2010;116(23):4874-84. doi: 10.1182/blood-2009-08-239681
 52. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70339-5
 53. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(2):153-66. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.005
 54. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41(11):1243-6. doi: 10.1038/ng.469
 55. Paulsson K, Horvat A, Strömbeck B, et al. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 Are Frequent and Possibly Mutually Exclusive in High Hyperdiploid Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(1):26-33. doi: 10.1002/gcc.20502
 56. Wiemels JL, Zhang Y, Chang J, et al. RAS Mutation Is Associated With Hyperdiploidy and Parental Characteristics in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia*. 2005;19(3):415-9. doi: 10.1038/sj.leu.2403641
 57. Reshmi SC, Harvey RC, Roberts KG, et al. Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2017;129(25):3352-61. doi: 10.1182/blood-2016-12-758979
 58. Roberts KG, Reshmi SC, Harvey RC, et al. Genomic and Outcome Analyses of Ph-like ALL in NCI Standard-Risk Patients: A Report From the Children's Oncology Group. *Blood*. 2018;132(8):815-24. doi: 10.1182/blood-2018-04-841676
 59. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol*. 2017;35(4):394-401. doi: 10.1200/JCO.2016.69.0073
 60. Perentesis JP, Bhatia S, Boyle E, et al. RAS oncogene mutations and outcome of therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(4):685-92. doi: 10.1038/sj.leu.2403272
 61. Driessen EM, Van Roon EHJ, Spijkers-Hagelstein JA, et al. Frequencies and prognostic impact of RAS mutations in MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants. *Haematologica*. 2013;98(6):937-44. doi: 10.3324/haematol.2012.067983
 62. Messina M, Chiaretti S, Wang J, et al. Prognostic and therapeutic role of targetable lesions in B-lineage acute lymphoblastic leukemia without recurrent fusion genes. *Oncotarget*. 2016;7(12):13886-901. doi: 10.18632/oncotarget.7356
 63. Sokolov N, Parovichnikova EN, Troitskaya VV, et al. Blinatumomab + Tyrosine Kinase Inhibitors with No Chemotherapy in BCR-ABL-Positive or IKZF1-Deleted or FLT3-ITD-Positive Relapsed/Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: High Molecular Remission Rate and Toxicity Profile. *Blood*. 2017;130(Suppl. 1):3884. doi: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.3884.3884
 64. Зарубина К.И., Усикова Е.В., Абрамова А.В. и др. Достижение полной молекулярной ремиссии у больного острым лимфобластным лейкозом с мутацией FLT3-ITD при терапии сорафенибом и блинатумомабом. *Клин. онкогематология*. 2017;10(4):540-1 [Zarubina KI, Usikova EV, Abramova AV, et al. *Clin Oncohematology*. 2017;10(4):540-1 (In Russ.)]. doi: 10.26442/terarkh2018907110-117
 65. Sokolov A, Parovichnikova E, Troitskaya V, et al. Targetable blinatumomab + tyrosine kinase inhibitors treatment in relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia patients: clinical effectiveness and peripheral lymphocytes subpopulations kinetics. *Haematologica*. 2017;102(s2):354-5.
 66. Sokolov AN, Parovichnikova EN, Troitskaya VV, et al. BCR/ABL, IKZF deletions and FLT3-ITD as the targets for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia treatment: Blinatumomab combined with Tyrosine kinase inhibitors and ATRA. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2020;9(1):38-45. doi: 10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-1-38-46

Поступила: 13.04.2020