

УДК 612.43

Ю.С. Чехова, Э.А. Кашуба, С.В. Соловьёва, М.В. Антонова

АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОРГАНИЗМА ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ ВОЗНИКШЕЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ И ПРИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОМ ОПЛОДОТВОРЕНИИ

ГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет,
г. Тюмень, Российская Федерация

Резюме. Изучение перестройки организма беременной женщины с точки зрения теории функциональных систем является необходимым для полного представления о формировании адаптивных процессов. Особый интерес представляет беременность, возникшая в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). **Цель исследования:** оценить адаптационные возможности организма женщин с физиологически возникшей беременностью и при экстракорпоральном оплодотворении. **Материалы и методы.** Объект исследования: клинически здоровые женщины до наступления беременности и в первом триместре (I-я группа), пациентки с трубно-перитонеальным бесплодием на этапе планирования и после эффективной процедуры ЭКО (II-я группа), женщины с неудачной попыткой ЭКО (III-я группа). Проведено исследование функционального состояния ССС беременных с расчетом адаптационного потенциала (АП) по Р.М. Баевскому. Дана оценка регуляции вегетативной нервной системы — индекс Кердо (ИК). Определено состояние регуляторных систем с помощью индекса стресса (по Л.Х. Гаркави с соавт.). **Результаты.** У пациенток с физиологической беременностью отмечалось напряжение адаптационных реакций при влиянии на сердечно-сосудистую систему симпатического отдела вегетативной нервной системы. **Заключение:** достоверные отличия изученных показателей у женщин с неэффективной программой ЭКО на этапе планирования беременности могут иметь важное прогностическое значение для определения тактики ведения пациенток.

Ключевые слова: физиологически возникшая беременность, экстракорпоральное оплодотворение, адаптация, адаптационный потенциал, вегетативная регуляция

Конфликт интересов отсутствует.
Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Чехова Юлия Сергеевна
doktor-ch@bk.ru

Дата поступления 28.04.2020 г.

Образец цитирования:

Чехова Ю.С., Кашуба Э.А., Соловьёва С.В., Антонова

М.В. Адаптационные возможности организма женщин с физиологически возникшей беременностью и при экстракорпоральном оплодотворении. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №2, с. 121–130, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-121-130

Введение

Изучение перестройки организма беременной женщины с точки зрения теории функциональных систем является необходимым для полного представления о формировании адаптивных процессов [1]. Во время беременности, в той или иной степени, происходит изменение работы всех систем организма. Новая функциональная система «мать-плацента-плод» порождает возникновение изменений, направленных на достижение полезного приспособительного результата — рождение здорового ребёнка [2, 3].

Учитывая высокую частоту бесплодия в популяции и широкое распространение вспомогательных репродуктивных технологий, особый интерес представляет беременность, возникшая в результате экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). На современном этапе положительные результаты ЭКО в России не превышают 40%, что является не только социально-демографической, медицинской, но и государственной проблемой [4]. Эффективность финансовых затрат отражают исходы проведенных программ. В связи с этим изучение функциональных особенностей организма женщин с физиологической беременностью и после ЭКО является необходимым как для теоретической, так и для практической медицины, что и определяет актуальность данной работы.

Цель работы: оценить адаптационные возможности организма женщин с физиологически возникшей беременностью и при экстракорпоральном оплодотворении.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились клинически здоровые женщины до наступления беременности и в первом триместре после зачатия (I группа — основная, n=70, возраст 25,69±0,14). Группу сравнения (II группа — ЭКО «+», n=25, возраст 30,28±0,50) составили жен-

щины с бесплодием трубно-перитонеального генеза до вступления в программу ЭКО и в первом триместре гестации. Третья группа была сформирована из пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием и неудачной попыткой ЭКО (III группа — ЭКО «-», $n=45$, возраст $32,29 \pm 0,32$).

Исследование одобрено Комитетом по этике при ГБОУ ВПО Тюменском ГМУ Минздрава России (выписка из протокола №68 от 08.04.2016 г.).

Для выполнения поставленной цели было проанализировано состояние сердечно-сосудистой системы и вегетативной регуляции, адаптационные возможности и росто-весовые показатели у женщин до и после наступления беременности, а также после неудачной попытки ЭКО. Исследование функционального состояния ССС беременных проводилось при помощи методики измерения периферического артериального давления, ЧСС в состоянии покоя с расчетом адаптационного потенциала (АП) по Р. М. Баевскому [5]. Для оценки состояния вегетативной нервной системы вычислялся индекс Кердо (ИК) [6]. Для характеристики состояния регуляторных систем организма, был использован индекс стресса (по Л.Х. Гаркави с соавт.), позволяющий по значениям показателей лейкоцитарной формулы периферической крови дифференцировать неспецифические адаптационные реакции [7]. Расчёт индекса массы тела (ИМТ) проведен с учетом массы тела женщин до настоящей беременности [8]. Все измерения осуществлялись в утреннее время, через 1-1,5 после приема пищи до проведения медицинских вмешательств. Исключены внешние воздействия, способные повлиять на результаты исследования.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ “Microsoft Office” и “Statistica10”. Нормальность распределения проверена при помощи критерия Шапиро-Уилка. Для показателей с нормальным распределением использовались общепринятые понятия описательной статистики: среднее (M), стандартная ошибка среднего (m), относительная величина (P), стандартная ошибка доли (sp). Для показателей с распределением, отличным от нормального, производился расчет медианы, 25-ого и 75-ого перцентилей (Me (C_{25} - C_{75})). Проверка гипотезы о равенстве двух средних количественных показателей с нормальным распределением проводилась с помощью t -критерия Стьюдента. В остальных случаях использовали критерий Вилкоксона (для зависимых выборок) и критерий Мана-Уитни (для независимых выборок). Критический уровень статистической значимости (p) принимали равным 0,05.

Результаты исследования

Анализ средних значений ИМТ до беременности и вступления в программу ЭКО показал статистически значимые различия в группах сравнения. Несмотря на то, что у всех пациенток ИМТ соответствовал норме и колебался в пределах $21,41$ - $22,48$ кг/м², у женщин I

и II групп данный показатель был достоверно ниже ($p_{1,3}=0,004$; $p_{2,3}=0,039$) (табл. 1).

Динамика прибавки массы тела в первом триместре соответствовала физиологической в I группе — $1,6 \pm 0,50$ ($p_{1,2}=0,000$; $p_{1,3}=0,000$). У женщин II группы, беременность которых наступила в результате ЭКО, прибавка была достоверно больше и составила $4,16 \pm 0,97$ ($p_{1,2}=0,000$). У пациенток с неудачной попыткой ЭКО, несмотря на отсутствие беременности, через 12 недель после начала программы масса тела увеличилась в среднем на $3,71 \pm 0,70$ кг. ($p_{1,3}=0,000$; $p_{2,3}=0,035$).

Резюмируя описанные изменения, можно сделать вывод, что у пациенток, страдающих бесплодием, на этапе прегравидарной подготовки отмечалась тенденция к увеличению ИМТ в сравнении с клинически здоровыми женщинами, при этом самые высокие значения зафиксированы в III группе. У беременных с ЭКО наблюдалось патологическое гестационное увеличение массы в первом триместре беременности (более 2 кг), что, вероятно, связано с приёмом гормональной терапии, предусмотренной протоколом программы. Даже при отсутствии беременности у женщин III группы выявлено значительное изменение массы тела, что также может быть обусловлено влиянием медикаментозных препаратов.

Таблица 1

Антропометрические данные и прибавка массы тела у женщин сравниваемых групп

показатели	I группа n=70	p	II группа n=25	p	III группа n=45
ИМТ до беременности и вступления в программу ЭКО	$21,41 \pm 0,22$	$p_{1,3} \leq 0,01$	$22,06 \pm 0,35$	$p_{2,3} < 0,05$	$22,48 \pm 0,30$
Прибавка массы тела	$1,6 \pm 0,50$	$p_{1,2} \leq 0,001$ $p_{1,3} \leq 0,001$	$4,16 \pm 0,97$	$p_{2,3} < 0,05$	$3,71 \pm 0,70$

Общий адаптационный процесс может влиять на состояние функциональной активности ССС [9]. Оценка функциональных показателей гемодинамики при наступлении беременности является важной задачей, так как новое состояние вызывает значительные изменения в сердечно-сосудистой системе, и направлено на поддержание гомеостаза и достижение полезного приспособительного результата. Таким образом, функциональное состояние ССС отражает состояние адаптационных процессов в организме [10, 11, 12]. Для оценки функционирования ССС до и в процессе беременности у пациенток групп сравнения нами были исследованы некоторые ее показатели. Измерения проводились с учетом физиологических изменений динамики уровня периферического артериального давления (АД) и ЧСС до и после наступления беременности (табл. 2).

Таблица 2

Анализ показателей артериального давления и частоты сердечных сокращений у женщин сравниваемых групп

показатели		I группа n=70	p	II группа n=25	p	III группа n=45
до беременности	САД, мм.рт.ст.	112,47±0,52	$p_{1-3} \leq 0,001$	111,6±0,56	$p_{2-3} < 0,001$	115,78±0,72
	ДАД, мм.рт.ст.	66,3±0,39	$p_{1-3} \leq 0,001$	66,2±0,55	$p_{2-3} < 0,001$	69,8±0,47
	ЧСС, уд/мин HRB/min/	63,23±0,412	$p_{1-2} \leq 0,001$	60,8±0,39	$p_{2-3} < 0,001$	64,18±0,43
I триместр и после ЭКО	САД, мм.рт.ст.	114,07±0,73	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	118,0±1,12	$p_{2-3} > 0,05$	118,44±0,87
	ДАД, мм.рт.ст DBP, mmHg	68,16±0,31	$p_{1-3} \leq 0,001$	67,32±0,71	$p_{2-3} < 0,001$	69,85±0,44
	ЧСС, уд/мин HRB/min/	64,29±0,31	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	70,28±0,79	$p_{2-3} > 0,05$	71,98±0,53

Частота сердечных сокращений (ЧСС) до беременности и вступления в программу ЭКО была статистически значимо выше в I и III группах сравнения (I — 63,23±0,412; II — 64,18±0,43; $p \leq 0,00$). У пациенток II группы отмечались более низкие значения ЧСС (60,8±0,39; $p \leq 0,00$). В первом триместре беременности зафиксированы достоверные изменения данного показателя во всех группах. При этом у женщин с физиологически наступившей беременностью ЧСС практически не изменилась (I — 64,29±0,31), а у пациенток программы ЭКО отмечалось достоверное увеличение ЧСС, с наиболее высокими значениями в III группе (II — 70,28±0,79; III — 71,98±0,53, $p \leq 0,00$).

Уровень систолического артериального давления (САД) до беременности и начала программы ЭКО у всех женщин был в пределах физиологической нормы, но в III группе отмечалось статистически значимое увеличение данного показателя ($p_{1-3} = 0,000$; $p_{2-3} = 0,000$). В первом триместре беременности, а также у женщин с неудачной попыткой ЭКО зафиксировано достоверное увеличение уровня САД ($p \leq 0,00$), при этом во II-й и III-й группах значения были выше на 4 мм. рт. ст. (I — 114,07±0,73; II — 118,0±1,12; III — 118,44±0,87; $p \leq 0,00$).

При анализе уровня диастолического артериального давления (ДАД) до наступления беременности и начала программы ЭКО выявлены статистически значимые более высокие показатели у пациенток III группы (I — 66,3±0,39; II — 66,2±0,55; III — 69,8±0,47; $p \leq 0,00$). При обследовании в динамике зафиксировано незначительное увеличение ДАД у беременных I и II групп, тогда как у женщин с неудачной попыткой ЭКО, данный показатель не изменился (табл. 2).

Таким образом, показатели САД, ДАД и ЧСС были достоверно выше у пациенток III группы (ЭКО «-») на этапе планирования и после ЭКО.

Анализ состояния адаптационных резервов организма на этапе подготовки и в период беременности может иметь важное прогностическое значение [13, 14] (табл.3).

Согласно нашим данным, у женщин I группы, до наступления беременности, адаптационный потенциал (АП) соответствовал удовлетворительной адаптации ССС (1,92±0,01; $p_{1-2} = 0,008$; $p_{1-3} = 0,000$). При повтор-

ном обследовании, в первом триместре беременности отмечено увеличение АП на 5 ед. (I — 1,97±0,01; $p \leq 0,00$), что свидетельствует о незначительном напряжении адаптации. В течение первых 12-ти недель беременности происходит закладка и становление новой функциональной системы, что объясняет напряжение регуляторных механизмов. Эти изменения отражаются на работе ССС и влияют на артериальное давление и ЧСС. Можно предположить, что выявленное нами напряжение адаптационных механизмов у женщин с физиологически возникшей и протекающей беременностью необходимо для поддержания гомеостаза.

У пациенток II группы, до начала программы ЭКО, АП составил 1,97±0,01 ($p_{2-3} = 0,000$), что указывает на слабовыраженное напряжение адаптации. После наступления беременности отмечалось увеличение данного показателя до 2,21±0,02 ($p_{2-3} = 0,002$), что демонстрировало значительный уровень напряжения адаптации ССС.

В третьей группе женщин зафиксированы высокие значения АП — 2,13±0,12 уже на этапе планирования беременности, что говорит о выраженном напряжении адаптации еще до вступления в программу ЭКО. При обследовании в динамике, у пациенток с несостоявшейся беременностью уровень АП увеличился до 2,29±0,01 и свидетельствовал о неудовлетворительной адаптации ССС. Вероятно, в данном случае защитно-приспособительная деятельность, вызывающая определенное напряжение регуляторных процессов, вследствие длительного воздействия этиологического фактора, вызвала ряд последовательных реакций, приводящих, в конечном итоге, к истощению.

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что у пациенток I группы отмечался удовлетворительный уровень адаптации на этапе подготовки к беременности и незначительное напряжение в первом триместре. У женщин с положительным результатом ЭКО уровень АП увеличивался и соответствовал состоянию напряжения как на этапе планирования, так во время беременности. Самые высокие значения АП, отражающие уровень выраженного напряжения адаптации ССС до ЭКО и неудовлетворительную адаптацию после процедуры, зафиксированы у пациенток III группы сравнения.

Таблица 3
Динамика адаптационного потенциала в сравниваемых группах

показатели		I группа n=70	p	II группа n=25	p	III группа n=45
до беременности	АП, балл	1,92±0,01	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	1,97±0,01	$p_{2-3} < 0,001$	2,13±0,12
I триместр и после ЭКО	АП, балл	1,97±0,01	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	2,21±0,02	$p_{2-3} < 0,001$	2,29±0,01
Критерий Стьюдента	АП, балл	p=0,000		p=0,000		p=0,000

Таблица 4
Вегетативный индекс Кердо в сравниваемых группах

Показатели		I группа n=70	p	II группа n=25	p	III группа n=45
до беременности	ИК	5,10±0,79	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	8,89±0,63	$p_{2-3} > 0,05$	8,80±0,43
I триместр и после ЭКО	ИК	9,48±0,33	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	-4,05±1,08	$p_{2-3} > 0,05$	-2,84±0,65
Критерий Стьюдент	ИК	p=0,000		p=0,000		p=0,000

Таблица 5
Доля лимфоцитов периферической крови у пациенток сравниваемых групп

показатели		I группа n=70	p	II группа n=25	p	III группа n=45
до беременности	лимф. %	24 (23;25)	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	25 (24;26)	$p_{2-3} < 0,001$	21 (20;22)
I триместр и после ЭКО	лимф. %	22 (22;23)	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	27 (26;28)	$p_{2-3} > 0,05$	28 (27;28)
Критерий W	лимф.	p=0,000		p=0,000		p=0,000

Примечание: показатели представлены в виде медианы (Me) и квартилей (Q1-Q3). Проверка гипотезы о равенстве медианных значений в двух зависимых выборках осуществлялась критерием Вилкоксона (W).

Адаптация осуществляется при участии вегетативной нервной системы, которая координирует компенсаторно-приспособительные реакции организма [12, 13].

При оценке вегетативного индекса Кердо (ИК) на этапе планирования беременности выявлено преобладание симпатического отдела вегетативной нервной системы (СО ВНС) во всех исследуемых группах, с более высокими значениями у женщин с бесплодием ($p_{1-2} = 0,007$; $p_{1-3} = 0,001$). В первые 12 недель после зачатия у пациенток I группы отмечено статистически значимое увеличение показателя ИК ($p \leq 0,00$). Это свидетельствует о физиологическом течении беременности и соответствует литературным данным о повышении активности СО ВНС в первом триместре беременности при снижении активности механизмов гуморальной регуляции [5, 12]. У пациенток II и III групп сравнения отмечено достоверное изменение показателей ИК после программы ЭКО ($p \leq 0,00$). Отрицательные значения (-4,05±1,08; -2,84±0,65; $p_{1-2} = 0,000$; $p_{1-3} = 0,000$) указывают на превалирование парасимпатических влияний.

Для оценки типа адаптивных реакций у пациенток, мы исследовали уровень лимфоцитов в периферической крови (табл. 5).

Полученные показатели уровня лимфоцитов в соответствии с теорией неспецифических адаптационных реакций организма свидетельствовали о преобладании реакций тренировки во всех сравниваемых группах на

этапе подготовки к беременности, при этом медианные значения у женщин I и II групп были достоверно выше ($p_{1-2} = 0,000$; $p_{1-3} = 0,000$; $p_{2-3} = 0,000$). После наступления беременности у пациенток I группы отмечалось снижение доли лимфоцитов в периферической крови с 24% до 22% ($p \leq 0,00$). У женщин с эффективной программой ЭКО в первом триместре наступившей беременности зафиксировано увеличение уровня лимфоцитов на 3% ($p \leq 0,00$). Самые высокие значения доли лимфоцитов отмечены в III-й группе пациенток (ЭКО «-») — 28 (27;28). Данный показатель свидетельствовал о преобладании реакции спокойной активации у данных женщин ($p \leq 0,00$).

Подводя итог, можно сделать вывод, что изменения в организме женщины, вызванные беременностью, — это результат приспособления, адаптации организма к ожидающим его задачам. У пациенток с физиологической беременностью отмечается напряжение адаптационных реакций при влиянии на сердечно-сосудистую систему симпатического отдела вегетативной нервной системы, тогда как у беременных с ЭКО истощается приспособительная активность СО ВНС, что приводит к значительному напряжению и даже срыву адаптации на фоне преобладающего влияния парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Кроме того, достоверные отличия изученных показателей у женщин с неэффективной программой ЭКО на этапе планирования беременности, могут иметь важное прогностическое значение для определения тактики ведения пациенток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Судаков К. В. Функциональные системы. Москва: РАМН; 2011.
2. Чёрная Е. Е. Особенности адаптации сердечно-сосудистой системы пришлых жительниц Среднего Приобья при физиологическом течении беременности / Е.Е. Чёрная, А.П. Койносов // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2017; 12: 25-29.
3. Михайлова С. В., Кузмичев Ю. Г., Красникова Л. И., Хрычева Т. В., Сабурцев С. А., Крылов В. Н. и др. Физиологические особенности адаптивных реакций организма / С.В. Михайлова, Ю.Г. Кузмичев, Л.И. Красникова, Т.В. Хрычева, С.А. Сабурцев, В.Н. Крылов, Л.В. Ошевенский // Журнал фундаментальной медицины и биологии. – 2018; 3: 24-38.
4. Вяликова Ю. В. Особенности беременности и родов у пациенток после экстракорпорального оплодотворения / Ю.В. Вяликова, А.Я. Алиева, Ю.В. Найко // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – Общество с ограниченной ответственностью Наука и инновации.-2015; 5 (5): 442-442.
5. Mizuno T., Tamakoshi K., Tanabe K. Anxiety during pregnancy and autonomic nervous system activity: A longitudinal observational and cross-sectional study / T. Mizuno, K. Tamakoshi, K. Tanabe // Journal of psychosomatic research. – 2017; 99: 105-111.
6. Спицин А. П., Царев Ю. К., Спицин А. А. Использование интегральных индексов центральной и периферической гемодинамики для ранней диагностики изменений сердечно-сосудистой системы у лиц молодого возраста. / А.П. Спицин, Ю.К. Царев, А.А. Спицин // II Международный форум врачей общей практики/ семейных врачей. – 2019; 125-128.
7. Barylyak L. G., Malychkova R.V., Tolstanov O.K., Tymochko O.B. Comparative estimation of informativeness of leucocytary index of adaptation by Garkavi and by Porovych .Медична гідрологія та реабілітація. – 2013; 11 (1): 5-22.
8. Zeng Z. Metabolic adaptations in pregnancy: a review / Z. Zeng, F.Liu , S. Li // Annals of Nutrition and Metabolism. – 2017; 70 (1): 59-65.
9. Серов В.Н., Сухих Г.Т., Прилепская В.Н., Радзинский В.Е. Руководство по амбулаторно-поликлинической помощи в акушерстве и гинекологии. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.
10. De Haas S. Physiological adaptation of maternal plasma volume during pregnancy: a systematic review and meta-analysis / S. de Haas, C. Ghossein-Doha, S. M. J. van Kuijk // Ultrasound in Obstetrics & Gynecology. – 2017; 49 (2): 177-187.
11. Костенко И.В., Рогожина И.Е., Ведищев Е.С., Оленко Е.С., Киричук В.В. и др. Функциональное состояние организма и его адаптационная возможность у беременных с гестозом / И.В. Костенко, И.Е. Рогожина, С.И. Ведищев, Е.С. Оленко, В.Ф. Киричук, А.И. Кодочигова, В.Г. Субботина // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. – 2012; 17(5): 1452-1455
12. Тайтубаева Г. К., Грибачева И. А. Изменения вегетативной нервной системы во время беременности / Г.К. Тайтубаева, И.А. Грибачёва // Уральский медицинский журнал. – 2019; 5: 67-72.
13. Boeldt D. S., Bird I. M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia / D.S. Boeldt, I. M. Bird // The Journal of endocrinology. – 2017; 232 (1): 27-44.
14. Athani K. B., Kalyanshetti S. B. A comparative study of cardiovascular autonomic function tests between pregnant and non-pregnant women / K.B. Athani, S. B. Kalyanshetti // International Journal of Physiology. – 2018; 6 (4): 11-17.

Авторы

Чехова Юлия Сергеевна

Ассистент кафедры инфекционных болезней с курсом детских инфекций
 doktor-ch@bk.ru

Соловьева Светлана Владимировна

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биологии
 svsolov@mail.ru

Кашуба Эдуард Алексеевич

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсом детских инфекций
 kashuba.ed@mail.com

Антонова Мария Владимировна

Аспирант кафедры инфекционных болезней с курсом детских инфекций antonovamariav@mail.ru

ФГБОУ ВО «Тюменский ГМУ» Минздрава РФ, г. Тюмень
 Российская Федерация, 625023, г. Тюмень, ул. Одесская, 54

J.S. Chehova, E.A. Kashuba, S.V. Solov'eva, M.V. Antonova

ADAPTIVE POSSIBILITY OF THE ORGANISM OF WOMEN WITH PHYSIOLOGICAL PREGNANCY AND EXTRACORPORAL FERTILIZATION

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russian Federation

Abstract. The study of the restructuring of the body of a pregnant woman with relation to the theory of functional systems is necessary for a complete understanding of the formation of adaptive processes. Of particular interest is pregnancy resulting from extracorporeal fertilization (IVF). **Aim.** to estimate the adaptive capacity of women with physiological pregnancy and IVF. **Materials and methods.** The object of the study: healthy women before pregnancy and in the I trimester (I group), patients with tubal-peritoneal infertility at the planning stage and after an effective IVF (II group), women with an unsuccessful IVF (III group). We conducted a study of the functional state of the cardiovascular system of pregnant women with the calculation of adaptive potential (AP) by R. M. Bayevsky. We assessed the regulation of the vegetative nervous system — Kerdo index (KI). We determined the state of regulatory systems with the stress index (L.H. Garkavi et al.). **Results.** In patients with physiological pregnancy, we noted the effect on the cardiovascular system of the autonomic nervous system and the tension of adaptive reactions. In pregnant women with IVF we recorded the depletion of adaptive activity of the sympathetic autonomic nervous system. This led to a significant strain or failure of adaptation with the predominant influence of the parasympathetic autonomic nervous system. **Conclusion.** Significant differences in the studied parameters in women with ineffective IVF program at the stage of pregnancy planning may have important prognostic value for determining the tactics of management of patients.

Keywords: physiologically pregnancy, extracorporeal fertilization, adaptation, adaptive potential, vegetative regulation

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Yulia S. Chekhova

doktor-ch@bk.ru

Received 28.04.2020

For citation:

Chehova J.S., Kashuba E.A., Solov'eva S.V., Antonova M.V. Adaptive possibility of the organism of women with physiological pregnancy and extracorporeal fertilization. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 2, pp. 121–130. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-121-130 (In Russ)

Introduction

From the point of view of the theory of functional systems, the study of body restructuring during pregnancy is necessary for a complete understanding of the formation of adaptive processes [1]. Changes in the work of all body systems occur during pregnancy. The new functional system «mother-placenta-fetus» generates changes that are aimed to achieve a useful adaptive result - the birth of a healthy child [2, 3].

Assisted reproductive technologies have become widespread because of the high incidence of infertility in the population. Particular interest is pregnancy resulting from in vitro fertilization (IVF). At the present stage the positive results of IVF in Russia don't exceed 40%. This isn't only a socio-demographic, medical, but also a state problem [4]. Cost effectiveness reflects the outcomes of the programs. In this regard, the study of the functional characteristics of the body of women with physiological pregnancy and after IVF is necessary for both theoretical and practical medicine. This determines the relevance of this work.

Aim: to estimate the adaptive capacity of women with physiological pregnancy and IVF.

Materials and methods

The objects of the study was clinically healthy women before their pregnancy and in the first trimester after conception (group I, n = 70, mean age = 25.69 ± 0.14). Comparison group — women with infertility of tubal — peritoneal genesis before entering the IVF program and in the first trimester of gestation (group II - IVF «+», n = 25, mean age 30.28 ± 0.50). The third group was the patients with tubal peritoneal infertility and an unsuccessful IVF attempt (group III — IVF «-», n = 45, mean age 32.29 ± 0.32).

The study was approved by the Ethics Committee at the Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Discussion note No. 68, 04.08.2016).

We analyzed the state of the cardiovascular system and autonomic regulation, adaptive capabilities and height and weight indicators in women before and after pregnancy, as well as after an unsuccessful IVF attempt. We studied the functional state of the cardiovascular system in pregnant women using the method of measuring peripheral blood pressure, heart rate at rest with the calculation of the adaptive potential (AP) (R.M. Baevskaya) [5]. To assess

the state of the autonomic nervous system we calculated the Kerdo index (IC) [6]. To characterize the state of the body's regulatory systems we used the stress index (by L.H. Garkavi et al.). It allows to differentiate nonspecific adaptive reactions by the values of the leukocyte formula of peripheral blood [7]. We calculated the body mass index (BMI) considering the body weight of women before her pregnancy [8]. We carried out all measurements in the morning, 1-1.5 hour after a meal, before medical interventions. We excluded external influences affecting the research results.

We carried out statistical processing of the obtained data using Microsoft Office and Statistical10. Normality of distribution was checked using the Shapiro-Wilk test. We used the generally accepted concepts of descriptive statistics: mean (M), standard error of the mean (m), relative value (P), standard error of proportion (sp) to describe indicators with a normal distribution. For indicators with abnormal distribution, the median, 25th and 75th percentiles were calculated (Me (C25-C75)). We tested the hypothesis of equality of two mean quantitative indicators with a normal distribution using the Student's t-test. In other cases, the Wilcoxon test (for dependent samples) and the Man-Whitney test (for independent samples) were used. The critical level of statistical significance (p) was taken equal to 0.05.

Results

We analyzed the average BMI values before pregnancy and entry into the IVF program and found statistically significant differences in the comparison groups. All patients had a normal BMI, which ranged from 21.41-22.48 kg/m². However, women in groups I and II had a significantly lower this indicator ($p_{1,3}=0.004$; $p_{2,3}=0.039$) (Table 1).

The dynamics of weight gain in group I in the 1st trimester was physiology — 1.6 ± 0.50 ($p_{1,2}=0.000$; $p_{1,3}=0.000$). Weight gain in women of group II (IVF +) was significantly higher and amounted to 4.16 ± 0.97 ($p_{1,2}=0.000$). In patients of group III (IVF-), despite the absence of pregnancy, 12 weeks after the start of the program, body weight increased by an average of 3.71 ± 0.70 kg. ($p_{1,3}=0.000$; $p_{2,3}=0.035$).

To summarize, in patients suffering from infertility, at the stage of pregravid preparation, there was a tendency to an increase in BMI in comparison with clinically healthy women. At the same time, the maximum values were recorded in group III. In pregnant women with IVF + in the first trimester of pregnancy, there was a pathological gestational weight gain (more than 2 kg). This was probably due to the hormone therapy prescribed by the program protocol. Non-pregnant women in group III (IVF-) had a significant change in body weight. It can also be due to the influence of medication.

Table 1

Anthropometric data and weight gain in women of the compared groups

index	group I n=70	p	group II n=25	p	group III n=45
BMI before pregnancy or IVF	21,41±0,22	$p_{1,3} \leq 0,01$	22,06±0,35	$p_{2,3} < 0,05$	22,48±0,30
weight gain	1,6±0,50	$p_{1,2} \leq 0,001$ $p_{1,3} \leq 0,001$	4,16±0,97	$p_{2,3} < 0,05$	3,71±0,70

The general adaptation process can affect the state of the functional activity of the CVS [9]. The new condition causes significant changes in the cardiovascular system, and is aimed at maintaining homeostasis and achieving a useful adaptive result. Therefore, an important task is to assess the functional parameters of hemodynamics during pregnancy. Thus, the functional state of the CVS reflects the state of adaptation processes in the body [10, 11, 12]. To assess the functioning of the CVS, we examined some indicators of CVS functioning before and during pregnancy in patients of group We measured the dynamics of the level of peripheral blood pressure (BP) and heart rate before and after pregnancy (Table 2).

According to the results of the study, we found that the heart rate (HR) before pregnancy and entry into the IVF program was statistically significantly higher in comparison groups I and III (I — 63.23 ± 0.412 ; II — 64.18 ± 0.43 ; $p \leq 0.00$). We noted that the patients of group II had lower heart rate values (60.8 ± 0.39 ; $p \leq 0.00$). We noted that the patients of group II had lower heart rate values (60.8 ± 0.39 ; $p \leq 0.00$). At the same time, in women with physiologically onset pregnancy, the heart rate did not change (I — 64.29 ± 0.31). Patients with IVF had a significant increase in heart rate. The maximum value was in group III (II — 70.28 ± 0.79 ; III — 71.98 ± 0.53 , $p \leq 0.00$).

According to our study, the level of systolic blood pressure (SBP) before pregnancy and the start of the IVF in all women was at the level of the physiological norm. However, in group III, this indicator significantly increased ($p_{1,3} = 0.000$; $p_{2,3} = 0.000$). We recorded a significant increase in SBP, the largest in groups II and III (I — 114.07 ± 0.73 ; II — 118.0 ± 1.12 ; III — 118.44 ± 0.87 ; $p \leq 0.00$).

The results of our study showed, that the level of diastolic blood pressure (DBP) before pregnancy and IVF was significantly higher in patients of group III (I — 66.3 ± 0.39 ; II — 66.2 ± 0.55 ; III — 69.8 ± 0.47 ; $p \leq 0.00$). In dynamics, the level of DBP in groups I and II increased insignificantly. In group III, this indicator did not change (Table 2).

Thus, in group III (IVF «-») at the planning stage and after IVF the indicators of SBP, DBP and heart rate were significantly higher.

We analyzed the state of the body's adaptive reserves at the stage of preparation and during pregnancy and suggested that they may have an important prognostic value [13, 14] (Table 3).

Table 2

Analysis of blood pressure and heart rate indicators in women of the compared groups

index		group I n=70	p	group II n=25	p	group III n=45
before pregnancy or IVF	systolic blood pressure, mm Hg	112.47±0.52	$p_{1-3} \leq 0.001$	111.6±0.56	$p_{2-3} < 0.001$	115.78±0.72
	diastolic blood pressure, mm Hg	66.3±0.39	$p_{1-3} \leq 0.001$	66.2±0.55	$p_{2-3} < 0.001$	69.8±0.47
	heart rate /min/	63.23±0.412	$p_{1-2} \leq 0.001$	60.8±0.39	$p_{2-3} < 0.001$	64.18±0.43
I trimester of pregnancy or after IVF	systolic blood pressure, mm Hg.	114.07±0.73	$p_{1-2} \leq 0.001$ $p_{1-3} \leq 0.001$	118.0±1.12	$p_{2-3} > 0.05$	118.44±0.87
	diastolic blood pressure, mm Hg	68.16±0.31	$p_{1-3} \leq 0.001$	67.32±0.71	$p_{2-3} < 0.001$	69.85±0.44
	heart rate /min/	64.29±0.31	$p_{1-2} \leq 0.001$ $p_{1-3} \leq 0.001$	70.28±0.79	$p_{2-3} > 0.05$	71.98±0.53

Table 3

Dynamics of adaptive potential in the compared groups

index		group I n=70	p	group II n=25	p	group III n=45
before pregnancy or IVF	AP, score	1,92±0,01	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	1,97±0,01	$p_{2-3} < 0,001$	2,13±0,12
I trimester of pregnancy or after IVF	AP, score	1,97±0,01	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	2,21±0,02	$p_{2-3} < 0,001$	2,29±0,01
Student t-test	AP, score	$p=0,000$		$p=0,000$		$p=0,000$

Table 4

Kerdo vegetative index in the compared groups

index		group I n=70	p	group II n=25	p	group III n=45
before pregnancy or IVF	KVI	5,10±0,79	$p_{1-2} \leq 0,01$ $p_{1-3} \leq 0,001$	8,89±0,63	$p_{2-3} > 0,05$	8,80±0,43
I trimester of pregnancy or after IVF	KVI	9,48±0,33	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	-4,05±1,08	$p_{2-3} > 0,05$	-2,84±0,65
Student t-test	KVI	$p=0,000$		$p=0,000$		$p=0,000$

Table 5

The content of lymphocytes in peripheral blood in the compared groups

index		group I n=70	p	group II n=25	p	group III n=45
before pregnancy or IVF	Lymphocytes %	24 (23;25)	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	25 (24;26)	$p_{2-3} < 0,001$	21 (20;22)
I trimester of pregnancy or after IVF	Lymphocytes %	22 (22;23)	$p_{1-2} \leq 0,001$ $p_{1-3} \leq 0,001$	27 (26;28)	$p_{2-3} > 0,05$	28 (27;28)
W-test	Lymphocytes %	$p=0,000$		$p=0,000$		$p=0,000$

Note: indicators are presented as median (Me) and quartiles (Q1-Q3). The hypothesis of the equality of median values in two dependent samples was tested using the Wilcoxon test (W).

According to our data, in women of the group I before pregnancy the adaptive potential (AP) corresponded to satisfactory adaptation of CVS (1.92 ± 0.01 ; $p_{1-2} = 0.008$; $p_{1-3} = 0.000$). We noted an increase in AP by 5 U. in group I in the first trimester of pregnancy ($I - 1.97 \pm 0.01$; $p \leq 0.00$). This indicated a slight adaptation stress. The tension of regulatory mechanisms during the first 12 weeks of pregnancy probably occurs as a result of the establishment and formation of a new functional system. These changes are reflected in the work of the cardiovascular system and affect blood pressure and heart rate. It can be assumed that the revealed tension of the adaptive mechanisms in pregnant women is necessary to maintain homeostasis.

In patients of group II before IVF, AP was 1.97 ± 0.01

($p_{2-3} = 0.000$). This indicated a mild adaptation tension. An increase in AP during pregnancy was noted to 2.21 ± 0.02 ($p_{2-3} = 0.002$). This demonstrated a significant level of stress adaptation of the CVS.

In the group III we recorded high AP values (2.13 ± 0.12) before pregnancy. This indicated a pronounced adaptation stress even before IVF. In dynamics, the AP level in IVF patients «-» increased to 2.29 ± 0.01 . This testified to the unsatisfactory adaptation of the CVS. Probably, the protective-adaptive activity, causing the tension of the regulatory processes, due to the prolonged exposure to the etiological factor, caused a number of successive reactions. These reactions eventually led to exhaustion.

Thus, we recorded a satisfactory level of adaptation

before pregnancy and insignificant stress in the first trimester in group I. The AP level in group II increased and corresponded to the state of stress both before and during pregnancy. In patients of group III, we recorded the maximum AP value. This reflected the level of pronounced stress adaptation of CVS before IVF and unsatisfactory adaptation after IVF «-».

Adaptation is carried out with the participation of the autonomic nervous system, which coordinates the compensatory and adaptive reactions of the body [12, 13].

Analysis of the Kerdo autonomic index (KVI) at the stage of pregnancy planning established that in all groups the influence of the sympathetic part of the autonomic nervous system (SP ANS) prevailed. Higher values were in women with infertility ($p_{1-2} = 0.007$; $p_{1-3} = 0.001$). We noted that in group I, during pregnancy, KVI increased significantly ($p \leq 0.00$). This indicates the physiological course of pregnancy and corresponds to the literature data. It has been proven that in the first trimester the activity of the SP ANS increases and the activity of the mechanisms of humoral regulation decreases [5, 12]. In groups II and III, there was a significant change in KVI after IVF ($p \leq 0.00$). Negative values (-4.05 ± 1.08 ; -2.84 ± 0.65 ; $p_{1-2} = 0.000$; $p_{1-3} = 0.000$) indicated the prevalence of parasympathetic influences.

We examined the level of lymphocytes in the peripheral blood to assess the type of adaptive responses in patients (Table 5).

The content of lymphocytes in women of the 1st and 2nd groups before pregnancy was significantly higher ($p_{1-2} = 0.000$; $p_{1-3} = 0.000$; $p_{2-3} = 0.000$). This indicated the predominance of training reactions, which corresponded to the theory of nonspecific adaptive reactions of the organism. The content of lymphocytes decreased from 24 to 22% ($p \leq 0.00$) in group I during pregnancy. We recorded an increase in lymphocytes by 3% ($p \leq 0.00$) in group II. The maximum proportion of lymphocytes was in group III — 28 (27; 28). This indicator testified to the predominance of the calm activation reaction in this group ($p \leq 0.00$).

In conclusion, changes in the body of a pregnant woman are the result of adaptation, adaptation of the body to the tasks awaiting it. The tension of adaptive reactions when influencing the cardiovascular system of the sympathetic part of the autonomic nervous system is observed in patients with physiological pregnancy. The sympathetic part of the autonomic nervous system affects the cardiovascular system, which leads to the tension of adaptive reactions in women with physiological pregnancy. In women with IVF, the adaptive activity of the SP ANS is depleted. This leads to the predominant influence of the parasympathetic division of the ANS, significant stress and disruption of adaptation. Significant differences in indicators in women with IVF «-» at the stage of pregnancy planning may have an important prognostic value for determining the tactics of patient management.

REFERENCES

1. Sudakov K. V. Funkcional'nye sistemy [Functional system]. Moskva: RAMS, 2011 (in Russ).
2. Chyornaya E. E. Kojnosov A.P. Features of adaptation of the cardiovascular system of newcomer residents of the Middle Ob region during physiological pregnancy. *Sovremennaya nauka: aktual'nye problemy teorii i praktiki. Seriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki* [Scientific and practical journal]. 2017, No 12, pp. 25-29 (in Russ).
3. Mihajlova S. V., Kuzmichev YU. G., Krasnikova L. I., Hrycheva T. V., Saburcev S. A., Krylov V. N. et al. Physiological features of the adaptive reactions of the body. *Zhurnal fundamental'noj mediciny i biologii* [Journal of Fundamental Medicine and Biology]. 2018, No 3, pp. 24-38 (in Russ).
4. Vyalikova Yu. V. Alieva A.Ya., Najko Yu.V. Features of pregnancy and childbirth in patients after in vitro fertilization. *Byulleten' medicinskih internet-konferenci* [Bulletin of Medical Internet Conferences]. 2015, No 5(5), pp. 442-442 (in Russ).
5. Mizuno T., Tamakoshi K., Tanabe K. Anxiety during pregnancy and autonomic nervous system activity: a longitudinal observational and cross-sectional study. *Journal of psychosomatic research*. 2017, No. 99, pp.105-111.
6. Spicin A. P., Carev YU. K., Spicin A. A. The use of integral indices of central and peripheral hemodynamics for early diagnosis of changes in the cardiovascular system in young people. *II Mezhdunarodnyj forum vrachej obshchej praktiki/semeynyh vrachej* [II International Forum of General Practitioners], 2019, p.125-128.
7. Barylyak L. G., Malychkova R.V., Tolstanov O.K., Tymochko O.B. Comparative estimation of informativeness of leucocytary index of adaptation by Garkavi and by Popovych. *Medical hydrology and rehabilitation*, 2013, No 11(1), pp. 5-22 (in Russ).
8. Zeng Z. Liu F., Li S. Metabolic adaptations in pregnancy: a review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2017, No 70(1), pp. 59-65.
9. Serov V.N., Suhij G.T., Prilepskaya V.N., Radzinskij V.E. *Obstetrics and Gynecology Outpatient Care Guide*. M.: GEOTAR-Media, 2017 (in Russ).
10. De Haas S. Physiological adaptation of maternal plasma volume during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 2017, No 49(2), pp. 177-187.
11. Kostenko I.V., Rogozhina I.E., Vedishchev E.S., Olenko E.S., Kirichuk V.V. et al. The functional state of the body and its adaptive capacity in pregnant women with gestosis. *Vestnik Tambovskogo universiteta. Seriya: Estestvennye i tekhnicheskie nauki* [Tambov University Reports. Series Natural and Technical Sciences], 2012, No.17(5), pp. 1452-1455 (in Russ).
12. Tajtubaeva G.K., Gribacheva I.A. Changes in the autonomic nervous system during pregnancy. *Ural'skij medicinskij zhurnal* [Ural Medical Journal], 2019, No 5,

pp. 67-72 (in Russ).

13. Boeldt D.S., Bird I.M. Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *The Journal of endocrinology*, 2017, No 232(1), pp. 27-44.

14. Athani K.B., Kalyanshetti S.B. A comparative study of cardiovascular autonomic function tests between pregnant and non-pregnant women. *International Journal of Physiology*, 2018, No 6(4), pp. 11-17.

Authors

Yulia S. Chekhova

Assistant of the Department of Infectious Diseases with a course of children's infections

doktor-ch@bk.ru

Svetlana V. Solovieva

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Biology

svsolov@mail.ru

Eduard A. Kashuba

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Infectious Diseases with a course of children's infections

kashuba.ed@mail.com

Maria V. Antonova

Postgraduate student of the Department of Infectious Diseases with a course of childhood infections

antonovamariav@mail.ru

Tyumen State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tyumen

54, Odesskaya str., Tyumen, 625023, Russian Federation

УДК: 616-006.446.8

А.В. Виноградов¹, А.В. Резайкин², С.В. Сазонов^{2,3}, А.Г. Сергеев²

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ОСТРОГО МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ

¹ ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1»,
Екатеринбург, Российская Федерация;

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»,
Екатеринбург, Российская Федерация;

³ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург, Российская Федерация

Резюме. *Цель:* определить мутационный профиль острого миеломонобластного лейкоза (ОММЛ) взрослых больных. *Материалы и методы.* Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 40 больных ОММЛ (в т.ч. 13 в возрасте 15–45, 15 в возрасте 45–60, 12 в возрасте старше 60 лет), получавших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в 2008–2019 гг. Детекцию хромосомных мутаций проводили с использованием стандартного цитогенетического метода (G-бэндинг) и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Определение генных мутаций включало исследование внутренних тандемных дупликаций и мутаций тирозинкиназных доменов гена FLT3, инсерций в экзоне 12 NPM1, мутаций в экзонах 4-11 TP53, а также мутаций в генах c-KIT (экзоны 7-12 и 16-19), NRAS (экзоны 1-4), WT1 (экзоны 6-9), DNMT3A (экзоны 18-26) и KRAS (экзоны 1-4) методом прямого автоматического секвенирования. *Результаты.* Общая частота генных мутаций FLT3, NPM1, TP53, c-KIT, WT1 и DNMT3A при ОММЛ составила 35,0%, при этом наиболее часто мутации определялись в генах DNMT3A (30,8%), NPM1 (20,0%) и FLT3 (20,0%). Мутации в генах семейства RAS выявлены не были, что может быть обусловлено объемом выборки. Частота двойных мутантов при ОММЛ составляла 15,2%, среднее число мутаций на пациента — 1,4, при этом наиболее часто кооперировались мутации в генах c-KIT, DNMT3A, NPM1 и FLT3. Средний возраст выявления мутаций в генах c-KIT и NPM1 соответствовал молодому, DNMT3A, WT1 и FLT3 — зрелому, TP53 — пожилому. Средний возраст двойных мутантов также соответствовал молодому возрасту (42,2) за счет преобладания ко-мутаций NPM1 и c-KIT.

Ключевые слова: острый миеломонобластный лейкоз, мутационный профиль, гены DNMT3A, FLT3, c-KIT, NPM1, TP53, WT1

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович
prof-ssazonov@yandex.ru

Дата поступления 29.09.2020 г.

Образец цитирования:

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Мутационный профиль острого миеломонобластного лейкоза взрослых. Вестник уральской медицинской академической науки. 2020, Том 17, №2, с. 131–138, DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-131-138

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — это группа генетически гетерогенных злокачественных заболеваний крови, чаще встречающихся у взрослых в пожилом и старческом возрасте и возникающих как следствие соматически приобретенных повреждений генома кроветворных клеток-предшественниц [1-3].

Ассоциации «генотип-фенотип» при ОМЛ установлены для некоторых специфических цитогенетических аномалий, но менее изучены при различных генных мутациях, выявленных в последние годы. В целом, цитоморфологические подтипы ОМЛ и молекулярные изменения до конца не изучены [4, 5]. В то время как некоторые генные мутации преобладают в нескольких цитоморфологических подтипах, ряд ассоциаций мутаций с различными фенотипами был идентифицирован для специфических молекулярных подгрупп. Так, D. Rose и соавт. установлено, что наиболее часто мутирующими генами при различных морфологических вариантах ОМЛ были следующие гены: RUNX1 при ОМЛ M0 (43,0%), NPM1 при M1 (42,0%), DNMT3A — M2 (26,0%), NPM1 — M4 (57,0%) и M5 (60,0%), TP53 — M6 (36,0%) [6].

Цель: определить мутационный профиль острого миеломонобластного лейкоза (ОММЛ) взрослых больных.

Материалы и методы

Исследуемая группа состояла из 40 пациентов (17 женщин (42,5%), 23 мужчин (57,5%), средний возраст

50 лет, в том числе 13 в возрасте от 15 до 45 лет, 15 в возрасте 45-60 лет, 12 в возрасте старше 60 лет) с впервые выявленным ОММЛ. Генетический анализ проводился на образцах костного мозга и периферической крови больных Свердловского областного гематологического центра в период с 2008 по 2019 год. Все пациенты дали письменное информированное согласие в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

Диагноз ОММЛ устанавливали в соответствии с рекомендациями ВОЗ и критериями FAB-классификации. Во всех случаях проводилась морфологическая оценка, включающая окраску по Романовскому-Гимза, цитохимическую реакцию на миелопероксидазу и иммунофенотипирование [7-9]. Стандартный цитогенетический анализ (G-бэндинг) был проведен у 32 пациентов (80,0%). Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-PCR) у 22 больных (55,0%) определялись криптические хромосомные аномалии: транслокация $t(8;21)(q22;q22)$, инверсия $inv(16)(p13;q22)$, транслокация $t(9;22)(q34.1;q11.2)$, аномалии сегмента 11q23. Хромосомные aberrации описаны в соответствии с международной системой цитогенетической номенклатуры человека. Комплексные изменения кариотипа определялись при обнаружении 3 и более структурных и/или количественных мутаций хромосом [6].

Скрининг точечных мутаций в 8 генах, включая внутренние тандемные дупликации (ITD) и миссенс-мутации в кодирующей последовательности тирозинкиназных доменов (TKD) в гене FLT3 ($n=35$), инсерции в экзоне 12 гена NPM1 ($n=25$), мутации в экзонах 4-11 гена TP53 ($n=24$), а также мутации в генах c-KIT (экзоны 7-12 и 16-19, $n=23$), NRAS (экзоны 1-4, $n=19$), WT1 (экзоны 6-9, $n=18$), DNMT3A (экзоны 18-26, $n=13$) и KRAS (экзоны 1-4, $n=4$), осуществляли методом прямого автоматического секвенирования по ранее описанным методикам [10-15]. Маркеры для генетического скрининга были выбраны в соответствии с рекомендациями ВОЗ и European Leukemia Net с учетом их прогностической значимости [7, 16]. Среднее число скринированных генов на одного пациента составило 4 (диапазон 1-8). Поэтому частоту двойных мутантов рассчитывали только для случаев, при которых число обследованных на мутации генов было не меньше двух ($n=33$). Для валидации мутантного фенотипа NPM1 использовали иммуногистохимический метод, описанный в работе [17].

Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью компьютерной программы MEGA X [18]. Доверительные интервалы (ДИ) для частот мутаций были установлены на основе биномиального распределения.

Результаты

У большинства больных (56,3%, при 95% ДИ от 39,3 до 71,8%) определялся нормальный кариотип ОММЛ,

у 15,6% (при 95% ДИ от 6,9 до 31,8%) — анеуплоидный, у 28,1% (при 95% ДИ от 15,6 до 45,4%) — другие структурные и количественные аномалии хромосом. Среднее количество лейкоцитов составляло $77 \times 10^9/\text{л}$ (диапазон $2,5-350,0 \times 10^9/\text{л}$).

Наиболее распространенным типом хромосомных aberrаций в исследуемой группе была инверсия $inv(16)(p13;q22)$ ($n=5$, 15,6%, при 95% ДИ от 6,9 до 31,8%). Реже встречалась трисомия хромосомы 8, которая была выявлена в 2 случаях (6,3%, при 95% ДИ от 1,7 до 20,1%). Другие мутации (трисомия хромосомы 11; трисомии хромосомы 13 и 14; трисомии хромосомы 4 и 21; моносомия хромосомы 5; aberrации 11q23; инверсия $inv(9)(q12;p11)$; комплексные изменения кариотипа: 52, XYX, $inv(3)(p12;q24)$, +1, +9, +11, +13, +19, +Y, +mar) были обнаружены каждая в одном наблюдении (3,1%, при 95% ДИ от 0,5 до 15,7%).

В целом, 35,0% (при 95% ДИ от 22,1 до 50,5%) пациентов имели точечные мутации в исследованных генах в момент диагностики ОММЛ. Пять из 8 проанализированных генов (DNMT3A, FLT3, NPM1, c-KIT, WT1) были мутированы у $\geq 5,0\%$ обследованных пациентов. Наиболее высокие частоты мутаций выявлены для генов DNMT3A (30,8%, при 95% ДИ от 12,7 до 57,7%), NPM1 (20,0%, при 95% ДИ от 8,9 до 39,1%) и FLT3 (20,0%, при 95% ДИ от 10,0 до 35,9%). Это частично согласуется с данными [6], которые сообщали о высокой частоте мутаций в гене NPM1 при ОММЛ (57,0%) по сравнению с другими морфологическими подтипами по FAB-классификации. Более редко встречались мутации в гене c-KIT, которые были выявлены в 2 случаях (8,7%, при 95% ДИ от 2,4 до 26,8%). Мутации в TP53 и WT1 были обнаружены каждая в одном наблюдении, 4,2% (при 95% ДИ от 0,7 до 20,2%) и 5,6% (при 95% ДИ от 1,0 до 25,8%), соответственно. Мутации в исследуемых экзонах генов KRAS и NRAS в исследуемой группе обнаружены не были, что может быть обусловлено объемом выборки.

В целом, мы не обнаружили мутаций ни в одном из исследуемых генов у 65,0% (при 95% ДИ от 49,5 до 77,9%) пациентов, в 22,5% (при 95% ДИ от 12,3 до 37,5%) мутации определялись в одном из генов, в 15,2% (при 95% ДИ от 6,7 до 30,9%) — в двух. В среднем частота составила 1,4 мутированных генов на пациента. Указанная оценка может быть неполной, учитывая тот факт, что не все пациенты были полностью обследованы на все 8 генов. Соответственно, дополнительные мутации могли присутствовать в неисследованных генах, и, в отсутствие единообразной оценки всех целевых генов, выявленные частоты представляют собой крайние границы значений.

Для половины из 8 проанализированных генов в значительной части наблюдений были выявлены комутации в других генах. Так, большинство мутантных ОММЛ по c-KIT (100,0%; $n=2$), DNMT3A (66,7%, $n=2$) и NPM1 (60,0%, $n=3$) имели комутации в других генах, тогда как комутации при FLT3 ITD и TKD

были менее частыми (42,9%, n=3), а для TP53 и WT1 таких случаев выявлено не было. Наиболее частыми сочетаниями, присутствующими в исследуемой группе, были ко-мутации NPM1 и FLT3-ITD (40,0%, n=2), DNMT3A и с-KIT (33,3%, n=1), а также NPM1 и с-KIT (20,0%, n=1).

Среди больных ОММЛ с диплоидией генные мутации определялись в 44,4% наблюдений (при 95% ДИ от 24,6 до 66,3%) и были представлены инсерциями в экзоне 12 гена NPM1 — 45,5% (при 95% ДИ от 21,3 до 72,0%), FLT3 ITD и TKD — 25,0% (при 95% ДИ от 10,2 до 49,5%), мутациями DNMT3A — 20,0% (n=1), с-KIT — 10,0% (n=1). Частота двойных мутантов составила 25,0% (при 95% ДИ от 8,9 до 53,2%). При анеуплоидных кариотипах криптические мутации определялись в 60,0% проб (n=3), в т.ч. FLT3 — 50,0% (n=2), DNMT3A — 50,0% (n=1), KIT — 33,3% (n=1), двойные мутанты — 25,0% (n=1). По одному случаю мутаций исследуемых генов выявлено в следующих цитогенетических подгруппах: миссенс-мутация в экзоне 7 гена TP53 — при ОММЛ с комплексными хромосомными aberrациями, несинонимичная транзигция A1363G в гене WT1 — при ОММЛ с инверсией хромосомы 16 (25,0%), FLT3 ITD в сочетании с заменой G2645A в гене DNMT3A — при ОММЛ с неуточненным кариотипом (20,0%) [19]. В целом, выявленные частоты генных мутаций соответствовали ранее установленным в предшествующих исследованиях [11, 13].

Также мы определили средний возраст возникновения мутаций при ОММЛ по возрастной классификации ВОЗ [20], который для генов с-KIT и NPM1 соответствовал молодым взрослым (33,5±2,9 и 44,2±11,4 соответственно), для 3 генов — зрелому возрасту (DNMT3A — 49,3±18,4; WT1 — 51,0; FLT3 — 54,0±12,3), для гена TP53 составил 63,0 года (n=1). Средний возраст двойных мутантов составил 42,2±13,7 года за счет преобладания ко-мутаций NPM1 и с-KIT.

Выводы

1. Общая частота генных мутаций FLT3, NPM1, TP53, с-KIT, WT1 и DNMT3A при ОММЛ составила 35,0%, при этом наиболее часто мутации определялись в генах DNMT3A (30,8%), NPM1 (20,0%) и FLT3 (20,0%). Мутации в генах семейства RAS выявлены не были, что может быть обусловлено объемом выборки.

2. Частота двойных мутантов при ОММЛ составляла 15,2%, среднее число мутаций на пациента — 1,4, при этом наиболее часто кооперировались мутации в генах с-KIT, DNMT3A, NPM1 и FLT3.

3. Средний возраст выявления мутаций в генах с-KIT и NPM1 соответствовал молодому, DNMT3A, WT1 и FLT3 — зрелому, TP53 — пожилому. Средний возраст двойных мутантов также соответствовал молодому возрасту за счет преобладания ко-мутаций NPM1 и с-KIT.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017. Vol 35(9). pp. 934-46.
2. Jung J., Cho B.S., Kim H.J. et al. Reclassification of acute myeloid leukemia according to the 2016 WHO classification. *Ann. Lab. Med.* 2019. Vol. 39(3). pp. 311-316.
3. Panuzzo C., Signorino E., Calabrese C. et al. Landscape of tumor suppressor mutations in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Med.* 2020. Vol. 9(3). p. 802.
4. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15-45 лет // *Гены и клетки* 2018; 14(3): 70-74.
5. Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017. Vol. 130 (4). pp. 410-423.
6. Rose D., Haferlach T., Schnittger S. et al. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017. Vol. 31 (1). pp. 11-17.
7. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. Vol.127 (20). pp. 2391-2405.
8. Vardiman J.V., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009. Vol. 114 (5). pp. 937-952.
9. Walter R.B., Othus M., Burnett A.K. et al. Significance of FAB subclassification of «acute myeloid leukemia, NOS» in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. Vol. 121 (13). pp. 2424-2431.
10. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах // *Российский онкологический журнал*. – 2013. – №4. – С. 34-35.
11. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и соавт. Детекция мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с нормальным кариотипом бластных клеток // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. - 2016. – №2. – С. 89-101.
12. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция внутренних tandemных дупликаций и точковых мутаций гена FLT3 при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2013. – №1. – С. 64-66.
13. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с aberrантными кариотипами // *Вестник Уральской медицинской академи-*

ческой науки. - 2015. – №1. – С. 77-84.

14. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций в гене DNMT3A при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т.14. – №1. – С. 18-23.

15. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования // Вестник Башкирского университета. – 2014. – Т.19. - №3. – С. 845-847.

16. Döhner H., Estey E.H., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017. Vol. 129 (4). pp. 424-447.

17. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и соавт. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена NPM1 при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2013. – №4. – С. 124-127.

18. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35(6). pp. 1547-1549.

19. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Изотов Д.В., Сергеев А.Г. Применение технологии прямого автоматического секвенирования для детекции мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2016. – №4. – С.38-51.

20. Гериатрия: национальное руководство / под ред. О.Н. Ткачевой, Е.В. Фроловой, Н.Н. Яхно. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – С. 40-66.

Авторы

Виноградов Александр Владимирович
ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», отделение гематологии
Врач-гематолог, кандидат медицинских наук, главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области
Российская Федерация, 620014, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, д. 34б
a.vinogradov@egov66.ru

Резайкин Алексей Васильевич
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра медицинской физики
Кандидат медицинских наук, доцент
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
alexrez@usma.ru

Сазонов Сергей Владимирович
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
sazonov@usma.ru

Сергеев Александр Григорьевич
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
sergeev@usma.ru

A.V. Vinogradov¹, A.V. Rezaykin², S.V. Sazonov^{2,3}, A.G. Sergeev²

GENE MUTATIONS LANDSCAPE IN ADULT ACUTE MYELOMONOBLASTIC LEUKEMIA

¹ Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Yekaterinburg, Russian Federation;

² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

³ Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. Aim: to estimate gene mutations landscape in adult acute myelomonoblastic leukemia (AMML) patients (pts). **Materials and methods.** Bone marrow and peripheral blood samples were obtained from 40 AMML pts (including 13 aged 15 to 45, 15 aged 45-60, 12 aged over 60 years old), treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2008–2019. Detection of chromosomal mutations performed using G-banding and real-time polymerase chain reaction. Gene mutation screening for 8 genes investigating the presence of FLT3 ITD and TKD, NPM1 exon 12 insertions, TP53 exons 4-11 mutations, as well as of mutations in c-KIT exons 7-12 and 16-19, NRAS exons 1-4, WT1 exons 6-9, DNMT3A exons 18-26 and KRAS exons 1-4 was performed using direct automatic sequencing. **Results.** The total frequency of FLT3, NPM1, TP53, C-KIT, WT1 and DNMT3A genes mutations in AMML was 35.0%. The most frequent mutations were detected in the DNMT3A (30.8%), NPM1 (20.0%), and FLT3 (20.0%) genes. Mutations in the RAS family genes were not detected, which may be due to the sample size. The frequency of double mutants was 15.2%, the average number of mutations per patient was 1.4, and mutations in the c-KIT, DNMT3A, NPM1 and FLT3 genes were most often co-operated. c-KIT and NPM1 genes mutations were mainly detected at a young patients, DNMT3A, WT1 and FLT3 — at a middle-aged patients and TP53 was identified in patient over 60 years old. The average age of the double mutants also corresponded to the young age (42,2) due to the predominance of mutations NPM1 and c-KIT.

Keywords: acute myelomonoblastic leukemia, mutations landscape, DNMT3A, FLT3, c-KIT, NPM1, TP53, WT1

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Sergey V. Sazonov

prof-ssazonov@yandex.ru

Received 29.09.2020

For citation:

Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Gene mutations landscape in adult acute myelomonoblastic leukemia. *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki.* = Journal of Ural Medical Academic Science. 2020, Vol. 17, no. 2, pp. 131–138. DOI: 10.22138/2500-0918-2020-17-2-131-138 (In Russ)

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of genetically heterogeneous malignant blood diseases, more common in elderly and arises as the consequences of somatically acquired genetic lesions in hematopoietic progenitor cells [1-3].

AML genotype-phenotype associations are well established for a some of recurrent cytogenetic abnormalities but less well understood for the variety gene mutations identified in recent years. Today, the AML cytomorphological subtypes and molecular alterations are not fully understood [4, 5]. D. Rose et al. established that the most frequently mutated genes per morphological subtype were RUNX1 in M0 (43.0%), NPM1 in M1 (42.0%), DNMT3A in M2 (26.0%), NPM1 in M4 (57.0%) and M5 (60.0%), TP53 in M6 (36.0%). While some gene mutations were frequent in several cytomorphological subtypes, a series of associations of co-occurring mutations with distinct phenotypes were identified for molecular defined subcohorts [6].

Aim: to estimate gene mutations landscape in adult acute myelomonoblastic leukemia (AMML) patients

Materials and methods

A total of 40 patients (17 females (42,5%), 23 males (57,5%), median age 50 years, including 13 aged 15 to 45, 15 aged 45-60, 12 aged over 60 years old) with de novo AMML were examined. Genetic analyses were performed on bone marrow and peripheral blood samples from Sverdlovsk regional hematological center between 2008 and 2019. All subjects signed Informed Consent Form for depersonalized data processing adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki.

AMML was diagnosed according to the WHO recommendations and FAB classification. Morphological assessment based on Romanovsky-Giemsa stains, myeloperoxidase reaction, and immunophenotypical verification was performed in all cases [7-9]. Chromosome banding analysis was performed in 32 patients (80.0%) by standard cytogenetic method. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) on translocation t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(9;22)(q34.1;q11.2), abnormalities 11q23 was performed in 22 cases (55.0%) to prove specific rearrangements, identify cytogenetically cryptic rearrangements. Chromosomal aberrations were described according to the International System for Human

Cytogenetic Nomenclature. Complex karyotypes were defined as ≥ 3 mutations [6].

Gene mutation screening for 8 genes investigating the presence of FLT3 ITD and TKD (n=35), NPM1 exon 12 insertions (n=25), TP53 exons 4-11 mutations (n=24), as well as of mutations in c-KIT exons 7-12 and 16-19 (n=23), NRAS exons 1-4 (n=19), WT1 exons 6-9 (n=18), DNMT3A exons 18-26 (n=13) and KRAS exons 1-4 (n=4) was performed by direct automatic sequencing (described in previously methods) [10-15]. Markers for genetic screening were chosen according to WHO and European Leukemia Net recommendations, with considering of prognostic value [7, 16]. The mean number of screened genes per patient was 4 (range 1-8). Therefore, the frequency of double mutants was calculated only for cases in which the number of genes examined for mutations was at least two (n=33). To validate the NPM1 mutant phenotype we used an immunohistochemical method as described earlier [17].

Segments matching, alignments and comparison of nucleotide and amino acid sequences were performed using the MEGA X program [18]. Confidence intervals (CI) for the mutations frequencies were established based on the binomial distribution.

Results

The majority of patients (56.3%, with 95% CI from 39.3 to 71.8%) exhibited normal karyotype AMML, 15.6% (with 95% CI from 6.9 to 31.8%) had an aneuploid karyotype, 28.1% (with 95% CI from 15.6 to 45.4%) had other structural and quantitative chromosomal anomalies. The mean WBC count was $77 \times 10^9/L$ (range $2.5-350.0 \times 10^9/L$).

The most common type of chromosomal aberration was inversion $inv(16)(p13;q22)$ (n=5, 15.6%, with 95% CI from 6.9 to 31.8%). More rarely there was a trisomy of chromosome 8, which was detected in 2 cases (6.3%, with 95% CI from 1.7 to 20.1%). Other mutations (trisomy of chromosome 11; trisomy of chromosome 13 and 14; trisomy of chromosome 4 and 21; monosomy of chromosome 5; aberration of 11q23; $inv(9)(q12;p11)$; complex karyotype lesion: 52, XYY, $inv(3)(p12;q24)$, +1, +9, +11, +13, +19, +Y, +mar) were detected each in one instance (3.1%, with 95% CI from 0.5 to 15.7%).

Overall, 35.0% (with 95% CI from 22.1 to 50.5%) of analyzed patients showed point gene mutations at time of AMML diagnosis. Five of 8 analyzed genes (DNMT3A, FLT3, NPM1, c-KIT, WT1) were mutated in $\geq 5.0\%$ of screened patients. The highest mutation frequencies were detected for DNMT3A (30.8%, with 95% CI from 12.7 to 57.7%), NPM1 (20.0%, with 95% CI from 8.9 to 39.1%) and FLT3 (20.0%; with 95% CI from 10.0 to 35.9%). This is partially consistent with data from [6], the latter reporting higher NPM1 mutation rates for AMML (57.0%), compared to other FAB subtypes. More rarely there was c-KIT mutations, which was detected in 2 cases (8.7%, with 95% CI from 2.4 to 26.8%). Mutations in

TP53 and WT1 were detected each in one instance, 4.2% (with 95% CI from 0.7 to 20.2%) and 5.6% (with 95% CI from 1.0 to 25.8%), accordingly. Gene mutations in KRAS and NRAS genes were not observed, which may be due to the sample size.

In total, we did not observe gene mutations in 65.0% (with 95% CI from 49.5 to 77.9%) of patients, 22.5% (with 95% CI from 12.3 to 37.5%) were mutated in one of the analysed genes and 15.2% (with 95% CI from 6.7 to 30.9%) of patients in two genes. The average frequency was 1.4 mutated genes per patient. This might be an underestimate given the fact that not all patients were completely screened for all 8 genes. Additional mutations might be present in unanalysed genes and in the absence of a uniform assessment of all target genes the detected frequencies represent the extreme bound estimates.

For half of 8 analyzed genes significant part of patients exhibited co-occurring mutations in other genes. The majority of c-KIT (100.0%, n=2), DNMT3A (66.7%, n=2) and NPM1 (60.0%, n=3) mutated patient had co-occurring mutations in other genes, FLT3 ITD and TKD co-occurrences were less frequent (42.9%, n=3) and the null percentage was observed for TP53 and WT1. The most frequent co-occurrences present in the study sample were NPM1 with FLT3-ITD (40.0%, n=2), DNMT3A with c-KIT (33.3%, n=1) and NPM1 with c-KIT (20.0%, n=1).

Among AMML patients with diploidy, gene mutations were detected in 44.4% of cases (with 95% CI from 24.6 to 66.3%) and were represented by insertions in exon 12 of the NPM1 — 45.5% (with 95% CI from 21.3 to 72.0%), FLT3 ITD and TKD — 25.0% (with 95% CI from 10.2 to 49.5%), DNMT3A mutations — 20.0% (n=1), c-KIT — 10.0% (n=1). The frequency of double mutants was 25.0% (with 95% CI from 8.9 to 53.2%). In aneuploid karyotypes, cryptic mutations were detected in 60.0% of samples (n=3), including FLT3 — 50.0% (n=2), DNMT3A — 50.0% (n=1), c-KIT — 33.3% (n=1), and double mutants — 25.0% (n=1). One case of mutations of the studied genes was identified in the following cytogenetic subgroups: missense mutation in exon 7 of the TP53 gene — in AMML with complex chromosomal aberrations, non-synonymous A1363G transition in the WT1 gene-in AMML with chromosome 16 inversion (25.0%), FLT3 ITD in combination with G2645A substitution in the DNMT3A gene — in AMML with an unspecified karyotype (20.0%) [19]. In general, the detected frequencies of gene mutations corresponded to those established in previous studies [11, 13].

We also determined the average age of AMML mutation occurrence according to the WHO age classification [20], which for the c-KIT and NPM1 genes corresponded to young adults ($33,5 \pm 2,9$ and $44,2 \pm 11,4$, accordingly), for 3 genes — middle age (DNMT3A — $49,3 \pm 18,4$; WT1 — $51,0$; FLT3 — $54,0 \pm 12,3$), for TP53 gene — 63.0 years old. The average age of double mutants was $42,2 \pm 13,7$ years due to the predominance of mutations NPM1 and c-KIT.

Conclusion

1. The total frequency of FLT3, NPM1, TP53, C-KIT, WT1 and DNMT3A genes mutations in AMML was 35.0%, with the most frequent mutations detected in the DNMT3A (30.8%), NPM1 (20.0%), and FLT3 (20.0%) genes. Mutations in the RAS family genes were not detected, which may be due to the sample size.

2. The frequency of double mutants in AMML was 15.2%, the average number of mutations per patient was 1.4, and mutations in the c-KIT, DNMT3A, NPM1 and FLT3 genes were most were often co-occurring.

3. The average age of detection of c-KIT and NPM1 genes mutations was young, DNMT3A, WT1 and FLT3 — middle age, and TP53 — elderly. The average age of the double mutants was also associated with the young age.

REFERENCES

1. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017. Vol 35(9). pp. 934-46.
2. Jung J., Cho B.S., Kim H.J. et al. Reclassification of acute myeloid leukemia according to the 2016 WHO classification. *Ann. Lab. Med.* 2019. Vol. 39(3). pp. 311-316.
3. Panuzzo C., Signorino E., Calabrese C. et al. Landscape of tumor suppressor mutations in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Med.* 2020. Vol. 9(3). p. 802.
4. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT 3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. *Genes and cells [Geni I kletki]*. 2018. Vol. 14 (3). pp. 70-74. [In Russ.]
5. Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017. Vol. 130 (4). pp. 410-423.
6. Rose D., Haferlach T., Schnittger S. et al. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017. Vol. 31 (1). pp. 11-17.
7. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. Vol.127 (20). pp. 2391-2405.
8. Vardiman J.V., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009. Vol. 114 (5). pp. 937-952.
9. Walter R.B., Othus M., Burnett A.K. et al. Significance of FAB subclassification of «acute myeloid leukemia, NOS» in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. Vol. 121 (13). pp. 2424-2431.
10. Vinogradov A. V. Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 during acute myeloid leukemia. *Russian Journal of Oncology [Rossiyskiy Oncologicheskiy zhurnal]*.

2013. no. 4. pp. 34-35. [In Russ.]

11. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salahov D.R. et al. DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS NPM1, TP53 and WT1 genes point mutations detection in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2016. no. 2. pp. 89-101. [In Russ.]
12. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. Detection of FLT3 gene internal tandem duplications and tyrosine kinase domain mutations in acute myeloid leukemia using automated sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2013. no. 1. pp. 64-66. [In Russ.]
13. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. TP53, FLT3, KIT, NRAS and WT1 gene point mutations detection in acute myeloid leukemia with abnormal karyotype. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2015. no. 1. pp. 77-84. [In Russ.]
14. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. DNMT3A gene point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Bulletin of Siberian Medicine [Byulleten' Sibirskoj Mediciny]*. 2015. Vol. 14 (1). pp. 18-23 [In Russ.]
15. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Journal of Bashkir State University [Vestnik Bashkirkogo Universiteta]*. 2014. Vol. 19. No. 3. pp. 845–847. [In Russ.]
16. Döhner H., Estey E.H., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017. Vol. 129 (4). pp. 424-447.
17. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R. et al. Comparative analysis of NPM1 gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2013. No. 4. pp. 124-127. [In Russ.]
18. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35(6). pp. 1547-1549.
19. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2016. no. 4. pp. 38-51. [In Russ.]
20. Geriatrics: national guideline [Geriatrya: nacional'noe rukovodstvo]/ Ed. Tkacheva O.N., Frolova E.V., Yachno N.N. M.: GEOTAR-Media, 2018. pp. 40-66 [In Russ.]

Authors

Alexander V. Vinogradov

Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Department of Hematology

Hematologist, Dr. Sci. (Med.), Chief therapist of Sverdlovsk Regional Ministry of Health

34b, Wainer str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620014

a.vinogradov@egov66.ru

Alexey V. Rezaykin

Ural State Medical University, Department of Medical Physics

Cand.Sci. (Med.), Professor assistant

3, Repin str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

alexrez@usma.ru

Sergey V. Sazonov

Ural State Medical University, Department of Histology, Cytology and Embryology

Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief of the department

3, Repin str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

sazonov@usma.ru

Alexander G. Sergeev

Ural State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology

Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief of the department

3, Repin str., Yekaterinburg, Russian Federation, 620028

sergeev@usma.ru