

УДК: 616-006.446.8

*А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, Д.Р. Салахов,  
Д.В. Изотов, С.Е. Иощенко, А.Г. Сергеев*

**ДЕТЕКЦИЯ МУТАЦИЙ ГЕНОВ  
DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 И WT1  
ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ  
С НОРМАЛЬНЫМ КАРИОТИПОМ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК**

Министерство здравоохранения Свердловской области,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;  
ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;  
ГБУЗ СО Свердловская областная клиническая больница № 1,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;  
ГИАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация

*A.V. Vinogradov, A.V. Rezaykin, D.R. Salakhov, D.V. Izotov, S.E. Ioschenko, A.G. Sergeev*

**DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 AND WT1  
GENES MUTATIONS DETECTION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA  
WITH NORMAL KARYOTYPE**

Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Yekaterinburg, Russian Federation;  
Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;  
Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation;  
Institute of Medical Cell Technology, Yekaterinburg, Russian Federation

**Резюме.** Цель исследования — определить частоту мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с нормальным кариотипом бластных клеток.

**Материалы и методы исследования.** Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 45 больных ОМЛ в возрасте от 17 лет до 81 года, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2008 по 2015 г. В исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ M0 по FAB-классификации наблюдался 1 пациент, M1 – 3, M2 – 17, M4 – 21, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом и острым миеломонобластным лейкозом с патологической костномозговой эозинофилией в исследование не включались. Детекцию мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 проводили методом прямого автоматического секвенирования. В 10 случаях дополнительно выполнялась трепанобиопсия подвздошной кости с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием образца костного мозга, в т.ч. проводился анализ экспрессии белка Npm1.

**Результаты исследования.** Частота детекции функционально значимых мутаций в исследованных экзонах генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 при ОМЛ с диплоидным кариотипом со-

**Abstract.** Aim: to estimate the frequency of mutations in DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 and WT1 genes in acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) with normal karyotype.

**Materials and methods.** Bone marrow and peripheral blood samples were obtained from 45 AML pts aged 17 to 81, treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2008 – 2015. Distribution of the pts according to FAB-classification was as follows: AML M0 - 1, M1 - 3, M2 - 17, M4 - 21, M5 - 1, M6 - 1, M7 - 1. Detection of mutations in DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 and WT1 genes was performed by direct sequencing. Sequencing was realized using an automatic genetic analyzer ABI Prism 310. Additional analysis of normal (in nuclear) and abnormal (in cytoplasm) Npm1 protein localization in leukemic cells was performed in 10 bone marrow samples using immunohistochemical technique.

**Results.** The average frequency of functionally significant mutations in all investigated genes among the treated AML pts was 42.2%, and correlate with cumulative frequency of point mutation in AML with abnormal karyotype. Average frequency of mutations in NPM1 gene exons 9–12 was 50.0%, FLT3 gene exons 12–15 and 19–21 — 22.0%, KRAS gene exons 1–4 — 22.2%, KIT gene exons 7–12 and 16–19 — 16.7%, NRAS gene exons 1–4 — 13.0%, DNMT3A exons 18–26 —

ставляла 42,2%, что было сопоставимо с общей частотой точечных мутаций, определяемых методом секвенирования при ОМЛ с аберрантными кариотипами. Мутации в экзоне 12 гена NPM1 определялись в 50,0% исследованных образцов (n=15), в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 — в 22,0% (n=9), в экзонах 1–4 гена KRAS — в 22,2% (n=2), в экзонах 7–12 и 16–19 гена KIT — в 16,7% (n=5), в экзонах 1–4 гена NRAS — в 13,0% (n=3), в экзонах 18–26 гена DNMT3A — в 8,3% (n=1), в экзонах 6–9 гена WT1 — в 4,5% (n=1), в экзонах 4–11 гена TP53 — в 3,1% (n=1). В 24,4% исследованных проб (n=11) определялись множественные мутации (две и более), при этом наиболее часто кооперировались мутации генов NPM1 и FLT3 (9 наблюдений). Выявление дополнительных мутаций приводило во всех случаях к изменению прогноза ответа опухоли на проведение стандартной полихимиотерапии и общей вероятностной выживаемости больных ОМЛ с нормальным кариотипом. Максимальное количество молекулярных изменений (4) определялось при ОМЛ M4 в исходе ХММЛ: инсерция типа А в экзоне 12 гена NPM1, несинонимичные нуклеотидные замены с.88G>C и с.311A>C в гене KRAS, трансверсия с.2141C>G в гене DNMT3A. В двух случаях (при ОМЛ M1 и M6) одновременно определялось по три мутации (инсерция типа А в экзоне 12 гена NPM1, внутренние tandemные дубликации в гене FLT3 и трансверсия с.1621A>C в гене KIT). В четырех пробах (26,7%) были выявлены инсерции экзона 12 гена NPM1, не описанные в доступных нам источниках литературы (обозначенные нами как инсерции типа Ural-1 и Ural-2, соответственно). Установлено, что инсерция типа Ural-1, определявшаяся в трех наблюдениях и обуславливающая синтез мутантного белка Npm1, в котором формирование типичного NES-мотив сочеталось с частичной утратой NoLS-мотива, проявлялась, по данным иммуногистохимического исследования, цитоплазматической локализацией белка Npm1.

**Ключевые слова:** точечная мутация, острый миелоидный лейкоз, нормальный кариотип, ген DNMT3A, ген FLT3, ген KIT, ген KRAS, ген NRAS, ген NPM1, ген TP53, ген WT1, прямое автоматическое секвенирование

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний системы крови, характеризующихся клональной пролиферацией в костном мозге и некоторых других тканях и органах, подвергшихся злокачественной трансформации кроветворных клеток, несущих поверхностные, цитоплазматические и ядерные миелоидные маркеры, что обуславливает развитие клинико-лабораторной симптоматики костномозговой недостаточности. Установлено, что злокачественная транс-

8.3%, WT1 gene exons 6–9 — 4.5%, TP53 gene exons 4–11 — 3.1%. Multiple point mutations in investigated genes were detected in 24.4% cases AML pts with normal karyotype (usually NPM1 gene exon 12 insertion and FLT3 gene internal tandem duplication, ITD). These patients characterized by more dismal prognosis and poor response to standard chemotherapeutic regimens. In 1 case, AML M4, 4 point mutations were co-existed in investigated sample: NPM1 gene exon 12 tetranucleotide insertion, KRAS gene non-synonymous substitution c.88G>C and c.311A>C, DNMT3A gene transversion c.2141C>G. In 2 cases (AML M1 and AML M6) 3 mutations were co-existed in samples: NPM1 gene exon 12 tetranucleotide insertion, FLT3 ITD, KIT gene transversion c.1621A>C. In 4 samples (26.7%) 2 novel variants of NPM1 gene exon 12 tetranucleotide insertion (named types Ural-1 and Ural-2) were detected. Interestingly, in Ural-1 type of NPM1 gene exon 12 tetranucleotide insertion, in 3 cases, typical NES-motif associated with partially damage of NoLS-motif and characterized by abnormal cytoplasm localization of Npm1 protein using validated immunohistochemical technique.

**Keywords:** acute myeloid leukemia, normal karyotype, DNMT3A gene, FLT3 gene, KIT gene, KRAS gene, NRAS gene, TP53 gene, WT1 gene, sequencing, immunohistochemistry

формация гемопоэтических клеток обусловлена возникновением мутаций в ряде генов, продукты которых приводят к нарушению молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации, регуляции клеточного цикла и программированной гибели, что обуславливает нарушение процессов пролиферации, дифференцировки клеток и экспансию опухолевого клона [1–4].

В 2001 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) наличие отдельных специфических

генетических аномалий (например, транслокаций  $t(8;21)(q22;q22)$ ,  $t(15;17)(q22;q11)$ , инверсии  $inv(16)(p13;q22)$ ) было впервые включено в классификацию ОМЛ в качестве диагностического признака. В классификации ВОЗ пересмотра 2008 года перечень диагностически значимых генетических аномалий был расширен, в т.ч. за счет выделения новых подгрупп ОМЛ с мутациями генов NPM1 и СЕВРА при ОМЛ с нормальным кариотипом [3,4]. Кроме того, в ряде исследований было показано, что мутации генов, кодирующих белки тирозинкиназных рецепторов Flt3 и Kit, а также белки внутриклеточных сигнальных путей семейства Ras, тоже имеют патогенетическое и прогностическое значение при ОМЛ, однако в силу их широкого распространения в различных морфологических и цитогенетических подгруппах, не могут использоваться в качестве дифференциально-диагностического критерия [3–7].

Установлено, что мутациями, наиболее часто встречающимися при ОМЛ с нормальным кариотипом, являются инсерции экзона 12 гена NPM1, ассоциированные с благоприятным прогнозом и чувствительные к таргетному противоопухолевому лечению полностью транс-ретиноевой кислотой и триоксидом мышьяка [7–9]. Кроме того, в 2000-х годах с использованием технологии массивного параллельного секвенирования генома лейкозных клеток были впервые описаны мутации гена DNMT3A, частота которых при ОМЛ с нормальным кариотипом оказалась сопоставимой с частотой инсерций в гене NPM1. Однако, в отличие от последних, мутации в гене DNMT3A более гетерогенны и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом ОМЛ [10]. При этом достаточно высокая частота мутации гена DNMT3A определяется при ОМЛ с мутациями гена NPM1 (по данным некоторых авторов — до 50% случаев), что усложняет прогностическую стратификацию пациентов [11].

В связи с этим, исследование частоты и клинической значимости мутаций ключевых генов, выявляемых с использованием современных молекулярно-генетических методов при ОМЛ с нормальным кариотипом, является перспективным, так как, во-первых, позволяет дифференцированно определить прогноз общей вероятностной выживаемости внутри этой гетерогенной группы пациентов, во-вторых, уточнить персонализированные медицинские показания для применения таргетных противоопухолевых препаратов, воздействующих на выявленное молекулярное повреждение того или иного звена онкогенеза [12, 13].

**Цель исследования** — определить частоту мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с нормальным кариотипом бластных клеток методом прямого автоматического секвенирования.

## Материалы и методы исследований

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 45 пациентов с ОМЛ в возрасте от 17 лет до 81 года, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2008 по 2015 г. Средний возраст пациентов составил  $51,9 \pm 4,5$  лет.

Диагностику ОМЛ осуществляли, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования бластных клеток [3]. По медицинским показаниям выполняли трепанобиопсию подвздошной кости с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием, в т.ч. в 10 случаях осуществлена оценка экспрессии белка Npm1 в лейкоэмических клетках в соответствии с ранее описанной методикой [14]. Морфологический вариант ОМЛ определяли в соответствии с франко-американо-британской (FAB) классификацией [15]. В соответствии с ней, в исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ M0 наблюдался 1 пациент, M1 — 3, M2 — 17, M4 — 21, M5 — 1, M6 — 1, M7 — 1. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом и острым миеломонобластным лейкозом с патологической костномозговой эозинофилией в исследование не включались.

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование (полимеразная цепная реакция — ПЦР на транслокацию  $t(8;21)(q22;q22)$ , инверсию  $inv(16)(p13;q22)$ , транслокацию  $t(9;22)(p34;q11)$ , аномалии сегмента 11q23), на основании результатов которых установлен нормальный кариотип лейкозных клеток, т.е. отсутствие хромосомных аномалий [1, 2, 16].

Детекцию мутаций в исследуемых генах проводили с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Всего в изучаемой выборке на наличие мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3 протестированы 41 образец, экзонов 4–11 гена TP53 — 32 пробы, экзонов 9–12 гена NPM1 — 30, экзонов 7–12 и 16–19 гена KIT — 30, экзонов 1–4 гена NRAS — 23, экзонов 6–9 гена WT1 — 22, экзонов 18–26 гена DNMT3A — 12, экзонов 1–4 гена KRAS — 9. Праймеры, использованные для детекции мутаций в указанных генах, описаны нами ранее [17–20].

Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе либо методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной в мини-центрифужной колонке с помощью комплекта реагентов «QIAamp RNA Blood Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК проводили с использовани-

ем ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов («РЕВЕРТА-L», ФГБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва). Участки кДНК, соответствующие исследуемым экзонам указанных генов, амплифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [1, 16, 21].

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) по прямой и обратной последовательностям согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0 [22].

Программное лечение больных ОМЛ проводили по клиническим протоколам, разработанным Российской группой по изучению острых лейкозов [23, 24], в которых использовалась интенсивная индукция-консолидация ремиссии цитарабином в сочетании с анатрациклинами с последующей поддерживающей полихимиотерапией (протоколы ОМЛ 06.06, ОМЛ 01.10, протокол лечения больных ОМЛ в возрасте старше 60 лет).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы для ЭВМ «Генанализ» [25]. Проверку статистических гипотез проводили с использованием точного критерия Фишера. Доверительные интервалы (ДИ) для средних частот мутаций генов определяли на основе биномиального распределения. Оценку взаимозависимости молекулярных повреждений различных генов, выявляемых в одной пробе, проводили посредством сравнения ожидаемой вероятности, рассчитанной по формуле для независимых событий, с наблюдаемой в исследуемой выборке частотой. Если при сопоставлении расчетной и наблюдаемой частот выявлялось совпадение, то мутации считались независимыми. Если наблюдаемая частота отличалась от расчетной при уровне значимости  $p=0,05$ , то события признавали взаимозависимыми [21, 25].

### Результаты исследования

Мутации в экзонах 12-15 и 19-21 гена FLT3 выявлены в 9 пробах (22,0%, при 95% ДИ от 12,0 до 36,7%), в том числе при морфологических вариантах M1 и M6 по FAB-классификации — по одному наблюдению, M2 — 3, M4 — 4 (таблица 1). Средний возраст больных с мутациями гена FLT3 составил  $56,3 \pm 11,8$  лет. В двух наблюдениях (при ОМЛ M2 и M4) мутации были представлены несинонимичными трансверсиями в кодирующих последовательностях активационной петли и С-концевого каталитического домена

(с.2522A>T и с.2479A>T, соответственно), во всех остальных образцах определялись внутренние тандемные дупликации (ITD) кодирующей последовательности юкстамембранного и киназного доменов. При этом точка дупликации и длина дублирующегося фрагмента варьировала в каждой из проб (таблица 1). Соответственно, степень вовлечения тирозинкиназного домена-1 белка Flt3 в структурные перестройки также отличалась, что, по данным литературы, влияет на чувствительность опухолевых клеток при проведении таргетного лечения ингибиторами тирозинкиназ (ТКИ) I и II типа [26-30]. В пяти пробах наряду с мутациями в гене FLT3 определялись также функционально значимые мутации в гене NPM1, в двух образцах — в гене KIT (таблица 2).

При проведении стандартной полихимиотерапии [23,24] наличие мутаций в гене FLT3 ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом ОМЛ. Медиана общей выживаемости таких пациентов не превышала 6 месяцев. В трех случаях была зафиксирована ранняя летальность, в четырех — первичная резистентность, в двух — ранние рецидивы лейкоза на этапе консолидации ремиссии в срок до 3 месяцев от начала программного лечения.

Инсерции в экзоне 12 гена NPM1, ассоциированные, по данным международных многоцентровых исследований, с благоприятным прогнозом общей вероятностной выживаемости больных ОМЛ [3, 4, 8, 9], определялись в 15 образцах (50,0%, при 95% ДИ от 33,2 до 66,8%) и являлись самым частым типом генетических аномалий в исследуемой выборке. Средний возраст больных с мутациями в гене NPM1 составил  $54,8 \pm 7,6$  лет. Среди молекулярных повреждений экзона 12 наиболее часто обнаруживались инсерции типа A (7 случаев, 46,7%), реже встречались инсерции типа D (три образца, 20,0%), в одном наблюдении определялась инсерция типа B (6,7%), кроме того, в четырех пробах (26,7%) были выявлены мутации, не описанные в доступных нам источниках литературы (обозначены, соответственно, как инсерции типа Ural-1 и Ural-2, таблица 3).

В 10 образцах (66,7%), наряду с мутациями в гене NPM1, выявлялись молекулярные повреждения других исследованных генов, в том числе в 6 пробах — ITD и несинонимичные трансверсии в гене FLT3. Статистические расчеты показали, что мутации генов NPM1 и FLT3 являлись взаимосвязанными событиями, кооперирующимися при онкогенезе ОМЛ (таблица 2) [25]. Более того, их наличие могло обуславливать ухудшение прогноза общей вероятностной выживаемости NPM1-позитивных пациентов, медиана которой в исследуемой группе больных составляла 4 месяца. Стойкая продолжительная клинико-гематологическая ремиссия (более 12 месяцев) была достигнута в трех наблюдениях (20,0%).

Таблица 1

Характеристика мутаций гена FLT3, выявленных при ОМЛ с нормальным кариотипом

Table 1

Features of FLT3 gene mutations in AML patients with normal karyotype

| Морфологический вариант ОМЛ / FAB subtype | Вариант мутации / Mutation type                                | Локализация мутации в белке flt3 / Localization in flt3 protein      | Чувствительность к ТКИ / Tyrosine kinase inhibitors (TKI) sensitivity |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| M4                                        | ITD 93 п.о.*/1731 31 а.о.**/578 // ITD 93 bp*/1731 31 ar**/578 | Юкстамембранный домен, мотив JM-B / Juxtamembrane domain, JM-B motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M4                                        | c.2479A>T I827F                                                | С-концевой каталитический домен / C-terminus catalytic domain        | ТКИ II типа / TKI type II                                             |
| M4/ M4                                    | ITD 51 п.о./1743 17 а.о./581 // ITD 51 bp/1743 17 ar/581       | Юкстамембранный домен, мотив JM-S / Juxtamembrane domain, JM-S motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M4                                        | ITD 48 п.о./1758 16 а.о./587 // ITD 48 bp/1758 16 ar/587       | Юкстамембранный домен, мотив JM-S / Juxtamembrane domain, JM-S motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M2                                        | ITD 66 п.о./1764 22 а.о./588 // ITD 66 bp/1764 22 ar/588       | Юкстамембранный домен, мотив JM-S / Juxtamembrane domain, JM-S motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M2                                        | ITD 48 п.о./1776 15 а.о./593 // ITD 48 bp/1776 15 ar/593       | Юкстамембранный домен, мотив JM-Z / Juxtamembrane domain, JM-Z motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M1                                        | ITD 18 п.о./1794 6 а.о./598 // ITD 18 bp/1794 6 ar/598         | Юкстамембранный домен, мотив JM-Z / Juxtamembrane domain, JM-Z motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M2                                        | c.2522A>T N841I                                                | Активационная петля / Activation loop                                | ТКИ I типа / TKI type I                                               |
| M6                                        | ITD 30 п.о./1777 10 а.о./593 // ITD 30 bp/1777 10 ar/593       | Юкстамембранный домен, мотив JM-Z / Juxtamembrane domain, JM-Z motif | ТКИ I типа / TKI type I                                               |

\* п.о. — число пар оснований вставки, цифра через дробь указывает ее положение в кодирующей последовательности транскрипта гена, \*\* а.о. — аминокислотные остатки, цифра через дробь указывает положение вставки в полипептидной цепи.

\* bp — number of base pair in insertion, localization in coding sequence, \*\* — amino acid residues, localization in polypeptide chain.

Таблица 2

Результаты прямого автоматического секвенирования проб при ОМЛ с нормальным кариотипом с мутациями в нескольких исследованных генах

Table 2

Direct sequencing results in normal karyotype AML patients

| Под-тип FAB / FAB subtype | Кол-во мута-ций / Number of genetic lesions | Характеристика выявленных мутаций в генах / Characteristics of genetic lesions |           |                                            |                                        |                  |           |                                              |
|---------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------|----------------------------------------|------------------|-----------|----------------------------------------------|
|                           |                                             | NPM1                                                                           | FLT3      | KIT                                        | NRAS                                   | KRAS             | DNMT3A    | WT1                                          |
| M4                        | 4                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | WT*       | WT                                         | WT                                     | c.88G>C c.311A>C | c.2141C>G | WT                                           |
| M6                        | 3                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | ITD       | c. 1621A>C                                 | WT                                     | WT               | WT        | WT                                           |
| M1                        | 3                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | ITD       | c. 1621A>C                                 | WT                                     | —                | WT        | WT                                           |
| M4                        | 2                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | WT        | c. 1621A>C                                 | WT                                     | WT               | WT        | WT                                           |
| M2                        | 2                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | c.2522A>T | WT                                         | WT                                     | —                | WT        | WT                                           |
| M4                        | 2                                           | Инсерция типа A / Insertion type A                                             | WT        | Делеция (1529;1774) / Deletion (1529;1774) | WT                                     | —                | WT        | WT                                           |
| M2                        | 2                                           | Инсерция типа Ural-2 / Insertion type Ural-2                                   | ITD       | WT                                         | WT                                     | —                | —         | WT                                           |
| M5                        | 2                                           | Инсерция типа D / Insertion type D                                             | WT        | WT                                         | WT                                     | —                | —         | Делеция (1289; 1372) / Deletion (1289; 1372) |
| M4                        | 2                                           | Инсерция типа Ural-1 / Insertion type Ural-1                                   | ITD       | WT                                         | —                                      | —                | —         | —                                            |
| M4                        | 2                                           | Инсерция типа Ural-1 / Insertion type Ural-1                                   | ITD       | WT                                         | —                                      | —                | —         | —                                            |
| M2                        | 2                                           | —                                                                              | —         | c. 1621A>C                                 | Делеция (293;453) / Deletion (293;453) | —                | —         | —                                            |

\* WT — «дикий тип» (мутаций не обнаружено), «—» — исследование не проводилось.

\* WT — wild type, «—» — not applicable.

Таблица 3

Варианты тетра-нуклеотидных инсерций в экзоне 12 гена NPM1, выявленные в материале от больных ОМЛ с нормальным кариотипом

Table 3

NPM1 gene exon 12 tetra-nucleotide insertion variants in normal karyotype AML patients

| Мутация   | Кол-во проб | Нуклеотидная последовательность ДНК экзона 12 гена NPM1 |      |                                 | Аминокислотная последовательность белка* |
|-----------|-------------|---------------------------------------------------------|------|---------------------------------|------------------------------------------|
| Дикий тип | 15          | gatctctg                                                | ---- | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLWQWRKSL                                |
| A         | 7           | gatctctg                                                | TCTG | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLCLAVEEVSLRK                            |
| B         | 1           | gatctctg                                                | CATG | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLCMAVEEVSLRK                            |
| D         | 3           | gatctctg                                                | CCTG | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLCLAVEEVSLRK                            |
| Ural-1    | 3           | gatctctg                                                | GCTG | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLWLAVEEVSLRK                            |
| Ural-2    | 1           | gatctctg                                                | CTTA | gcagtgaggagaagtctctttaagaaaatag | DLCLAVEEVSLRK                            |

\* Курсивом выделены остатки триптофана (W), образующие сигнал ядрышковой локализации; подчеркнуты аминокислотные остатки, образующие сигнал ядерного экспорта белка Npm1.

\* Tryptophan residues (W) of nucleolar localization signal marks in *italics*, amino acid residues of nuclear export signal marks by *underlying*.

Среди двух ранее не описанных в литературе мутаций гена NPM1 особого внимания заслуживала инсерция экзона 12 типа Ural-1, определявшаяся в трех наблюдениях. Она приводила к тому, что в результате трансляции aberrантной кодирующей последовательности гена NPM1 синтезировалась полипептидная цепь вида L-xxx-V-xx-V-x-L (лейцин-\*\*\*-валин-\*\*-валин-\*-лейцин), то есть так называемый типичный NES-мотив (NES — nuclear export signal — сигнал ядерного экспорта), обуславливающий дислокацию мутантной молекулы белка Npm1 из ядра в цитоплазму [31]. Отличительной особенностью инсерции типа Ural-1 являлось сохранение в позиции 288 остатка триптофана, следовательно NoLS-мотив (NoLS — nucleolar localization signal — сигнал ядрышковой локализации), в норме образуемый остатками триптофана в позициях 288 и 290 [31], оказывался утраченным только частично. Сохранение триптофана в позиции 288 является редким событием и требует, согласно данным зарубежных исследователей, наличия нетипичного NES-мотива, в котором позиция 291 была бы представлена не валином, а лейцином, фенилаланином, цистеином или метионином (L-xxx-L-xx-V-x-L, или L-xxx-F-xx-V-x-L, или L-xxx-C-xx-V-x-L, или L-xxx-M-xx-V-x-L). Предполагалось, что благодаря такому нетипичному сочетанию аминокислот NES-мотив является функционально более активным, по сравнению с типичным NES-мотивом, составляя «противовес» остаточному NoLS-мотиву [32]. Однако при инсерции типа Ural-1 частично утраченный NoLS-мотив сочетался с типичным NES-мотивом (L-xxx-V-xx-V-x-L), при этом, по данным иммуногистохимического исследования трепанобиоптата костного мозга, в лейкоэмических клетках определялась цитоплазматическая локализация белка Npm1 (рис. 1). Следовательно, предположение о функцио-

нальном преимуществе нетипичного NES-мотива над типичным не подтвердилось.

Функционально значимые структурные изменения в кодирующей последовательности экзонов 7–12 и 16–19 гена KIT определялись в 5 пробах (16,7%, при 95% ДИ от 6,3 до 29,4%), в том числе при морфологических вариантах M1, M2 и M6 по FAB-классификации — по одному случаю, M4 — два наблюдения. Средний возраст больных с мутациями в гене KIT составлял  $53,4 \pm 16,5$  лет. Наиболее часто при молекулярно-генетическом анализе выявлялась трансверсия с.1621A>C, приводящая к замене аминокислотного остатка метионина на лейцин в позиции 541 кодируемого белка, которая определялась в четырех пробах (по одному случаю — при M1, M2, M4 и M6). По данным литературных источников, указанная нуклеотидная замена является, предположительно, полиморфным вариантом гена KIT, не имеющим патогенетического значения при ОМЛ [33]. Во всех указанных образцах трансверсия с.1621A>C в гене KIT определялась в сочетании с другими функционально и прогностически значимыми мутациями в исследованных генах (инсерции в гене NPM1 — 4, FLT3 ITD — 2, делеция в гене NRAS — 1, таблица 2). При этом частота ко-мутации с.1621A>C в гене KIT при выявлении указанных генетических аномалий значимо не изменялась, что свидетельствует о случайном характере сочетания этих молекулярных событий в исследованных образцах [25]. В одном наблюдении при ОМЛ M4 с инсерцией типа A в гене NPM1 в кодирующей последовательности экзонов 10 и 11 гена KIT определялась делеция протяженностью с 1529 по 1774 позиции нуклеотидов (таблица 2), приводящая к утрате 82 аминокислотных остатков в кодируемом белке, описанная нами ранее при ОМЛ M2 с t(8;21)(q22;q22) [34]. По литературным данным, делеции без сдвига

рамки считывания в экзоне 11 гена KIT являются значимыми для злокачественной трансформации клеток-предшественниц опухоли, так как затрагивают участки полипептидной цепи, обеспечивающий ингибирование аутофосфорилирования рецептора (остатки тирозина в положении 568 и 570). Следовательно, в указанном случае при ОМЛ могло иметь место аутофосфорилирование рецептора Kit в отсутствие лиганда, что может рассматриваться как потенциальное медицинское показание для назначения таргетного лечения ингибиторами тирозинкиназ [35, 36].

Мутации в гене NRAS определялись в трех исследованных образцах (13,0%, при 95% ДИ от 4,5 до 32,1%), в т.ч. в двух наблюдениях — при ОМЛ М2, одном — М7. В двух случаях, при ОМЛ М2 и М7 определялись, соответственно, несинонимичные трансверсии с.188А>Т и с.182А>С. В третьей пробе (ОМЛ М2) обнаруживалась делеция протяженностью 160 нуклеотидов, начиная с позиции 293 кодирующей последовательности гена NRAS, приводящая к изменению части аминокислотной последовательности и укорочению кодируемого белка до 106 аминокислот (рис. 2). Наряду с делецией в гене NRAS в указанном образце определялась также несинонимичная трансверсия с. 1621А>С в гене KIT (таблица 2). В целом, при ОМЛ с мутациями гена NRAS преобладали резистентные к программной химиотерапии формы (два случая), хотя в одном наблюдении (ОМЛ М2 с трансверсией с.188А>Т) была достигнута продолжительная первая ремиссия после стандартной программы индукции-консолидации по протоколу ОМЛ 01.10 [23,24].

Молекулярные повреждения гена KRAS определялись в двух исследованных образцах из девяти (22,2%), в обоих случаях при ОМЛ М4 (возраст больных 39 и 47 лет). В первой пробе определялась несинонимичная трансверсия с.183А>Т, приводившая к замене аминокислотного остатка глутамина на гистидин в положении 61 (р.61Q>H). Во втором образце определялись одновременно две несинонимичные трансверсии (с.88G>С и с.311А>С), обуславливающие, соответственно, замены аминокислотных остатков р.30D>H и р.104K>Т. Во втором наблюдении, наряду с мутациями в гене KRAS, определялись также инсерция типа А в экзоне 12 гена NPM1 и трансверсия с.2141С>G в гене DNMT3A (таблица 2).

Точечная мутация гена TP53 определялась в одной пробе при ОМЛ М2 (3,1%, при 95% ДИ от 0,6 до 15,7%), и была представлена изолированной несинонимичной транзицией с.377А>G (экзон 5), приводящей к изменению аминокислотного остатка в позиции р.126Y>С в ДНК-связывающем домене и полной инактивации белка p53. Возраст пациента составлял 61 год. Течение заболевания характеризовалось развитием первичной резистентности к программной по-

лихимиотерапии, клинико-гематологическая ремиссия достигнута не была. Смерть пациента зафиксирована через 2,5 месяца после начала программного лечения от осложнений в период постцитостатической панцитопении после второго курса индукции ремиссии. Лейкемическая инфильтрация костного мозга по результатам аутопсийного исследования сохранилась.

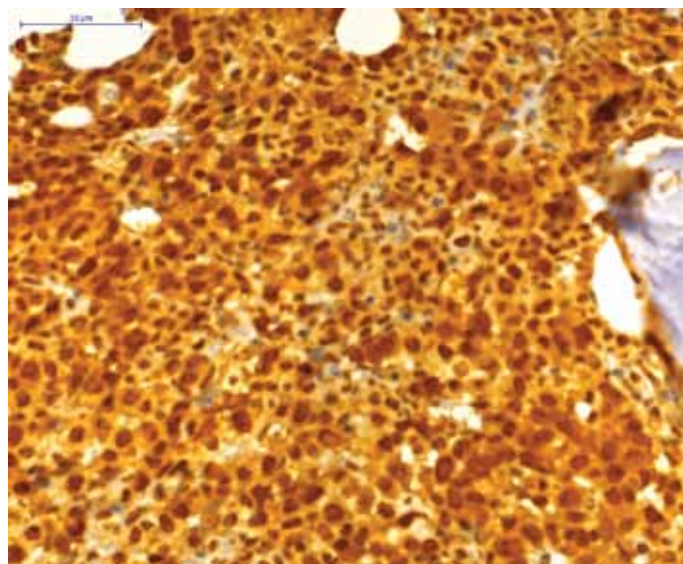


Рис. 1. Результаты иммуногистохимического исследования трепанобиоптата костного мозга при ОМЛ М4 с мутацией Ural-1 в гене NPM1.

Fig. 1. Immunohistochemical research of AML M4 patient bone marrow with NPM1 gene exon 12 insertion type Ural-1 (nuclear and cytoplasmic localization of Npm1 protein).

```
#NRAS-277 MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQHFVD EYDPTIEDSY [ 40]
#NRAS_CDS MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQHFVD EYDPTIEDSY [ 40]

#NRAS-277 RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YNRIGEGFLC [ 80]
#NRAS_CDS RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YNRIGEGFLC [ 80]

#NRAS-277 VTAINNRSKF ADINLYTALA MLPTTHAEKY ASTE*K---- [ 120]
#NRAS_CDS VTAINNRSKF ADINLYREQI KRVEDSDQVF MVLVGNKCDL [ 120]

#NRAS-277 ----- [ 160]
#NRAS_CDS PIRIVDTKQA MELAKSYGIP FIETSAKTRQ GVDEAFYTLV [ 160]

#NRAS-277 ----- [ 200]
#NRAS_CDS REIRQYRKKE LNSDDDTQGS CMLPFCVVM* ----- [ 200]
```

Рис. 2. Укороченная аминокислотная последовательность белка Nras, формирующаяся в результате делеции при ОМЛ М2 (измененная часть полипептидной цепи выделена красным).

Fig. 2. Truncated amino acid chain of Nras protein in AML M2 patient with normal karyotype and NRAS gene deletion (293;453) marked in red.

Мутация в кодирующей последовательности гена WT1 определялась в одном исследуемом образце (4,5%, при 95% ДИ от 0,8 до 21,8%) при резистентном ОМЛ М5b и была представлена делецией 84 нуклеотидов в позициях с 1289 по 1372, соответствующих экзону 8, что приводило к утрате в кодируемом

полипептиде 28 аминокислотных остатков в позициях с 431 по 458. Указанные молекулярные изменения, описанные нами ранее при резистентном ОМЛ М2 в исходе МДС с изолированной делецией длинного плеча хромосомы 5 (синдром 5q-) [34], приводили к полной функциональной инактивации белка Wt1. Также в исследуемой пробе была выявлена инсерция типа D в экзоне 12 гена NPM1 (таблица 2). Возраст пациента составлял 53 года.

Точечная мутация гена DNMT3A выявлена в одной пробе от больного ОМЛ М4 (8,3% при 95% ДИ от 1,5 до 35,4%), и была представлена несинонимичной нуклеотидной заменой с.2141C>G по второй позиции триплета TCC, что приводило к аминокислотной замене p.714S>C (то есть серина на цистеин в позиции 714) в метилтрансферазном домене белка Dnmt3a. Наряду с указанной трансверсией, в лейкоэмических клетках из этого образца определялись также мутации в генах NPM1 и KRAS, подробно описанные выше (таблица 2). В прочих исследуемых пробах мутации в гене DNMT3A не определялись.

### Обсуждение результатов

Таким образом, при ОМЛ с нормальным кариотипом лейкоэмических бластов мутации в кодирующих последовательностях экзонов 9–12 гена NPM1, экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3, экзонов 7–12 и 16–19 гена KIT, экзонов 1–4 гена KRAS, экзонов 1–4 гена NRAS, экзонов 18–26 гена DNMT3A, экзонов 4–11 гена TP53 и экзонов 6–9 гена WT1 были выявлены с использованием технологии прямого автоматического секвенирования в 19 исследованных образцах (42,2%, при 95% ДИ от 26,5 до 51,4%), что в целом сопоставимо с кумулятивной частотой детекции генных мутаций при ОМЛ с аберрантными кариотипами бластных клеток [34]. Однако спектр выявленных мутаций и характер их кооперации существенно отличался. Так, при ОМЛ с нормальным кариотипом наиболее часто определялись мутации генов NPM1 и FLT3, тогда как при ОМЛ с аберрантными кариотипами – NRAS и TP53, при этом вариант преобладающей генетической аномалии варьировал в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ с аберрантным кариотипом [34]. В 11 исследованных образцах при ОМЛ с нормальным кариотипом определялись мутации в двух и более генах (24,4%, при 95% ДИ от 14,2 до 38,7%, таблица 2). Во всех случаях это обуславливало изменение стратификации риска за счет переоценки прогноза ответа лейкозного клона на стандартную программную полихимиотерапию с промежуточного прогноза на благоприятный (при выявлении изолированных инсерций экзона 12 гена NPM1, а также инсерций экзона 12 гена NPM1 в сочетании с трансверсией с.1621A>C в гене KIT) либо неблагоприятный (во всех остальных случаях) [37]. Максимальное количе-

ство молекулярных изменений определялось у больного ОМЛ М4 в возрасте 47 лет, резвившемся в исходе хронического миеломоноцитарного лейкоза, когда одновременно обнаруживались инсерция типа A в экзоне 12 гена NPM1, несинонимичные нуклеотидные замены с.88G>C и с.311A>C в гене KRAS, трансверсия с.2141C>G в гене DNMT3A. В двух исследованных образцах (при ОМЛ М1 и М6) одновременно определялось по три генетических аномалии (инсерция типа A в экзоне 12 гена NPM1, FLT3 ITD и трансверсия с.1621A>C в гене KIT), в восьми пробах — по две. Среди последних инсерции в экзоне 12 гена NPM1 в сочетании с мутациями в гене FLT3 определялись в 4 наблюдениях, инсерции в экзоне 12 гена NPM1 в сочетании с мутациями в гене KIT — в двух, инсерция типа D гена NPM1 в сочетании с делецией экзона 8 гена WT1 и делеция в гене NRAS в сочетании с трансверсией с.1621A>C в гене KIT — по одному случаю. Таким образом, наиболее часто при ОМЛ с нормальным кариотипом в кооперации участвовали молекулярные повреждения в генах NPM1 (10 случаев), FLT3 (6 наблюдений) и KIT (у 5 пациентов). При этом с использованием программных статистических методик [25] установлено, что кооперация выявленных изменений в кодирующих последовательностях генов NPM1 и KIT носит случайный характер, а NPM1 и FLT3 — неслучайный, что подтверждает высказанную ранее гипотезу об их дифференциальной значимости в патогенезе ОМЛ [38].

В четырех пробах (26,7%) больных ОМЛ с нормальным кариотипом лейкозных бластов были выявлены инсерции экзона 12 гена NPM1, не описанные в доступных нам источниках литературы (Ural-1 и Ural-2, таблица 1) [31, 32]. Установлено, что инсерция типа Ural-1, определявшаяся в трех наблюдениях и обуславливающая синтез мутантного белка Npm1, в котором формирование типичного NES-мотива сочеталось с частичной утратой NoLS-мотива, фенотипически проявлялась, по данным иммуногистохимического исследования, цитоплазматической локализацией белка Npm1. То есть сочетание типичного NES-мотива с NoLS-мотивом оказалось достаточным для появления аберрантной цитоплазматической экспрессии мутантного белка Npm1 в лейкоэмических клетках.

Таким образом, применение прямого автоматического секвенирования для детекции криптических генных мутаций при ОМЛ с нормальным кариотипом бластных клеток может использоваться в практической онкогематологии в качестве дополнительного лабораторного теста как для уточнения прогноза ответа лейкоэмического клона на стандартное химиотерапевтическое лечение по национальным клиническим протоколам, разработанным Российской кооперативной группой по лечению острых лейкозов [23, 24], так и для создания персонализированных программ лече-

ния, основанных на применении индивидуально подобранных таргетных противоопухолевых препаратов [37, 39, 40].

### Выводы

1. Частота детекции функционально значимых мутаций генов FLT3, KIT, KRAS, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 с использованием метода прямого автоматического секвенирования при ОМЛ с нормальным кариотипом бластных клеток составляла 42,2%.

2. Наиболее частым молекулярным событием при ОМЛ с нормальным кариотипом являлась инсерция экзона 12 гена NPM1, определявшаяся в 15 исследованных образцах (частота выявления – 50,0%), при этом в 66,6% случаев она выявлялась в сочетании с генетическими изменениями в кодирующих последовательностях других генов (FLT3, KIT, KRAS, DNMT3A, WT1).

3. Частота обнаружения множественных (две и более) мутаций генов при ОМЛ с нормальным кариотипом бластных клеток составляла 24,4%, при этом наиболее часто кооперировались мутации генов NPM1 (10 случаев), FLT3 (6 наблюдений) и KIT (5 проб).

При этом кооперация молекулярных событий в генах NPM1 и FLT3 носила неслучайный характер.

4. Прогноз общей вероятностной выживаемости больных ОМЛ с диплоидией, у которых определялось множественные криптические мутации исследованных генов, изменялся с промежуточного на неблагоприятный, за исключением случаев сочетания инсерции экзона 12 гена NPM1 с трансверсией с.1621A>C гена KIT, имевшего случайный характер.

5. При выявлении изолированных инсерций экзона 12 гена NPM1, а также инсерции экзона 12 гена NPM1 в сочетании с трансверсией с.1621A>C гена KIT прогностическая стратификация общей выживаемости больных ОМЛ с нормальным кариотипом бластных клеток изменялась с промежуточной на благоприятную (n=6).

6. Описаны новые варианты инсерций в экзоне 12 гена NPM1, в том числе обуславливающие синтез мутантного белка Npm1, в котором формирование типичного NES-мотив сочеталось с частичной утратой NoLS-мотива, что проявлялась, по данным иммуногистохимического исследования, цитоплазматической локализацией белка Npm1.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев А.Г., Иванов Р.А. Генодиагностика лейкозов. – Екатеринбург: УГМА, 1998. – 39 с.
2. Сергеев А.Г., Иванов Р.А., Фечина Л.Г. Диагностическое и прогностическое значение генетических аномалий опухолевых клеток при острых лейкозах // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т.45. – №1. – С. 28-35.
3. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. – 439 p.
4. 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. – V.114. – N.5. – P. 937-952.
5. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology. – 2013. – P. 220-226.
6. Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management // BMC Cancer. – 2012. – V.12. – P. 304.
7. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia / The Cancer Genome Atlas Research Network // NEJM. – 2013. – V.368. – N. 22. – P. 2059-2074.
8. El Hajj H., Dassouki Z., Berthie C. et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells // Blood. – 2015. – V. 125. – P. 3447 – 3454.
9. Martelli M.P., Gionfriddo I., Mezzasoma F. et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target

### REFERENCES

1. Sergeev A.G., Ivanov R.A. Genetic diagnostics of leukemias. – Ekaterinburg: USMA, 1998. 39 p.
2. Sergeev A.G., Ivanov R.A., Fechina L.G. Diagnostic and prognostic impact of genetic abnormalities in the acute leukemia. Hematology and transfusiology. 2000. V.45. No. 1. pp. 28-35.
3. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. 439 p.
4. 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. V.114. No. 5. pp. 937-952.
5. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology. 2013. pp. 220-226.
6. Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. BMC Cancer. 2012. V.12. pp. 304.
7. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The Cancer Genome Atlas Research Network. NEJM. 2013. V.368. No. 22. pp. 2059-2074.
8. El Hajj H., Dassouki Z., Berthie C. et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells. Blood. 2015. V. 125. pp. 3447–3454.
9. Martelli M.P., Gionfriddo I., Mezzasoma F. et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid target

- NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells // *Blood*. – 2015. – V. 125. – P. 3455 – 3465.
10. Li Y., Zhu B. Acute myeloid leukemia with DNMT3A mutations // *Leuk. & Lymph.* – 2014. – V. 55. – N. 9. – P. 2002-2012.
11. Alpermann T., Schnittger S., Eder C. et al. Molecular subtypes of NPM1 mutations have different clinical profiles, specific patterns of accompanying molecular mutations and varying outcomes in intermediate risk acute myeloid leukemia // *Haematologica*. – 2016. – V. 101. – P. e55-8.
12. Döhner H., Estey E.H., Amadori S. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet // *Blood*. – 2010. – V.115. – N.3. – P. 453-474.
13. Stein E.M. Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia // *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. – 2015. – P. 579-583.
14. 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.
15. 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. – V.121. – N.13. – P. 2424-2431.
16. Виноградов А.В. Клинико-диагностическое значение генетических аномалий при программном лечении острого миелобластного лейкоза. Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. – Екатеринбург, 2009. – 114 с.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Ком-  
NPM1 mutant oncoprotein levels and induce apoptosis in NPM1-mutated AML cells. *Blood*. 2015. V. 125. pp. 3455–3465.
10. Li Y., Zhu B. Acute myeloid leukemia with DNMT3A mutations. *Leuk. & Lymph.* 2014. V. 55. No. 9. pp. 2002-2012.
11. Alpermann T., Schnittger S., Eder C. et al. Molecular subtypes of NPM1 mutations have different clinical profiles, specific patterns of accompanying molecular mutations and varying outcomes in intermediate risk acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016. V. 101. pp. e55-
12. Döhner H., Estey E.H., Amadori S. et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010. V. 115. No. 3. pp. 453-474.
13. Stein E.M. Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2015. pp. 579-583.
14. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R. et al.. Comparative analysis of NPM1 gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Bulletin of Ural Medical Academic Science*. 2013. No. 4. pp. 124-127.
15. 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. V. 121. No. 13. pp. 2424-2431.
16. Vinogradov A. V. Clinical and diagnostic impact of genetic abnormalities in the acute myeloid leukemia program treatment. MD dissertation. Yekaterinburg, 2009. 114 p.
17. 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*. 2013. No. 4. pp. 34-35.
18. 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*. 2015. V. 14. No. 1. pp. 18–23.
19. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Bulletin of Bashkir State University*. 2014. V. 19. No. 3. pp. 845–847.
20. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. TP53, FLT3, KIT, N-RAS, NPM1 and WT1 gene mutations complex investigation in acute myeloid leukemia using direct sequencing method. *Biomics*. 2012. V. 3. No. 1. pp. 22-243.
21. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G.

- плексное исследование мутаций генов TP53, FLT3, KIT, N-RAS, NPM1 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого секвенирования // Биомика. – 2012. – Т.3. – №1. – С. 22-243.
21. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Прогностическое значение мутаций гена TP53 при программном лечении острых лейкозов // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2013. – Т. 24. – №2. – С. 33-40.
  22. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. – 2011. – V. 28. – N. 10. – P. 2731-2739.
  23. Программное лечение заболеваний системы крови // Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / Под ред. В. Г. Савченко. – М.: Практика, 2012. – 1056 с.
  24. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – С.2. – С. 2-29.
  25. Виноградов А.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Генанализ» № 2014610088, 09.01.2014, выдано Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.
  26. Изотов Д.В., Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Влияние внутренних тандемных дупликаций и точечных мутаций на функциональные свойства белка Flt3 при острых миелоидных лейкозах // Белки и пептиды. Материалы VII Российского симпозиума 12-17 июля 2015 г. – Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2015. – С. 323.
  27. Annesley C.E., Brown P. The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia // Frontiers in Oncology. - 2014. - V. 4. - A. 263.
  28. Chan P.M. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model // Protein Cell. - 2011. - V. 2. - P. 108-115.
  29. Smith C.C., Wang Q., Chin C.S. et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia // Nature. – 2012. – V. 485. – N. 7397. – P. 260-263.
  30. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex // Blood. - 2011. - V. 118. - P. 60-68.
  31. Falini B., Bolli N., Shan J. et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML // Blood. – 2006. – V. 107. – Prognostic impact of TP53 mutations in the treatment of acute leukemia. Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS. 2013. V. 24. No. 2. pp. 33-40.
  22. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. No. 10. pp. 2731-2739.
  23. Program treatment of hematologic diseases. Proceedings of diagnostic algorithms and treatment protocols of hematologic diseases. Ed. V. G. Savchenko. M.: Praktika, 2012. 1056 p.
  24. 24. Savchenko V.G., Parovichnikova E.N., Afanasyev B.V. et al. National clinical guidelines for adult acute myeloid leukemia diagnostics and treatment. Hematology and transfusiology. 2014. V. 59. S. 2. pp. 2-29.
  25. Vinogradov A. V. The certificate of state registration for the computer program «Gene analysis» N. 2014610088, 09.01.2014, issued by Russian federal bureau for intellectual property, patents and trademarks.
  26. Izotov D.V., Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. Impact of FLT3 gene ITD and point mutations on functional prosperities of Flt3 protein in acute myeloid leukemia patients. Proteins and peptides. Materials of VII Russian symposium 2015, July, 12-15. Novosibirsk: IPP Ofset Ltd., 2015. p. 323.
  27. Annesley C.E., Brown P. The biology and targeting of FLT3 in pediatric leukemia. Frontiers in Oncology. 2014. V. 4. A. 263.
  28. Chan P.M. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. Protein Cell. 2011. V. 2. pp. 108-115.
  29. Smith C.C., Wang Q., Chin C.S. et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature. 2012. V. 485. No. 7397. pp. 260-263.
  30. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. Blood. 2011. V. 118. pp. 60-68.
  31. Falini B., Bolli N., Shan J. et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. Blood. 2006. V. 107. pp. 4514–4523.
  32. Falini B., Nicoletti I., Bolli N., et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. Haematologica. 2007. V. 92. pp. 519–532.
  33. Szatkowski D., Hellmann A. The Overexpression of KIT Proto-Oncogene in Acute Leukemic Cells Is Not Necessarily Caused by the Gene Mutation. Acta

- P. 4514–4523.
32. Falini B., Nicoletti I., Bolli N., et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias // *Haematologica*. – 2007. – V. 92. – P. 519–532.
33. Szatkowski D., Hellmann A. The Overexpression of KIT Proto-Oncogene in Acute Leukemic Cells Is Not Necessarily Caused by the Gene Mutation // *Acta Haematol.* – 2015. – V.133. –P. 116-123.
34. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с аберрантными кариотипами // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2015. – №1. – С. 77-84.
35. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – Т. 2. – №2. – С. 29-40.
36. Heldin C.H., Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V.5 – N.8. – P. a009100.
37. Grossmann V., Schnittger S., Kohlmann A. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations // *Blood*. – 2012. – V.120. – P. 2963-2972.
38. 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.
39. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia // *Nature Rev. Clin. Oncology*. 2016. V. 13. pp. 305–318.
40. Grunwald M.R., Levis M.J. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* 2015. V. 52. No. 3. pp. 192–199.
- Haematol. 2015. V.133. pp. 116-123.
34. 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. *Bulletin of Ural Medical Academic Science*. 2015. No. 1. pp. 77-84.
35. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V. Molecular features and genetic markers of gastrointestinal stromal tumors. *Advances in Modern Oncology*. 2015. V.2. No. 2. pp. 29-40.
36. Heldin C.H., Lennartsson J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V.5 No. 8. P. a009100.
37. Grossmann V., Schnittger S., Kohlmann A. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood*. 2012. V. 120. pp. 2963-2972.
38. 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. *Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki*. 2013. No. 1. pp. 64-66.
39. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. *Nature Rev. Clin. Oncology*. 2016. V. 13. pp. 305–318.
40. Grunwald M.R., Levis M.J. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. *Semin. Hematol.* 2015. V. 52. No. 3. pp. 192–199.

## Авторы:

Виноградов Александр Владимирович  
Министерство здравоохранения Свердловской области  
отдел специализированной медицинской помощи, в т.ч. высокотехнологичной медицинской помощи  
к.м.н., главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области  
Российская Федерация, 620014, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, д. 34б  
a.vinogradov@egov66.ru

Резайкин Алексей Васильевич

ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет

## Authors:

Vinogradov Alexander V.  
Sverdlovsk Regional Ministry of Health,  
Department of Specialized and Hi-Tech Medical Care  
MD, chief therapist, scientific advisor  
Russian Federation, 620014, Yekaterinburg, Wainer str., 34b  
vinogradov-av@russia.ru

Rezaykin Alexey V.

Ural State Medical University,  
Department of Microbiology, Virology and Immunology,  
Laboratory of Molecular Diagnostic  
MD, assistant  
Russian Federation 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3

кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, лаборатория молекулярной диагностики  
к.м.н., ассистент  
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3  
alexrez@usma.ru

Салахов Денис Ринатович  
ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», отделение гематологии и химиотерапии  
врач-гематолог  
Российская Федерация, 620102, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, д. 185  
noo\_namee@mail.ru

Изотов Денис Владимирович  
ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет  
врач-интерн  
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3  
phoenus@yandex.ru

Иощенко Сергей Евгеньевич  
ГАОУ СО Институт медицинских клеточных технологий  
к.м.н., научный сотрудник  
Российская Федерация, 620026, г. Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22а  
ioshhenko@inbox.ru

Сергеев Александр Григорьевич  
ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет  
кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, лаборатория молекулярной диагностики  
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, научный руководитель лаборатории  
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3  
sergeev@usma.ru

alexrez@usma.ru

Salakhov Denis R.  
Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No.1,  
Department of Hematology And Chemotherapy  
hematologist  
Russian Federation, 620102, Yekaterinburg,  
Vologradskaya str., 185  
noo\_namee@mail.ru

Izotov Denis V.  
Ural State Medical University  
intern-hematologist  
Russian Federation 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3  
phoenus@yandex.ru

Ioschenko Sergey E.  
Institute of Medical Cell Technologies  
MD, scientific advisor  
Russian Federation 620026, Yekaterinburg, Karl Marx str., 22a  
ioshhenko@inbox.ru

Sergeev Alexander G.  
Ural State Medical University,  
Department of Microbiology, Virology and Immunology,  
Laboratory of Molecular Diagnostic  
MD, professor, chief of the department, scientific chief of the laboratory  
Russian Federation 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3  
sergeev@usma.ru

Дата поступления – 20.05.2016

Received – 20.05.2016

Образец цитирования:

For citation:

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р., Изотов Д.В., Иощенко С.Е., Сергеев А.Г. 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, DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101

Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Salakhov D.R., Izotov D.V., Ioschenko S.E., Sergeev A.G. DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 AND WT1 Genes Mutations Detection in Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype [Detektsiya mutatsij genov DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 i WT1 pri ostrykh mieloidnykh lejkozakh s normal'nym kariotipom blastnykh kletok] *Vestnik uralskoi meditsinskoi akad-emicheskoi nauki – Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki*. 2016, no. 2, pp. 89-101. DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101 [In Russ.]