

АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ $p15^{INK4B}$ И $SOX7$ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОДИСПЛАСТИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ И ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Грицаев С.В., Сидорова Ж.Ю., Капустин С.И., Кострома И.И., Потихонова Н.А., Мартынкевич И.С., Блинов М.Н., Абдулкадыров К.М.

ФГБУ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России, 193024, г. Санкт-Петербург

Резюме. Эпигенетические нарушения – принципиальный механизм лейкозогенеза. Одним из них является метилирование островков CpG в промоторных областях генов-супрессоров опухоли. Аберрантный статус метилирования может быть ассоциирован с агрессивным течением миелодиспластического синдрома (МДС) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и с выживаемостью больных. Цель исследования – оценить частоту встречаемости аберрантного метилирования генов $p15^{INK4B}$ и $SOX7$ при различных вариантах МДС и ОМЛ. Проведено пилотное изучение образцов ДНК 20 больных МДС и 17 больных ОМЛ, заготовленных до начала специальной терапии. Диагностику МДС и ОМЛ осуществляли по критериям классификации ВОЗ (2008 г.). Кариотип изучали с помощью стандартного GTG-метода. Эффективность ХТ оценивали по критериям IWG. Для изучения статуса метилирования генов $p15^{INK4B}$ и $SOX7$ был использован метод метил-специфической полимеразной цепной реакции (MSP). Метилирование гена $p15^{INK4B}$ обнаружено у 5 (25%), $SOX7$ – у 16 (80%) больных МДС. Число случаев с аберрантным статусом генов увеличивалось среди больных с бластозом в костном мозге (КМ): 33,3% и 100% соответственно. Метилирование гена $p15^{INK4B}$ было более частой находкой среди больных с нормальным кариотипом: 42,9% против 8,3% с хромосомными поломками ($p = 0,075$). Среди больных с цитогенетическими поломками чаще обнаруживали аберрантный статус гена $SOX7$ нежели гена $p15^{INK4B}$ ($p = 0,002$). Метилирование гена $p15^{INK4B}$ выявлено у 2 (11,8%), $SOX7$ – у 8 (74,1%) больных ОМЛ. Аберрантный статус гена $SOX7$ был характерной находкой среди больных с миелоидными, нежели другими вариантами ОМЛ ($p = 0,019$). При медиане времени наблюдения 4 мес у 5 (50%) из 10 больных развился рецидив, из которых у 4 (80%) до начала индукционной ХТ был обнаружен аберрантный статус метилирования генов. Выявлена вариабельность статуса метилирования генов $p15^{INK4B}$ и $SOX7$ в зависимости от клинических и лабораторных характеристик МДС и ОМЛ. Аберрантное метилирование может быть предиктором неблагоприятного течения ОМЛ.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром; острый миелоидный лейкоз; ген $p15^{INK4B}$; ген $SOX7$; метилирование; CpG-островки; метил-специфическая полимеразная цепная реакция.

Для цитирования: Гематология и трансфузиология. 2015; 60 (1): 12-17.

ABERRANT METHYLATION OF $p15^{INK4B}$ AND $SOX7$ GENES IN PATIENTS WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Gritsaev S.V., Sidorova Z.J., Kapustin S.I., Kostroma I.I., Potichonova N.A., Martinkevitch I.S., Blinov M.N., Abdulkadyrov K.M.

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 193024, St.Petersburg, Russia

Summary. Disturbance of epigenetic regulation is a crucial mechanism of leukemogenesis. Aberrant methylation of CpG islands leads to the biologic phenomenon of tumor-suppressor genes silencing. Aberrant methylation may be associated with course of disease and survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). Aim of the study was to evaluate the frequencies of aberrant methylation status of $p15^{INK4B}$ and $SOX7$ genes in accordance with the variant of MDS or AML and effectiveness of standard chemotherapy. The samples of DNA of 20 patients with MDS and 17 patients with AML were studied. The diagnosis of MDS and AML were verified according to WHO 2008 classification. Standard GTG method was used to clarify the patient's karyotype. Methylation status of $p15^{INK4B}$ and $SOX7$ genes was studied with MSP (methylation-specific PCR). Aberrant methylation of $p15^{INK4B}$ and $SOX7$ was found in 5 (25%) and 16 (80%) of MDS patients, accordingly. The number of patients with aberrant methylation status was increased in the group with excess of BM blasts: 33.3% and 100% for $p15^{INK4B}$ and $SOX7$, respectively. Aberrant status of $p15^{INK4B}$ have been mostly found in patients with the normal karyotype; $p = 0.075$. At the same time, the aberrant status of $SOX7$ was associated with cytogenetic abnormalities; $p = 0.002$. Aberrant methylation of $p15^{INK4B}$ and $SOX7$ was found in 2 (11.8%) and 8 (74.1%) of AML patients, accordingly. Aberrant status of $SOX7$ was typical abnormality in patients with myeloid morphology of blasts; $p = 0.019$. During the 4 months (Me) of follow-up, relapse was detected in 5 out of 10 patients. Of them, 4 (80%) have had an aberrant methylation status of either gene before starting the induction chemotherapy. We conclude that aberrant methylation is a predictor of unfavorable course of AML.

Key words: myelodysplastic syndromes; acute myeloid leukemia; $p15^{INK4B}$ gene; $SOX7$ gene; DNA methylation; CpG islands; MSP.

Citation: Gematologiya i transfuziologiya. 2015; 60 (1): 12-17.

Расшифровка отдельных механизмов лейкозогенеза в совокупности с разработкой и внедрением в клиническую практику новых лекарственных средств, воздействующих на принципиальные биологические процессы развития патологического

клона, создает условия для значимого повышения эффективности терапии больных онкогематологическими заболеваниями. Наглядным примером может служить «выключение» экспрессии генов-супрессоров опухоли вследствие аберрантного метили-

рования островков CpG в промоторных областях, регулирующих их транскрипционную активность. Назначение гипометилирующих препаратов (или азануклеозидов), таких как азацитидин и децитабин, позиционируют как терапию выбора для лечения больных развернутыми стадиями миелодиспластического синдрома (МДС) и острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), которым из-за неблагоприятного соматического статуса или отягощенной коморбидности не может быть назначена стандартная химиотерапия (ХТ) [1–4].

Лечебный эффект азануклеозидов опосредован инактивацией ДНК-метилтрансфераз с последующим переводом цитозиновых остатков ДНК в неметилированное состояние, что в конечном итоге сопровождается резкспрессией генов-супрессоров опухоли, нормализацией ряда физиологических процессов и апоптозом лейкозных клеток. Наблюдаемый в большинстве случаев отсроченный ответ на терапию, нередко после 6–9 курсов, обусловлен необходимостью длительного воздействия азануклеозидов на ДНК и РНК для индукции гипометилирования [1, 4].

Спрогнозировать эффективность азануклеозидов возможно по анализу отдельных клинических, гематологических и молекулярно-генетических показателей, таких как вариант кариотипа и мутационный статус гена *TET2* [5, 6]. Однако вполне обоснованным в качестве предиктора ответа предполагают изучение статуса метилирования отдельных генов [7–11]. Это продиктовано, отчасти, отсутствием однозначного мнения о сопряженности отдельных хромосомных aberrаций с клиническим ответом [6, 12–14].

Помимо больных с избыточным количеством бластных клеток в костном мозге (КМ), не менее привлекательной представляется идея назначения азануклеозидов больным МДС низкого риска с зависимостью от трансфузий компонентов крови и неэффективностью эритропоэстимулирующих, иммуномодулирующих или иммуносупрессивных препаратов [15–18]. Нарастание тяжести цитопении в большинстве этих случаев ассоциировано с прогрессией МДС. Нельзя исключить, что раннее назначение лекарственных средств, способных модифицировать течение болезни, не только уменьшит потребность в трансфузиях, но и предупредит увеличение объема бластных клеток с трансформацией в ОМЛ. Однако вопрос об ассоциации статуса метилирования генов с тяжестью цитопении у больных МДС низкого риска и эффективностью азануклеозидов остается нерешенным.

Другой областью изучения статуса метилирования генов является прогнозирование течения МДС

и ОМЛ [1]. Метилирование генов нередко сопряжено со снижением частоты ответов на ХТ, развитием рецидива и ухудшением выживаемости [19–24]. Вместе с тем не известно, является ли данный феномен отражением только aberrантного метилирования генов или обусловлен совокупностью негативных факторов, включая, в том числе, и метилирование антионкогенов. Данная проблема весьма актуальна, так как назначение азануклеозидов в качестве префаза может существенно повысить чувствительность бластных клеток к цитостатическим препаратам [25].

Для изучения значимости статуса метилирования генов-супрессоров опухоли при прогнозировании течения МДС и ОМЛ и эффективности терапии азануклеозидами была разработана программа, выполнение которой запланировано в несколько этапов. Цель первого этапа, результаты которого представлены в данной статье, – оценить частоту выявляемости aberrантного метилирования двух генов (*p15^{INK4B}* и *SOX7*) в зависимости от варианта МДС и ОМЛ и эффективности ХТ. Необходимо отметить, что исследование, проводимое в рамках первого этапа, носит пилотный характер. На основании полученных данных будет разработан окончательный дизайн последующего исследования.

Материалы и методы

В качестве материала исследования использовали образцы геномной ДНК, полученной из лейкоцитов периферической крови стандартным способом, согласно S. Miller [26]. Для достижения поставленной цели из числа заготовленных были отобраны образцы ДНК больных, соответствующих следующим критериям:

- *de novo* МДС и ОМЛ;
- отсутствие указания в анамнезе на использование гипометилирующих препаратов;
- ранее нелеченные больные ОМЛ;
- все варианты ОМЛ за исключением острого промиелоцитарного лейкоза;
- наблюдение за больными после заготовки биологических образцов в течение не менее 6 мес;
- достаточное для проведения исследования количество и качество образца ДНК.

Диагноз МДС и ОМЛ устанавливали согласно критериям классификации ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей 2008 г. [27].

Изучение кариотипа осуществляли стандартным GTG-методом с обязательным анализом не менее 20 метафазных пластинок.

Распределение больных ОМЛ на отдельные варианты проводили по результатам морфологического, цитохимического и иммунологического исследований бластных клеток без учета цитогенетических aberrаций.

Эффективность ХТ больных ОМЛ оценивали по критериям IWG [28].

Для проведения пилотного исследования по изучению aberrантного метилирования первоначально были выбраны два гена: *p15^{INK4B}* и *SOX7*. Необходимо было оценить статус метилирования CpG-островков в промоторной области выбранных генов. Критерием выбора гена *p15^{INK4B}* явились данные литературы [29–31], согласно которым его промоторная область aberrантно метилирована в

Для корреспонденции:

Грицаев Сергей Васильевич, доктор мед. наук, главный научный сотрудник клинического отдела химиотерапии гемобластозов, депрессий кроветворения и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России.

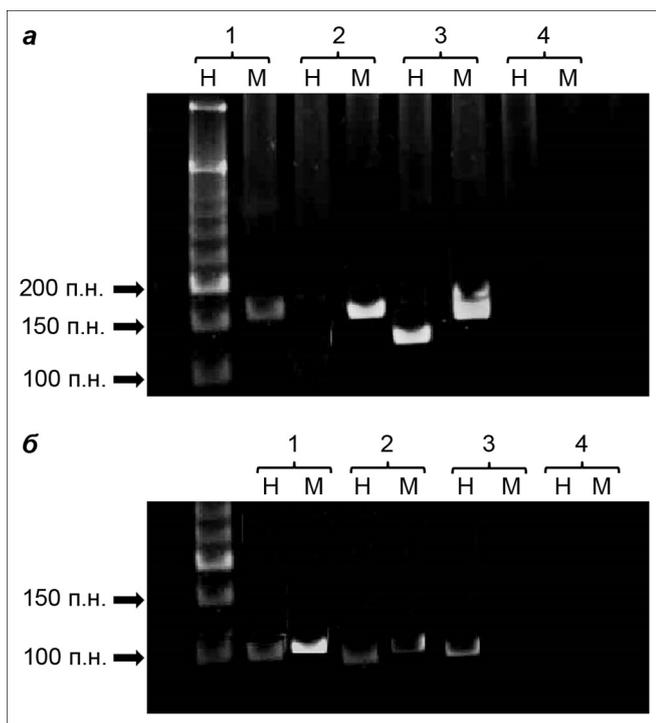
Адрес: 193024, Россия, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Телефон: +7(812)717-58-57.

E-mail: gritsaevsv@mail.ru

Corresponding author:

Gritsaev Sergey, MD, PhD, DSc (gritsaevsv@mail.ru).



Анализ метилирования CpG островков промоторных областей гена *p15^{INK4B}* (а) и гена *SOX7* (б).

а – результаты MS CpG-островков промоторной области гена *p15^{INK4B}*; б – результаты MSP CpG-островков промоторной области гена *SOX7*.

Линия Н – амплификат, полученный с праймерами для неметилированных участков ДНК; линия М – амплификат, полученный с праймерами для метилированных участков ДНК.

1 – результаты проведения ПЦР (MSP) у пациента 1; 2 – результаты проведения ПЦР (MSP) у пациента 2; 3 – результаты проведения ПЦР (MSP) у донора; 4 – результаты проведения ПЦР (MSP) с необработанной ДНК (ДНК, не прошедшей бисульфитную конверсию).

клетках при различных лейкозах. Ген *p15^{INK4B}* является ингибитором циклинзависимой киназы и играет важную роль в регуляции клеточного цикла.

Ген *SOX7* был выбран как один из генов семейства SOX, кодирующего транскрипционные факторы, которые влияют на активность Wnt-сигнального пути и играют роль в дифференцировке стволовых клеток [32, 33].

В качестве метода анализа статуса метилирования был использован принцип специфической детекции 5-метилцитозина или продуктов его превращения (бисульфитная конверсия). Для определения статуса метилирования CpG-островков промоторных участков генов была использована метилспецифическая полимеразная цепная реакция – ПЦР (MSP) [34].

Для проведения бисульфитной конверсии проб ДНК использован набор EZ DNA Methylation-Gold® ("Zymo Research", США). После получения конвертированной и очищенной ДНК, проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных и неметилированных участков ДНК промоторных областей генов *p15^{INK4B}* и *SOX7* [29, 32]. После проведения 40 циклов ПЦР полученный амплификат анализировали с помощью электрофореза в 6% полиакриламидном геле. Фрагменты ДНК визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете после окрашивания геля бромистым этидием в концентрации 1 мкг/мл. Наличие амплификата, полученного при проведении ПЦР с праймерами для метилированных участков ДНК, свидетельствовало о наличии aberrантного метилирования.

Наличие ПЦР-продукта, полученного при проведении ПЦР с праймерами для неметилированных участков ДНК, и отсутствие амплификата с праймерами для метилированных участков ДНК свидетельствовало об отсутствии aberrантного метилирования (см. рисунок).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программ Microsoft Excel и Statistica.

Результаты

В соответствии с установленными критериями включения в исследование для анализа были отобраны данные 37 больных (20 больных МДС и 17 больных ОМЛ). Возраст больных МДС был от 41 до 79 лет (медиана возраста 63 года).

Распределение по вариантам было следующим: 2 больных рефрактерной анемией, 1 – рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами, 3 – с изолированной делецией del(5q), 5 – рефрактерной цитопенией с мультилинейной дисплазией, 9 больных рефрактерной анемией с избытком бластов (РАИБ), включая 2 РАИБ-1 и 7 РАИБ-2.

Нормальный кариотип выявлен у 7 больных. Хромосомные aberrации обнаружены у 12 больных. Кариотип 1 больного на момент заготовки периферической крови остался неизвестным из-за отсутствия роста клеток в культуре.

Метилирование генов обнаружено у 16 (80%) из 20 больных МДС.

Aberrантный статус генов *p15^{INK4B}* имелся у 5 (25%), *SOX7* – у 16 (80%) больных. Во всех случаях метилирование гена *p15^{INK4B}* сопровождалось обнаружением aberrантного статуса гена *SOX7*. У 11 больных выявлено метилирование только гена *SOX7*.

При вариантах без избытка бластных клеток более частой находкой было метилирование гена *SOX7* (63,6%), нежели гена *p15^{INK4B}* (18,2%); $p = 0,030$. У больных РАИБ частота обнаружения aberrантного статуса соответствующих генов значительно возрастала, при этом метилирование гена *SOX7* по-прежнему оставалось доминирующим событием – 100% и 33,3% ($p = 0,002$). Установлена тенденция сопряженности метилирования гена *SOX7* с избыточным количеством бластных клеток в КМ ($r = 0,452$; $p = 0,045$).

Метилирование гена *p15^{INK4B}* было более частой находкой у больных с нормальным (42,9%), нежели aberrантным (8,3%) кариотипом, хотя различие и не было значимым ($p = 0,075$). Частота метилирования гена *SOX7* была одинаково высокой независимо от варианта кариотипа – 71,4% и 83,3% соответственно. При этом у больных с цитогенетическими поломками чаще обнаруживался aberrантный статус гена *SOX7* (83,3%), чем гена *p15^{INK4B}* (8,3%); $p = 0,002$ (см. таблицу).

При анализе результатов обследования больных ОМЛ получены следующие данные.

Возраст больных был от 34 до 75 лет (медиана возраста 56,5 года).

Распределение по морфологическим вариантам было следующим: 3 больных М1-вариантом, 7 – М2, 1 – М4, 2 – М5, 3 – М6, 1 больной М7-вариантом.

Цитогенетическое исследование выполнено у 16

больных. Нормальный кариотип имелся у 7 больных. Хромосомные поломки выявлены у 9 больных и представлены одиночными, двойными или множественными абберациями.

Метилирование генов *p15^{INK4B}* и *SOX7* обнаружено у 8 из 17 (47,1%) больных.

Также как и среди больных МДС, частота выявления абберантного гена *SOX7* была выше (47,1%), чем гена *p15^{INK4B}* (11,8%), и во всех случаях метилирование гена *p15^{INK4B}* сопровождалось метилированием гена *SOX7*.

Метилирование гена *SOX7* с большей частотой выявлялось у больных миелоидными (М1 и М2) вариантами: 60% против 28,6% больных другими морфологическими вариантами; $p = 0,019$.

Распределение случаев с абберантным статусом генов *p15^{INK4B}* и *SOX7* среди больных с нормальным кариотипом и цитогенетическими поломками было практически одинаковым (см. таблицу).

При наблюдении за больным в сроки от 1 до 19 мес (медиана 4 мес) из 10 больных, у которых была достигнута полная ремиссия, рецидив развился у 5, включая 1 из 4 (25%) больных без метилирования генов и 4 из 6 (66,7%) больных с метилированием генов. Следует отметить, что у 2 из 4 больных с абберантным статусом (метилирование гена *SOX7*) рецидив развился после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Обсуждение

В отличие от генетических повреждений, при эпигенетических нарушениях изменение структуры хроматина и инактивация генов осуществляется без нарушения последовательности нуклеотидов в ДНК. Тем не менее эпигенетические нарушения наряду с молекулярно-генетическими абберациями и повреждением гемопоэтического микроокружения принимают непосредственное участие в механизмах возникновения и развития лейкозного клона. Подтверждение этому – обнаружение мутаций в генах *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2* и *TET2*, принимающих участие в регуляции эпигенетических процессов, а также увеличение случаев с абберантным метилированием генов у больных развернутыми стадиями МДС [35, 36]. В свою очередь обратимость эпигенетических нарушений делает их привлекательными «мишенями» для медикаментозного воздействия, эффективность которого опосредована действием, модифицирующим естественное течение болезни. Клиническим примером может быть активное внедрение в лечебную практику азациитидина и децитабина для лечения больных МДС и ОМЛ [1, 2].

Неслучайно наибольшее внимание из всех эпигенетических нарушений уделяется метилированию цитозина в островках CpG, локализованных вблизи или непосредственно в промоторных областях генов. Метилирование – доминирующий эпигенетический феномен в лейкозных клетках [4].

При изучении метилирования абберантный статус островков CpG обнаружен во многих генах, включая гены, которые вовлечены в регуляцию клеточного цикла (*CDKN1B*, *CDKN2B*, *HIC1*, *FHIT*), дифферен-

Клинико-гематологическая характеристика больных и статус метилирования генов *p15^{INK4B}* и *SOX7*

Показатель	Метилирование				<i>p</i> *
	ген <i>p15^{INK4B}</i>		ген <i>SOX7</i>		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
МДС (<i>n</i> = 20)**	5	25	16	80	
без бластога (<i>n</i> = 11)	2	18,2	7	63,6	0,03
с бластозом (<i>n</i> = 9)	3	33,3	9	100	0,002
нормальный кариотип (<i>n</i> = 7)	3	42,9	5	71,4	
абберантный кариотип (<i>n</i> = 12)	1	8,3	10	83,3	0,0002
ОМЛ (<i>n</i> = 17)***	2	11,8	8	47,1	
миелоидный вариант (<i>n</i> = 10)	1	10	6	60	0,019
другие варианты (<i>n</i> = 7)	1	14,3	2	28,6	
нормальный кариотип (<i>n</i> = 7)	1	14,3	3	42,9	
абберантный кариотип (<i>n</i> = 9)	1	11,1	4	44,4	
Доноры (<i>n</i> = 40)	0	0	1	2,5	

Примечание. * – приведены показатели значимых различий: ** – кариотип проанализирован у 19 больных; *** – кариотип проанализирован у 16 больных.

цировки (гены-антагонисты Wnt сигнального пути – *SFRP*, *DKK*, *SOX*) и механизмы адгезии (*IGSF4*, *CDH1*, *CDH13*), процессы апоптоза (*DAPK1*) и роста клеток (*ESR1*) [10, 11, 14, 20–25, 32, 33]. Частота и степень метилирования в разных генах разная [10, 20, 25, 30, 33, 37–39]. Нередко варьируют и показатели статуса метилирования одного и того же гена, полученные в разных исследованиях. Данный феномен обусловлен составом больных, включенных в исследования: установлена сопряженность абберантного статуса отдельных генов с возрастом и фенотипом бластных клеток [19, 40]. Косвенным подтверждением могут быть и результаты собственного исследования. В группе МДС число больных с абберантным статусом генов *p15^{INK4B}* и *SOX7* различалось в зависимости от количества бластных клеток в КМ и варианта кариотипа, а в группе ОМЛ – от морфологического фенотипа лейкозных клеток.

Увеличение числа исследуемых генов имеет принципиальное значение для планирования последующего исследования. Не исключено, что расширение спектра анализируемых генов позволит более корректно стратифицировать больных МДС и ОМЛ на группы риска и с большей вероятностью прогнозировать эффективность азануклеозидов [10, 23, 41]. Так, М. Abaigar и соавт. [41] проанализировали статус метилирования 24 генов у 63 больных МДС и ОМЛ с медианой возраста 69 лет. Абберантное метилирование ДНК выявлено у 73% больных и в большинстве случаев обнаруживалось в одном из исследуемых генов. По данным многовариантного анализа обнаружено, что число генов с абберантным статусом метилирования (2 и более) наряду с лейкоцитозом ($15 \cdot 10^9/\text{л}$ и более) и анемией (гемоглобин менее 100 г/л) является независимым прогностическим фактором, ассоциированным с ухудшением выживаемости. В свою очередь, М. Grovdal и соавт. [23] сравнили эффективность индукционной ХТ «7+2» с подкожным введением цитарабина по 150 мг/м² в 1–7-е сутки и внутривенным введением

даунорубицина по 60 мг/м² в 1–2-е сутки у больных МДС высокого риска и ОМЛ в зависимости от статуса метилирования генов *p15^{INK4B}*, *CDH* и *HIC*. Авторами не выявлено зависимости ответа на индукционную терапию, если aberrантный статус гена *p15^{INK4B}* был одиночной находкой. В то же время при обнаружении aberrантного статуса еще одного гена частота ПР была значимо ниже: 20% против 54% у больных без метилирования генов или с метилированием только одного гена *p15^{INK4B}* ($p = 0,05$). Более того, ни один из больных с метилированием ДНК во всех трех генах не ответил на ХТ.

Как было продемонстрировано С. Olk-Batz и соавт. [42] на примере больных ювенильным миеломоноцитарным лейкозом, обнаруживаемое до начала специфической терапии метилирование ДНК может быть ассоциировано с развитием рецидива после алло-ТГСК. В собственном исследовании рецидив после алло-ТГСК развился у 2 больных ОМЛ с aberrантным статусом гена *SOX7*, выявленным до индукции индукционной ХТ. Следует отметить, что у этих больных были другие факторы, свидетельствующие об агрессивном течении болезни, в частности, отсутствие ответа на индукционные курсы и развитие рецидива в течение года после окончания высокодозной ХТ. Тем не менее, нельзя исключить, что aberrантный статус гена *SOX7* наряду с другими механизмами мог принимать непосредственное участие в формировании нестабильности генома лейкозных клеток (у одного из больных развитие морфологического рецидива сопровождалось присоединением множественных хромосомных поломок) и/или их резистентности к цитостатическим препаратам. Возможно, этим больным было бы оправданным назначение азануклеозидов в качестве префазы на этапе индукции ремиссии или в противорецидивном режиме с удлинением сроков введения препаратов [25, 43].

Результаты пилотного исследования, полученные при изучении ДНК и клинико-гематологическом наблюдении за 37 больными МДС и ОМЛ, позволяют сделать несколько предварительных заключений. Во-первых, существует вариабельность статуса метилирования генов в зависимости от клинических и лабораторных характеристик МДС и ОМЛ. Во-вторых, не исключено негативное влияние aberrантного метилирования генов на характер течения миелоидных неоплазий. В-третьих, информативность исследования статуса метилирования зависит от количества изучаемых генов.

Тем самым в дальнейшем исследовании запланированы следующие положения. Расширение перечня изучаемых генов посредством включения генов, aberrантный статус которых по данным литературы встречается не менее чем у 20% больных миелоидными неоплазиями и/или которые принимают участие в принципиальных процессах лейкозогенеза. Формирование 3 групп больных, однородных по характеру терапевтического пособия: 1) группа больных МДС низкого риска, не получающих терапию азануклеозидами; 2) группа больных МДС и ОМЛ, получающих стандартную индукционную ХТ по схеме «7+3» и последующую консолидацию курсами

с высокодозным цитарабином или алло-ТГСК; 3) группа больных МДС и ОМЛ, получающих терапию азануклеозидами. В последней группе предполагается динамическое изучение статуса метилирования генов не менее чем в 3 временных точках (до начала и непосредственно после окончания терапии, через 10–14 дней после завершения курса) в течение 2 первых курсов. Предполагается, что полученные результаты позволят расшифровать отдельные механизмы лейкозогенеза, пополнить список прогностических факторов, расширить показания к назначению азануклеозидов и повысить их эффективность путем отбора больных с высокой вероятностью ответа.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Кострома И.И. Азациитидин и миелодиспластический синдром. *Гематология и трансфузиология*. 2012; 1: 23–9.
- [Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Kostroma I.I. Azacytidine and myelodysplastic syndrome. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2012; 1: 23–9]. (in Russian)
2. Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Кострома И.И., Аксенова В.Ю., Петрова Е.В., Сергеев А.Н. и др. Децитабин: уроки, извлеченные из опыта лечения больных миелоидными неоплазиями. *Клиническая онкогематология*. 2012; 3: 225–31.
- [Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Kostroma I.I., AksenoVA V.Yu., Petrova E.V., Sergeev A.N., et al. Decitabine: lessons learned from the treatment of patients with myeloid neoplasias. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 3: 225–31]. (in Russian)
3. Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Кострома И.И., Карягина Е.В., Низамутдинова А.С., Мартыненко Л.С. и др. Результаты терапии больных de novo острым миелоидным лейкозом 60 лет и старше. *Клиническая онкогематология*. 2012; 4: 355–60.
- [Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Kostroma I.I., Karyagina E.V., Nizamutdinova A.S., Martynenko L.S., et al. The results of therapy in patients with de novo acute myeloid leukemia 60 years and older. *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2012; 4: 355–60]. (in Russian)
4. Issa J.P. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 2010; 24(2): 317–30.
5. Itzykson R., Thepot S., Quesnel B., Dreyfus F., Beyne-Rauzy O., Turlure P. et al. Prognostic factors for response and overall survival in 282 patients with higher-risk myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Blood*. 2011; 117(2): 403–11.
6. Itzykson R., Kosmider J., Cluzeau T., Mansat-De Mas V., Dreyfus F., Beyne-Rauzy O., et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011; 25(7): 1147–52.
7. Gore S.D., Baylin S., Sugar E., Carraway H., Miller C.B., Carducci M., et al. Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res*. 2006; 66(12): 6361–9.
8. Fandy T.E., Herman J.G., Kerns P., Jemjit A., Sugar E.A., Choi S.H., et al. Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood*. 2009; 114(13): 2764–73.
9. Folloa M.Y., Finellib C., Mongiorgi S., Clissa C., Bosi C., Testoni N., et al. Reduction of phosphoinositide-phospholipase C beta1 methylation predicts the responsiveness to azacitidine in high-risk MDS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(39): 16811–6.
10. Shen L., Kantarjian H., Guo Y., Lin E., Shan J., Huang X., et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(4): 605–13.
11. Tran H.T.T., Kim H.N., Lee I.K., Kim Y.K., Ahn J.S., Yang D.H., et al. DNA methylation changes following 5-azacitidine treat-

- ment in patients with myelodysplastic syndrome. *J. Korean Med. Sci.* 2011; 26(2): 207–13.
12. Itzykson R., Thepot S., Eclache V., Quesnel B., Dreyfus F., Beyne-Rauzy O., et al. Prognostic significance of monosomal karyotype in higher risk myelodysplastic syndrome treated with azacitidine. *Leukemia*. 2011; 25(7): 1207–9.
 13. Müller-Thomas C., Schuster T., Peschel C., Götze K.S. A limited number of 5-azacitidine cycles can be effective treatment in MDS. *Ann. Hematol.* 2009; 88(3): 213–9.
 14. Raj K., John A., Ho A., Chronis C., Khan S., Samuel J., et al. CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia*. 2007; 21(9): 1937–44.
 15. Grinblatt D.L., Narang M., Malone J.M., Sweet D.A., Dunne T.S., Sullivan K.A. Treatment of patients with low risk myelodysplastic syndromes receiving azacitidine who are enrolled in AVIDA, a longitudinal patient registry. *Blood*. 2008; 112(11): abstr. 1646.
 16. Lyons R.M., Cosgriff T., Modi S., Gersh R.H., Hainsworth J.D., Cohn A.L., et al. Hematologic response to 3 alternative dosing schedules of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(11): 1850–6.
 17. Musto P., Maurillo L., Spagnoli A., Gozzini A., Rivellini F., Lunghi M., et al. Azacitidine for the treatment of lower risk myelodysplastic syndromes. *Cancer*. 2010; 116(6): 1485–94.
 18. Silverman L.R., Demakos E.P., Peterson B.L., Kornblith A.B., Holland J.C., Odchimar-Reissig R., et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20(10): 2429–40.
 19. Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Аксенова В.Ю. Метилирование промотерных областей генов как один из механизмов лейкогенеза и «мишень» для лекарственного воздействия при лечении больных миелоидными неоплазиями. *Вестник гематологии*. 2011; 2: 78–85.
 - [Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Aksanova V.Yu. Methylation of promoter regions of genes as a mechanism leukaemogenesis and «target» for drug exposure in the treatment of patients with myeloid neoplasias. *Vestnik gematologii*. 2011; 2: 78–85].
 20. Aggerholm A., Holm M.S., Guldborg P., Olesen L.H., Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.* 2006; 76(1): 23–32.
 21. Christiansen D.H., Andersen M.K., Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003; 17(9): 1813–9.
 22. Figueroa M.E., Lugthart S., Li Y., Erpelinck-Verschueren C., Deng X., Christos P.J., et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2010; 17(1): 13–27.
 23. Grovdal M., Khan R., Aggerholm A., Antunovic P., Astermark J., Bernell P., et al. Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(23): 7107–12.
 24. Shimamoto T., Ohyashiki J.H., Ohyashiki K. Methylation of p15INK4b and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 2005; 29(6): 653–9.
 25. Scandura J.M., Roboz G.J., Moh M., Morawa E., Brenet F., Bose J.R., et al. Phase 1 study of epigenetic priming with decitabine prior to standard induction chemotherapy for patients with AML. *Blood*. 2011; 118(6): 1472–80.
 26. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 1988; 16(3): 1215–8.
 27. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5): 937–51.
 28. Cheson B.D., Bennett J.M., Kopecy K.J., Büchner T., Willman C.L., Estey E.H., et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21(24): 4642–9.
 29. Herman J.G., Graff J.R., Myöhänen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93(18): 9821–6.
 30. Tien H.F., Tang J.L., Tsay W., Liu M.C., Lee F.Y., Wang C.H., et al. Methylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br. J. Haematol.* 2001; 112(1): 148–54.
 31. Lubbert M. Gene silencing of the p15^{INK4B} cell-cycle inhibitor by hypermethylation: an early or later epigenetic alteration in myelodysplastic syndromes? *Leukemia*. 2003; 17(9): 1762–4.
 32. Fan R., Zhang L.Y., Wang H., Yang B., Han T., Zhao X.L., et al. Methylation of the CpG island near SOX7 gene promoter is correlated with the poor prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Tohoku J. Exp. Med.* 2012; 227(2): 119–28.
 33. Wang H., Fan R., Wang X.Q., Wu D.P., Lin G.W., Xu Y., Li W.Y. Methylation of Wnt antagonist genes: a useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. *Ann. Hematol.* 2013; 92(2): 199–209. doi: 10.1007/s00277-012-1595-y.
 34. Kristensen L.S., Hansen L.L. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognosis, and response to treatment. *Clin. Chem.* 2009; 55(8): 1471–83.
 35. Jiang Y., Dunbar A., Gondek L.P., Mohan S., Rataul M., O’Keefe C., et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009; 113(6): 1315–25.
 36. Lee S., Kwon H.C., Kim S.H., Oh S.Y., Lee J.H., Lee Y.S., et al. Identification of genes underlying different methylation profiles in refractory anemia with excess blast and refractory cytopenia with multilineage dysplasia in myelodysplastic syndrome. *Korean J. Hematol.* 2012; 47(3): 186–93. doi: 10.5045/kjh.2012.47.3.186.
 37. Hess C.J., Errami A., Berkhof J., Denkers F., Ossenkoppele G.J., Nygren A.O., et al. Concurrent methylation of promoters from tumor associated genes predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymph.* 2008; 49(6): 1132–41.
 38. Kroeger H., Jelinek J., Estecio M.R.H., He R., Kondo K., Chung W., et al. Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood*. 2008; 112(4): 1366–73.
 39. Toyota M., Kopecy K.J., Toyota M.O., Jair K.W., Willman C.L., Issa J.P. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 97(9): 2823–9.
 40. Li X., Xiao Z., Chang C., Xu F., Wu L., He Q., et al. Distinct clinical and experimental characteristics in the patients younger than 60 years old with myelodysplastic syndromes. *Plos. One*. 2013; 8(2): e57392.
 41. Abaigar M., Ramos F., Benito R., Diez-Campelo M., Sanchez-del-Real J., et al. Prognostic impact of the number of methylated genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias treated with azacytidine. *Ann. Hematol.* 2013; 92(11): 1543–52.
 42. Olk-Batz C., Poetsch A.R., Nollke P., Claus R., Zucknick M., Sandrock I., et al. Aberrant DNA methylation characterizes juvenile myelomonocytic leukemia with poor outcome. *Blood*. 2011; 117(18): 4871–80.
 43. Blum W., Garzon R., Klisovic R.B., Schwind S., Walker A., Geyer S., et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107(16): 7473–78.
 44. Bhatnagar B., Duong V.H., Gourdin T.S., Tidwell M.L., Chen C., Ning Y., et al. Ten-day decitabine as initial therapy for newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia unfit for intensive chemotherapy. *Leuk. Lymphoma*. 2014; 55(7): 1533–7. doi: 10.3109/10428194.2013.856425.