

УДК: 616-006.446.8

*А.В. Виноградов², Д.В. Изотов¹, А.В. Резайкин¹,
С.В. Сазонов^{1,3}, А.Г. Сергеев¹, С.Л. Леонтьев³*

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ FLT3 ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ БОЛЬНЫХ МОЛОДОГО И ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАСПРЕДЕЛЕННОЙ СЕТИ ПРЕДСКАЗАНИЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

¹ Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

² Свердловская областная клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Российская Федерация;

³ Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург, Российская Федерация

*A.V. Vinogradov², D.V. Izotov¹, A.V. Rezaykin¹,
S.V. Sazonov^{1,3}, A.G. Sergeev¹, S.L. Leontiev³*

MOLECULAR MODELING OF MUTANT FLT3 IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS AGED 15-45 AND 60-75 YEARS OLD

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

² Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N1, Yekaterinburg, Russian Federation;

³ Institute Medical Cells Technology, Yekaterinburg, Russian Federation

Резюме. Цель исследования — определить функциональные последствия мутаций в гене FLT3 при острых миелоидных лейкозах у больных молодого и пожилого возраста с использованием распределенной сети предсказания структуры белка. **Материалы и методы исследования.** Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 70 больных ОМЛ, в т.ч. 32 — в возрасте от 15 до 45 и 38 — от 60 до 75 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2009 по 2017 г. В исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ M0 наблюдалось трое пациентов, M1 — 6, M2 — 30, M3 — 4, M4 — 18, M4eo — 2, M5 — 3, M6 — 1, острый миелофиброз — 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2. Детекцию мутаций гена FLT3 проводили методом прямого автоматического секвенирования 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.** Частота детекции патогенетически значимых криптических мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 18–26 гена FLT3 у больных ОМЛ в возрасте 15–45 и 60–75 лет не имела статистически достоверных отличий и составляла в исследуемой группе 20,0%. Функциональная значимость выявленных мутаций гена FLT3 подтверждена при помощи молекулярного моделирования их последствий с использованием распределенной сети предсказания структуры белка. Определен механизм влияния выявленных мутаций на структуру и функциональные свойства белка Flt3 за счет нару-

Abstract. Aim: to estimate the functional implications of mutations in FLT3 gene in acute myeloid leukemia (AML) patients (pts) aged 15–45 and 60–75 years old using Protein Homology/Analogy Recognition Engine. **Materials and methods.** Bone marrow and peripheral blood samples obtained from 70 AML pts (including 32 aged 15 to 45 and 38 aged 60 to 75 years old), treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2009–2017. Distribution of the pts according to classification was as follows: AML M0 — 3, M1 — 6, M2 — 30, M3 — 4, M4 — 18, M4eo — 2, M5 — 3, M6 — 1, acute myelofibrosis — 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm — 1. Detection of mutations in FLT3 gene performed by automatic direct sequencing technique. Sequencing realized using automatic genetic analyzers ABI Prism 310 (Applied Biosystems, USA) and 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). **Results.** The average frequency of prognostic significant mutations in FLT3 gene among the treated AML pts was 20.0%, including 7 cases (21.9%) in young pts and 7 cases (18.4%) in old pts. Functional implications of mutations in FLT3 gene confirmed using Protein Homology/Analogy Recognition Engine. The mechanism of the mutation effect of mutations on the structure and functional properties of the protein Flt3 due to violations autoinhibitory conformation of the molecule with subsequent ligand-independent activation of the catalytic domains. Therefore, mutation status of the FLT3 gene should be considered for the development of personalized programs for the treatment of AML, including the use of tyrosinekinase inhibitors of types I and II, determining the medical indications for high-dose polychemotherapy, bone marrow transplantation and

шений аутоингибированной конформации молекулы с последующей лиганд-независимой активацией каталитических доменов. Следовательно, мутационный статус гена FLT3 необходимо учитывать для разработки персонализированных программ лечения ОМЛ, включающих применение ингибиторов тирозинкиназ I и II типов, определении медицинских показаний к высокодозной полихимиотерапии, трансплантации костного мозга и паллиативному лечению.

Ключевые слова: мутация, острый миелоидный лейкоз, ген FLT3, прямое автоматическое секвенирование, распределенная сеть предсказания структуры белка

palliative treatment.

Keywords: mutation, acute myeloid leukemia, FLT3 gene, direct sequencing, Protein Homology/Analogy Recognition Engine

Конфликт интересов отсутствует.

There is no conflict of interest.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Виноградов Александр Владимирович
a.vinogradov@egov66.ru

Contact information of the author responsible for correspondence:

Alexander V. Vinogradov
a.vinogradov@egov66.ru

Дата поступления 19.04.2018

Received 19.04.2018

Образец цитирования:

Виноградов А.В., Изотов Д.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г., Леонтьев С.Л. Молекулярное моделирование мутантных форм FLT3 при острых миелоидных лейкозах больных молодого и пожилого возраста с использованием распределенной сети предсказания структуры белка. Вестник уральской медицинской академической науки. 2018, Том 15, №3, с. 384–392, DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-3-384-392

For citation:

Vinogradov A.V., Izotov D.V., Rezaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G., Leontiev S.L. Molecular modeling of mutant FLT3 in acute myeloid leukemia patients aged 15-45 and 60-75 years old. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki. = Journal of Ural Medical Academic Science. 2018, Vol. 15, no. 3, pp. 384–392. DOI: 10.22138/2500-0918-2018-15-3-384-392 (In Russ)

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) представляют собой гетерогенную группу злокачественных новообразований системы крови, характеризующихся клональной пролиферацией в костном мозге и некоторых других тканях и органах, подвергшихся опухолевой трансформации кроветворных клеток-предшественниц, несущих поверхностные, цитоплазматические и ядерные миелоидные маркеры, что обуславливает развитие клинико-лабораторной симптоматики костномозговой недостаточности [1–4].

Установлено, что злокачественная трансформация кроветворных клеток обусловлена возникновением мутаций в ряде ключевых генов, продукты которых приводят к нарушению молекулярных механизмов внутриклеточной сигнализации, регуляции клеточного цикла и запрограммированной гибели, что обуславливает нарушение процессов пролиферации, дифференцировки клеток и экспансию опухолевого клона [6–8].

Согласно результатам современных исследований, к генам, наиболее часто мутирующим при ОМЛ, относятся FLT3 (39%), NPM1 (33%), DNMT3A (31%),

NRAS (22%), WT1 (13%), TP53 (9%) и другие. Соответственно, основные патогенетически значимые для развития ОМЛ мутации распределяются на несколько классов: активационные повреждения клеточных сигнальных путей (FLT3, NRAS, KIT), нуклеофозмина (NPM1), аппарата метилирования ДНК (DNMT3A, WT1), запрограммированной клеточной гибели (TP53) и другие [9–11]. Однако до настоящего времени детекция генных мутаций при ОМЛ не нашла широкого применения в организациях практического здравоохранения при оказании медицинской помощи больным онкогематологического профиля.

Цель исследования — определить функциональные последствия мутаций в гене FLT3 при острых миелоидных лейкозах у больных ОМЛ молодого и пожилого возраста с использованием распределенной сети предсказания структуры белка.

Материалы и методы исследований

Исследовали пробы костного мозга и перифериче-

ской крови 70 больных ОМЛ в возрасте от 15 до 75 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2009 по 2017 г. Среди пациентов в возрасте от 15 до 45 было 32 человека, от 60 до 75 лет — 38. В исследование было включено эквивалентное количество мужчин и женщин (по 35). Во всех случаях было получено добровольное информированное согласие больных на исследование.

Диагностику ОМЛ осуществляли, в соответствии с рекомендациями ВОЗ [6–9], на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования. По медицинским показаниям выполняли трепанобиопсию подвздошной кости с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием [12]. Морфологический вариант ОМЛ определяли согласно франко-американо-британской (FAB) классификации [7, 13]. В соответствии с этим, в исследуемой группе с морфологическим вариантом M0 наблюдалось трое больных, M1 — 6, M2 — 30, M3 — 4, M4 — 18, M4эо — 2, M5 — 3, M6 — 1, острый миелофиброз — 1, бластная плазматоидная дендритоклеточная опухоль — 2.

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование (полимеразная цепная реакция — ПЦР в реальном времени на t(8;21), inv(16), t(9;22), аномалии 11q23), на основании результатов которых они распределялись, в зависимости от характера выявленных хромосомных aberrаций, в подгруппы aberrантного, диплоидного и неуточненного кариотипа [7, 14].

Детекцию криптических генных мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3 осуществляли с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Праймеры, использованные для детекции указанных мутаций, описаны нами ранее [15–17].

Осуществляли выделение тотальной РНК из лейкозных blasts с последующей обратной транскрипцией и получением кДНК с использованием ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов («РЕВЕРТА-L», ФГБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, РФ). Участки кДНК, соответствующие исследуемым экзонам указанных генов, амплифицировали методом ПЦР [7]. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [15–17].

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили на автоматических генетических анализаторах ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США) и 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., 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 [18].

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 референсной для белка Flt3 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. [19, 20]

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы для ЭВМ «Биомод» [27–29]. Проверку статистических гипотез проводили с использованием точного критерия Фишера (F). Доверительные интервалы (ДИ) для средних частот мутаций генов определяли на основе биномиального распределения. [21].

Результаты исследования

Генетические изменения в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 относительно референсной последовательности NM_004119 были выявлены в 7 пробах больных ОМЛ в возрасте 15–45 лет (21,9%, при 95% ДИ от 11,0 до 38,8%), при морфологических вариантах M0, M2, M3 и M4 (таблица 1). Среди них в одном случае выявлялась несинонимичная нуклеотидная замена с. 1471 G>T (3,1%, при 95% ДИ от 0,5 до 15,7%), еще в одном — несинонимичная трансверсия с. 2522 A>T (3,1%, при 95% ДИ от 0,5 до 15,7%), в пяти (15,6%, при 95% ДИ от 6,8 до 31,7%) — внутренние tandemные дубликации (ITD) кодирующей последовательности юкстамембранного и киназного доменов (таблица 1). В группе больных старшей возрастной группы (60–75 лет) мутации в экзонах 12–15 и 19–21 гена FLT3 также определены в 7 пробах (18,4%, при 95% ДИ от 9,2 до 33,4%), при морфологических вариантах M1, M4 и M5 (таблица 2). Среди них в одном случае выявлялась несинонимичная трансверсия с. 2479 A>T (2,6%, при 95% ДИ от 0,5 до 13,4%), в шести (15,8% при 95% ДИ от 7,5 до 30,4%) — внутренние tandemные дубликации и инсерции в кодирующей последовательности юкстамембранного и киназного доменов. Точка дубликации и длина дублицирующегося фрагмента при FLT3 ITD варьировала в каждом из исследуемых образцов. В целом, они оказались наиболее частыми функционально значимыми генными мутациями, выявленными в исследуемой группе. При

этом степень вовлечения юкстамембранного и 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 [19, 20, 22, 23].

Таблица 1
Характеристика мутаций гена FLT3, выявленных у больных ОМЛ в возрасте от 15 до 45 лет
Table 1
FLT3 gene mutations in AML patients aged 15–45

Вариант по FAB / Option for FAB	Цитогенетический вариант / Cytogenetic variant	Результаты секвенирования / results sequencing	Локализация в кодирующей последовательности / Localization in the coding sequence	Чувствительность к ТКИ / Sensitivity to TKI
M2	46, XY, inv(16)	с. 1471 G>T V491L	Внеклеточный домен D5	ТКИ I типа
M2	45, X, t(8;21) (q22;q22), -Y	с. 2522 A>T N841I	Активационная петля	ТКИ I типа
M2	Диплоидия	ITD (инсерция) 51 п.о./1835 17 а.о./613	Тирозинкиназный домен 1, β1-лист	ТКИ I типа
M3	46, XX, t(15;17), inv(9) (p12;q12)	ITD 21 п.о./1821 7 а.о./607	Юкстамембранный домен, шарнирная область	ТКИ I типа
M3	46, XX, t(9;17), +8, -14	ITD 21 п.о./1779 7 а.о./593	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z	ТКИ I типа
M4	Диплоидия	ITD 93 п.о./1731 31 а.о./578	Юкстамембранный домен, мотив JM-B	ТКИ I типа
M4	Диплоидия	ITD 48 п.о./1758 16 а.о./587	Юкстамембранный домен, мотив JM-S	ТКИ I типа

* здесь и далее п.о. — число пар оснований вставки, цифра через дробь указывает ее положение в кодирующей последовательности транскрипта гена / here and below п.о. — the number of base pairs of the insert, the digit through the fraction indicates its position in the coding sequence of the gene transcript;

** а.о. — аминокислотные остатки, цифра через дробь указывает положение вставки в полипептидной цепи / а.о. — amino acid residues, the digit through the fraction indicates the position of the insert in the polypeptide chain;

Таблица 2
Характеристика мутаций гена FLT3, выявленных у больных ОМЛ в возрасте от 60 до 75 лет
Table 2
FLT3 gene mutations in AML patients aged 60–75

Вариант по FAB / Option for FAB	Цитогенетический вариант / Cytogenetic variant	Результаты секвенирования / results sequencing	Локализация в кодирующей последовательности / Localization in the coding sequence	Чувствительность к ТКИ / Sensitivity to TKI
M1	Низкая митотическая активность	ITD 54 п.о./1786 18 а.о./596	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z	ТКИ I типа
M4	Нормальный кариотип	с. 2479 A>T I827F	Тирозинкиназный домен II	ТКИ II типа
M4	48, XX,+13,+14 [6]/ 46, XX [5]	ITD 21 п.о./1784 7 а.о./595	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z	ТКИ I типа
M5	Низкая митотическая активность	ITD 27 п.о./1780 9 а.о./594	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z	ТКИ I типа
M1	Низкая митотическая активность	ITD 18 п.о./1794 6 а.о./598	Юкстамембранный домен, мотив JM-Z	ТКИ I типа
M4	47, XY, +8 [11]/ 46, XY [9]	ITD 111 п.о./1843 37 а.о./615	Тирозинкиназный домен I, β1-лист	ТКИ I типа*
M4	Низкая митотическая активность	ITD 27 п.о./1754 9 а.о./585	Юкстамембранный домен, мотив JM-S	ТКИ I типа

* [23].

Компьютерное 3D-моделирование мутантной структуры белка Flt3 с использованием распределенной сети предсказания структуры белка Phyre v. 2.0 показало, что FLT3 ITD, выявленные при анализе проб молодых больных ОМЛ M4 (таблица 1), способствовали 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). Дубликации, выявленные при анализе проб молодых пациентов с ОМЛ M3, не влияли на положение остатков тирозина, однако могли способствовать нарушению взаимодействия между αС-спиралью N-каталитического домена и мотивом JM-Z («zipper motif»), что особенно хорошо заметно в случае, затрагивающем шарнирную область домена — небольшой участок, включающий аминокислотные остатки в положениях 604-609 и отвечающий, наряду с застежкой между Tyr599 и Glu604, за корректную взаимную ориентацию мотива JM-Z и αС-спирали (рис. 1Б). Подобное нарушение приводило к повышению вероятности спонтанного изменения положения юкстамембранно-

го домена и лиганд-независимой активации каталитического центра белка. Аналогичная картина возникла и в случае дубликации 51 нуклеотида, начиная с положения 1835, при этом последовательность вставки была не полностью идентична основной последовательности, поэтому корректнее говорить об инсерции. 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 конформацию (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 ТКИ I типа [22, 23].

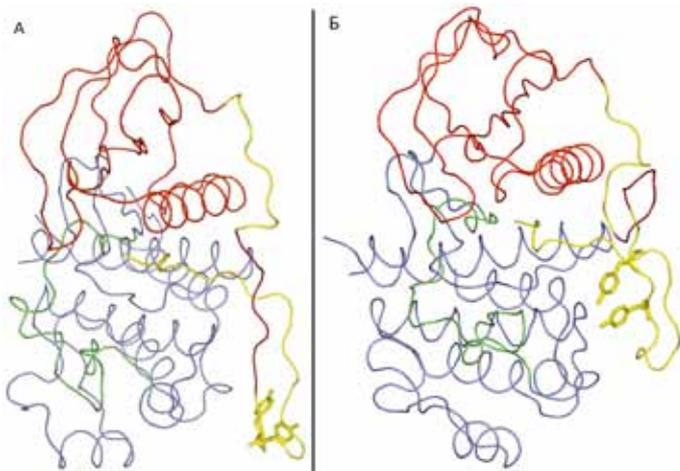


Рис. 1. Результаты моделирования третичной структуры мутантных белков Flt3 при ОМЛ М4 (А), М3 (Б).

Fig.1. 3D modeling of mutated Flt3 protein structure in AML M4 (A), M3 (B) patients.

Точечная мутация активационной петли с. 2522 A>T, определявшаяся в образце от больного ОМЛ М2 с t(8;21), приводила к нарушению системы водородных связей, стабилизирующих ее в «закрытой» конформации (DFG-out), характерной для аутоингибированного состояния. Являясь энергетически менее выгодной, она способствовала формированию конформации DFG-in и активации тирозинкиназы (рис. 2). Трансверсия с.1471G>T, выявленная в пробе при ОМЛ М2 с inv(16), обуславливала аминокислотную замену валина на лейцин в положении 491 во внеклеточном домене D5, участвующем в процессах димеризации рецептора и генерации нисходящих активирующих сигналов. В этом случае, несмотря на изначально интактность активационной петли, димеризация приводила к фосфорилированию ключевых остатков тирозина и формированию ее «открытой» конформации, что также обуславливало чувствительность к ТКИ I типа.

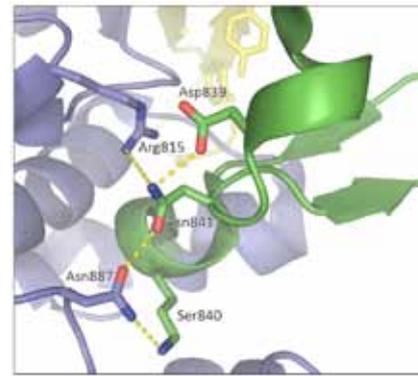


Рис. 2. Активационная петля стабилизирована в «закрытой» конформации при помощи системы водородных связей между функциональными группами аминокислотных остатков С-киназного домена и самой петли.

Fig. 2. The activation loop is stabilized in «closed» conformation by the hydrogen bond system between functional groups of amino acid residues of the C-kinase domain and the loop itself.

У пожилых больных при различных морфологических вариантах преобладающими (57,1% случаев) также являлись дубликации, нарушающие взаимодействие между α -спиралью N-каталитического домена и мотивом JM-Z. Кроме того, в одном случае ОМЛ М4 была выявлена так называемая non-JM-ITD, локализованная в β 1-листе тирозинкиназного домена I и вызывавшая вторичные изменения в конфигурации юкстамембранного домена, ведущие к утере последним способности к аутоингибированию белка. Также в одном случае ОМЛ М4 наблюдалась FLT3 ITD, способствовавшая изменению конфигурации мотива JM-S и остатков тирозина Tyr589 и Tyr591. Объединяет все эти мутации формирование активированной конформации (DFG-in) белка Flt3 и потенциальную чувствительность пациентов к таргетной терапии селективными ТКИ I типа. Однако, в одном случае ОМЛ М4 была выявлена точечная мутация тирозинкиназного домена II, приводящая к замене изолейцина на фенилаланин в позиции 827. Мутации собственно киназных доменов не затрагивают активационную петлю, но устраняют препятствие для свободного поворота N-домена относительно С-домена и последующей аутоактивации тирозинкиназы. Интактность петли в данном случае обуславливает наличие резистентности к ИТК I типа при сохраненной чувствительности к ингибиторам II типа.

При проведении стандартной программной полихимиотерапии цитарабином в сочетании с антрациклинами наличие функционально значимых мутаций в гене FLT3 ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом ОМЛ. Медиана общей вероятностной выживаемости больных ОМЛ с мутациями в экзонах 12–15

и 19–21 гена FLT3 не превышала 12 месяцев. В двух случаях была зафиксирована первичная резистентность опухоли, в пяти — ранняя летальность, еще в двух — рецидивы заболевания. При ОМЛ М2 с трансверсией с. 1471 G>T зафиксирована смерть в ремиссии после второго курса консолидации.

Кроме того, в двух случаях при ОМЛ в возрасте 15–45 лет (6,2%, при 95% ДИ от 1,8 до 20,2%) и в пяти (13,2% при 95% ДИ от 5,8 до 27,4%) — 60–75 лет определялись синонимичные однонуклеотидные замены с. 1683 A>G, не имеющие самостоятельного патогенетического значения при злокачественных опухолях крови [16].

Обсуждение результатов

Таким образом, функционально значимые мутации в кодирующих последовательностях экзонов 12–15 и 19–21 гена FLT3 были выявлены с использованием технологии прямого автоматического секвенирования в 14 исследованных биообразцах от (20,0%, при 95% ДИ от 12,3 до 30,8%), из них 7 — в группе больных ОМЛ в возрасте 15–45 лет (21,9%), еще 7 (18,4%) — у пациентов пожилого возраста. В целом, частота мутаций гена FLT3 у больных молодого и пожилого возраста статистически не отличалась.

Известно, что наличие некоторых криптических мутаций в генах является прогностически неблагоприятным молекулярным предиктором при ОМЛ [24–26]. Следовательно, их выявление при ОМЛ с благоприятным, промежуточным и неуточненным цитогенетическим прогнозом позволяло получить дополнительную оценку вероятности достижения молекулярной ремиссии и общей вероятностной выживаемости пациентов при проведении стандартной полихимиотера-

пии. При этом прогноз ОМЛ с криптическими генными мутациями FLT3 изменялся с благоприятного на промежуточный, а с промежуточного либо неуточненного — на неблагоприятный [8, 9, 12, 26].

Следовательно, необходимо учитывать полученные данные при планировании и разработке у больных ОМЛ молодого и пожилого возраста персонализированных программ противоопухолевого лечения, включающих назначение таргетных биофармацевтических препаратов, в т.ч. ингибиторов тирозинкиназ I и II типов, а также при определении медицинских показаний к проведению трансплантации костного мозга и паллиативному лечению [12,23,27].

Выводы

1. Частота детекции патогенетически значимых криптических мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 18–26 гена 12–15 и 19–21 гена FLT3 у больных ОМЛ в возрасте 15–45 и 60–75 лет не имела статистически достоверных отличий и составляла 20,0%.

2. Функциональная значимость выявленных мутаций гена FLT3 подтверждена при помощи молекулярного моделирования их последствий с использованием распределенной сети предсказания структуры белка.

3. Мутационный статус гена FLT3 при ОМЛ необходимо учитывать для разработки персонализированных программ лечения, включающих применение ингибиторов тирозинкиназ I и II типов, определении медицинских показаний к высокодозной полихимиотерапии, трансплантации костного мозга и паллиативному лечению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017. Vol. 130 (4). pp. 410-423.
2. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The Cancer Genome Atlas Research Network. *NEJM*. 2013. Vol. 368 (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 (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.
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., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Салахов Д.Р., Сергеев А.Г. Бластная плазмацитоидная

REFERENCES

1. Taylor J., Xiao W., Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017. Vol. 130 (4). pp. 410-423.
2. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. The Cancer Genome Atlas Research Network. *NEJM*. 2013. Vol. 368 (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 (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.
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., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Salakhov D.R., Sergeev A.G. Blastny plasmacytoid

дендритоклеточная опухоль: опыт диагностики и лечения в Свердловском областном онкогематологическом центре. Российский иммунологический журнал. 2017. Т.11. №2(20). С. 110-114.

8. Vardiman J.V., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009. Vol. 114 (5). pp. 937-952.

9. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. Vol. 127 (20). pp. 2391-2405.

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 (5). pp. 686-698.

11. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2013. pp. 220-226.

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

13. Walter R.B., Othus M., Burnett A.K. et al. Significance of FAB subclassification of «acute myeloid leukemia, NOS» in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. Vol. 121 (13). pp. 2424-2431.

14. 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. 89-101. DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-10119.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum

dendritokletochnaya tumor: the experience of diagnosis and treatment in the Sverdlovsk regional oncohematological center. *Russian Immunological Journal*. 2017. T.11. №2 (20). pp. 110-114. (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 (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 (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 (5). pp. 686-698.

11. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2013. pp. 220-226.

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

13. Walter R.B., Othus M., Burnett A.K. et al. Significance of FAB subclassification of «acute myeloid leukemia, NOS» in the 2008 WHO classification: analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Blood*. 2013. Vol. 121 (13). pp. 2424-2431.

14. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 AND WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique // Bulletin of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]. 2016. no. 4. pp. 77-84. (In Russ.)

15. Vinogradov A. V. Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 during acute myeloid leukemia [Razrabotka tehnologii detekcii mutatsiy genov CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 pri ostrih myeloidnih leukozah]. *Russian Journal of Oncology [Rossiyskiy Onkologicheskiy zhurnal]*. 2013. no. 4. pp. 34-35. (In Russ.)

16. 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 [Detektsiya vnutrennih tandemnyih duplikatsiy i tochkovyih mutatsiy gena FLT3 pri ostrih myeloidnyih leukozah metodom pryamogo avtomaticheskogo sekvenirovaniya]. *Bulletin of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2013. no. 1. pp. 64-66. (In Russ.)

17. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. TP53, FLT3, KIT, N-RAS, NPM1 and WT1 gene mutations

likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011. Vol. 28 (10). pp. 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.

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

20. 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 (7397). pp. 260-263.

21. Виноградов А.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Биомод» № 2017661500, 12.08.2017, выдано Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.

22. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. *Blood.* 2011. Vol. 118 (1). pp. 60-68.

23. Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R. et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2009. Vol. 113 (17). pp. 4074-4077.

24. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов FLT3, KIT, NRAS, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с абберрантными кариотипами // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2015. - №1. - С. 77-84.

25. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и соавт. Детекция мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с нормальным кариотипом бластных клеток // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2016. - №2. - С. 89-101. DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101

26. Grossmann V., Schnittger S., Kohlmann A. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood.* 2012. Vol.120 (15). pp. 2963-2972.

27. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. *Nature Rev. Clin. Oncology.* 2016. Vol. 13 (5). pp. 305-318.

complex investigation in acute myeloid leukemia using direct sequencing method [Комплексное исследование мутаций генов TP53, FLT3, KIT, N-RAS, NPM1 и WT1 при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого секвенирования]. *Biomics [Biomika].* 2012. Vol.3. no. 1. pp. 22-243. (In Russ.)

18. 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 (10). pp. 2731-2739.

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

20. 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 (7397). pp. 260-263.

21. Vinogradov A. V. The certificate of state registration for the computer program «Biomod» no. 2017661500, 12.08.2017, issued by Russian federal bureau for intellectual property, patents and trademarks. (In Russ.)

22. Verstraete K., Vandriessche G., Januar M. et al. Structural insights into the extracellular assembly of the hematopoietic Flt3 signaling complex. *Blood.* 2011. Vol. 118 (1). pp. 60-68.

23. Breitenbuecher F., Schnittger S., Grundler R. et al. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Blood.* 2009. Vol. 113 (17). pp. 4074-4077.

24. 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 [Detektsiya mutatsiy genov FLT3, KIT, NRAS, TP53 i WT1 pri ostryih mieloidnyih leykozah s aberrantnyimi kariotipami]. *Bulletin of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki].* 2015. no. 1. pp. 77-84. (In Russ.)

25. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salahov D.R. et al. DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS NPM1, TP53 and WT1 genes point mutations detection in acute myeloid leukemia with normal karyotype [Detektsiya mutatsiy genov DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS, NPM1, TP53 i WT1 pri ostryih mieloidnyih leykozah s normalnyim kariotipom blastnyih kletok]. *Bulletin of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki].* 2016. no. 1. pp. 77-84. (In Russ.) DOI: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101.

26. Grossmann V., Schnittger S., Kohlmann A. et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood.* 2012. Vol. 120 (15). pp. 2963-2972.

27. Coombs C.C., Tallman M.S., Levine R.S. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. *Nature Rev. Clin. Oncology.* 2016. Vol. 13 (5). pp. 305-318.

Авторы

Виноградов Александр Владимирович
Свердловская областная клиническая больница №1
К.м.н., главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области
Российская Федерация, 620014, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, д. 34б
a.vinogradov@egov66.ru

Изотов Денис Владимирович

Уральский государственный медицинский университет
Клинический ординатор
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
phoenus@yandex.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, д. 3
alexrez@usma.ru

Сазонов Сергей Владимирович

Уральский государственный медицинский университет
кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии
д.м.н., профессор, заведующий кафедрой
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
sazonov@usma.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
Российская Федерация, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3
sergeev@usma.ru

Леонтьев Сергей Леопольдович

Институт медицинских клеточных технологий
Д.м.н., профессор, главный врач
Российская Федерация, 620137, г. Екатеринбург, ул. Вилонова, 76а
imct@celltechnologies.ru

Authors

Alexander V. Vinogradov
Sverdlovsk Regional Hospital №1
Cand.Sci. (Med.), Chief Therapist
Russian Federation, 620014, Yekaterinburg, Weiner str., 34b
a.vinogradov@egov66.ru

Denis V. Izotov

Ural State Medical University
Intern
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
phoenus@yandex.ru

Alexey V. Rezaykin

Ural State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Laboratory of Molecular Diagnostic
Cand.Sci. (Med.), Professor Assistant
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
alexrez@usma.ru

Sergey V. Sazonov

Ural State Medical University, Department of Histology, Cytology and Embryology, Institute of Medical Cell Technologies
Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief of the Department
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
sazonov@usma.ru

Alexander G. Sergeev

Ural State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Laboratory of Molecular Diagnostic
Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief of the Department, Scientific Chief of the Laboratory
Russian Federation, 620028, Yekaterinburg, Repin str., 3
sergeev@usma.ru

Sergey L. Leontiev

Institute of Medical Cell Technologies
Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Institute of Medical Cell Technologies
Russian Federation, 620137, Yekaterinburg, ul. Vilonova 76a
imct@celltechnologies.ru