

УДК: 616-006.446.8

*А.В. Виноградов<sup>1</sup>, А.В. Резайкин<sup>2</sup>, С.В. Сазонов<sup>2, 3</sup>, А.Г. Сергеев<sup>2</sup>*  
**ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ХРОМОСОМНЫХ И ГЕННЫХ  
МУТАЦИЙ ПРИ ОСТРЫХ МИЕЛОИДНЫХ ЛЕЙКОЗАХ ВЗРОСЛЫХ**

<sup>1</sup>ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1»,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет,  
г. Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

*A.V. Vinogradov<sup>1</sup>, A.V. Rezaykin<sup>2</sup>, S.V. Sazonov<sup>2, 3</sup>, A.G. Sergeev<sup>2</sup>*  
**AGE-RELATED FEATURES OF CHROMOSOMAL  
AND GENE MUTATIONS IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN ADULTS**

<sup>1</sup>Sverdlovsk Regional Clinical Hospital No.1, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of medical cell technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

**Резюме. Цель исследования** — определить возрастные особенности хромосомных и генных мутаций при острых миелоидных лейкозах взрослых.

**Материалы и методы исследования.** Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 145 больных ОМЛ, в т.ч. 36 — в возрасте от 15 до 45, 55 — от 45 до 60, 54 — старше 60 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2009 по 2019 г. В исследуемой группе с морфологическим вариантом ОМЛ М0 наблюдалось 6 пациентов (4,1%), М1 — 10 (6,9%), М2 — 63 (43,5%), М3 — 13 (9,0%), М4 — 35 (24,1%), М4ео — 3 (2,1%), М5 — 4 (2,8%), М6 — 6 (4,1%), М7 — 1 (0,7%), острый миелофиброз — 1 (0,7%), острый гибридный лейкоз (миело/лимфо) — 1 (0,7%), бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2 (1,4%).

Детекцию мутаций в генах FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 проводили методом прямого автоматического секвенирования. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием программного продукта MEGA, v. 5.0.

**Результаты исследования.** Установлено, что средняя частота мутаций в кодирующих последовательностях экзона 12 гена NPM1 и экзонов 5-9 гена TP53 имела при ОМЛ статистически достоверные возрастные отличия. Это обуславливало статистически значимое 4,5-кратное уменьшение доли больных ОМЛ с благоприятным генетическим прогнозом в возрастной группе 60 лет и старше (до 3,7%). Это существенно ограничивало эффективность использования традиционных схем полихимиотерапии для достижения стойкой продолжительной ремиссии. При этом отмечалось статистически значимое 4,5-кратное увеличение доли больных ОМЛ с неуточненным генетическим прогнозом в возрастной группе старше 45 лет. Последнее может указывать на значимую роль механизмов онкогенеза,

**Abstract. Aim:** to estimate the age-related features of chromosomal and gene mutations in adults acute myeloid leukemia (AML).

**Materials and methods.** Bone marrow and peripheral blood samples obtained from 145 AML pts (including 36 aged 15 to 45, 55 aged 45-60, 54 aged over 60 years old), treated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2009–2019. Distribution of the pts according to FAB-classification was as follows: AML M0 — 6, M1 — 10, M2 — 63, M3 — 13, M4 — 35, M4eo — 3, M5 — 4, M6 — 6, M7 — 1, acute myelofibrosis — 1, acute hybrid (myelo/lympho) leukemia — 1, blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm — 2.

Detection of mutations performed using G-banding, real time — polymerase chain reaction and 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.** It was found that the average mutation rate in the coding sequences of exon 12 of NPM1 gene and exons 5-9 of TP53 gene had statistically significant age differences in AML. This resulted in a statistically significant 4.5-fold decrease in the proportion of AML patients with a favorable genetic prognosis in the age group of 60 years and older to 3.7%. This does not allow the effective use of traditional polychemotherapy regimens to achieve stable long-term remission. In addition, there was a statistically significant 4.5-fold increase in the proportion of AML patients with unspecified genetic prognosis in the age group older than 45 years. This indicate the leading role of oncogenic pathways, detection of defects in which by traditional cytogenetic, PCR and direct sequencing methods is difficult.

детекция дефектов в которых традиционными цитогенетическим, ПЦР и методами прямого секвенирования затруднена.

**Ключевые слова:** острый миелоидный лейкоз, хромосомная aberrация, генная мутация, ген FLT3, ген KIT, ген NPM1, ген NRAS, ген TP53, ген WT1

**Keywords:** acute myeloid leukemia, chromosomal aberration, gene mutation, FLT3 gene, KIT gene, NPM1 gene, NRAS gene, TP53 gene, WT1 gene

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Виноградов Александр Владимирович

a.vinogradov@egov66.ru

Дата поступления 16.12.2019 г.

Образец цитирования:

Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Возрастные особенности хромосомных и генных мутаций при острых миелоидных лейкозах взрослых. Вестник уральской медицинской академической науки. 2019, Том 16, №4, с. 422–431, DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-4-422-431

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Alexander V. Vinogradov

a.vinogradov@egov66.ru

Received 16.12.2019

For citation:

Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Age-Related Features of Chromosomal and Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia in Adults. Vestn. Ural. Med. Akad. Nauki.=Journal of Ural Medical Academic Science. 2019, Vol. 16, no. 4, pp. 422–431. DOI: 10.22138/2500-0918-2019-16-4-422-431 (In Russ).

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) являются гетерогенной группой злокачественных новообразований системы крови, развивающихся преимущественно у взрослых, тогда как острые лимфобластные лейкозы более характерны для детей. Заболеваемость ОМЛ коррелирует с возрастом пациентов и достигает популяционного максимума у лиц старше 80 лет. Международные исследования, проведенные с использованием технологий массового параллельного секвенирования, выявили, что латентные мутации в некоторых прото- и антионкогенах, специфические для ОМЛ, выявляются в лейкоцитах здоровых доноров, начиная с возраста 40-50 лет. При этом доля популяции лейкоцитов, содержащих указанные мутации, тоже увеличивается с возрастом и ассоциирована с повышенным риском развития ОМЛ, который, тем не менее, не превышает 10% за 10 лет наблюдения. Однако риск злокачественной трансформации возрастает в 4-5 и более раз при увеличении в лейкоцитах числа генов, несущих специфические мутации. Соответственно, рассматривается трехэтапная схема развития ОМЛ: 1) доклиническая стадия, 2) стадия клональной болезни и 3) трансформация в злокачественную опухоль [1-5]. То есть, молекулярный онкогенез ОМЛ у взрослых больных молодого, зрелого, пожилого и старческого возрастов может быть различным [6]. Следовательно, исследование возрастных особенностей молекулярного повреждения основных прото- и антионкогенов, а также хромосомных aberrаций при ОМЛ у лиц разного возраста может быть актуальным для разработки подходов к противоопухолевому лечению, дифференцированных в зависимости от возраста заболевших.

**Цель исследования** — определить возрастные особенности хромосомных и генных мутаций при острых

Acute myeloid leukemia (AML) is a group of genetically heterogeneous malignant blood diseases, more common in adults while acute lymphoblastic leukemia is more common in children. The incidence of AML correlates with the age of patients, affecting people over 80 years. Worldwide studies using next-generation sequencing technologies have revealed that latent mutations in some proto and anti-oncogenes specific for AML are detected in the leukocytes of healthy donors over 40-50 years. Leukocyte populations containing these mutations increases with age and associated with an increased risk of AML, which, however, does not exceed 10% over 10 years of observation. However, the risk of malignant transformation increases by 4-5 or more times with an increase in the number of genes carrying specific mutations in leukocytes. Accordingly, there are 3 stages of AML development AML: pre-clinical stage, stage of clonal disease and malignancy [1-5]. The oncogenesis of AML in adult patients of young, mature, elderly and senile ages can be different [6]. Therefore, the study of age-related features of molecular damage to the main proto- and anti-oncogenes, as well as chromosomal aberrations in AML in people of different ages may be relevant for the development of approaches to antitumor treatment, differentiated depending on the age of the onset of disease.

**Aim:** to estimate the age-related features of chromosomal and gene mutations in adults acute myeloid leukemia (AML) using direct sequencing technique, G-banding and real time – polymerase chain reaction.

#### Materials and methods

Bone marrow and peripheral blood samples obtained from 145 AML pts (70 males and 75 females, including 36 aged 15 to 45, 55 aged 45-60, 54 aged over 60 years old;),

миелоидных лейкозах взрослых с использованием методов прямого автоматического секвенирования, цитогенетики и полимеразной цепной реакции.

### Материалы и методы исследований

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 145 больных ОМЛ в возрасте от 15 до 82 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2009 по 2019 г. Среди пациентов в возрасте от 15 до 45 было 36 человек, от 45 до 60–55, старше 60–54. В исследование было включено 70 мужчин и 75 женщин. Во всех случаях было получено добровольное информированное согласие больных на исследование.

Диагностику ОМЛ осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [7-9], 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 [10]. Морфологический вариант ОМЛ определяли с учетом франко-американо-британской (FAB) классификации [11]. Всего в исследуемой группе с морфологическим вариантом M0 наблюдалось 6 больных (4,1%), M1 — 10 (6,9%), M2 — 63 (43,5%), M3 — 13 (9,0%), M4 — 35 (24,1%), M4eo — 3 (2,1%), M5 — 4 (2,8%), M6 — 6 (4,1%), M7 — 1 (0,7%), острый миелофиброз — 1 (0,7%), острый гибридный лейкоз (миело/лимфо) — 1 (0,7%), бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль — 2 (1,4%).

Всем пациентам выполнено цитогенетическое и/или молекулярно-генетическое исследование лейкозных клеток аспирата костного мозга (полимеразная цепная реакция — ПЦР в реальном времени на t(8;21), inv(16), t(9;22), аномалии 11q23), на основании результатов которых больные распределялись в подгруппы aberrantного, нормального и неуточненного кариотипов [12-14].

Детекцию мутаций в кодирующих последовательностях экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3, экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT, экзонов 9-12 гена NPM1, экзонов 1-4 гена NRAS, экзонов 4-11 гена TP53, экзонов 6-9 гена WT1 осуществляли с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. Всего на наличие мутаций в кодирующих последовательностях гена FLT3 исследованы 133 пробы, гена TP53 — 112, NPM1 — 100, KIT — 95, NRAS — 81, WT1 — 77. Оригинальные последовательности праймеров, использованных для выявления точечных мутаций в указанных генах, были опубликованы ранее [15-18].

Выделение тотальной РНК из лейкозных бластов с последующей обратной транскрипцией и получением кДНК осуществляли с использованием ревертазы M-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью. Участки кДНК, соответствующие исследуемым экзонам указанных генов, ам-

тreated in Sverdlovsk Regional Hematological Centre during the period 2009–2019. Informed consent from all patients was obtained.

AML was diagnosed in accordance with WHO recommendations [7–9] based on the clinical presentations, cytological analysis of blood and bone marrow, cytochemical and immunophenotypic studies. Trepine biopsies was performed according to medical indications with subsequent histological and immunohistochemical examination [10]. The subtypes of AML determined by the French-American-British classification (FAB) [11]. Accordingly, there were 6 patients (4.1%) with the morphological variant AML M0, M1 — 10 (6.9%), M2 — 63 (43.5%), M3 — 13 (9.0%), M4 — 35 (24.1%), M4eo — 3 (2.1%), M5 — 4 (2.8%), M6 — 6 (4.1%), M7 — 1 (0.7%), acute myelofibrosis — 1 (0.7%), acute hybrid leukemia (myelo/lymph) — 1 (0.7%), blast plasmacytoid dendritic cell neoplasm — 2 (1.4%).

All patients were obtained by cytogenetic and / or molecular genetic studies of bone marrow aspirate leukemia cells (polymerase chain reaction — real-time PCR at t(8;21), inv(16), t(9;22), abnormalities 11q23), based on the results of which patients were divided into subgroups of aberrant, normal and unspecified karyotypes [12-14].

Detection of mutations in the coding sequences of exons 12-15 and 19-21 of the FLT3 gene, exons 7-12 and 16-19 of the KIT gene, exons 9-12 of the NPM1 gene, exons 1-4 of the NRAS gene, exons 4-11 of the TP53 gene, exons 6-9 gene WT1 performed using direct sequencing technique.

Extraction of total RNA from leukemic blasts followed by reverse transcription and cDNA production was performed using M-MLV revertase and random sequence hexanucleotide primers. Plots of cDNA corresponding to the studied exons of these genes were amplified by PCR. Analysis of the amplification products was performed by electrophoresis followed by detection in an ultraviolet transilluminator [15-18].

Sequencing of amplified fragments were performed using ABI Prism 310 (Applied Biosystems, USA) and 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) automated genetic analyzers in forward and reverse sequences according to the manufacturer's recommendations. Segment matching, alignment and comparison of nucleotide and amino acid sequences was performed using the MEGA computer program, version 5.0 [19].

AML patients was treated according to clinical protocols developed by the Russian group for the study of acute leukemia [20]. Treatment regimens were included 3-4 courses of intensive polychemotherapy followed by supportive treatment. Patients who had medical contraindications for program chemotherapy received 6-mercaptopurine and / or hydroxycarbamide.

Statistical analysis was by the computer program «Biomod». Statistical hypotheses were tested using Fisher's exact test (F). Confidence intervals (CI) for the

плифицировали методом ПЦР. Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе [15-18].

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 [19].

Больные ОМЛ получали лечение по клиническим протоколам, разработанным Российской группой по изучению острых лейкозов [20], в которых использовались 3-4 курса интенсивной полихимиотерапии с последующим поддерживающим противоопухолевым лечением. Пациенты, имевшие медицинские противопоказания к программной химиотерапии, получали 6-меркаптопурин и/или гидроксикарбамид.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программы для ЭВМ «Биомод». 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

Наиболее частым типом хромосомных aberrаций в исследуемой группе пациентов являлись комплексные хромосомные aberrации (n=24, 16,6%, при 95% ДИ от 11,4 до 23,4%). В 12,4% случаев (n=18, при 95% ДИ от 8,0 до 18,8%) определялись структурные мутации хромосом, ассоциированные с благоприятным прогнозом (инверсия inv(16)(q24;q11), транслокации t(8;21)(q22;q22) и t(15;17)(q22;q11). Изолированные специфические хромосомные aberrации, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом выявлены у 7 больных (4,8%, при 95% ДИ от 2,4 до 9,6%). В большинстве же образцов (n=78, 53,8%, ДИ от 45,7 до 61,7%) определить хромосомные мутации в аспиратах костного мозга не удалось – у эквивалентного количества пациентов определялись нормальный либо неуточненный кариотип лейкоэмических бластов (n=39, 26,9%, при 95% ДИ от 20,3 до 34,6%).

Частота встречаемости структурных мутаций хромосом, ассоциированных с благоприятным прогнозом, была максимальной в группе больных моложе 45 лет (n=8, 22,2%, при 95% ДИ от 11,7 до 38,1%) и статистически значимо уменьшалась с возрастом (F=0,02, p<0,05). Аналогичная возрастная динамика определялась для изолированных специфических aberrаций, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом (n=5, 13,9%, при 95% ДИ от 6,1 до 28,7%, F=0,05, p<0,05, рис. 1).

average frequencies of gene mutations were determined based on the binomial distribution. [21].

### Results

The most common type of chromosomal aberration was complex chromosomal aberration (n=24, 16.6%, with 95% CI from 11.4 to 23.4%). In 12.4% of cases (n=18, with 95% CI from 8.0 to 18.8%), structural chromosome mutations were identified associated with a favorable prognosis (inversion inv (16) (q24; q11), translocation t (8 ; 21) (q22; q22) and t (15; 17) (q22; q11). Isolated specific chromosome aberrations associated with an unfavorable prognosis were identified in 7 patients (4.8%, with 95% CI from 2.4 to 9.6%). In the majority of cases (n=78, 53.8%, CI from 45.7 to 61.7%), chromosomal mutations in bone marrow aspirates were not determined, in an equivalent number of patients, normal or unspecified leukemic karyotype was determined (n=39, 26.9%, with 95% CI from 20.3 to 34.6%).

The frequency of structural mutations of chromosomes associated with a favorable prognosis (n=8, 22.2%, with 95% CI from 11.7 to 38.1%) and statistically significantly decreased with age younger than 45 (F=0.02, p<0.05). A similar age-related dynamics was determined for isolated specific aberrations associated with an unfavorable prognosis (n=5, 13.9%, at 95% CI from 6.1 to 28.7%, F=0.05, p<0.05, Fig. 1).

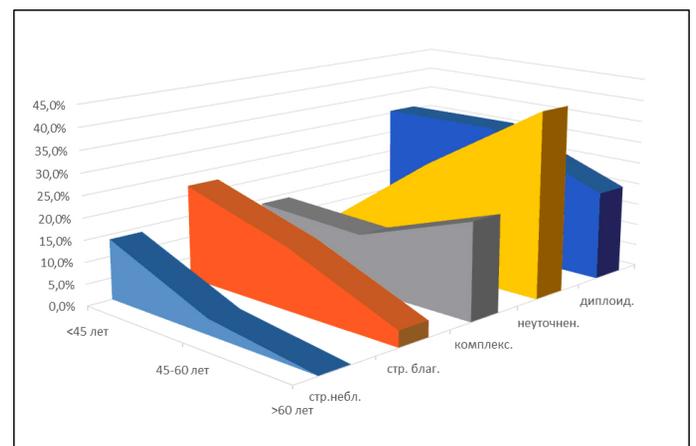


Fig.1. Age-dependent features of the frequency of chromosomal mutations in AML.

It was not possible to identify statistically significant differences in the frequency of complex chromosomal mutations and diploidy in the studied age groups, which may be due to the small sample size. At the same time, the frequency of complex genetic abnormalities tended to increase slightly in the age group of patients with AML over 60 years old (n=12, 22.2%, with 95% CI from 13.2 to 35.0%), and diploidy — to decrease (n=11, 20.4%, with 95% CI from 11.8 to 32.9%).

The frequency of cytogenetic detection of the unspecified karyotype of leukemic blasts was the highest in patients over 60 years old (n=23, 42.6%, with 95% CI from 30.3 to 55.8%) and statistically significantly increased with

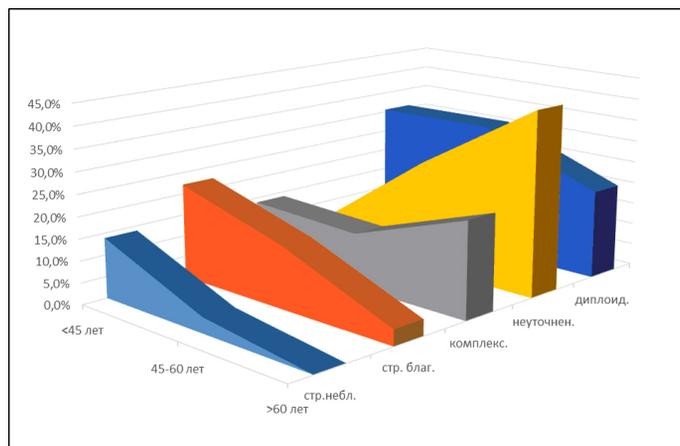


Рис. 1. Возрастные особенности частоты хромосомных мутаций при ОМЛ.

Статистически значимых отличий в частоте комплексных хромосомных мутаций и диплоидии в исследуемых возрастных группах выявить не удалось, что может быть обусловлено малым размером выборки. При этом частота комплексных генетических аномалий имела тенденцию к некоторому увеличению в возрастной группе больных ОМЛ старше 60 лет ( $n=12$ , 22,2%, при 95% ДИ от 13,2 до 35,0%), а диплоидии — к снижению ( $n=11$ , 20,4%, при 95% ДИ от 11,8 до 32,9%).

Частота выявления при цитогенетическом исследовании неуточненного кариотипа лейкозных бластов была максимальной в возрастной группе ОМЛ старше 60 лет ( $n=23$ , 42,6%, при 95% ДИ от 30,3 до 55,8%) и статистически значимо увеличивалась с возрастом пациентов ( $F=0,06$ ,  $p=0,05$ , рис. 1), что могло быть обусловлено биологическими особенностями исследуемых образцов костного мозга (меньшая клеточность аспирата, низкий пролиферативный потенциал лейкозных бластов) [12].

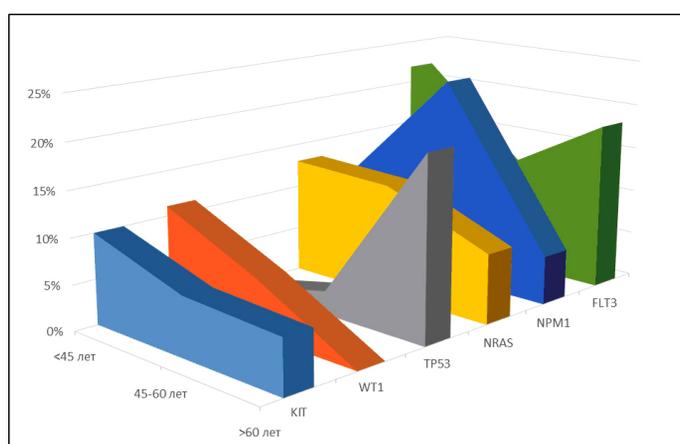


Рис. 2. Возрастные различия частот мутаций в генах KIT, WT1, TP53, NRAS, NPM1, FLT3 при ОМЛ.

Среди исследуемых прото- и антионкогенов с наибольшей частотой мутации определялись в кодирующей последовательности экзонов 12-15 и 19-21 гена FLT3 — 16,5% ( $n=22$ , при 95% ДИ от 11,4 до 23,4%), из

age of patients ( $F=0,06$ ,  $p=0,05$ , Fig. 1), which could be due to the biological features of the studied bone marrow samples (lower cellularity of the aspirate, low proliferative potential of leukemic blasts) [12].

Among the proto- and anti-oncogenes studied, the mutations with the highest frequency were determined in the coding sequence of exons 12–15 and 19–21 of the FLT3 gene — 16.5% ( $n=22$ , at 95% CI from 11.4 to 23.4%), from dominated by internal tandem duplications ( $n=18$ , 13.5%, with 95% CI from 8.7 to 20.4%). Less common were non-synonymous single nucleotide substitutions in the coding sequence of tyrosine kinase domains ( $n=4$ , 3.0%, with 95% CI from 1.2 to 7.5%). There were no statistically significant differences in the distribution of FLT3 mutations in the studied age groups (Fig. 2).

Tetranucleotide insertions in exon 12 of the NPM1 gene, associated with a favorable prognosis of AML [10], were determined in 13.0% of cases ( $n=13$ , with 95% CI from 7.8 to 21.0%). Their frequency was maximum in the group of patients over 45-60 years ( $n=8$ , 22.9%, with 95% CI from 12.1 to 39.0%), minimal — in elderly patients ( $n=2$ , 5.4%, at 95% CI from 1.5 to 17.7%), and the differences were statistically significant ( $F=0.04$ ,  $p<0.05$ , Fig. 2).

Functionally significant genetic changes in the coding sequence of exons 1-4 of the NRAS gene associated with an unfavorable prognosis [18] were detected in 11.1% of AML cases ( $n=9$ , with 95% CI from 6.0 to 19.8%), statistically significant age differences in their incidence were not revealed.

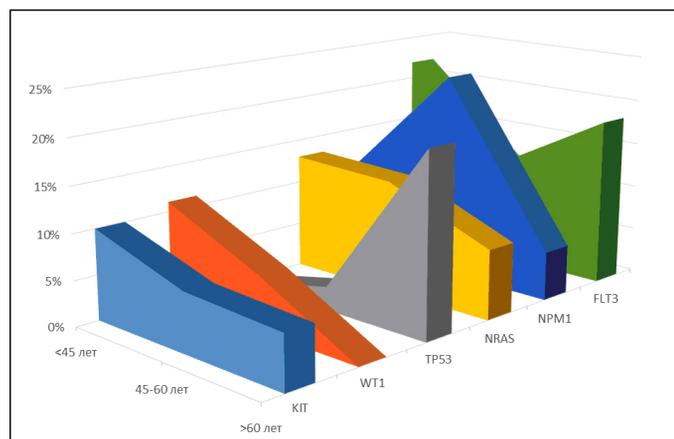


Fig.2. Age-dependent differences of the frequency of KIT, WT1, TP53, NRAS, NPM1 and FLT3 mutations in AML.

The average mutation frequency in the coding sequence of exons 4-11 of the TP53 anti-oncogene (including the DNA-binding domain) was 8.9% ( $n=10$ , with 95% CI from 4.9 to 15.7%) and had a significant age dynamics ( $F=0.00$ ,  $p<0.05$ , Fig. 2). In the group of patients younger than 45 years, these mutations were not determined, in the age group of 45-60 years were detected in one observation (2.6%, with 95% CI from 0.5 to 13.5%), in elderly patients — in 9 (20.0%, with 95% CI from 10.9 to 33.8%). Mutations were represented by non-synonymous substitutions, deletions and insertions, localized in exons 5-9. As a rule,

которых преобладали внутренние tandemные дубликации ( $n=18$ , 13,5%, при 95% ДИ от 8,7 до 20,4%). Реже встречались несинонимичные однонуклеотидные замены в кодирующей последовательности тирозинкиназных доменов ( $n=4$ , 3,0%, при 95% ДИ от 1,2 до 7,5%). Статистически значимых различий в распределении FLT3 мутаций в исследуемых возрастных группах не выявлено (рис. 2).

Тетрануклеотидные инсерции в экзоне 12 гена NPM1, ассоциированные с благоприятным прогнозом ОМЛ [10], определялись в 13,0% наблюдений ( $n=13$ , при 95% ДИ от 7,8 до 21,0%). Их частота была максимальной в группе пациентов в возрасте 45-60 лет ( $n=8$ , 22,9%, при 95% ДИ от 12,1 до 39,0%), минимальна — у пациентов пожилого и старческого возраста ( $n=2$ , 5,4%, при 95% ДИ от 1,5 до 17,7%), при этом различия являлись статистически достоверными ( $F=0,04$ ,  $p<0,05$ , рис. 2). Однако в целом, частота выявления мутаций в гене NPM1 в исследуемой выборке была ниже, чем в других исследованиях, что может быть обусловлено особенностями ее цитогенетического профиля (рис. 1). Функционально значимые генетические изменения в кодирующей последовательности экзонов 1-4 гена NRAS, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом [18], определялись в 11,1% случаев ( $n=9$ , при 95% ДИ от 6,0 до 19,8%), статистически значимых возрастных отличий в частоте их встречаемости не выявлено.

Средняя частота мутаций в кодирующей последовательности экзонов 4-11 антионкогена TP53 (включая ДНК-связывающий домен) составляла 8,9% ( $n=10$ , при 95% ДИ от 4,9 до 15,7%) и имела ярко выраженную возрастную динамику ( $F=0,00$ ,  $p<0,05$ , рис. 2). В группе больных моложе 45 лет указанные мутации не определялись, в возрастной группе 45-60 лет выявлялись в одном наблюдении (2,6%, при 95% ДИ от 0,5 до 13,5%), у больных пожилого и старческого возраста — в 9 (20,0%, при 95% ДИ от 10,9 до 33,8%). Мутации были представлены несинонимичными заменами, делециями и инсерциями, локализовались в экзонах 5-9. Как правило, мутации в гене TP53 сочетались с комплексными аномалиями кариотипа (7 случаев), реже — с неуточненным кариотипом ( $n=2$ ) и диплоидией ( $n=1$ ).

Генетические изменения в кодирующей последовательности экзонов 7-12 и 16-19 гена KIT определялись в 7,4% наблюдений ( $n=7$ , при 95% ДИ от 3,6 до 14,4%) и были представлены несинонимичными заменами нуклеотидов и делециями. Статистически значимых возрастных различий в частоте этих мутаций не было выявлено, во всех исследуемых группах она варьировала в пределах 5,9-10,0%.

Частота мутаций в антионкогене WT1 составила 5,2% ( $n=4$ , при 95% ДИ от 2,0 до 12,6%), и имела статистически незначимую тенденцию к уменьшению в возрастной группе ОМЛ старше 60 лет (рис. 2,  $F=0,29$ ,  $p>0,05$ ), в которой они не определялись ни в одном на-

блюдении. Мутации в гене TP53 были представлены несинонимичными заменами нуклеотидов, делециями и инсерциями. Мутации в гене TP53 были представлены несинонимичными заменами нуклеотидов, делециями и инсерциями. Мутации в гене TP53 были представлены несинонимичными заменами нуклеотидов, делециями и инсерциями.

Genetic changes in the coding sequence of exons 7-12 and 16-19 of the KIT gene were determined in 7.4% of cases ( $n=7$ , with 95% CI from 3.6 to 14.4%) and were represented by non-synonymous nucleotide substitutions and deletions. There were no statistically significant age differences in the frequency of these mutations, in all the study groups it was varied in the range of 5.9-10.0%.

The mutation rate in the WT1 anti-oncogene was 5.2% ( $n=4$ , with 95% CI from 2.0 to 12.6%), and had a statistically insignificant tendency to decrease in the age group of AML over 60 years old (Fig. 2,  $F=0.29$ ,  $p>0.05$ ), in which they were not determined in any case. Mutations were represented by insertions and deletions. Verification of the identified trend requires further research and expansion of the sample size.

### Discussion

According to the results of cytogenetic and additional molecular genetic studies, a favorable prognosis of overall survival was established in 17 cases (11.7%, with 95% CI from 7.5 to 18.0%), the intermediate — in 34 (23, 4%, at 95% CI from 17.3 to 31.0%), unfavorable — at 64 (44.1%, at 95% CI from 36.3 to 52.3%), unspecified — at 30 (20, 7%, with 95% CI from 14.9 to 28.0%). In this case, a statistically significant pattern was revealed ( $F=0.03$ ,  $p<0.05$ ) for a decrease in the frequency of patients with a favorable genetic prognosis in the age group of patients with AML aged 60 years and older ( $n=2$ , 3,7%, with 95% CI from 1.0 to 12.5%). Statistically significant differences in the proportion of patients with intermediate and unfavorable genetic prognosis in different age groups could not be detected, which may be due to the small size of the sample.

However, in AML patients over 45 years, there was a statistically significant increase in the proportion of patients with an unspecified [12] genetic prognosis ( $F=0.01$ ,  $p<0.05$ ) compared with young patients ( $n=2$ , 5.6%, with 95% CI from 1.5 to 18.1%). This may indicate a leading role in the oncogenesis of AML in adulthood and elderly age of molecular mechanisms, the detection of defects in which is complicated by traditional cytogenetic, PCR, and direct automatic sequencing methods [1, 4].

### Conclusions

1. The mutation frequency in the coding sequences of exon 12 of the NPM1 gene and exons 5-9 of the TP53 gene had statistically significant age-related differences in AML.

2. A statistically significant 4.5-fold decrease in the proportion of patients with AML with a favorable genetic prognosis in the age group of 60 years and older (up to 3.7%) was established, which does not allow the efficient use of traditional chemotherapy regimens to achieve persistent long-term remission.

блюдении. Мутации были представлены инсерциями и делециями. Для верификации выявленной тенденции необходимы дальнейшие исследования и расширение объема выборки.

### Обсуждение результатов

Таким образом, по результатам цитогенетического и дополнительного молекулярно-генетического исследования, благоприятный прогноз общей вероятностной выживаемости установлен в 17 наблюдениях (11,7%, при 95% ДИ от 7,5 до 18,0%), промежуточный — в 34 (23,4%, при 95% ДИ от 17,3 до 31,0%), неблагоприятный — в 64 (44,1%, при 95% ДИ от 36,3 до 52,3%), неуточненный — в 30 (20,7%, при 95% ДИ от 14,9 до 28,0%). При этом выявлялась статистически значимая закономерность ( $F=0,03$ ,  $p<0,05$ ) к уменьшению частоты пациентов с благоприятным генетическим прогнозом в возрастной группе пациентов с ОМЛ в возрасте 60 лет и старше ( $n=2$ , 3,7%, при 95% ДИ от 1,0 до 12,5%). Статистически достоверных различий в доле больных с промежуточным и неблагоприятным генетическим прогнозом в различных возрастных группах выявить не удалось, что может быть обусловлено малым объемом исследуемой выборки.

Однако, в возрастных группах больных ОМЛ старше 45 лет отмечалось статистически значимое увеличение доли больных с неуточненным [12] генетическим прогнозом ( $F=0,01$ ,  $p<0,05$ ) по сравнению с молодыми пациентами, у которых она оказалась минимальной ( $n=2$ , 5,6%, при 95% ДИ от 1,5 до 18,1%). Это может указывать на ведущую роль в онкогенезе ОМЛ в зрелом, пожилом и старческом возрасте молекулярных механизмов, детекция дефектов в которых традиционными цитогенетическим, ПЦР и методами прямого автоматического секвенирования затруднена [1, 4].

### Выводы

1. Средняя частота мутаций в кодирующих последовательностях экзона 12 гена NPM1 и экзонов 5-9 гена TP53 имела при ОМЛ статистически достоверные возрастные отличия.

2. Установлено статистически значимое 4,5-кратное уменьшение доли больных ОМЛ с благоприятным генетическим прогнозом в возрастной группе 60 лет и старше (до 3,7%), что не позволяет эффективно использовать традиционные схемы полихимиотерапии для достижения стойкой продолжительной ремиссии.

3. Выявлено статистически значимое 4,5-кратное увеличение доли больных ОМЛ с неуточненным генетическим прогнозом в возрастной группе старше 45 лет, что может указывать на значимую роль механизмов онкогенеза, детекция дефектов в которых традиционными цитогенетическим, ПЦР и методами прямого автоматического секвенирования затруднена.

3. A statistically significant 4.5-fold increase in the proportion of AML patients with an unspecified genetic prognosis in the age group over 45 years was revealed, which may indicate a significant role of oncogenesis mechanisms, the detection of defects in which is complicated by traditional cytogenetic, PCR, and direct automatic sequencing methods.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol.* 2017; 35(9):934-46.
2. Desai P., Mencia-Trinchant N., Savenkov O. et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018; 24(7):1015-23.
3. 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.
4. 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.
5. Zink F., Stacey S.N., Norddahl G.L. et al., Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* 2017; 130: 742-52.
6. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 и WT1 у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15-45 лет. *Гены и клетки* 2018; 14(3): 72-77.
7. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-405.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и соавт. Детекция мутаций генов DNMT3A, FLT3, KIT, REFERENCES
1. Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol.* 2017; 35(9):934-46.
2. Desai P., Mencia-Trinchant N., Savenkov O. et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* 2018; 24(7):1015-23.
3. 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 (3). pp. 70-74.
4. 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.
5. Zink F., Stacey S.N., Norddahl G.L. et al., Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. *Blood* 2017; 130: 742-52.
6. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. *Genes and cells.* 2018. Vol. 13 (5). pp. 686-698. [In Russ.]
7. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016. Vol.127 (20). pp. 2391-2405.
8. Vardiman J.V., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009. Vol. 114 (5). pp. 937-952.
9. 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.
10. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R. et al. Comparative analysis of NPM1 gene mutations detection results using sequencing and immunohistochemical technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki].* 2013. No. 4. pp. 124-127. [In Russ.]
11. 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.
12. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 AND WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki].* 2016. no. 4. pp. 77-84. [In Russ.]
13. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salakhov D.R. et al. DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS NPM1, TP53 and WT1 genes point mutations detection in acute myeloid

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.

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

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 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.

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. 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.

19. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35 (6). pp. 1547-1549.

20. Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В. и соавт. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых // Гематология и трансфузиология. - 2014. - Т.59. - С.2. - С. 2-29.

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.

#### Авторы

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

leukemia with normal karyotype. Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]. 2016. no. 1. pp. 77-84. [In Russ.]

14. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. TP53, FLT3, KIT, NRAS and WT1 gene point mutations detection in acute myeloid leukemia with abnormal karyotype. Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]. 2015. no. 1. pp. 77-84. [In Russ.]

15. Vinogradov A. V. Technology development of CDKN2A/ARF gene mutations detection, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 during acute myeloid leukemia. Russian Journal of Oncology [Rossiyskiy Onkologicheskii 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. Journal 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 complex investigation in acute myeloid leukemia using direct sequencing method // Biomica [Biomika]. 2012. Vol.3. no. 1. pp. 22-243. [In Russ.]

18. Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. Journal of Bashkir State University. 2014. Vol. 19. No. 3. pp. 845-847. [In Russ.]

19. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Mol. Biol. Evol. 2018. Vol. 35 (6). pp. 1547-1549.

20. 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.]

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.]

#### Authors

Alexander V. Vinogradov  
Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Department of Hematology  
Hematologist, MD, Chief Therapist of Sverdlovsk Regional Ministry of Health  
34b Weiner Str. Ekaterinburg 620014 Russian Federation  
a.vinogradov@egov66.ru

Alexey V. Rezaikin  
Ural State Medical University, Department of Medical Physics

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

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

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

MD, Professor Assistant  
3 Repin Str. Ekaterinburg 620028 Russian Federation  
alexrez@usma.ru

Sergey V. Sazonov  
Ural State Medical University, Department of Histology, Cytology and Embryology  
MD, Professor, Chief of the department  
3 Repin Str. Ekaterinburg 620028 Russian Federation  
sazonov@usma.ru

Alexander G. Sergeev  
Ural State Medical University, Department of Microbiology, Virology and Immunology  
MD, professor, Chief of the department  
3 Repin Str. Ekaterinburg 620028 Russian Federation  
sergeev@usma.ru