

# Анализ изменений аномального метилирования ДНК в процессе комплексного лечения при остром миелоидном лейкозе у детей

Руденко В.В.<sup>1\*</sup>, Казакова С.А.<sup>4</sup>, Танас А.С.<sup>1,2</sup>, Попа А.В.<sup>3</sup>,  
Немировченко В.С.<sup>3</sup>, Залетаев Д.В.<sup>1,2,4</sup>, Стрельников В.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478 (e-mail: shkarupo@mail.ru)

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 (e-mail: vstrel@list.ru)

<sup>3</sup> Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 (e-mail: apopa@list.ru)

<sup>4</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 (e-mail: zalnem@mail.ru)

Нарушение распределения метилирования является функциональным событием процесса лейкемогенеза и терапевтической мишенью эпигенетических препаратов. Для идентификации аномального метилирования при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у детей была разработана система мультилокусной метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР) для фрагментов, принадлежащих промоторным областям генов *EGFLAM*, *TMEM176A/176B*, *GSG1L*, *CLDN7*, *CXCL14* и *SOX8*, отобранных с использованием метода непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов. Система обладает чувствительностью 90–91% в отношении определения наличия злокачественного процесса, является универсальной системой маркеров ОМЛ у детей, перекрывающей всей молекулярные подтипы опухоли. Проанализированы образцы биологического материала костного мозга (КМ) 39 пациентов с ОМЛ. Курс лечения пациентов включал 4–5 блоков химиотерапии (ХТ), в зависимости от выставленной группы риска, а также эпигенетические препараты — АТРА и дакоген. Для пациентов с содержанием миелобластов <40% — средний индекс метилирования (ИМ) составил  $0,197 \pm 0,181$ , а для пациентов с количеством миелобластных клеток >40% —  $0,514 \pm 0,228$  ( $p = 0,000736$ ). В группе с низким ИМ полностью отсутствует метилирование генов *CLDN7*, *GSG1L* и *EGFLAM*. На 15 день после начала первого блока химиотерапии КМ пациентов с первоначальным содержанием миелобластов <40% демонстрирует полное отсутствие метилирования, содержание бластных клеток (БКМ) при этом варьирует от 0 до 40%. В группе с первоначально высоким содержанием миелобластных клеток происходит снижение среднего ИМ с  $0,514$  до  $0,41$  за счет снижения частоты метилирования генов *CXCL14*, *TMEM176A/176B*, *GSG1L* и *SOX8*, при этом снижения частоты метилирования *CLDN7* и *EGFLAM* практически не происходит. 5-дневный курс деметилирующей терапии, сопровождается ростом содержания БКМ и выравниванием профиля метилирования при среднем количестве БКМ в обеих группах <3%. С помощью разработанной системы возможна оценка злокачественной прогрессии БКМ, которые после проведения ХТ считаются морфологически нормальными, при этом демонстрируя профиль аномального метилирования опухолевых клеток.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз у детей, эпигенетические маркеры, метилирование ДНК, клональность.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Analysis of changes in abnormal DNA methylation in the process of complex treatment in acute myeloid leukemia in children

Rudenko V.V.<sup>1\*</sup>, Kazakova S.A.<sup>4</sup>, Tanas A.S.<sup>1,2</sup>, Popa A.V.<sup>3</sup>,  
Nemirovchenko V.S.<sup>3</sup>, Zaletaev D.V.<sup>1,2,4</sup>, Strelnikov V.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University

<sup>3</sup> N.N. Blokhin Russian Research Center for Oncology

<sup>4</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

An aberrant DNA methylation distribution is a functional event in the process of leukemogenesis and a target of epigenetic therapy. To identify DNA methylation markers most common for any molecular subtype of pediatric acute myeloid leukemia (AML) we have applied a method of unbiased differential methylation screening of the genomes and designed multiplex MS-PCR system of DNA methylation markers belonging to the promoter regions of the genes *EGFLAM*, *TMEM176A/176B*, *GSG1L*, *CLDN7*, *CXCL14* and *SOX8*. The system has a sensitivity of 90–91% for determining the malignant process. We have studied bone marrow samples from 39 children with AML. All patients were treated by decitabine and ATRA in complex with chemotherapy (CT). Methylation index (MI) was  $0.197 \pm 0.181$  for patients with a myeloblasts content less than 40%, and  $0.514 \pm 0.222$  for patients with myeloblasts content more than 40% ( $p = 0.000736$ ). Methylation of the *CLDN7*, *GSG1L* and *EGFLAM* genes is absent in the group with low MI. Patients with the initial content of myeloblasts less than 40% demonstrate absence of methylation on the 15th day after the start of the CT. The average MI decreases in the group with the initially high content of myeloblasts due to decrease in the frequencies of methylation of the genes *CXCL14*, *TMEM176A/176B*, *GSG1L* and *SOX8*. The 5-day course of demethylation therapy is accompanied by an increase in the content of blast cells and an equalization of the methylation profile. With the marker system developed it is possible to evaluate the malignant progression of blast cells, which are considered morphologically normal after CT, demonstrating at the same time the abnormal methylation profile of tumor cells.

**Key words:** acute myeloid leukemia in children, epigenetic markers, DNA methylation, clonality.

### Введение

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) является результатом злокачественной трансформации стволовой гемопоэтической клетки и представляет собой группу клональных заболеваний костного мозга [1]. Ключевыми факторами патогенеза заболевания считаются цитогенетические аномалии (ЦГА) и мутации генов. В настоящий момент эти факторы хорошо известны и используются в международных классификаторах заболевания [2]. Хромосомные aberrации определяются у 50% пациентов с ОМЛ и являются важнейшими предикторами прогноза и риска рецидива. Остальная часть пациентов с нормальным кариотипом, на первый взгляд, представляющая гомогенную группу, фактически состоит из подгрупп пациентов с разным клиническим исходом [3]. С учетом этого возникает необходимость детального изучения иных звеньев патогенеза, способных на прогнозирование и стратификацию рисков для пациентов. В процессе лейкогенеза помимо ЦГА и мутаций генов участвуют эпигенетические механизмы, в частности, метилирование ДНК [4].

Нормальный профиль метилирования ДНК важен для развития организма, дифференцировки тканей и поддержания гомеостаза клетки [5]. Паттерны метилирования ДНК наследуются при делении клеток с высокой точностью. Нарушение распределения метилирования, гиперметилирование или гипометилирование, являются маркерными событиями процесса канцерогенеза и может играть значимую роль в инициации и прогрессии злокачественного перерождения генома. Например, гиперметилирование промотора гена-супрессора опухолевого роста *CDKN2b* и ассоциированное с этим отсутствие его экспрессии были описаны для 88% ОМЛ у взрослых и 67% ОМЛ у детей [6]. Накопление эпигенетических нарушений, вероятно, также способствует развитию ОМЛ.

В настоящее время для лечения ОМЛ широко используются деметилирующие агенты децитабин (5-аза-2'-деоксицитидин) и азацитидин (5-азацитидин). Препараты являются неспецифическими деметилирующими агентами и действуют как имитаторы цитозина. Гипометилирующий эффект достигается за счет ингибирования ДНК-метилтрансферазы DNMT1. В клетку препараты попадают с помощью переносчика нуклеозидов hENT1. После трех фосфорилирований молекула лекарственного препарата встраивается в молекулу ДНК [7]. В ходе репликации метилированной нуклеотидной последовательности ДНК-метилтрансфераза копирует метильную группу на вновь синтезированную цепь ДНК. При использовании деметилирующих агентов фермент контактирует со встроенным в цепь ДНК вместо цитозина динуклеотидом азацитидин-гуанин (так как не чувствителен к замене основания) и ковалентно с ним сшивается. После чего захваченные DNMTs разлагаются протеасомой, приводя

к пассивному гипометилированию. Таким образом, после репликации в ДНК останется метилированной только одна из цепочек вместо двух. Дальнейшая репликация приведет к появлению клеток, полностью лишенных метилирования [8].

Обоснованием терапевтического эффекта является восстановление экспрессии генов-супрессоров опухолевого роста, а также других генов, имеющих фундаментальное значение в процессах опухолеобразования, за счет деметилирования промоторных регуляторных областей. Реверсия этих эпигенетических изменений, таким образом, может восстановить пролиферационный контроль и апоптотическую чувствительность клетки. Идентификация подобных событий у пациентов, принимающих деметилирующую терапию, затруднена и сконцентрирована, главным образом, на статусе метилирования отдельных генов. Большая часть подобных исследований проведена на генах-супрессорах опухолевого роста, в частности *p15<sup>INK4b</sup>* и *CDH1 (E-cadherin)*. В ряде исследований показано, что гены гиперметилированы при миелодиспластическом синдроме (МДС) и ОМЛ, а под воздействием терапии децитабином деметилируются, восстанавливая свою экспрессию [9].

В дополнение к деметилирующему эффекту, нельзя не учитывать прямое повреждающее действие гипометилирующих агентов на ДНК и апоптоз. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз (DNMTi) вызывают повреждение ДНК за счет неспецифического деметилирования рассеянных CpG-пар, метилированных в норме, и последующей дестабилизации генома. Потенциальной проблемой безопасности при неспецифическом деметилировании ДНК является повышенная индукция незаконных транскрипционных событий. На мышинных моделях со сниженным уровнем метилирования ДНК была показана активация онкогенных локусов [10]. Эти события, вероятно, связаны с эпигенетической реактивацией мобильных элементов ДНК, что приводит к необходимости осуществлять молекулярный мониторинг деметилирующей терапии с целью сведения к минимуму негативных последствий. Интересно отметить, что клинически при введении децитабина в высокодозном режиме эффект от лечения более выражен, чем при поддержании низкого уровня препарата в плазме крови. Таким образом, клиническая эффективность препарата может зависеть не только от прямого деметилирующего эффекта, но также от способа введения препарата и выбора дозы терапевтического курса, оптимального для сбалансированного деметилирования ДНК и индукции апоптоза [11].

Исследования этой области способны пролить свет на биологическую природу заболевания и привести к совершенствованию клинической классификации ОМЛ с целью стратификации рисков и индивидуализации таргетной терапии.

### Материалы и методы

В группу исследования вошли образцы биологического материала костного мозга (КМ) детей с ОМЛ (НИИ ДОиГ РОНЦ им. Н.Н.Блохина).

Медиана возраста пациентов составила 4 года [1, 9, 12], из них — 43,6% мальчики и 56,4% — девочки. Патологии, сопутствующей основному заболеванию выявлено не было.

Проанализированы образцы биологического материала КМ 39 пациентов с ОМЛ до лечения и/или на различных его этапах. Для лечения пациентов была использована комбинация стандартной химиотерапии и эпигенетической терапии. Курс химиотерапии включал 4–5 блоков в зависимости от выставленной группы риска, после чего пациента переводили на поддерживающую терапию. Для эпигенетической терапии был использован весанонид (полностью транс-ретиноевая кислота, ATRA) в качестве ингибитора гистоновых деацетилаз. Пациенты принимали препарат на протяжении всех курсов химиотерапии. В качестве деметилирующего препарата, ингибирующего ДНК-метилтрансферазу, был использован децитабин (дакоген). Препарат вводили 1 раз за все лечение в течение 5 дней. Три пациента представлены до лечения и после 2 курсов полихимиотерапии (ПХТ), они были проанализированы в общей группе до лечения и в группе, включающей пациентов после блока AIE (идарубицин, этопозид). Пяти пациентам курс приема децитабина был назначен на 1–5 день, до начала первого блока ПХТ (до AIE) (рис. 1), 31 пациенту деметилирующая терапия назначалась на 16–20 день индукционной химиотерапии, после AIE (рис. 2), в период аплазии костного мозга, с целью оптимизации терапевтического эффекта деметилирующего препарата.

В выборке было выявлено 11 исходов — рецидив и/или смерть. Смерть троих пациентов была вызвана аплазией костного мозга и сепсисом до окончания курса индукционной химиотерапии. 8 человек имели КМ рецидив, 3 из них со смертельным исходом уже после индукции и консолидации процесса.

Выделение ДНК из костного мозга пациентов проводили стандартным методом экстракции фенол/хлороформом. Подготовка выделенной ДНК перед проведением ПЦР заключалась в обработке рестриктазой BstHNI (Сибэнзим) в течение 16 часов при  $t = 50^\circ\text{C}$  с дальнейшей инактивацией при  $t = 75^\circ\text{C}$  в течение 20 мин.

Для идентификации аномального метилирования нами была разработана система праймеров мультилокусной метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР) для фрагментов, отобранных с использованием метода непредвзятого скрининга дифференциального метилирования геномов (НСДМГ) [12]. Дизайн праймеров для мультилокусной МЧ-ПЦР проведен с помощью программы MPrimer (<http://biocompute.bmi.ac.cn/CZlab/mprimer/>), позволяющей планировать пулы праймеров для амплификации нескольких це-

левых и контрольных локусов в мультиплексном формате при близких условиях, минимизируя появление неспецифических продуктов ПЦР, что особенно важно при проведении ПЦР фрагментов CpG-островков. Было предложено проводить реакции с использованием в качестве внутреннего положительного контроля ПЦР константно метилированного фрагмента гена *CUX1*, а в качестве внутреннего контроля полноты гидролиза — константно неметилированного фрагмента гена *SNRK*.

Для анализа метилирования конкретных специфических последовательностей использована частощепляющая метилчувствительная рестриктаза BstHNI, так как районы CpG-островков имеют множество сайтов узнавания этого фермента, что практически устраняет возможность неполного гидролиза ДНК. При наличии большого количества специфических сайтов узнавания, содержащих изучаемые CpG пары, выявляется эпигенетический статус локусов, метилированных по всем сайтам узнавания рестриктазы, то есть гиперметилированный статус достаточно протяженного участка промоторной



Рис. 1. Курс лечения пациентов с ОМЛ согласно дизайну протокола НИИ ДОГ ОМЛ 2012: введение децитабина перед химиотерапией (день — 5–0 до начала химиотерапии). ATRA — полностью транс-ретиноевая кислота, циклы химиотерапии: AIE — идарубицин, этопозид, haM — митоксантрон (высокие дозы), AI — идарубицин, haM — митоксантрон (низкие дозы), HAЕ — цитарабин, этопозид).

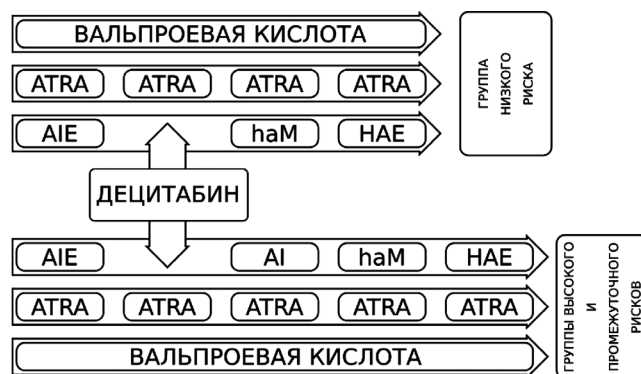


Рис. 2. Курс лечения пациентов с ОМЛ согласно дизайну протокола НИИ ДОГ ОМЛ 2012: введение децитабина после блока AIE (день 16–20 после начала химиотерапии). ATRA — полностью транс-ретиноевая кислота, циклы химиотерапии: AIE — идарубицин, этопозид, haM — митоксантрон (высокие дозы), AI — идарубицин, haM — митоксантрон (низкие дозы), HAЕ — цитарабин, этопозид).

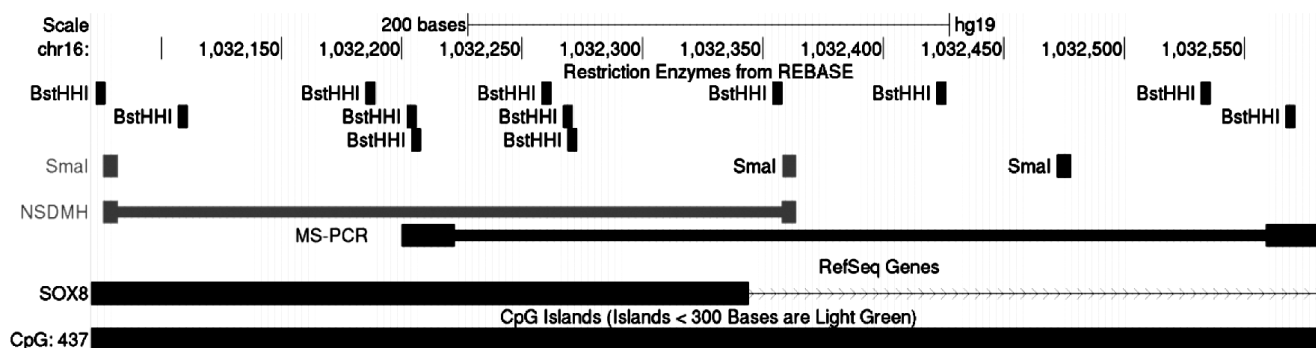


Рис. 3. Демонстрация сопоставимости локусов и возможности для определения внутренней гетерогенности, использованных маркеров, на примере гена *SOX8*. Серым цветом указаны сайты узнавания рестриктазы *SmaI*, использовавшиеся в качестве маркеров, при анализе промоторного участка гена *SOX8* методом НСДМГ.

области (рис. 3). Однако это одновременно является причиной существенного снижения числа выявляемых аномально метилированных образцов. Поэтому система из 16 генов [13], выявленных методом НСДМГ, была скорректирована до 9 локусов, принадлежащих промоторным областям генов *SOX8*, *ABCG4*, *DLK2*, *CXCL14*, *GSG1L*, *TMEM176A/TMEM176B*, *CLDN7*, *EGFLAM*, *TMEM200B*.

Исходные предпосылки формирования панели маркеров были следующими: целевые гены были выбраны из области фрагментов библиотеки, созданных методом НСДМГ; анализируемая область принадлежала промоторному CpG-островку гена, для которого показана ассоциация с процессами канцерогенеза и/или инактивация экспрессии за счет гиперметилирования промоторной области. Гены *ABCG4*, *DLK2* и *TMEM200B* продемонстрировали низкую частоту метилирования в образцах до лечения (<5%) и были исключены из дальнейшего анализа.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием термоциклера «C1000 Touch Thermal Cycler» (BioRad, США).

Состав реакционной смеси ПЦР:

Для генов *GSG1L*, *CXCL14*, *TMEM176A/176B* (P1): 2 мкл растворенной ДНК, 0,3 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 2,5 мкл каждого 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл 10 пмоль прямого (F) и обратного (R) праймеров для каждого фрагмента, 2,5 ед. термостабильной Taq-полимеразы, добавленной на этапе прогревания до 95°C («горячий старт»), 5 мкл 5-кратного буфера для ПЦР («Интерлабсервис», Москва), 2 мкл DMSO (Helicon), 2 мкл β-меркаптоэтанола, деионизированной воды до 25 мкл.

Программа ПЦР: смесь прогревали при t = 95°C в течение 10 мин. с добавлением Taq-полимеразы и проводили 27 циклов с параметрами: денатурация: 95°C — 30 с; отжиг: 69°C — 45 с; элонгация: 72°C — 1 мин. Финальную инкубацию проводили при t = 72°C в течение 10 мин.

Состав реакционной смеси ПЦР для гена *SOX8* (P1-I): 2 мкл растворенной ДНК, 1,3 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>,

по 2 мкл каждого 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл 10 пмоль прямого (F) и обратного (R) праймеров для каждого фрагмента, 2,5 ед. термостабильной Taq-полимеразы, 5 мкл 5-кратного буфера для ПЦР («Интерлабсервис», Москва), 3 мкл DMSO (Helicon), деионизированной воды до 25 мкл.

Программа ПЦР: смесь прогревали при 95°C в течение 5 мин. и проводили 33 цикла с параметрами: денатурация: 95°C — 1 мин; отжиг: 63°C — 45 с; элонгация: 72°C — 30 с. Финальную инкубацию проводили при 72°C в течение 10 мин.

Для генов *EGFLAM*, *CLDN7* (P2): 2 мкл растворенной ДНК, 1,3 мкл 50 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 2 мкл каждого 2,5 мМ dNTP, по 0,5 мкл 10 пмоль прямого (F) и обратного (R) праймеров для каждого фрагмента, 2,5 ед. термостабильной Taq-полимеразы, добавленной на этапе прогревания до 95°C («горячий старт»), 5 мкл 5-кратного буфера для ПЦР («Интерлабсервис», Москва), 3 мкл DMSO (Helicon), 2 мкл β-меркаптоэтанола, деионизированной воды до 25 мкл.

Программа ПЦР: смесь прогревали при t = 95°C в течение 10 мин с добавлением Taq-полимеразы и проводили 27 циклов с параметрами: денатурация: 95°C — 30 с; отжиг: 56°C — 45 с; элонгация: 72°C — 1 мин. Финальную инкубацию проводили при t = 72°C в течение 10 мин.

Условия ПЦР: используемые специфические праймеры и длины полученных фрагментов указаны в табл. 1.

Разделение продуктов рестрикции проводили в 8%-ном полиакриламидном геле методом вертикального электрофореза. В качестве контроля использовали ДНК стандартной молекулярной массы pUC19/MspI. Визуальный контроль пробега проб ДНК проводили по ксиленицианолу и бромфеноловому синему. Окрашивание геля нитратом серебра для визуализации продуктов ПЦР проводили в растворе 0,011 М AgNO<sub>3</sub> в течение 10–15 минут, затем трижды промывали в дистиллированной воде. Для проявления использовали раствор следующего состава: 0,75 М NaOH; 0,5 М HCHO; 2,3 мМ

Na(BH<sub>4</sub>) около 10–15 минут, в зависимости от интенсивности проявления геля.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета Statistica 10.0. Для определения профиля метилирования изучаемой панели генов до и после различных этапов комбинированного лечения была рассчитана частота метилирования генов в образцах. При сравнении частот аномального метилирования исследуемых маркеров были использованы точный критерий Фишера и критерий  $\chi^2$ . В работе также определяли количественный показатель — индекс метилирования (ИМ), в данном случае рассчитываемый как отношение числа метилированных генов к общему числу генов панели. Для сравнения средних значений ИМ в группах был использован t-критерий Стьюдента. Для определения взаимосвязи между содержанием бластных клеток в КМ и ИМ рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона.

## Результаты и обсуждение

Несмотря на очевидные успехи клинического использования эпигенетической терапии все еще остается множество вопросов, касающихся избирательности реактивации генной экспрессии [14], так как помимо неспецифичности эпигенетических агентов, существуют свидетельства рецидивов у пациентов или отсутствия ответа при использовании эпигенетической терапии [15, 16], а также невыраженный эффект при лечении солидных опухолей [17].

В образцах пациентов до лечения были изучены клинико-генетические корреляции между частотой метилирования изучаемых генов, ИМ и такими клинико-морфологическими признаками злокачественного новообразования, как наличие ЦГА, FАВ-вариант заболевания, группа риска и содержание миелобластных клеток (МБК) в КМ.

Было отмечено, что у пациентов с содержанием МБК <40% средний ИМ составил  $0,197 \pm 0,181$ ,  $n = 10$ ,

Таблица 1

Последовательность праймеров и длина продуктов ПЦР, проанализированных в работе

Ген	Праймеры	Длина (п.н.)
<i>SOX8</i>	5'-cgg cgc gct caa agc caa gcc g-3'	381
	5'-cac acc cca ggc gct gcc ctc c-3'	
<i>GSG1</i>	5'-ggg gct cgg gtg cct gag atc g-3'	274
	5'-ggg cgg gct ccg gaa cag tgt c-3'	
<i>CXCL14</i>	5'-gtc gcc cgc ccc ggg aaa gga c-3'	369
	5'-gca ggg gcc ctt ggg ggt cag g-3'	
<i>TMEM176A/176B</i>	5'-ccc agg ctg cgc ggt ttc ccg a-3'	173
	5'-cgt tct cgc ctc cag ccc cgc c-3'	
<i>EGFLAM</i>	5'-gcg agg agt gaa ggt ttc ag-3'	226
	5'-gga aac acg ggt agt tcc aa-3'	
<i>CLDN7</i>	5'-gat agg ggg aag ggt gaa ag-3'	137
	5'-gat tag ccg aag cca caa ac-3'	
<i>ABCG4</i>	5'-ggc ggg acc ggc gag cag tag c-3'	429
	5'-aag cca ggc gca cca ccc gga c-3'	
<i>DLK2</i>	5'-ggg cgc gct cac ctc gga cag g-3'	442
	5'-tcc cca tcc cgc gga ccc ctc c-3'	
<i>TMEM200B</i>	5'-ccc ata ccc acc agt acc ac-3'	251
	5'-gtc ctt gcc tcc cat ctt ct-3'	
<i>CUX1_P1</i>	5'-cgg gcg cca gcg act cac cct c-3'	539
	5'-ggc ggc ctt ctc cag gcg gtg g-3'	
<i>CUX1_P2</i>	5'-aga agg ccg cga act tga ac-3'	418
	5'-tat ggc gat ttt gcc ctg tg-3'	
<i>SNRK_P1</i>	5'-agc gct ggg tgc ggg gtt tcg g-3'	169
	5'-gcg-gag-gct-act-gag-gcg-gcg-g-3'	
<i>SNRK_P2</i>	5'-cag ccc gct cgg tat tat ga-3'	197
	5'-gca aca gcg gag gct act ga-3'	

а у пациентов с количеством МБК >40% —  $0,514 \pm 0,228$ ,  $n = 19$  ( $p = 0,000736$ ) (рис. 4а). В группе с низким ИМ полностью отсутствует метилирование генов *CLDN7* (0/10, 8/10,  $p = 0,0251$ ), *GSG11* и *EGFLAM*

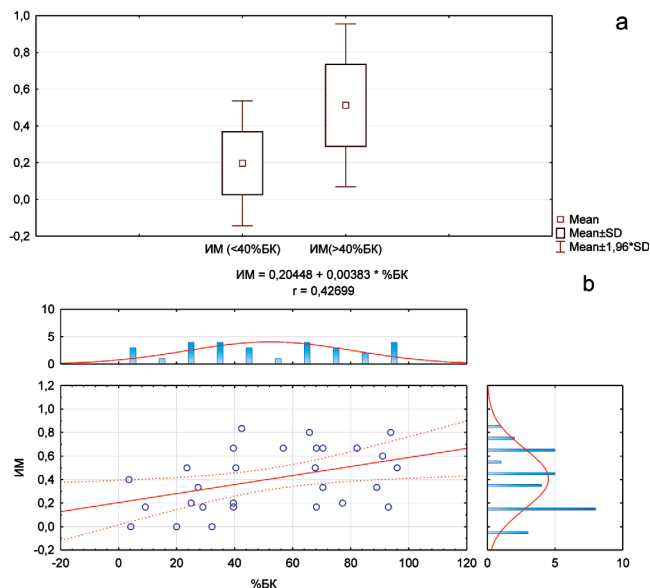


Рис. 4. Средний индекс метилирования в группах с различным содержанием МБК до начала лечения (а) и корреляционный график для ИМ и %-ного содержания бластных клеток (б).

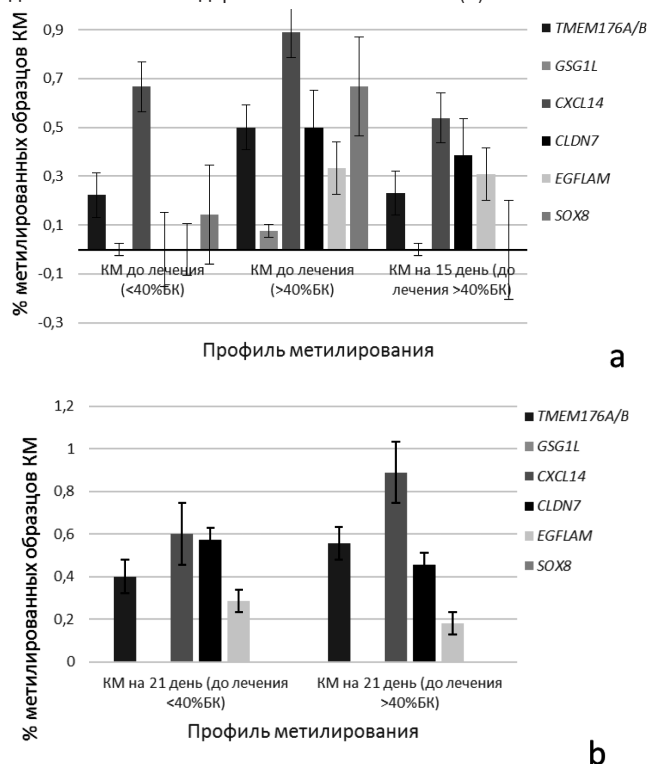


Рис. 5. Профиль метилирования до лечения и после АИЕ — 15 день терапии (а), после АИЕ + дакоген — 21 день терапии (б).

(рис. 5а). При этом выраженной корреляции между ИМ и содержанием МБК не показано (рис. 4б). На 15 день после начала первого блока химиотерапии (АИЕ) КМ пациентов из группы терапии II с первоначальным содержанием МБК <40% демонстрирует полное отсутствие метилирования по всем генам. При том, что содержание бластных клеток (БК) варьирует от 0 до 40%. В группе с первоначально высоким содержанием МБК также происходит снижение среднего ИМ с 0,514 до 0,41 за счет снижения частоты метилирования генов *CXCL14* ( $p = 0,0297$ ), *TMEM176A/176B*, *GSG11* и *SOX8*, при этом снижения частоты метилирования *CLDN7* и *EGFLAM* практически не происходит (рис. 5б). 5-дневный курс деметилирующей терапии, сопровождается некоторым восстановлением клеточного пула и ростом процентного содержания БК. После 5-дневного курса деметилирующей терапии было обнаружено выравнивание профиля метилирования (рис.5б) и ИМ (с 0,197 до 0,29 и с 0,514 до 0,39 при среднем количестве БК в обеих группах <3%), свидетельствующее о начале лекарственно индуцированной клональной эволюции опухоли. Значимого различия в частоте метилирования генов на 21 день терапии также не определяется.

Пациенты, вошедшие в группы с различным режимом введения деметилирующего агента, были отобраны случайным образом, кроме того сравнение частоты метилирования генов до лечения в обеих группах показало их идентичность по данному признаку (табл. 2). Однако в группе пациентов, получавших дакоген до курса ХТ, лейкозная нагрузка была значительно выше, чем во второй группе, так как содержание клеток в КМ до лечения значительно выше, чем уже после первого блока ХТ. Именно с этим связывается терапевтический эффект в группе II, в которой отмечена высокая безрецидивная выживаемость (рис. 6).

Клинический эффект от лечения был лучше в группе II, с режимом введения децитабина после блока АИЕ. Трехлетняя безрецидивная выживаемость в группе (I) пациентов, получавших децитабин до курса ХТ, составила  $50,0 \pm 25,0\%$  при средней продолжительности наблюдения  $40,2 \pm 8,0$  месяцев; а в группе (II), где деметилирующий агент вводился после курса АИЕ (16—20 дни ХТ), —  $69,3 \pm 10,6\%$  при средней продолжительности наблюдения  $35,7 \pm 3,7$  месяцев ( $p = 0,000$ ).

В группе I из 5 пациентов 4 (80%) имели различные ЦГА, и у 2 (50%) из них было отмечено рецидивирование заболевания. Часть группы II, для которой проводилась оценка эффекта лечения в виде рецидива ( $n = 22$ ), была разделена на две подгруппы по наличию ЦГА. ЦГА было диагностировано у 11 (50%) из них рецидив возник у 5 пациентов (45,5%), у 11 пациентов без ЦГА рецидив был выявлен у 1 пациента (9%). Все это не позволяет однозначно связать лучшую результативность лечения в группе II с режимом введения лекарственного препарата из-за наличия влияния фактора-конфаундера — ЦГА. Как уже было сказано выше — хромосомные абер-

рации определяются у 50–60% пациентов с ОМЛ и являются важнейшими предикторами прогноза и риска рецидива [3].

Особенностью децитабина как деметилирующего агента является неспецифичность его действия, метильная группа утрачивается случайным образом. Тем не менее терапевтический эффект лекарства связывается с возможным деметилированием промоторных областей генов-супрессоров опухолевого роста и, как следствие, восстановлением их экспрессии [9, 18]. Гены, выявленные методом НСДМГ, не являются непосредственными генами-супрессорами, что отчасти подтверждается отсутствием значимого снижения частоты метилирования после 5-дневного курса лечения дакогеном. Однако можно отметить, что при использовании дакогена до АИЕ все-таки происходит снижение метилирования, в то время как анализ метилирования после использования схемы АИЕ + дакоген демонстрирует клональную эволюцию опухоли, так как у трех генов происходит снижение частоты метилирования, у трех других — увеличение (табл. 3). В частности, происходит значительное увеличение частоты метилирования гена *CLDN7* с 22,22 до 56,52% ( $p = 0,0195$ ) и уменьшение частоты метилирования гена *SOX8* с 38,1 до 8,33. При этом по результатам миелограмм в пунктате КМ на данном этапе обнаруживается, как правило, менее 5% БК, условно относимых к нормальному биологическому материалу, что одновременно свидетельствует о том, что метод МЧ-ПЦП позволяет определять наличие аномального метилирования в избытке нормального биологического материала

ла с высокой чувствительностью и об отсутствии корреляции между содержанием бластных клеток и качественным выявлением аномального метилирования изучаемых локусов. Однако количественное определение содержания лейкозных клеток при таком подходе невозможно. Поэтому мы не делаем акцента на множественном сравнении генов и достоверности выявленных различий. На данном этапе возможно оценить лишь общие закономерности, происходящие с лейкозными клетками в процессе комплексного лечения.

На 15 день терапии в группе II мы видим снижение частоты метилирования генов, а после применения дакогена частоты метилирования снова начинают расти. КМ после курса АИЕ берется на 15 день, то есть до восстановления клеточного пула. Цель — снизить число эффекторных молекул для лекарства и тем самым добиться более значимого эффекта при той же концентрации препарата. Это может влиять на выявляемость метилирования клеток. Во всех остальных случаях забор КМ реализуется перед новым курсом ХТ, и при этом анализу подвергается восстановленный пул костномозговых элементов. Кроме того, в рассматриваемой выборке мы имеем влияние некоего стороннего эффекта, курса эпигенетической терапии (АТРА+вальпроевая кислота) (рис. 1, 2), оказывающего свой первоначальный эффект на ацетилирование гистонов, но тем не менее который также может быть связан с деметилированием ДНК.

Только после третьего блока ХТ (АИ) становится статистически заметным снижение выявляемости аномаль-

Таблица 2

#### Определение гомогенности выборки по частоте аномального метилирования изучаемых локусов

Ген	Общая группа, % (n = 33)	Группа I, % (n = 5)	Группа II, % (n = 28)	p
<i>SOX8</i>	44 (11/25)	60 (3/5)	38,1 (8/21)	0,2878
<i>GSG1L</i>	6,45 (2/31)	0 (0/5)	7,69 (2/26)	1
<i>EGFLAM</i>	18,75 (6/32)	40 (2/5)	14,82 (4/27)	0,2279
<i>CLDN7</i>	28,13 (9/32)	60 (3/5)	22,22 (6/27)	0,1206
<i>THEM176A/176B</i>	51,61 (16/31)	60 (3/5)	50 (13/26)	0,3445
<i>CXCL14</i>	87,1 (27/31)	80 (4/5)	88,46 (23/26)	0,1729

Таблица 3

#### Определение различия частоты аномального метилирования изучаемых локусов до и после лечения (группа I — дакоген + АИЕ, группа II — АИЕ + дакоген)

Ген	Группа I до лечения, % (n = 5)	Группа I после АИЕ, % (n = 5)	p	Группа II, % (n = 28)	Группа II на 21 день, % (n = 23)	p
<i>SOX8</i>	60 (3/5)	0 (0/5)	0,1667	38,1 (8/21)	8,33 (1/12)	0,1074
<i>GSG1L</i>	0 (0/5)	0 (0/5)	--	7,69 (2/26)	0 (0/16)	0,5168
<i>EGFLAM</i>	40 (2/5)	20 (1/5)	1	14,82 (4/27)	30,43 (7/23)	0,3047
<i>CLDN7</i>	60 (3/5)	40 (2/5)	1	22,22 (6/27)	56,52 (13/23)	0,0195
<i>THEM176A/176B</i>	60 (3/5)	20 (1/5)	0,5238	50 (13/26)	56,25 (9/16)	0,7581
<i>CXCL14</i>	80 (4/5)	60 (3/5)	1	88,46 (23/26)	75 (12/16)	0,3971

но метилированных генов, образцов с полным деметилированием становится 75% против 9%, обнаруженных до начала терапии ( $p < 0,0001$ ), что может свидетельствовать о достижении молекулярной ремиссии у части пациентов. Снижение ИМ происходит до уровня 0,138 с 0,39 до лечения. Однако даже на этом этапе не отмечено стабильного исчезновения метилирования образцов КМ. На дальнейших этапах ХТ и поддерживающей терапии часть пациентов демонстрируют реметилирование образцов. На настоящий момент не удалось установить значимой корреляции со стабильно сохраняющимся метилированием образца и рецидивом заболевания, более того, пациенты демонстрировавшие стабильный ИМ на протяжении курса лечения, рецидивов не имели. Еще 2 пациента в момент рецидивирования не показали аномального метилирования ни одного из 6 изучаемых генов. Последнее обстоятельство подтверждает тот факт, что чувствительность панели маркеров — не превышает 90–91%, так как до лечения метилирование той или иной степени выраженности было обнаружено в 30 образцах из 33. Однако в крови большинства пациентов после окончания индукции обнаруживается некоторое количество морфологически нормальных бластных клеток. Исходя из этого, можно предположить, что обнаруживаемое метилирование уже относится к профилю условно нормальных бластных клеток как реактивный ответ на проведение агрессивной химиотерапии. Для ответа на поставленный вопрос необходимо проведение дальнейших исследований с использованием клеточного сортера. Также обращает на себя внимание следующее обстоятельство — из 33 образцов до лечения, для которых определяли ИМ, только 4 пациента продемонстрировали метилирование 5 генов из 6 (ИМ = 0,83), и один — метилирование 4 генов, ИМ = 1 не был обнаружен ни у одного из пациентов. Из 4 человек с ИМ = 0,83 два были из группы I, двое других их группы II. Оба пациента из II группы скорострительно скончались уже после 1 блока ХТ. Двое других, у которых деметилирующая терапия проводилась до начала блока АИЕ, имели рецидив, но один из них остался жив,

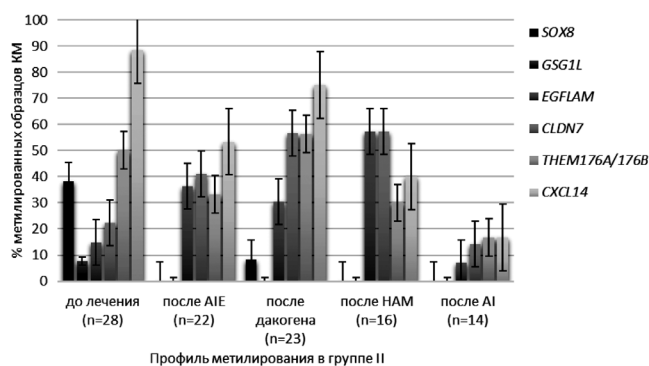


Рис. 6. Изменение профиля метилирования изучаемой панели в процессе лечения.

другой скончался только через год из-за раннего КМ рецидива. Пациент, у которого показано метилирование 4 генов из 6, принадлежал к группе, в которой назначалась химиотерапия без дакогена, и продемонстрировал резистентность к ХТ. Все пять пациентов с высоким ИМ  $> 0,5$  относились к группе неблагоприятного ответа на ХТ из-за наличия соответствующих ЦГА. Кроме того, согласно литературным данным, группа высокого метилирования ассоциирована с наличием мутаций в генах *IDH1*, *IDH2* [19], являющихся негативными прогностическими факторами заболевания и связанными с плохой выживаемостью [20]. Все это является подтверждением возможности использования маркеров метилирования в качестве вспомогательных прогностических критериев при ОМЛ у детей.

Несмотря на то, что после начала ХТ лейкозные клетки представлены более агрессивными клонами, они плавно восстанавливают нормальный профиль метилирования, возможно, за счет снижения числа лейкозных клеток в процессе ХТ (рис. 6). На настоящей панели маркеров прямое действие деметилирующего препарата остается невыясненным. Так, например, по данным Lund K. с соавт. [21], после применения деметилирующей терапии 5-азациитидином на клеточной линии происходит снижение частоты метилирования CpG-островков в 2 раза. Отсутствие значимого снижения профиля в нашем случае может свидетельствовать об отсутствии эффективности отобранных маркеров для оценки деметилирующего действия дакогена, либо о влиянии иных механизмов, не позволяющих в условиях *in vivo* продемонстрировать деметилирующий эффект препарата.

## Заключение

Предложенная система из 6 маркеров аномального метилирования, принадлежащих промоторным областям генов *SOX8*, *CXCL14*, *GSG1L*, *TMEM176A/TMEM176B*, *CLDN7*, *EGFLAM*, является универсальной системой маркеров ОМЛ у детей, перекрывающей все молекулярные подтипы опухоли. Система обладает чувствительностью 90–91% в отношении определения наличия злокачественного процесса. Однако непредвзятый характер скрининга, в ходе которого проводился отбор маркеров, не позволил выявить гены, непосредственно вовлеченные в процесс лейкемогенеза. В ходе исследования были использованы гены, для которых был выявлен гиперметилированный статус на образцах ОМЛ у детей и показана ассоциация с процессами канцерогенеза в целом. Использование системы на образцах ОМЛ у детей после лечения не демонстрирует прямого ожидаемого действия эпигенетической терапии — снижения частоты метилирования локусов даже в условиях существенного снижения содержания бластных клеток. Исследования, проводившиеся до настоящего времени не только на клеточных линиях, но и на пациентах с ОМЛ, ориентированы на определение ко-



личественного снижения параметра «метилирование», объясняемого снижением содержания миеглобластов. Разработанная система маркеров — качественная и предназначена для выявления аномального метилирования в существенном избытке нормального биологического материала, что подтверждается результатами исследования. Наличие аномального метилирования у пациентов с полной гематологической ремиссией, без рецидива заболевания заставляет нас сделать предположение о клональной эволюции бластных клеток костного мозга. С помощью разработанной системы возможна оценка злокачественной прогрессии бластных клеток, которые после проведения ХТ считаются нормальными по совокупности морфологических признаков, определяемых под микроскопом, при этом они демонстрируют профиль аномального метилирования опухолевых клеток, что требует дальнейших исследований.

### Список литературы

1. Li S, Mason CE, Melnick A. Genetic and epigenetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Genet Dev*. 2016. 36:100-106. doi: 10.1016/j.gde.2016.03.011.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, France. 2008.
3. Gaidzik V, Dohner K. Prognostic implications of gene mutations in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Semin Oncol*. 2008. 35:346-355. doi: 10.1053/j.seminoncol.2008.04.005.
4. Valerio DG, Katsman-Kuipers JE, Jansen JH et al. Mapping epigenetic regulator gene mutations in cytogenetically normal pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2014. 99(8):e130 — e132. doi:10.3324/haematol.2013.094565.
5. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999. 99:247 — 257.
6. Herman JG, Civin CI, Issa J.-P.J et al. Distinct patterns of inactivation of *p15<sup>INK4B</sup>* and *p16<sup>INK4A</sup>* characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res*. 1997. 57(5): 837-41.
7. Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nature Biotechnology*. 2010. 28:1069-1078. doi: 10.1038/nbt.1678.
8. Simmons D. Epigenetic influence and disease. *Nature Education*. 2008. 1(1):6.
9. Boulwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2007. 138:3-11. DOI:10.1111/j.1365-2141.2007.06604.x.
10. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009. doi: 10.2217/epi.09.33.
11. Stressemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008. 123(1):8-13. doi: 10.1002/ijc.23607.
12. Tanas AS, Rudenko (Shkarupo) VV, Kuznetsova EB, Zaletaev DV, Strelnikov VV. *Epigenomics*. 2010. 2(2):325-33. doi: 10.2217/epi.10.3.
13. Руденко В.В., Немировиченко В.С., Танас А.С., Попа А.В., Казакова С.А., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Новые маркеры аномального метилирования ДНК при остром миелоидном лейкозе у детей, идентифицированные непредвзятым скринингом дифференциального метилирования геномов. *Медицинская генетика*. 2015. 14(1): 36-44.
14. Rius M, Lyko F. Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene*. 2012. 31(39):4257-65. doi: 10.1038/onc.2011.601.
15. Navada SC, Steinmann J, Lubbert M, Silverman LR. Clinical development of demethylating agents in hematology. *J Clin Invest*. 2014. 124(1): 40-6. doi: 10.1172/JCI69739.
16. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*. 2014. 124(1):30-9. doi: 10.1172/JCI69738.
17. Ahuja N, Easwaran H, Baylin SB. Harnessing the potential of epigenetic therapy to target solid tumors. *J Clin Invest*. 2014. 124(1):56-63. doi: 10.1172/JCI69736.
18. Lakshmikuttyamma A, Scott SA, DeCoteau JF, Geyer CR. Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene*. 2010. 29:576-588. doi: 10.1038/onc.2009.361.
19. The cancer genome atlas research network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013. 368(22):2059-2074. DOI: 10.1056/NEJMoa1301689.
20. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Kronke J, Bullinger L, Spath D, Kayser S, Zucknick M, Gotze K, Horst HA, Germing U, Dohner H, Dohner K. *IDH1* and *IDH2* mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation without *FLT3* internal tandem duplication. *Journal of Clinical Oncology*. 2010. 28(22): 3636-3643. doi: 10.1200/JCO.2010.28.3762.
21. Lund K, John J Cole JJ, VanderKraats ND, McBryan T, Pchelintsev NA, Clark W, Copland M, John R Edwards JR, Peter D Adams PD. DNMT inhibitors reverse a specific signature of aberrant promoter DNA methylation and associated gene silencing in AML. *Genome Biol*. 2014. 15:406. doi: 10.1186/s13059-014-0406-2.