

УДК: 616-006.446.8

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

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ОСТРОГО МИЕЛОМОНОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА ВЗРОСЛЫХ

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

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

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

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

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

Конфликт интересов отсутствует.

Контактная информация автора, ответственного за переписку:

Сазонов Сергей Владимирович
prof-ssazonov@yandex.ru

Дата поступления 29.09.2020 г.

Образец цитирования:

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

Результаты

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Выводы

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

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

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

ЛИТЕРАТУРА

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Авторы

Виноградов Александр Владимирович
ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», отделение гематологии
Врач-гематолог, кандидат медицинских наук, главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области
Российская Федерация, 620014, г. Екатеринбург, ул. Вайнера, д. 346
a.vinogradov@egov66.ru

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

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

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

*A.V. Vinogradov*¹, *A.V. Rezaykin*², *S.V. Sazonov*^{2, 3}, *A.G. Sergeev*²

GENE MUTATIONS LANDSCAPE IN ADULT ACUTE MYELOMONOBLASTIC LEUKEMIA

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

² Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russian Federation;

³ Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russian Federation

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

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

There is no conflict of interest.

Contact details of the corresponding author:

Sergey V. Sazonov

prof-ssazonov@yandex.ru

Received 29.09.2020

For citation:

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

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

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

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

Materials and methods

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

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

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

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

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

Results

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

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

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

REFERENCES

- Bullinger L., Döhner K., Döhner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017. Vol 35(9). pp. 934-46.
- Jung J., Cho B.S., Kim H.J. et al. Reclassification of acute myeloid leukemia according to the 2016 WHO classification. *Ann. Lab. Med*. 2019. Vol. 39(3). pp. 311-316.
- Panuzzo C., Signorino E., Calabrese C. et al. Landscape of tumor suppressor mutations in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Med*. 2020. Vol. 9(3). p. 802.
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features DNMT3A, FLT 3, KIT, NPM1, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. *Genes and cells [Geni I kletki]*. 2018. Vol. 14 (3). pp. 70-74. [In Russ.]
- 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.
- Rose D., Haferlach T., Schnittger S. et al. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017. Vol. 31 (1). pp. 11-17.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.]
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Salahov D.R. et al. DNMT3A, FLT3, KIT, KRAS, NRAS NPM1, TP53 and WT1 genes point mutations detection in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2016. no. 2. pp. 89-101. [In Russ.]
- 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.]
- 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.]
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. DNMT3A gene point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Bulletin of Siberian Medicine [Byulleten' Sibirskoj Mediciny]*. 2015. Vol. 14 (1). pp. 18-23 [In Russ.]
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G. KRAS and NRAS genes point mutations detection in acute myeloid leukemia patients using sequencing technique. *Journal of Bashkir State University [Vestnik Bashkirkogo Universiteta]*. 2014. Vol. 19. No. 3. pp. 845–847. [In Russ.]
- 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.
- 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.]
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 2018. Vol. 35(6). pp. 1547-1549.
- Vinogradov A.V., Rezaikin A.V., Izotov D.V., Sergeev A.G. ASXL1, DNMT3A, FLT3, KIT, NRAS, TP53 and WT1 genes mutations detection in acute myeloid leukemia with unspecified karyotype using direct sequencing technique. *Journal of Ural Medical Academic Science [Vestnik Uralskoy medicinskoy akademicheskoy nauki]*. 2016. no. 4. pp. 38-51. [In Russ.]
- Geriatrics: national guideline [Geriatrya: nacional'noe rukovodstvo]/ Ed. Tkacheva O.N., Frolova E.V., Yachno N.N. M.: GEOTAR-Media, 2018. pp. 40-66 [In Russ.]

Authors

Alexander V. Vinogradov

Sverdlovsk Regional Clinical Hospital N 1, Department of Hematology

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

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

a.vinogradov@egov66.ru

Alexey V. Rezaykin

Ural State Medical University, Department of Medical Physics

Cand.Sci. (Med.), Professor assistant

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

alexrez@usma.ru

Sergey V. Sazonov

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

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

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

sazonov@usma.ru

Alexander G. Sergeev

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

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

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

sergeev@usma.ru