DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

УДК: 616-006.446.8

А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, Д.В. Изотов, А.Г. Сергеев

ПРИМЕНЕИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРЯМОГО АВТОМАТИЧЕСКОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 И WT1 ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ С НЕУТОЧНЕННЫМ КАРИОТИПОМ

Министерство здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Российская Федерация;
Уральский государственный медицинский университет, Г. Екатеринбург, Российская Федерация;
Свердловская областная клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Российская Федерация

A.V. Vinogradov, A.V. Rezaykin, D.V. Izotov, A.G. Sergeev

ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 AND WT1 GENES MUTATIONS DETECTION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA WITH UNSPECIFIED KARYOTYPE USING DIRECT SEQUENCING TECHNIQUE

Sverdlovsk Regional Ministry of Health, Yekaterinburg, Russian Federation;
Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;
Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. Цель исследования — определить частоту мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) с неуточненным кариотипом.

Материалы и методы исследования. Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 41 пациента с ОМЛ в возрасте от 21 до 82 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2008 по 2016 г. В исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ М0 по FAB-классификации наблюдался 1 пациент, М1 — 3, М2 — 23, М4 — 10, М5 — 1, острый миелофиброз — 1, неуточненный ОМЛ — 2. Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом, острым миеломонобластным лейкозом с патологической костномозговой эозинофилией, прочими морфологическими вариантами ОМЛ с установленным цитогенетическим статусом, а также с криптическими инсерциями в экзоне 12 гена NPM1, выявленными методом прямого автоматического секвенирования, специфическими хромосомными аномалиями t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(9;22)(p34;q11), abn (11)(q23), выявленными методом ПЦР, в исследование не включались. Детекцию мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 проводили методом прямого автоматического секвенирования с использованием автоматического анализатора ABI Prism 310 по прямой и обратной последовательностям. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием программного продукта MEGA, v. 5.0.

Результаты исследования. Кумулятивная часто-

Abstract. Aim: to estimate the frequency of mutations in ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes in acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) with unspecified karyotype using direct automatic sequencing technique.

Materials and methods. Bone marrow and peripheral blood samples obtained from 41 AML pts aged 21 to 82, treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2008–2016. Distribution of the pts according to FAB-classification was as follows: AML M0 — 1, M1 — 3, M2 — 23, M4 — 10, M5 — 1, acute myelofibrosis — 1, AML pts with unspecified morphological variants — 2. AML pts with M3, M4eo morphologic subtype according to FAB-classification, with normal or abnormal karyotype (in G-banding), t(8;21), inv(16), t(9;22), abn11q23 (in PCR) and NPM1 gene exon 12 insertion (in sequencing) were excluded from research.

Detection of mutations in ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes performed by direct sequencing. Sequencing realized using an automatic genetic analyzer ABI Prism 310.

Results. The average frequency of functionally significant mutations in all investigated genes among the treated AML pts was 26.8%, and low than cumulative frequency of point mutation in AML with normal and abnormal karyotype. Average frequency of mutations in KIT gene exons 7–12 and 16–19 was 15.0%, ASXL1 gene exons 12–13 – 12.5%, DNMT3A exons 18–26 – 11.1%, WT1 gene exons 6–9 — 11.1%, FLT3 gene exons 12–15 and 19–21 —10.8%, NRAS gene exons 1–4 — 5.4%, TP53 gene exons 4–11 — 3.6%. Multiple point mutations in investigated genes detected in 9.8%

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

та детекции функционально значимых мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при ОМЛ с неуточненным кариотипом составляла 26,8%, что было несколько ниже средней частоты криптических генных мутаций, определяемых методом секвенирования при ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами. Мутации в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 определялись в 10,8% исследованных образцов (n=4), экзонах 7–12 и 16–19 гена KIT — в 15,0% (n=3), экзонах 12–13 гена ASXL1 — 12,5% (n=1), экзонах 6–9 гена WT1 — в 11,1% (n=2), экзонах 18–26 гена DNMT3A — в 11,1% (n=1), экзонах 1–4 гена NRAS — в 5,3% (n=1), экзонах 4-11 гена TP53 — в 3,6% (n=1). Выявление вышеуказанных мутаций методом прямого автоматического секвенирования в 24,4% случаев (n=10) позволяло уточнить прогноз ответа опухоли на проведение стандартной полихимиотерапии при ОМЛ. В 9,8% исследованных образцов (n=4) определялись одновременно по две функционально значимые мутации в исследованных генах. При этом максимальное количество патогенетически значимых молекулярных повреждений определялось в двух пробах: при ОМЛ М5 (внутренняя тандемная дупликация в гене FLT3 в сочетании с делецией в гене KIT) и ОМЛ М2 в исходе эссенциальной тромбоцитемии (делеция в гене WT1 в сочетании с несинонимичной заменой в гене DNMT3A). В двух случаях, при ОМЛ М2 с тандемной дупликацией в экзоне 9 гена TP53 и ОМЛ М2 с несинонимичной транзицией c. 1636A>G в гене KIT, определялась несинонимичная трансверсия c. 1621A>C, являющаяся, по-видимому, полиморфным аллельным вариантом гена KIT и не имеющая патогенетического и прогностического значения при ОМЛ.

Ключевые слова: точечная мутация, острый миелоидный лейкоз, неуточненный кариотип, ген ASXL1, ген DNMT3A, ген FLT3, ген KIT, ген NRAS, ген TP53, ген WT1, прямое автоматическое секвенирование

AML pts with unspecified karyotype (usually KIT gene non-synonymous substitution and deletion). In 2 cases 2 different gene mutations were co-existed in samples: AML M5 with FLT3 ITD and KIT gene deletion n. Del. 1529–1774, AML M2 with WT1 gene deletion n. Del. 1289–1372 and DNMT3A gene non-synonymous substitution c. 2645G>A. In 2 another samples, both AML M2 with KIT gene non-synonymous transversion c. 1621A>C additional TP53 gene exon 6 tandem duplication and KIT gene non-synonymous transition c. 1636A>G were detected, respectively.

Keywords: acute myeloid leukemia, unspecified karyotype, ASXL1 gene, DNMT3A gene, FLT3 gene, KIT gene, NRAS gene, TP53 gene, WT1 gene, sequencing

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 обусловливает развитие клинико-лабораторной симптоматики костномозговой недостаточности. Установлено, что злокачественная трансформация гемопоэтических клеток обусловлена возникновением мутаций в ряде ключевых генов, продукты которых приводят к нарушению молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации, регуляции клеточного цикла и программированной гибели, что обусловливает нарушение процессов пролиферации, дифференцировки клеток и экспансию опухолевого клона [1–4].

В 2001 году Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) наличие некоторых специфических генетических аномалий (например, транслокаций t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11), инверсии inv(16)(p13;q22)), имевших доказанное влияние на прогноз общей вероятностной выживаемости, было впервые включено в классификацию ОМЛ в качестве диагностического признака [5, 6]. В классификации ВОЗ пересмотра 2008 года перечень диагностически значимых генетических аномалий был расширен, в т.ч.

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

за счет выделения новых подгрупп ОМЛ со специфическими мутациями генов NPM1 и CEBPA, ассоциированных с благоприятным прогнозом [7, 8]. В опубликованной классификации ВОЗ пересмотра 2016 года предполагается выделение нескольких новых обособленных подгрупп ОМЛ на основе детекции специфических генных и хромосомных аномалий, таких как мутации генов RUNX1, KMT2A, транслокация t(9;22)(q34;q11) с образованием химерного гена BCR-ABL1 и другие [9].

Согласно результатам современных многоцентровых исследований, к генам, наиболее часто мутирующим при ОМЛ, относятся FLT3 (39%), NPM1 (33%), DNMT3A (31%), NRAS (22%), RUNX1 (15%), TET2 (15%), IDH2 (14%), WT1 (13%), ASXL1 (11%), PTPN11 (10%), SRSF2 (10%), TP53 (9%), CEBPA (8%) и другие [10]. При этом наряду с так называемыми «драйверными» мутациями, играющими ключевую роль в патогенезе ОМЛ, в вышеуказанных и ряде других генов могут встречаться случайные («пассажирские»), возникающие на фоне генетической нестабильности опухоли либо появившиеся на ранних стадиях эмбриогенеза и содержащиеся во всех соматических клетках организма, а потому не имеющие значения для диагностики и прогноза ОМЛ (в отличие, например, от мутаций в генах, обусловливающих генетическую предрасположенность к миелопролиферативным новообразованиям) [10,11]. Патогенетически значимые при ОМЛ мутации распределяются на 9 классов, наибольшее значение среди которых имеют активационные повреждения клеточных сигнальных путей (FLT3, NRAS, PTPN11, KRAS, KIT), нуклеофозмина (NPM1), аппарата метилирования ДНК (DNMT3A, TET2, IDH2, WT1), транскрипции (RUNX1, CEBPA), упаковки хроматина (ASXL1, KMT2A, GATA2), сплайсинга РНК (SRSF2), программированной клеточной гибели (TP53), кохексинового комплекса (SRAG2) и другие (например, miR142) [10–14]. Однако, в силу широкого распространения, они зачастую не могут использоваться в качестве дифференциально-диагностического и классификационного критерия при ОМЛ [7–9, 15].

Тем не менее, для ряда наиболее распространенных генетических аномалий в настоящее время разработаны или продолжают активно разрабатываться таргетные противоопухолевые препараты, воздействующие на молекулярное звено патогенеза, повреждение которого вызвано тем или иным генетическим событием. [14, 16, 17]. Следовательно, исследование частоты и клинической значимости криптических генных мутаций, выявляемых при ОМЛ с использованием современных молекулярно-генетических методов, является актуальной задачей практической онкогематологии, решение которой позволит, во-первых, дифференцированно определить прогноз общей вероятностной выживаемости пациентов при проведении стандартной программной полихимиотерапии и, во-вторых, уточнить персонализированные медицинские показания для применения таргетных противоопухолевых препаратов, воздействующих на конкретное молекулярное повреждение, играющее ключевую роль в онкогенезе той или иной подгруппы ОМЛ.

Цель исследования — определить частоту мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с неуточненным кариотипом методом прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы исследований

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 41 больного ОМЛ в возрасте от 21 до 82 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2008 по 2016 г. Средний возраст пациентов составил 60,1±4,7 лет.

Диагностику ОМЛ осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [6,8], на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования бластных клеток. По медицинским показаниям выполняли трепанобиопсию подвздошной кости с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием [14]. Морфологический вариант ОМЛ определяли согласно франко-американо-британской (FAB) классификации [7, 18]. В соответствии с ней, в исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ M0 наблюдался 1 пациент, M1 — 3, M2 — 23, M4 — 10, M5 — 1, острый миелофиброз — 1, неуточненный ОМЛ — 2.

Пациенты с острым промиелоцитарным лейкозом, острым миеломонобластным лейкозом с патологической костномозговой эозинофилией, прочими вариантами ОМЛ с установленным по результатам кариотипирования (G-banding), а также ПЦР-исследования на специфические хромосомные аберрации и секвенирования экзона 12 гена NPM1, генетическим статусом в исследование не включались. То есть, все включенные в исследование больные имели неуточненный кариотип, при этом специфические хромосомные аномалии t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13;q22), t(9;22)(p34;q11), аберрации abn(11)(q23), а также инсерции в экзоне 12 гена NPM1 молекулярно-генетическими методами у них не выявлялись [7, 14].

Детекцию криптических мутаций в исследуемых генах проводили с использованием технологии пря-

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

мого автоматического секвенирования. Всего на наличие мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3 в изучаемой выборке протестированы 37 образцов, экзонов 4–11 гена TP53 — 28 проб, экзонов 7–12 и 16–19 гена KIT — 20, экзонов 1–4 гена NRAS — 19, экзонов 6–9 гена WT1 — 18, экзонов 18–26 гена DNMT3A — 9, экзонов 12–13 гена ASXL1 — 8. Праймеры, использованные для детекции мутаций в указанных генах, описаны нами ранее [19–25].

Выделение тотальной РНК из лейкозных бластов проводили методом сорбции на силикагелевом носителе либо методом лизиса клеток с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной в миницентрифужной колонке с помощью комплекта реагентов «QIAamp RNA Blood Mini Kit» (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК проводили с использованием 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 [1, 5, 7]. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [19–25].

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 [19–26].

Программное лечение больных ОМЛ проводили по клиническим протоколам, разработанным Российской группой по изучению острых лейкозов [27, 28], в которых использовалась интенсивная индукция-консолидация ремиссии цитарабином в сочетании с антрациклинами с последующей поддерживающей полихимиотерапией (протоколы ОМЛ 06.06, ОМЛ 01.10, протокол лечения больных ОМЛ в возрасте старше 60 лет). Больные, имевшие медицинские противопоказания к программному лечению, лечились малыми дозами цитозара, 6-меркаптопурином, в качестве циторедуктивной терапии у больных с гиперлейкоцитозом использовался гидроксикарбамид [27, 28].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ для ЭВМ «Генанализ» и «Генсвязь» [29, 30]. Проверку статистических гипотез проводили с использованием точного критерия Фишера (F). 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 [25].

Моделирование третичной структуры белков проводили с использованием распределенной сети предсказания структуры белка Protein Homology/AnalogY Recognition Engine (Phyre) версия 2.0 в режиме «Normal». В качестве референтной использована полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2,10 Å модель 1RJB из Protein Data Bank (PDB 1RJB). Структуры мутантных вариантов белка Flt3 моделировали на основе полученных при секвенировании нуклеотидных последовательностей индивидуально для каждой положительной пробы. Для визуализации и анализа использовали программное обеспечение PyMol версия 1.3r1. [31]

Результаты исследования

Мутации в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 были выявлены в 4 пробах (10,8%, при 95% ДИ от 4,3 до 24,7%), по одному наблюдению при морфологических вариантах M1, M2, M4 и M5 (таблица 1). Средний возраст больных составил 64,5±6,9 лет. Во всех наблюдениях мутации были представлены внутренними тандемными дупликациями (ITD) кодирующей последовательности юкстамембранного и киназного доменов гена FLT3, при этом точка дупликации и длина дуплицирующегося фрагмента варьировала в каждом из исследуемых образцов (таблица 1). Соответственно, степень вовлечения юкстамембранного и первого тирозинкиназного доменов белка Flt3 в структурные перестройки также отличалась, что, по данным литературы, влияет на химиочувствительность опухолевых клеток к таргетному лечению ингибиторами тирозинкиназ (ТКИ) I и II типа [32–34].

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

Таблица 1

Характеристика мутаций гена FLT3, выявленных при ОМЛ с неуточненным кариотипом

Table 1

Features of FLT3 gene mutations in AML patients with unspecified 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
M1	ITD 69 п.о.*/1744 23 а.о.**/582 ITD 69 bp*/1744 23 ar**/582	Юкстамембранный домен, мотив JM-S/ Juxtamembrane domain, JM-S motif	ТКИ I типа/ TKI type I
M2	ITD 54 п.о./1786 18 а.о./596 ITD 54 bp*/1786 18 ar**/596	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z / Juxtamembrane domain, JM-Z motif	ТКИ I типа/ TKI type I
M5	ITD 27 п.о./1780 9 а.о./594 ITD 27 bp*/1780 9 ar**/594	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z / Juxtamembrane domain, JM-Z motif	ТКИ I типа/ TKI type I
M2	ITD 18 п.о./1791 6 а.о./597 ITD 18 bp*/1791 6 ar**/597	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, ar — amino acid residues, localization in polypeptide chain.

Таблица 2

Результаты прямого автоматического секвенирования проб при ОМЛ с неуточненным кариотипом с двумя функционально значимыми мутациями в исследованных генах*

Table 2

Direct sequencing results in normal karyotype AML patients with unspecified karyotype*

Подтип по FAB/ FAB subtype	Кол-во мутаций / Number of genetic lesions	Характеристика выявленных мутаций в генах/ Characteristics of genetic lesions				
		FLT3	KIT	DNMT3A	TP53	WT1
M2	2	WT**	c. 1638A>G	**c. 2645G>A**	c. 215C>G	**n. Del. 1289-1372**
M2	2	c. 1683A>G	**c. 1621A>C, c.** 2586G>C	WT	**TD****	WT
M2	2	c. 1683A>G	**c. 1621A>C, c. 1636A>G, c.** 1821T>C	–**	–	–
M5	2	**ITD**	**n. Del. 1529-1774, c.** 2586G>C	WT	c. 215C>G	WT

* синонимичные нуклеотидные замены выделены курсивом, полиморфный аллельный вариант гена TP53 c. 215C>G — подчеркиванием; функционально значимые мутации (в т.ч. KIT c. 1621A>C) выделены полужирным шрифтом

* synonymous nucleotide substitution marked by italic, TP53 gene polymorphism marked by underlying, non-synonymous nucleotide substitution and other significant genetic lesions marked by boldface;

** WT — «дикий тип» (изменений кодирующей последовательности исследуемых экзонов в сравнении с референсной последовательностью не обнаружено), «–»— исследование не проводилось, TD – тандемная дупликация

** WT — wild type , «–» — not applicable, TD — tandem duplication.

Так, оказалось, что выявленная при анализе пробы больного ОМЛ M1 (таблица 1) FLT3 ITD способствовала существенному изменению конфигурации мотива JM-S («switching motif») и в особенности — ключевых остатков тирозина (Tyr589 и Tyr591), которые, в свою очередь, могли легко подвергаться фосфорилированию, активируя тирозинкиназные домены (рис. 1А). Дупликации, выявленные при анализе проб пациентов с ОМЛ M2 и M5, не влияли на положение остатков тирозина, однако могли способствовать нарушению взаимодействия между αC-спиралью и мотивом JM-Z («zipper motif»), тем самым повышая вероятность спонтанного изменения положения юкстамембранного домена и лиганднезависимой активации каталитического центра белка (рис. 1Б). Во всех случаях наличие FLT3 ITD приводило к нарушению комплементарного взаимодействия структурных элементов, сохраняющих белок в аутоингибированном состоянии и способствовало переходу белка Flt3 в активированную конформа-

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

цию (DFG-in, связанную с «открытым» положением активационной петли, не препятствующем взаимодействию каталитического центра с субстратом), что позволяет рассматривать возможность применения в таких случаях таргетной терапии селективными тирозинкиназными ингибиторами I типа [17, 33, 35].

В одной из проб, ОМЛ М5, наряду с FLT3 ITD определялась функционально значимая делеция в гене KIT (таблица 2), описанная нами ранее [36]. Кроме того, в 5 пробах определялась синонимичная транзиция c. 1638A>G в гене FLT3, не имевшая, по-видимому, самостоятельного патогенетического и прогностического значения при ОМЛ [32, 33].

При проведении стандартной программной полихимиотерапии [27, 28] наличие мутаций в гене FLT3 ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом ОМЛ. Медиана общей вероятностной выживаемости больных с мутациями в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 лейкемических бластов не превышала 6 месяцев. В одном случае была зафиксирована первичная резистентность, в трех — ранние рецидивы заболевания.

Функционально значимые структурные изменения в кодирующей последовательности экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT определялись в 3 пробах (15,0%, при 95% ДИ от 5,2 до 36,0%), в том числе при морфологическом варианте М2 по FAB-классификации — два наблюдения, М5 — одно. Средний возраст больных составлял 67,7 ± 9,1 лет. В одном из исследуемых образцов (ОМЛ М2) одновременно определялись две несинонимичные замены в кодирующей последовательности гена KIT — трансверсия c.1621A>C, приводящая к замене аминокислотного остатка метионина на лейцин в позиции 541 кодируемого белка, и транзиция c. 1636A>G, приводящая к аминокислотной замене лизина на глутаминовую кислоту а позиции 546 (таблица 2). Кроме того, в этой же пробе присутствовала синонимичная транзиция c. 1821T>C. Трансверсия c.1621A>C определялась в образце периферической крови при ОМЛ М5 с тандемной дупликацией в экзоне 9 гена TP53 (таблица 2). По литературным данным, указанная трансверсия является, предположительно, полиморфным аллельным вариантом гена KIT, не имеющим самостоятельного патогенетического и прогностического значения при ОМЛ [37]. Это корреспондирует с ранее полученными нами данными о случайном характере сочетания трансверсии c.1621A>C с другими молекулярными повреждениями прото- и антионкогенов при ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами [20, 36, 38].

Еще в одном наблюдении при ОМЛ М2 с FLT3 ITD, в кодирующей последовательности экзонов 10 и 11 гена KIT определялась делеция протяженностью с 1529 по 1774 позиции нуклеотидов (n. Del 1529-1774, таблица 2), приводящая к утрате 82 аминокислотных остатков в транслируемом белке. Указанная делеция описана нами ранее при ОМЛ со специфическими аномалиями – М2 с t(8;21)(q22;q22) [36] и М4 с нормальным кариотипом и инсерцией типа А в экзоне 12 гена NPM1 [38]. По данным литературы, делеции без сдвига рамки считывания в экзоне 11 гена KIT являются значимыми для злокачественной трансформации клеток, так как затрагивают участок полипептидной цепи, обеспечивающий ингибирование аутофосфорилирования рецептора, следовательно, в указанном случае может обсуждаться потенциальное медицинское показание для назначения таргетного лечения ингибиторами тирозинкиназ [39, 40].

Мутации в кодирующей последовательности гена WT1 определялись в двух исследуемых образцах (11,1%, при 95% ДИ от 4,5 до 24,9%), из них в одном наблюдении — при ОМЛ М2, диагностированном после окончания курса лечения апластической анемии, во втором — при ОМЛ М2 в исходе эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ). Возраст указанных больных составил 50 и 64 года, соответственно.

В обеих пробах определялась делеция 84 нуклеотидов в позициях с 1289 по 1372 от начала кодирующей последовательности, соответствующих экзону 8 (n. Del 1289-1372), что приводило к утрате в синтезируемом белке Wt1 28 аминокислотных остатков в позициях с 431 по 458. Во второй пробе (ОМЛ в исходе ЭТ) определялась несинонимичная замена в гене DNMT3A (таблица 2). В обоих случаях ОМЛ с делециями экзона 8 гена WT1 оказались ассоциированы с неблагоприятным прогнозом. Так, в первом наблюдении была зафиксирована ранняя летальность в постцитостатическом периоде после первого курса индукции ремисии, во втором – резистентность лейкозного клона к проводимой стандартной полихимиотерапии. Медиана общей выживаемости пациентов не превышала 6 месяцев.

Аналогичные делеции в гене WT1, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом, были описаны нами ранее при резистентном ОМЛ М2 в исходе МДС с делецией длинного плеча хромосомы 5 (синдром 5q-) [36] и при ОМЛ М5 с нормальным кариотипом с инсерцией типа D в экзоне 12 гена NPM1 [38].

Криптическая делеция нуклеотидов в позициях с 1755 по 2007 от начала кодирующей последовательности гена ASXL1 (n. Del 1755-2007) определялась в одном исследованном образце (12,5%, при 95% ДИ от 2,2 до 47,1%), при морфологическом варианте ОМЛ М2. Возраст больного составлял 64 года. Она обусловливала сдвиг рамки считывания и раннюю терминацию синтеза кодируемого полипептида (p. Lys 586 Arg fsX33). В указанной пробе определялась также синонимичная транзиция c.639A>G в экзоне

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

6 гена TP53, не имеющая функционального значения, и несинонимичная трансверсия c. 215C>G, являющаяся полиморфным аллельным вариантом гена TP53, описанная нами ранее [25]. В указанном случае была достигнута непродолжительная клинико-гематологическая ремиссия после первого курса стандартной программной полихимиотерапии, однако через несколько недель наблюдения зафиксирован ранний рецидив ОМЛ и больной переведен на сдерживающую химиотерапию (продолжительность наблюдения составляет 16 месяцев).

Точечная мутация гена DNMT3A выявлена в одной исследованной пробе при ОМЛ М2 в исходе эссенциальной тромбоцитемии (11,1%, при 95% ДИ от 2,0 до 43,5%). Она представляла собой несинонимичную транзицию c. 2645G>A, приводящую к аминокислотной замене аргинина на гистидин в позиции 882. Указанная мутация ранее описана A.M. Jankowska et al. при хроническом миеломоноцитарном лейкозе (ХММЛ), а в последующих экспериментах J. Xu et al. установлено, что трансфекция вектором, содержащим ген DNMT3A с транзицией c. 2645 G>A, приводит к развитию у лабораторных животных ХММЛ-подобного заболевания [41, 42]. Наряду с указанной трансверсией, в лейкемических клетках из этого же образца определялась делеция экзона 8 гена WT1, подробно описанная выше (n. Del 1289-1372, таблица 2). В прочих исследуемых пробах мутации в гене DNMT3A не определялись.

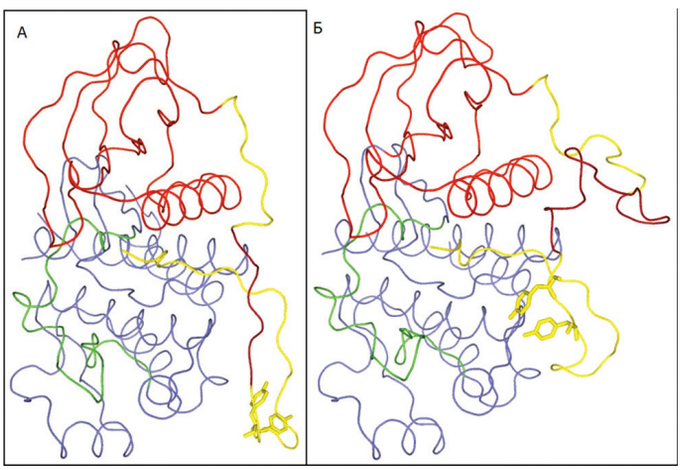

Рис. 1. Результаты моделирования третичной структуры мутантных белков Flt3 при ОМЛ М1 (А), М2 и М5 (Б).

Fig. 1. 3D modeling of mutated Flt3 protein structure in AML M1 (A), M2 and M5 (B) patients.

Точечная мутация в гене NRAS определялась в одном исследованном образце (5,3%, при 95% ДИ от 0,9 до 24,6%) при ОМЛ М2 и была представлена несинонимичной трансверсией c. 181C>A. Возраст больного составил 61 год. В указанном случае была зафиксирована ранняя летальность пациента в постцитостатическом периоде после первого курса индукции ремиссии по схеме программной полихимиотерапии «7+3» [27].

Криптическая мутация в гене TP53 определялась в одной исследуемой пробе при ОМЛ М2 (3,6%, при 95% ДИ от 0,6 до 17,7%), возраст пациента составлял 63 года. Она представляла собой не описанную ранее тандемную дупликацию протяженностью 19 нуклеотидов, начиная с позиции 960 кодирующей последовательности (экзон 9) и обусловливала вставку 9 аминокислот в транслируемом белке p53 (рис. 2). Одновременно в указанном биообразце в кодирующей последовательности гена KIT определялись несинонимичная (c.1621A>C) и синонимичная (c. 2586G>C) трансверсии (таблица 2). В указанном наблюдении была зафиксирована ранняя летальность, то есть смерть пациента в период постцитостатической панцитопении после первого курса индукции ремиссии. При этом, однако, лейкемическая инфильтрация костного мозга по результатам аутопсии сохранялась.

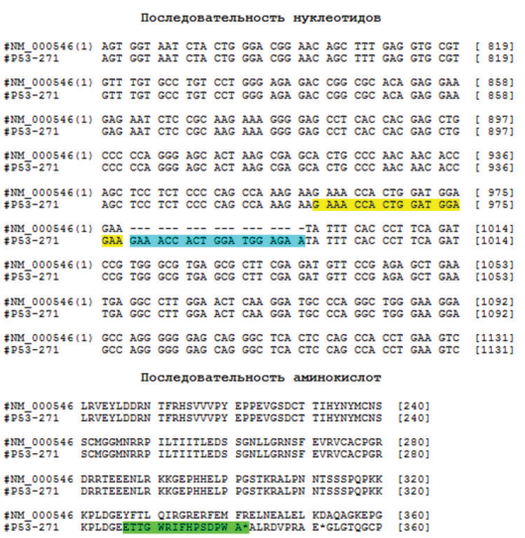

Рис. 2. Кодирующая последовательность гена TP53 с тандемной дупликацией протяженностью 19 п.о. в позиции 960 (выделена желтым цветом) и аминокислотная последовательность мутантного белка p53 (измененная часть выделена зеленым цветом), выявленные в образце периферической крови при ОМЛ М2.

Fig. 2. TP53 gene coding sequence with tandem duplication in position 960 (marked in yellow) and mutated amino acid chain of p53 protein (marked in green) in AML M2 patient.

Обсуждение результатов

Таким образом, функционально значимые мутации в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3, 7–12 и 16–19 гена KIT, 6–9 гена WT1, 12–13 гена ASXL1, 18–26 гена DNMT3A, 1–4 гена NRAS и 4–11 гена TP53 были выявлены с

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

использованием технологии прямого автоматического секвенирования в 11 исследованных образцах от больных ОМЛ с неуточненным кариотипом лейкемических бластов (26,8%, при 95% ДИ от 15,7 до 41,9%), что несколько ниже кумулятивной частоты детекции криптических генных мутаций при ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами [36, 38]. Не исключено, что это могло обусловливаться более низким качеством исследованного биоматериала, не позволившим провести как качественное кариотипирование (G-banding) лейкемических клеток, так и выявить в них специфические хромосомные аберрации методом ПЦР [7]. Спектр криптических генных мутаций, выявленных в исследуемой подгруппе ОМЛ методом прямого автоматического секвенирования, а также характер их кооперации существенно отличался от исследованных ранее подгрупп (таблица 3), что может отражать ее смешанный характер, обусловленный присутствием в ней биоматериала от больных ОМЛ как с нормальным, так и с аберрантными кариотипами.

В предшествующих исследованиях нами было показано [38], что при ОМЛ с нормальным кариотипом с наибольшей частотой определялись мутации генов NPM1 и FLT3 (50,0% и 22,0%, соответственно), которые в 40% наблюдений кооперировались друг с другом, причем указанное взаимодействие носило неслучайный характер. Напротив, при ОМЛ с аберрантными кариотипами наиболее часто определялись мутации генов NRAS и TP53 (19,2% и 18,4%, соответственно), при этом кооперации указанных молекулярных событий не определялось [36]. В группе больных ОМЛ с неуточненным кариотипом установить преобладающий тип криптических генных мутаций оказалось невозможным, так как максимальная частота выявляемых методом прямого автоматического секвенирования молекулярных повреждений каждого из генов не превышала 15,0%, а в диапазоне частот от 10,0 до 15,0% определялись мутации в пяти исследованных генах (KIT, ASXL1, DNMT3A, WT1 и FLT3) из семи (таблица 3).

Таблица 3

Частота выявления мутаций различных генов с использованием технологии прямого автоматического секвенирования проб при ОМЛ с неуточненным, нормальным и аберрантными кариотипами лейкозных бластов в сравнении с данными международного исследования Metzeler K.H. et al., 2016 г.

Table 3

ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NPM1, NRAS, TP53, WT1 genes mutations frequency in AML with unspecified, normal and aberrant karyotype and Metzeler K.H. et al. research [10], 2016

Вариант кариотипа / Karyotype	Частота мутаций в исследованных генах, % / Mutation frequency, %								
	ASXL1	DNMT3A	FLT3	KIT	KRAS	NPM1	NRAS	TP53	WT1
Неуточненный/Unspecified	12,5	11,1	10,8	15,0	–*	–	5,3	3,6	11,1
Нормальный/ Normal [38]	–	8,3	22,0	16,7	22,2	50,0	13,0	3,1	4,5
Аберрантные/ Aberrant [36]	–	–	9,6	14,3	–	–	19,2	18,4	3,6
Metzeler K.H. et al., 2016 [10]	11,0	31,0	39,0	4,0	6,0	33,0	22,0	9,0	13,0

* «–» — исследование не проводилось / *«–» — not applicable.

Установлено, что с максимальной частотой (15,0%) среди исследованных генов при ОМЛ с неуточненным кариотипом определялись мутации в гене KIT, что соответствовало средним частотам генетических изменений гена KIT при ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами (F=1,0). Однако в исследовании Metzeler K.H. и соавт. [10] мутации в гене KIT при ОМЛ определялись с существенно более низкой частотой — 4,0% (таблица 3). По-видимому, это обусловлено высокой частотой выявления в исследуемых нами подгруппах трансверсии c.1621A>C, которая, по данным литературы, не имеет самостоятельного патогенетического и прогностического значения в онкогенезе ОМЛ [37]. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что кооперация указанной несинонимичной трансверсии с другими генетическими аномалиями при ОМЛ как с нормальным, так и аберрантными кариотипами, носила случайный характер [36, 38]. Следовательно, при исследовании частоты генетических изменений при ОМЛ трансверсию c.1621A>C и другие мутации в гене KIT необходимо учитывать раздельно.

Мутации в гене TP53 в исследуемой группе пациентов выявлялись, напротив, с минимальной частотой (3,6%), которая совпадала с таковой при ОМЛ с диплоидией и была существенно ниже частоты мутаций TP53 при ОМЛ с аберрантными кариотипами (F=0,124) [36, 38]. В исследовании Metzeler K.H. и соавт. [10] мутации в гене TP53 определялись с частотой 9,0%, что соответствовало средней кумулятивной частоте мутаций гена в подгруппах ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами (таблица 3).

Частота мутаций в гене FLT3 при ОМЛ с неуточненным кариотипом наоборот, совпадала со средней частотой мутаций указанного гена при ОМЛ с аберрантными кариотипами, хотя была ниже, чем при ОМЛ с диплоидией (F=0,233, таблица 3). В целом, она была также ниже, чем в исследовании Metzeler

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

К.Н. и соавт. [10], при этом статистически достоверной разницы выявлено не было.

Мутации в экзонах 1-4 гена NRAS в исследуемой выборке определялись с невысокой частотой (5,3%), которая оказалась ниже, чем в группах больных ОМЛ с нормальным и аберрантными кариотипами (F=0,222), а также в исследовании Metzeler K.H. и соавт. (таблица 3) [10, 36, 38]. По-видимому, указанные различия, статистически незначимые, обусловлены малым размером исследуемой выборки.

Особого внимания заслуживали делеции экзона 8 гена WT1, определявшиеся в подгруппе больных ОМЛ с неуточненным кариотипом в двух наблюдениях (11,1%). Оказалось, что в обоих случаях они выявлялись у больных с предшествующей гематологической патологией (ОМЛ М2, диагностированный после апластической анемии, ОМЛ М2 в исходе эссенциальной тромбоцитемии). В исследованной ранее группе больных с аберрантным кариотипом [36] делеция экзона 8 гена WT1 также определялась у одного больного ОМЛ М2 в исходе миелодиспластического синдрома с делецией длинного плеча хромосомы 5 (так называемый синдром 5q-). В группе ОМЛ с нормальным кариотипом [38] аналогичная делеция в гене WT1 определялась в одном биообразце аспирата костного мозга от больного ОМЛ М5b с инсерцией в экзоне 12 гена NPM1, и являлась, по-видимому, вторичным генетическим событием в онкогенезе лейкоза. В целом, частота определения мутаций в гене WT1 при ОМЛ с неуточненным кариотипом оказалась близкой к аналогичному показателю, установленному в исследовании Metzeler K.H. и соавт. (таблица 3) [10].

В четырех наблюдениях при ОМЛ с неуточненным кариотипом определялись по две функционально значимые мутации в исследованных генах (9,8%, при 95% ДИ от 3,9 до 22,5%, таблица 2). Однако в двух случаях, при ОМЛ М2 с тандемной дупликацией в экзоне 9 гена TP53 и ОМЛ М2 с несинонимичной транзицией c. 1636A>G в гене KIT, второй функционально значимой мутацией являлась несинонимичная трансверсия c. 1621A>C в гене KIT, являющаяся, предположительно, полиморфным аллельным вариантом гена, не имеющим самостоятельного патогенетического и прогностического значения при ОМЛ [37]. Следовательно, только в двух пробах из четырех определялось по два потенциально патогенетически значимых при ОМЛ молекулярных события: ОМЛ М5 с внутренней тандемной дупликацией в гене FLT3 в сочетании с делецией в гене KIT и ОМЛ М2 в исходе ХМПЗ с делецией в гене WT1 в сочетании с несинонимичной заменой в гене DNMT3A.

Необходимо отметить, что согласно литературным данным [2, 9, 10, 12, 13, 43], наличие мутаций в генах ASXL1, DNMT3A, FLT3, NRAS, TP53 и WT1 является прогностически неблагоприятным молекулярным предиктором при ОМЛ. Следовательно, выявление криптических мутаций в указанных генах при ОМЛ с неуточненным кариотипом позволяло во всех указанных случаях (n=10, 24,4%, при 95% ДИ от 13,8 до 39,3%, таблица 2) определить прогноз ответа опухоли на проведение стандартной полихимиотерапии и общей вероятностной выживаемости пациентов. При этом прогностическое значение кооперации несинонимичной трансверсии c. 1621A>C с несинонимичной транзицией c. 1636A>G в гене KIT, выявляемых одновременно при ОМЛ М2, подлежит дополнительному исследованию. Во всех остальных случаях прогноз общей выживаемости пациентов с криптическими мутациями в исследованных генах изменялся с неопределенного на неблагоприятный.

Таким образом, применение технологии прямого автоматичского секвенирования для детекции криптических генных мутаций при ОМЛ с неуточненным кариотипом может использоваться в практической онкогематологии в качестве дополнительного молекулярно-генетического теста как для определения прогноза ответа лейкемического клона на стандартную программную полихимиотерапию [43], так и разработки персонализированных программ противоопухолевого лечения, включающих назначение таргетных препаратов, специфичных к ключевым молекулярным повреждениям при ОМЛ, например, ингибиторов тирозинкиназ при FLT3 ITD [17, 44, 45].

Выводы

1. Кумулятивная частота детекции функционально значимых мутаций генов ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при ОМЛ с неуточненным кариотипом с использованием технологии прямого автоматического секвенирования составляла 26,8%.

2. В группе ОМЛ с неуточненным кариотипом средние частоты мутаций генов KIT, ASXL1, DNMT3A, WT1 и FLT3 находились в диапазоне 10,8–15,0%, что подтверждало ее смешанный характер.

3. Частота обнаружения множественных (две и более) криптических генных мутаций при ОМЛ с неуточненным кариотипом составляла 9,8%, при этом наиболее часто в кооперации участвовали мутации гена KIT (за счет трансверсии c. 1621A>C).

4. Применение прямого автоматического секвенирования позволило определить прогноз у 24,4% больных ОМЛ с неуточненным кариотипом за счет выявления функционально и патогенетически значимых молекулярных повреждений генов FLT3, WT1, ASXL1, DNMT3A, NRAS и TP53. Прогноз стандартного полихимиотерапевтического лечения больных ОМЛ при этом изменялся с неопределенного на не-

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

благоприятный.

5. Технология прямого автоматического секвенирования может использоваться для разработки персонализированных программ лечения больных ОМЛ, включающих применение таргетных химиопрепаратов, специфичных к некоторым молекулярным мишеням, например, внутренним тандемным дупликациям в гене FLT3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеев А.Г., Иванов Р.А. Генодиагностика лейкозов. – Екатеринбург: УГМА, 1998. – 39 с.

2. 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.

3. Ho T.-C., LaMere M., Stevens B.M. et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression // Blood. – 2016. – V.128. – N.13. – P. 1671-1678.

4. Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management // BMC Cancer. – 2012. – V.12. – P. 304.

5. 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.

6. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. – 439 p.

7. 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.

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. – V.114. – N.5. – P. 937-952.

9. 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. – V.127. – N.20. – P. 2391-2405.

10. Metzeler K.H., Herold T., Rothenberg-Thurle M. et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia // Blood. – 2016. – V.128. – N.5. – P. 686-698.

11. Zebisch A., Lal R., Muller M. et al. Acute myeloid leukemia with TP53 germ line mutations // Blood. – 2016. – V.128. – N.18. – P. 2270-2272.

12. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology. – 2013. – P. 220-226.

13. Li Y., Zhu B. Acute myeloid leukemia with DNMT3A

REFERENCES:

1. Sergeev A.G., Ivanov R.A. Genetic diagnostics of leukemias. Ekaterinburg: USMA, 1998. 39 p. [In Russ.]

2. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The Cancer Genome Atlas Research Networ. NEJM. 2013. Vol. 368. No. 22. pp. 2059-2074.

3. Ho T.-C., LaMere M., Stevens B.M. et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. Blood. 2016. Vol. 128. No. 13. pp. 1671-1678.

4. Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al. Myeloid malignancies: mutations, models and management. BMC Cancer. 2012. Vol. 12. p. 304.

5. Sergeev A.G., Ivanov R.A., Fechina L.G. Diagnostic and prognostic impact of genetic abnormalities in the acute leukemia. Hematology and transfusiology. 2000. Vol. 45. No. 1. pp. 28-35. [In Russ.]

6. Swerdlow S. H., Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC, 2008. 439 p.

7. Vinogradov A. V. Clinical and diagnostic impact of genetic abnormalities in the acute myeloid leukemia program treatment. MD dissertation. Ekaterinburg, 2009. 114 p. [In Russ.]

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. No. 5. pp. 937-952.

9. 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. No. 20. pp. 2391-2405.

10. Metzeler K.H., Herold T., Rothenberg-Thurle M. et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood. 2016. Vol. 128. No. 5. pp. 686-698.

11. Zebisch A., Lal R., Muller M. et al. Acute myeloid leukemia with TP53 germ line mutations. Blood. 2016. Vol. 128. No. 18. pp. 2270-2272.

12. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology. – 2013. – P. 220-226.

13. Li Y., Zhu B. Acute myeloid leukemia with DNMT3A mutations. Leuk. & Lymph. 2014. Vol. 55. No. 9. pp. 2002-2012.

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

mutations // Leuk. & Lymph. – 2014. – V. 55. – N. 9. – P. 2002-2012.

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. 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.

16. Stein E.M. Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia // Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. – 2015. – P. 579-583.

17. Li S. Fighting fat in AML // Blood. – 2016. – V.128. – N.15. – P. 1910-1911.

18. 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.

19. 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.

20. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция внутренних тандемных дупликаций и точковых мутаций гена FLT3 при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2013. – №1. – С.64-66.

21. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций экзонов 12-13 гена ASXL1 при гемобластозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования // XXVII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 9-12 февраля 2015 г., М. – С. 148.

22. 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.

23. 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.

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. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. – Journal of Ural Medical Academic Science. 2013. No. 4. pp. 124-127. [In Russ.]

15. 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. Vol. 115. No. 3. pp. 453-474.

16. Stein E.M. Molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2015. pp. 579-583.

17. Li S. Fighting fat in AML. Blood. 2016. Vol. 128. No. 15. pp. 1910-1911.

18. 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. No. 13. pp. 2424-2431.

19. 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. [In Russ.]

20. 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. – Journal of Ural Medical Academic Science. 2013. No. 1. pp. 64-66. [In Russ.]

21. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. ASXL1 gene exons 12-13 mutations detection using automatic direct sequencing technique. XXVII International winter scientific school of young scientists “Perspektivnie napravleniya fisko-himicheskoy biologii I biotehnologii”, 9–12 February, 2015, Moscow. 148 p.

22. 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. Vol. 14. No. 1. pp. 18–23. [In Russ.]

23. 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. Vol. 19. No. 3. pp. 845–847. [In Russ.]

24. 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. Vol. 3. No. 1. pp. 22-243. [In Russ.]

25. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. Prognostic impact of TP53 mutations in the treatment

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918

24. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Комплексное 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.

25. 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.

26. 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.

27. Программное лечение заболеваний системы крови // Сборник алгоритмов диагностики и протоколов лечения заболеваний системы крови / Под ред. В. Г. Савченко. – М.: Практика, 2012. — 1056 с.

28. 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. – S.2. – С. 2-29.

29. 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.

30. Виноградов А.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Генсвязь» № 2016661500, 12.08.2016, выдано Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.

31. Kelley L.A., Sternberg M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server // Nat. Prot. – 2009. – V. 4. – N. 3. – P. 363-371.

32. Chan P.M. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model // Protein Cell. - 2011. - V. 2. - P. 108-115.

33. 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.

34. 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.

35. Dany M., Gencer S., Nganga R. et al. Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML // Blood. – 2016. – V.128. – N.15. – P. 1944-1958.

36. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 of acute leukemia. Journal of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS. 2013. Vol. 24. No. 2. pp. 33-40. [In Russ.]

26. 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. Vol. 28. No. 10. pp. 2731-2739.

27. Program treatment of hematologic diseases. Proceedings of diagnostic algorithms and treatment protocols of hematologic diseases. Ed. V. G. Savchenko. M.: Praktika, 2012. 1056 p. [In Russ.]

28. 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. Vol. 59. No. 2. pp. 2-29. [In Russ.]

29. 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. [In Russ.]

30. Vinogradov A. V. The certificate of state registration for the computer program «Gene link» N. 2016661500, 12.08.2016, issued by Russian federal bureau for intellectual property, patents and trademarks. [In Russ.]

31. Kelley L.A., Sternberg M.J.E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nat. Prot. 2009. Vol. 4. No. 3. pp. 363-371.

32. Chan P.M. Differential signaling of Flt3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. Protein Cell. 2011. Vol. 2. pp. 108-115.

33. 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. Vol. 485. No. 7397. pp. 260-263.

34. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. Blood. 2011. Vol. 118. pp. 60-68.

35. Dany M., Gencer S., Nganga R. et al. Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. Blood. 2016. Vol. 128. No.15. pp. 1944-1958.

36. 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. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. – Journal of Ural Medical Academic Science. 2015. No. 1. pp. 77-84. [In Russ.]

37. 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. Vol. 133. pp. 116-123.

DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

при острых миелоидных лейкозах с аберрантными кариотипами // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2015. – №1. – С.77-84.

37. 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.

38. 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

39. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2. – №2. – С. 29-40.

40. 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.

41. Jankowska A.M., Makishima H., Tiu R.V. et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A // Blood. – 2011. – V. 118. - N. 14. – P. 3932-3941.

42. Xu J., Wang Y.Y., Dai Y.J. et al. DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2014. – V. 111. - N. 7. – P. 2620-2625.

43. 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.

44. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia // Nature Rev. Clin. Oncology. – 2016. – V. 13. – P. 305–318.

45. 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. – N. 3. – P. 192 –199.

38. 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 akademicheskoi nauki – Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. 2016, no. 2, pp. 89-101. DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101 [In Russ.]

39. Mazurenko N.N., Tsyganova I.V. Molecular features and genetic markers of gastrointestinal stromal tumors. Advances in Modern Oncology. 2015. Vol. 2. No. 2. pp. 29-40. [In Russ.]

40. 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. Vol. 5. No. 8. p. a009100.

41. Jankowska A.M., Makishima H., Tiu R.V. et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. Blood. 2011. Vol. 118. No. 14. pp. 3932-3941.

42. Xu J., Wang Y.Y., Dai Y.J. et al. DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. Vol. 111. No. 7. pp. 2620-2625.

43. Grossmann V., Schnittger S., Kohlmann A. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. Blood. 2012. Vol. 120. pp. 2963-2972.

44. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. Nature Rev. Clin. Oncology. 2016. Vol. 13. pp. 305–318.

45. Grunwald M.R., Levis M.J. FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition as a Paradigm for Targeted Drug Development in Acute Myeloid Leukemia. Semin. Hematol. 2015. Vol. 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, 34 Б

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, Weiner str., 34b
a.vinogradov@egov66.ru

Rezaykin Alexey V.

print ISSN 2073-9125
on-line ISSN 2500-0918
vestnikural.ru

a.vinogradov@egov66.ru

Резайкин Алексей Васильевич
Уральский государственный медицинский университет
кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии, лаборатория молекулярной диагностики
к.м.н., доцент
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3
alexrez@usma.ru

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

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

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

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

Контактная информация автора, ответственного за переписку
Виноградов Александр Владимирович
a.vinogradov@egov66.ru

Contact information of the author responsible for correspondence
Vinogradov Alexander V.
a.vinogradov@egov66.ru

Дата поступления 08.11.2016

Received 08.11.2016

Образец цитирования:
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, DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51

For citation:
Vinogradov A.V., Rezaykin 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 [Primenenie tehnologii prjamogo avtomaticheskogo sekvenirovanija dlja detekcii mutacij genov ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 i WT1 pri ostryh mieloidnyh lejkozah c neutochnennym kariotipom] Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. – Journal of Ural Medical Academic Science. 2016, no. 4, pp. 38–51. DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-4-38-51 [In Russ.]