

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской программы

_____ Е. И. Шишацкая

«_____»-_____ 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Определение соматических мутаций методом фрагментного анализа у пациентов с
диагнозом ОМЛ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный
руководитель

канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

подпись, дата

Выпускник

И.Е. Маслюкова

подпись, дата

Рецензент

профессор, д-р мед. наук
Ю.И. Гринштейн

подпись, дата

Красноярск 2020

АННОТАЦИЯ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным миелопролиферативным заболеванием с активной пролиферацией недифференцированных миелоидных предшественников. Возникновение данного заболевания обусловлено большим спектром, как цитогенетических нарушений, так и генетическими мутациями. Часть из них специфичны по отношению к ОМЛ, другие являются прогностическими. К последним относятся мутации в гене *FLT3*, которые представлены внутренними tandemными дупликациями в юкстамембранном домене, а также миссенс-мутации в кодонах D835 и I836 в петле активации соответствующего белка FMS-подобной тирозинкиназы. Распространенность мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD составляет 20–35% и 7% среди взрослых и 15% и 7% у детей с ОМЛ, соответственно. По рекомендациям ВОЗ и ELN мутации в гене *FLT3* принято определять при постановке диагноза и для определения прогноза течения заболевания, так как они ассоциированы с неблагоприятным исходом. Причем важно не просто обнаружить эти мутации, но также определить уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. С этой целью в мировой практике стали применять фрагментный анализ, который в данном случае имеет явные преимущества перед секвенированием по Сенгэру.

Таким образом, целью данной работы было определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Анализ мутаций в гене *FLT3* проводился с использованием метода фрагментного анализа с определением уровня аллельной нагрузки мутантного аллеля, а также секвенирования по Сэнгера в качестве дополнительного метода. Из 18 пациентов с ОМЛ у 5 пациентов (27,8%), в том числе 2 из которых дети (13,3% из 15 детей), были обнаружены *FLT3*-ITD мутации. Однако в представленной группе не было обнаружено *FLT3*-TKD мутаций.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3*-ITD МУТАЦИИ, *FLT3*-TKD МУТАЦИИ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Определение соматических мутаций методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ» содержит 56 страниц текстового документа, 34 иллюстрации, 8 таблиц и 84 использованных источника.

ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3*-ITD МУТАЦИИ, *FLT3*-TKD МУТАЦИИ, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

Цель исследования – определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать тест-системы на основе фрагментного анализа для выявления ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* у пациентов с диагнозом ОМЛ.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-ITD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-TKD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
4. Сравнить результаты анализа мутаций в гене *FLT3*, полученные при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что соматические мутации в гене *FLT3* ассоциированы с неблагоприятным исходом течения заболевания у пациентов с диагнозом острый миелоидный лейкоз, на который особенно влияет аллельная нагрузка мутантного аллеля. Таким образом, важно не только обнаружение таких мутаций, но также их количественный анализ. Поэтому в этой области фрагментный анализ имеет явные преимущества перед секвенированием по Сенгэру.

В ходе работы разработаны тест-системы для выявления и количественного анализа ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* на основе фрагментного анализа. Использование разработанной тест-системы позволило выявить *FLT3*-ITD мутации у 5 пациентов (2 из которых дети) из 18 случаев ОМЛ, определить длину tandemного повтора у каждого образца и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. Однако в представленной группе не было обнаружено *FLT3*-TKD мутаций. Результаты, полученные при использовании фрагментного анализа, полностью соответствуют результатам, полученным при проведении других молекулярно-генетических технологий. На примере 19 образцов было показано

преимущество использования фрагментного анализа для исследования мутаций в гене *FLT3* перед секвенированием по Сэнгеру.

ABSTRACT

The master's thesis on the topic «Determination of somatic mutations by the method of fragment analysis in patients with a diagnosis of AML" contains 56 pages of a text document, 34 illustrations, 8 tables and 84 sources used.

ACUTE MYELOID LEUKEMIA, *FLT3* GENE, *FLT3*-ITD MUTATIONS, *FLT3*-TKD MUTATIONS, SOMATIC MUTATIONS, FRAGMENT ANALYSIS, SANGER SEQUENCING, ALLELE BURDEN.

The aim of the work is determine of somatic mutations in *FLT3* gene by the method of fragment analysis in patients with AML.

Based on the goal, the following tasks were formulated:

1. Develop a test systems based on fragment analysis to detect ITD and TKD mutations in the *FLT3* gene in patients with AML
2. Analyze the DNA of patients with AML for the presence of *FLT3*-ITD mutation with determination of allelic burden level using the developed test system
3. Analyze the DNA of patients with AML for the presence of *FLT3*-TKD mutation with determination of allelic burden level using the developed test system
4. Compare the results of the mutation analysis in the *FLT3* gene obtained by fragment analysis with the corresponding results obtained by other molecular genetic technologies.

The relevance of the thesis is that somatic mutations in the *FLT3* gene are associated with an unfavorable outcome of the disease in patients with acute myeloid leukemia, which is especially affected by the allelic burden of mutant allele. Thus, it is important not only to detect mutations, but also to quantify them. Therefore, in this area, fragment analysis has clear advantages over Sanger sequencing.

In the work test systems were developed for the identification and quantitative analysis of ITD and TKD mutations in the *FLT3* gene based on fragment analysis. Using the developed test system was possible to identify *FLT3*-ITD mutations in 5 patients (2 of which are children) from 18 cases of AML, to determine the tandem repeat length in each sample and the allelic burden level of the mutant allele. However, no *FLT3*-TKD mutations were detected in the group represented. The results obtained using fragment analysis are fully consistent with the results obtained by other molecular genetic technologies. Using 19 samples as an example, the advantage of using fragment analysis to study mutations in the *FLT3* gene before Sanger sequencing was shown.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Острый миелоидный лейкоз	8
1.2 Рецидивирующие генетические нарушения при ОМЛ	11
1.3 FMS-подобная тирозин киназа (FLT3)	15
1.4 Прогностические мутации в гене <i>FLT3</i>	16
1.5 Белок-шапперон нуклеофосмин (NPM1).....	20
1.6 Диагностические мутации в гене <i>NPM1</i>	21
1.7 Молекулярные методы, используемые для определения мутаций в гене <i>FLT3</i> ...	23
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Объект исследования.....	25
2.2 Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия).....	27
2.3 Измерение концентрации ДНК с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3. (Invitrogen, США).....	28
2.4 Проведение ПЦР с помощью набора реагентов «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Москва) на приборе CFX 96 (BioRad, США) .	28
2.5 Проведение ПДРФ анализа для исследования <i>FLT3</i> -TKD мутаций с помощью рестриктазы EcoRV (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США)	31
2.6 Проведение фрагментного анализа с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США).....	32
2.7 Проведение секвенирования по Сэнгеру с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США).....	34
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	36
3.1 Дизайн исследования мутаций в гене <i>FLT3</i>	36
3.2 Анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру	39

3.2.1 Количественный анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций у детей	40
3.2.2 Количественный анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций взрослых пациентов.....	43
3.3 Количественный анализ <i>FLT3</i> -TKD мутаций фрагментным анализом.....	47
3.4 Сравнение результатов анализа мутаций в гене <i>FLT3</i> , полученных при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий	47
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	55

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является злокачественным миелопролиферативным заболеванием с активной пролиферацией недифференцированных миелоидных предшественников. Возникновение данного заболевания обусловлено большим спектром как цитогенетических нарушений, так и генетическими мутациями. Часть из них специфичны по отношению к ОМЛ, другие являются прогностическими. К последним относятся мутации в гене *FLT3*, которые представлены внутренними tandemными дупликациями в юкстамембранном домене, а также миссенс-мутации в кодонах D835 и I836 в петле активации соответствующего белка fms-подобной тирозинкиназы [1]. Распространенность мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD составляет 20–35% и 7% среди взрослых и 15% и 7% у детей с ОМЛ [2], соответственно. По рекомендациям ВОЗ [3] и ELN [4] мутации в гене *FLT3* принято определять при постановке диагноза и для определения прогноза течения заболевания, так как они ассоциированы с неблагоприятным исходом. Причем важно не просто обнаружить эти мутации, но также определить уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. С этой целью в мировой практике стали применять фрагментный анализ, который в данном случае имеет явные преимущества перед секвенированием по Сенгэру.

Таким образом, целью данной работы было определение соматических мутаций в гене *FLT3* методом фрагментного анализа у пациентов с диагнозом ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать тест-системы на основе фрагментного анализа для выявления ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* у пациентов с диагнозом ОМЛ.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-ITD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной тест-системы на наличие *FLT3*-TKD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
4. Сравнить результаты анализа мутаций в гене *FLT3*, полученные при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Острый миелоидный лейкоз

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенное клональное заболевание, характеризующееся аномальной пролиферацией миелоидных клеточных предшественников в результате возникновения мутации, приводящей также к блокировке дифференцировки [5]. Миелоидное новообразование, согласно критериям ВОЗ [3], с 20% и более бластов в периферической крови и костном мозге считается ОМЛ *de novo* или же вторичным ОМЛ, если ему предшествовал миелодиспластический синдром (МДС) или миелопролиферативные новообразования (МПН). В 2008 г. [6] был представлен пересмотренный вариант классификации ОМЛ ВОЗ, в который были внесены изменения по нескольким категориям заболеваний (знаком * обозначена группа, введенная в 2016 г):

- ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями
- ОМЛ с генными мутациями*
- ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией
- Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей химиотерапией
- ОМЛ, по-другому не специфицированные (NOS)
- Миелоидная саркома
- Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна
- Опухоль из плазмацитоидных дендритных клеток
- Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки

В отличие от классификации франко-американо-британской системы (ФАБ), которая строилась на морфологическом аспекте заболевания, новая классификация выстроена на сочетании клинических, морфологических, иммунофенотипических и генетических особенностей. Особенно интересны две первые группы, представленные в таблице 1, в которых включены подвиды ОМЛ, определяющиеся хромосомными аномалиями (первая группа) и генными мутациями (вторая группа). Именно открытие новых прогностических и диагностических генетических маркеров, а также накопление большого материала по их

исследованию привело к тому, что определение мутационного статуса пациента стало обязательным критерием для постановки диагноза ОМЛ.

Таблица 1 – Острый миелоидный лейкоз с рецидивирующими генетическими нарушениями (классификация ВОЗ)

ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями	ОМЛ с генными мутациями*
<ul style="list-style-type: none"> • ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)$; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; <i>CBFB-MYH11</i> • Острый промиелоцитарный лейкоз с $t(15;17)(q22;q12)$; <i>PML-RARA</i> • ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23)$; <i>MLLT3-MLL</i> • ОМЛ с $t(6;9)(p23;q34)$; <i>DEK-NUP214</i> • ОМЛ с $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; <i>RPNI-EVII</i> • ОМЛ (мегакариобластный) с $t(1;22)(p13;q13)$; <i>RBM15-MKL1</i> • ОМЛ с <i>BCR/ABL1</i>* 	<ul style="list-style-type: none"> • ОМЛ с мутированным геном <i>NPM1</i>* • ОМЛ с биаллельной мутацией гена <i>CEBPA</i>* • ОМЛ с мутированным геном <i>RUNX1</i>*

Недостатком системы ФАБ был критерий классификации – фенотип, который не всегда можно было распознать однозначно, что приводило к недифференцированному ОМЛ. Тем самым обе классификации в каких-то моментах сходятся, например при остром промиелоцитарном лейкозе (М3) транслокация $t(15;17)(q22;q12)$, *PML-RARA*, встречается у 98 % больных. Тогда как при остром миелобластном лейкозе с созреванием (М2) встречаются и $t(8;21)(q22;q22)$, *RUNX1-RUNX1T1* в 40% случаях и $t(6;9)(p23;q34)$, *DEK-NUP214* в 1%. В классификации ВОЗ же ОМЛ с хромосомными транслокациями $t(8;21)(q22;q22)$ и $t(6;9)(p23;q34)$ выделены в отдельные подтипы [7].

В большинстве случаев конкретная причина возникновения мутаций при ОМЛ остается неизвестной. Однако существует несколько этиологических факторов, увеличивающих риск развития заболевания: ионизирующее излучения, воздействие химических веществ, электромагнитные волны, курение и др. Также стоит отметить, что отдельным этиологическим фактором является химиотерапевтическое лечение уже

диагностированной онкологии. Риск развития вторичного ОМЛ в 85 % случаев возникает в сроки до 10 лет с момента окончания лечения [8].

Клиническая картина заболевания является следствием замещения нормальных клеток костного мозга мутантным клоном. Наблюдаются нейтропения, анемия, гемморагический синдром, немотивируемая слабость, гиперплазия десен и др. [9]. Дебют ОМЛ может сопровождаться значительным повышением температуры, кровоточивостью, интоксикацией, резкой слабостью, тяжелыми инфекциями. Хотя достаточно часто бывают ситуации случайной постановки диагноза при плановом медицинском осмотре или госпитализации по другой причине (у пожилых людей могут проявляться признаки стенокардии) [10].

Эффективность химиотерапии зависит от специфичности цитостатического воздействия и адекватности сопроводительного лечения, уменьшающей токсический эффект первого. Терапия при ОМЛ состоит из трех этапов: индукция ремиссии, консолидация и поддерживающая терапия [11]. Индукция ремиссии проводится в 1-2 курса для быстрого и существенного сокращения мутантного клона. Полная ремиссия считается достигнутой, когда на фоне применения цитостатических средств в костном мозге обнаруживается менее 5 % опухолевых клеток (морфологическая оценка на 21-28-й день) [12]. Препараты в этот период назначаются по схеме «7 + 3», представляющая собой комбинацию, как правило, цитарабина (7 дней) и даунорубицина (3 дня) [13]. Если после второго курса индукционной терапии не достигается полная ремиссия, констатируется первичная резистентность [14], и пациентам проводят терапию по программам лечения рефрактерных форм лейкемии. Консолидация ремиссии или закрепление достигнутого противоопухолевого эффекта заключается в еще большем уменьшении числа аномальных клеток, включающий более агрессивный курс терапии. После следует этап поддерживающего лечения, заключающегося в продолжение цитостатического или таргетного воздействия на возможно остающийся опухолевый клон. У 50-65% молодых пациентов после использования одного курса индукционной терапии удаётся достичь полной ремиссии, после двух курсов – у 70-75% [15]. Помимо этого постремиссионной терапией для пациентов из групп благоприятного и промежуточного риска может являться ауто-трансплантация гемопоэтических стволовых клеток [16,17]. Однако у пациентов после 55-60 лет прогноз максимально неблагоприятен: возникает резистентность к терапии, а долгосрочная выживаемость не превышает 5-7% [18,19]. При отсутствии лечения ОМЛ является потенциально губительным заболеванием, а пациенты умирают от осложнений в виде инфекций и кровопотерь. При симптоматической терапии выживаемость не превышает 11-20 недель (медиана) [20,21].

Заболеваемость ОМЛ в среднем 3-5 человек на 100 тыс. населения в год [22], но в возрасте старше 80 лет уже составляет 12-13 случаев [23]. Так в США ежегодно диагностируются 10500 новых случаев ОМЛ [24]. Учитывая численность населения, в России расчетный показатель должен составлять 5000 новых случаев в год [25]. Стоит отметить, что мужчины болеют ОМЛ в примерно 1,5 раза чаще женщин (4,6 против 3,0 случаев на 100 000 населения в год) [26].

1.2 Рецидивирующие генетические нарушения при ОМЛ

Как говорилось ранее несколько хромосомных аномалий и генетических мутаций стали отдельными категориями ОМЛ. Часть из них являются прогностическими, часть диагностическими, а некоторые могут сочетать обе функции. Диагностической мутацией можно назвать, когда она присуща одному конкретному заболеванию, и позволяет, таким образом, его дифференцировать от других. Примером такой перестройки был приведен в предыдущем разделе – $t(15;17)(q22;q12)$ при остром промиелоцитарном лейкозе. Прогностический аспект мутации выражен в корреляции мутации и особенностями заболевания, что получило отражение в Европейской классификации риска лейкемии (ELN) 2017 года [4] (таблица 2).

Таблица 2 – Стратификация генетического риска согласно рекомендациям ELN, 2017

Группа риска	Генетические аномалии
Благоприятная	<ul style="list-style-type: none"> • $NPM1\langle + \rangle / FLT3-ITD\langle - \rangle$ или $FLT3-ITD\langle + \rangle$ (низк) • Биаллельная мутация <i>CEBPA</i> • $t(8;21)(q22;q22)$; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> • $inv(16)(p13.1q22)$ or $t(16;16)(p13.1;q22)$; <i>CBFB-MYH11</i>
Промежуточная	<ul style="list-style-type: none"> • $NPM1\langle + \rangle / FLT3-ITD\langle + \rangle$ (выс) • $NPM1\langle - \rangle / FLT3-ITD\langle - \rangle$ или $FLT3-ITD\langle + \rangle$ (низк) в отсутствии неблагоприятных генетических аномалий • $t(9;11)(p22;q23)$; <i>MLLT3-KMT2A</i> (ранее <i>MLLT3-MLL</i>) • Цитогенетические аномалии, не классифицированные как благоприятные или неблагоприятные
Неблагоприятная	<ul style="list-style-type: none"> • Комплексный кариотип • Моносомный кариотип

	<ul style="list-style-type: none"> • -5или del(5q); -7; -17/abn(17p) • T(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> (перегруппированный аллельный сегмент) • inv(3)(q21q26.2) или t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPNI-EVII</i> • t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> • T(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> • <i>NPM1</i>«-»/<i>FLT3-ITD</i>«+» (выс) • Мутация <i>TP53</i> • Мутация <i>RUNX1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска) • Мутация <i>ASXL1</i> (не является неблагоприятной при подтипе ОМЛ из группы благоприятного риска)
--	---

Все мутации можно разделить на два типа: первые возникают в генах, кодирующих ферменты, непосредственно являющиеся звеньями сигнальных путей, а вторые – в генах, кодирующие белки эпигенетической регуляции.

К мутациям I класса относят мутации в генах, кодирующих цитозольные или рецепторные протеинкиназы. Среди мутаций, встречающихся при ОМЛ, к этому классу относят мутации в генах *FLT3*, *KIT* и *RAS*. Эти мутации присущи не только ОМЛ, они являются прогностическими и их важно анализировать, хотя они и не выделены в отдельные категории ОМЛ согласно ВОЗ. Соответствующие протеинкиназы обладают большим онкогенным потенциалом, поэтому в клетке существуют системы контроля, в том числе убиквитин-протеосомная система. Но основным механизмом, в особенности для рецепторных тирозинкиназ, является аутоингибирование [27]. В структуре такого фермента присутствует домен, выполняющий данную функцию, который в неактивной форме киназы (в отсутствии лиганда) ингибирует домен, отвечающий за фосфорилирование нижестоящих компонентов сигнального пути (киназный домен). Как правило, для рецепторных тирозинкиназ можно предугадать расположение мутаций, которые будут приводить к аномальной активации фермента: это мутации в ингибирующем домене и в киназном домене [28]. Именно эти участки и являются онкогенными у *FLT3*, *KIT* и *RAS*.

Основная масса хромосомных aberrаций, представленных в классификации ВОЗ, относят к мутациям II класса, а также мутации в генах *NPM1* и *CEBPA*. Также помимо этих к диагностически значимым мутациям можно еще отнести *DNMT3A*, *TET2*, *IDH2*, *WT1*, *TP53* мутации и др., которые не являются специфическими для ОМЛ. Эти мутации влияют на

пролиферацию и выживаемость мутантного клона через «посредников», являясь при этом основным звеном эпигенетической регуляции [29]. Нужно также понимать, что при хромосомных абберациях химерный ген, возникающий из участков двух генов, экспрессируется в виде химерного продукта, который приводит к выживаемости собственного мутантного клона за счет аномальных функций. При этом один из изначальных генов выполнял эпигенетическую функцию, а второй при химеризации изменил структуру первого.

Для большинства наиболее значимых мутаций разрабатываются таргетные препараты, следовательно, исследования, направленные на изучения прогностического значения этих мутаций, их частоты встречаемости, являются актуальной задачей. Первый вопрос касается прогноза общей выживаемости пациентов при той или иной мутации или их сочетаний [30]. А второй затрагивает вопрос специфичности и токсичности цитостатиков, поэтому важна персонализация медицинских показаний к этим препаратам.

Хромосомные аномалии и мутации при нормальном кариотипе встречаются примерно в одинаковых пропорциях при ОМЛ: по некоторым данным цитогенетические нарушения показаны в 30% случаев, тогда как на долю нормального кариотипа выпадает 40-50% [31]. При нормальном кариотипе 60% мутаций приходится на мутации в гене *NPM1*, 30% – в гене *FLT3*, 15% – в гене *CEBPA* и 15% на остальные мутации (рисунок 1). По последним данным из всех случаев ОМЛ на долю наиболее часто мутирующих генов приходятся: *FLT3* (39%), *NPM1* (33%), *DNMT3A* (31%), *NRAS* (22%), *RUNX1* (15%), *TET2* (15%), *IDH2* (14%), *WT1* (13%), *ASXL1* (11%), *PTPN11* (10%), *SRSF2* (10%), *TP53* (9%), *CEBPA* (8%) и другие [32, 33].

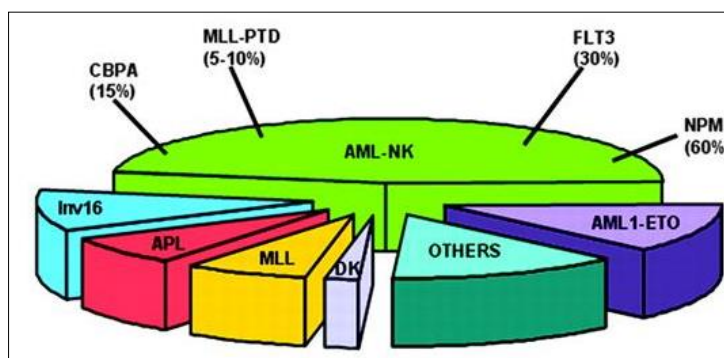


Рисунок 1 – Встречаемость ОМЛ ассоциированных мутаций при нормальном кариотипе

Стоит отметить, что часть мутаций встречаются исключительно при нормальном кариотипе (например, *NPM1*), тогда как другая, например *FLT3* мутации, могут присутствовать вместе с хромосомными нарушениями. Причем во многих исследованиях показаны сочетания различных мутаций при ОМЛ. Возможно, что для развития этого заболевания недостаточно только одной конкретной мутации. Так при исследовании детей с

ОМЛ de novo было определено, что у 50% обнаружено 3 и более генетических аномалий [34]. У Tripon et al [35] описан интересный клинический случай с сочетанием четырех различных прогностических мутаций. Пациент был гетерозиготным по *FLT3*-ITD (с нагрузкой 86%) и D835, *NPM1* (42%) и *DNMT3A*. Причем для *FLT3*-ITD мутации было выявлено три разных дублицированных фрагмента. Случай был уникальным, т.к. исследование Mevatee et al. [36] на 100 пациентах среди ОМЛ, предложенное для сравнения авторами, не выявило положительных случаев сочетания *FLT3* + *DNMT3A* + *NPM1*. Сочетание мутаций в разных генах имеет разное прогностическое значения для пациента с ОМЛ. Например, Loghavi et al. [37] сделали вывод, что пациенты с ОМЛ с сочетанием мутациями *NPM1* + *DNMT3A* имеют более короткую общую выживаемость по сравнению с *FLT3*-ITD + *NPM1*-положительными пациентами. Последняя пара мутаций, к слову, поэтому не просто так включена в рекомендации ELN [4]. Встречаемость сочетаний мутаций в этих генах представлена на рисунке 2.

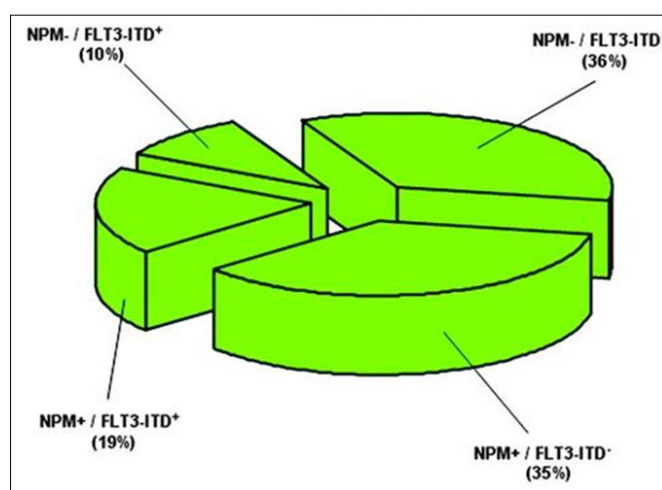


Рисунок 2 – Сочетание вариантов мутаций в генах *FLT3* и *NPM1*

Недавнее исследование (2016 г) Виноградова и др. [32] показало, что в 40% исследованных случаях мутации генов *NPM1* и *FLT3* кооперировались неслучайным образом, и определяли исход заболевания [38]. Ниже подробно разобраны механизмы действия данных мутаций.

1.3 FMS-подобная тирозин киназа (FLT3)

FLT3 (fms-подобная тирозинкиназа 3), также известная как тирозинкиназа-1 стволовых клеток или тирозинкиназа печени-2 плода, является одним из рецепторов тирозинкиназы (РТК) класса III. Ген *FLT3* обычно экспрессируется в незрелых кроветворных предшественниках.

РТК имеют общие структурные элементы: 5 иммуноглобулиноподобных домена во внеклеточных областях для связывания лиганда, трансмембранный домен, юкстамембранный (JM) домен, выполняющий аутоингибирующую функцию, и 2 киназных домена (TK1 и TK2), разделенных доменом вставки киназы и С-терминальный домен во внутриклеточных областях (рисунок 4) [39].

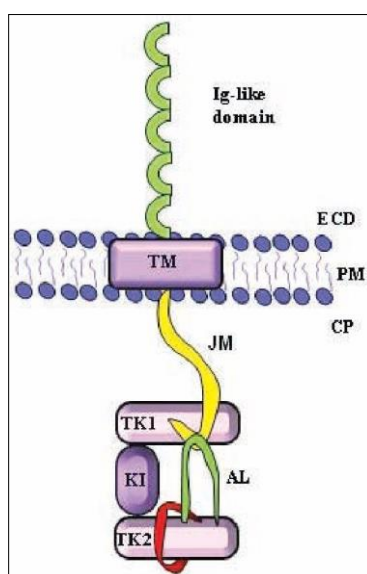


Рисунок 4 – Схематическое изображение мономера рецептора FLT3

Лиганд для FLT3 (лиганд FLT3 или FL) был клонирован в 1993 году. FL экспрессируется в клетках микроокружения костного мозга, включая фибробласты костного мозга, а также в миелоидном ростке кроветворения [40]. FL приводит к димеризации рецептора и его аутофосфорилированию, запуская сигнальные пути, ответственные за пролиферацию клеток. На это взаимодействие влияют и другие цитокины, такие как лиганд Kit (KL). Показано, что при стимуляции *in vitro* клеток-предшественников либо только FL, или либо только KL, достигается незначительный или нулевой пролиферативный ответ, но оба лиганда вместе синергически усиливают рост [41]. Схема активации FLT3 представлена на рисунке 5.

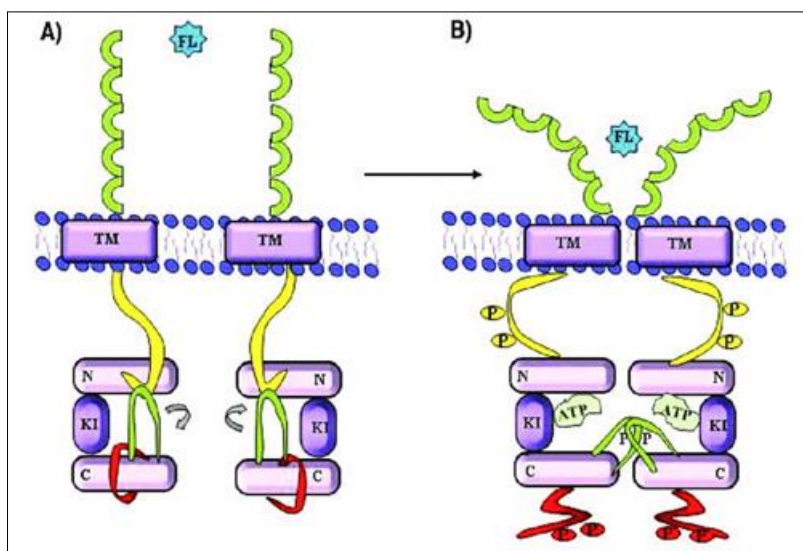


Рисунок 5 – Механизм активации рецептора FLT3:

А – неактивная форма, В – активная форма

Два киназных домена (TKD1 и TKD2) формируют активный центр фермента, в основе которого лежит петля активации (А-петля). В неактивной форме JM домен принимает такую конформацию, которая блокирует А-петлю, что приводит к ингибированию самодимеризации. При связывании лиганда происходит преодоление ингибирующего эффекта, за счет аутофосфорилирования тирозинкиназы в JM и, как следствие, изменения его конформации. Активная форма тирозинкиназы фосфорилирует нижестоящие элементы сигнальных путей, запуская каскад реакций, ведущих к пролиферации и активации клеток. Такими путями являются MAP-киназный и АКТ пути. Также упоминается STAT путь, однако есть упоминание о патологичности данного пути для FLT3 [42].

1.4 Прогностические мутации в гене *FLT3*

Первый раз заговорили про мутации в гене *FLT3*, когда Nakaо et al. [1] во время исследования экспрессии гена *FLT3* у 30 пациентов с ОМЛ случайно обнаружили неожиданно более длинные транскрипты у пяти из них. Ими оказались внутренние tandemные дубликации (вставка повтора без сдвига рамки считывания). Дубликация (ITD) была переменной как по размеру (от 3 bp и до > 400 bp), так и по расположению у разных людей, но всегда находилась в пределах области JM, кодируемой экзонами 14 и 15. Хотя есть данные, что длина может достигать до 1236 bp [43], и что в JM присутствуют лишь 70% tandemных повторов, тогда как остальные приходятся на тирозинкиназный домен 1 [44].

Дальнейшие исследования выявили, что *FLT3*-ITD мутации возникают у пациентов с ОМЛ в 15-20% случаев [2].

Второй тип мутаций, который встречается в гене *FLT3*, представляет собой ряд однонуклеотидных замен в 20 экзоне в петле активации тирозинкиназного домена 2 (TKD). Но наиболее часто встречаемыми из них являются мутации в соседних кодонах D835 и I836, включающих по меньшей мере 9 разных замен (рисунок 6). Частота встречаемости колеблется от 6,4% до 7,7% у неотобранных взрослых пациентов с ОМЛ [2].

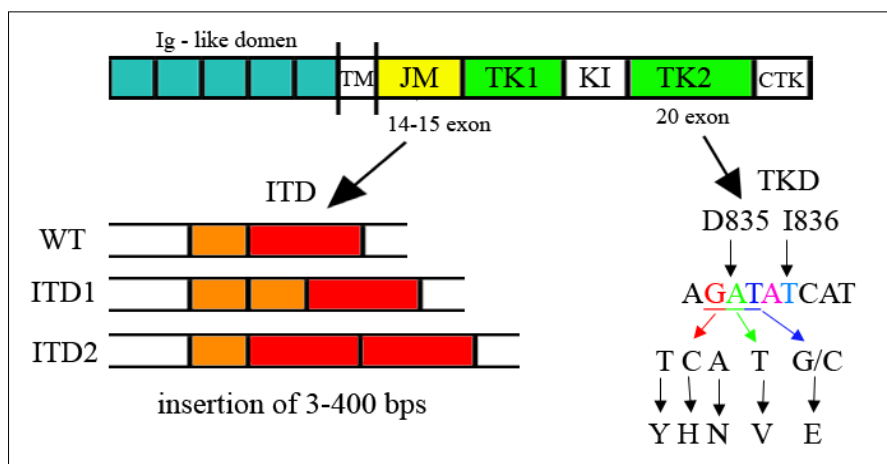


Рисунок 6 – Основные мутации в гене *FLT3*: ITD – тандемные повторы в JM и TKD – однонуклеотидные замены в А-петле

Мутации *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD приводят к схожему действию – нарушению аутоингибирующего эффекта неактивной формы тирозинкиназы в отсутствии лиганда. Но из-за их различной локализации механизм влияния у них разный. Выше упоминалось, что в рецепторных тирозинкиназах легко предугадываются «горячие точки» для мутаций. Так удлинение JM при *FLT3*-ITD мутациях приводит к конформационным изменениям в домене, он перестает удерживать петлю активации в неактивной конформации, что приводит к самопроизвольной димеризации фермента. Точковые мутации в самой А-петле при *FLT3*-TKD меняют ее форму так, что она не блокируется JM доменом при его нормальной длине [45]. Таким образом, оба варианта мутаций приведут к дестабилизации неактивной формы фермента, и соответственно к конститутивной активации рецептора [46]. Бесконтрольное фосфорилирование нижележащих элементов сигнальных путей, упомянутых в прошлом разделе, запустят аномальную пролиферацию мутантного клона [47]. Причем согласно исследованию Janke et al. [42], если принять пролиферацию клеток при *FLT3*-ITD за 100%, то пролиферация *FLT3*-TKD клонов составит 14-42%. При стимуляции FL клоны *FLT3*-ITD не показали никакого ответа, а *FLT3*-TKD – промежуточный ответ, если сравнивать с диким

типом (100%). *FLT3*-TKD показали повышенную активность MAPK и AKT путей по сравнению с диким типом (WT), а *FLT3*-ITD – STAT пути. Также можно предположить, что помимо активной пролиферации для выживания мутантного клона запускаются механизмы дополнительной продукции лиганда FL [48], а также фосфорилирования факторов транскрипции самого гена *FLT3*, что способствует так называемому аресту дифференцировки.

Приведенные выше эффекты объясняют, почему *FLT3*-ITD мутации ассоциированы с неблагоприятным исходом течения ОМЛ. Пациенты с данной мутацией характеризуются повышенным риском рецидивов и более короткой средней продолжительностью жизни [49]. На рисунке 7 показан анализ выживаемости пациентов с *FLT3*-ITD в зависимости от уровня аллельной нагрузки: высокий уровень аллельной нагрузки снижает общую выживаемость, а также безрецидивную выживаемость [50]. Такая же связь прослеживается и с увеличением длины tandemного повтора. Но при этом показано, что повторы менее 15 bp не являются прогностически значимыми [51]. При этом не было никакой связи между длиной дуплицированного фрагмента и аллельной нагрузкой или возрастом.

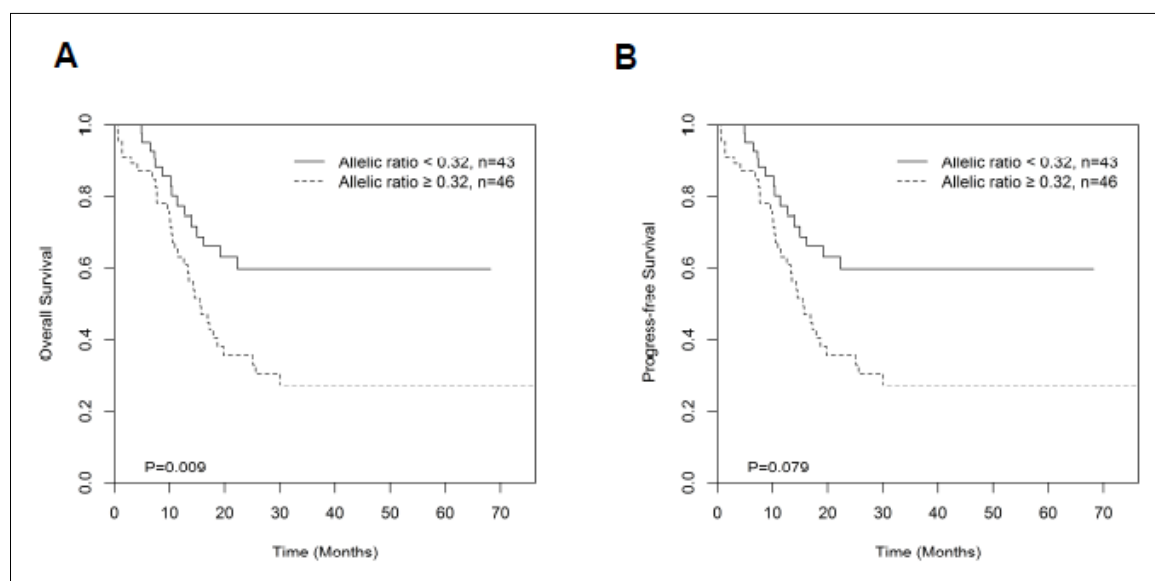


Рисунок 7 – Анализ выживаемости пациентов с *FLT3*-ITD в зависимости от уровня аллельной нагрузки (0,32 или 32% – медиана в данном исследовании):

А – общая выживаемость, В – безрецидивная выживаемость

Данные о влиянии на исход заболевания у *FLT3*-TKD-положительных пациентов противоречивы, однако четко выявлено, что эти мутации могут возникнуть в ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназы, а также сами быть резистентными к этим

ингибиторам [52]. Также одновременное присутствие обоих типов мутаций не является благоприятным.

Во многих исследованиях общая встречаемость мутаций в гене *FLT3* близка к 30% для взрослых пациентов. Но для мутаций *FLT3*-ITD она варьируется между ОМЛ пациентами из разных этнических групп. Так при исследовании азиатской группы она составила 12,6% [53], а русской группы – 18,1% [54]. Однако в европейских или американских группах этот тип имели треть взрослых пациентов с ОМЛ [55, 33]. Помимо этого, стоит упомянуть, что распространенность *FLT3*-ITD мутаций увеличивается с возрастом (рисунок 8): у детей в возрасте до года она составляла 1%, 7% – от года до 5 лет, 17% – от 10 до 20 лет, а у пожилых достигает 30%. Для пациентов с *FLT3*-TKD мутациями встречаемость составляет 5-8% и не повышается с возрастом [2]

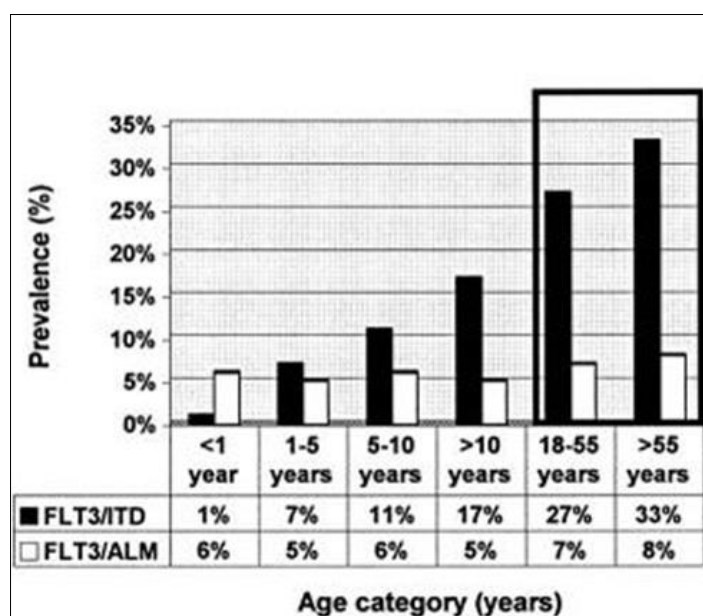


Рисунок 8 – Взаимосвязь встречаемости *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD (здесь обозначено как *FLT3*-ALM) и возраста

Мутации в гене *FLT3* обнаружены во всех подтипах ОМЛ, но чаще всего в исследованиях встречаются в подвидах ОМЛ М2, М3, М4 и М5 системы классификации ФАБ [53, 54]. Также эти мутации обнаруживаются при МДС в 10% случаях, иногда способствуя бластному кризу, и не встречаются при МПН [56].

В литературе также описаны случаи делеций и комплексных мутаций в *JM*, но они редкие и плохо описаны в настоящее время [57].

1.5 Белок-шаперон нуклеофосмин (NPM1)

NPM1 – это ядрышковый фосфопротеин, способный перемещаться между ядром и цитоплазмой. Такой белок-шаперон участвует в биогенезе рибосом (перенос субъединиц), способен связываться с центросомой в цитоплазме, контролируя деление клетки, а также взаимодействует с p53 и его регуляторными молекулами (рисунок 9) [58].

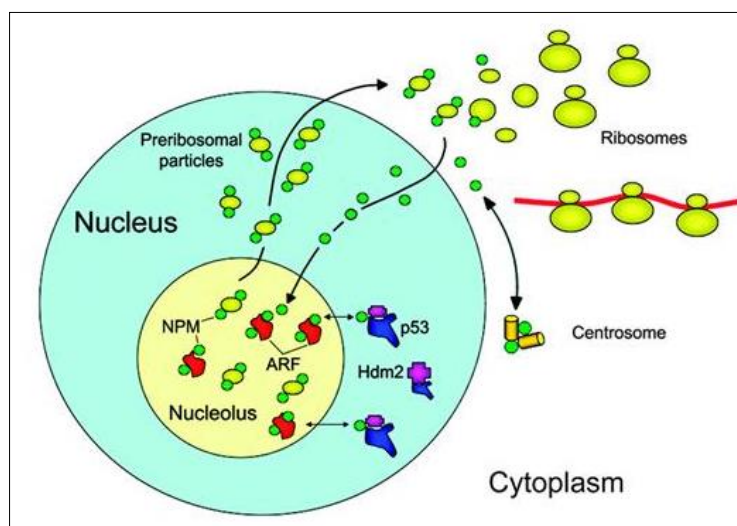


Рисунок 9 – Функции нуклеофосмина в клетке

Изоформа В23.1 белка нуклеофосмина, преобладающая изоформа, имеет несколько функциональных доменов. N-концевой участок содержит гидрофобную область, регулирующую самоолигомеризацию и активность шаперона NPM1 в отношении белков, нуклеиновых кислот и гистонов. Средняя часть содержит 2 кислотных участка, служащие для связывания гистонов, а сегмент между кислотными участками проявляет рибонуклеазную активность. С-концевой домен содержит триптофаны 288 и 290, которые являются критическими для связывания NPM1 с ядрышком [59]. Сигнал ядерной локализации (NLS) и сигнал ядерного экспорта (NES) на поверхности белка обеспечивают его транспорт (рисунок 10).

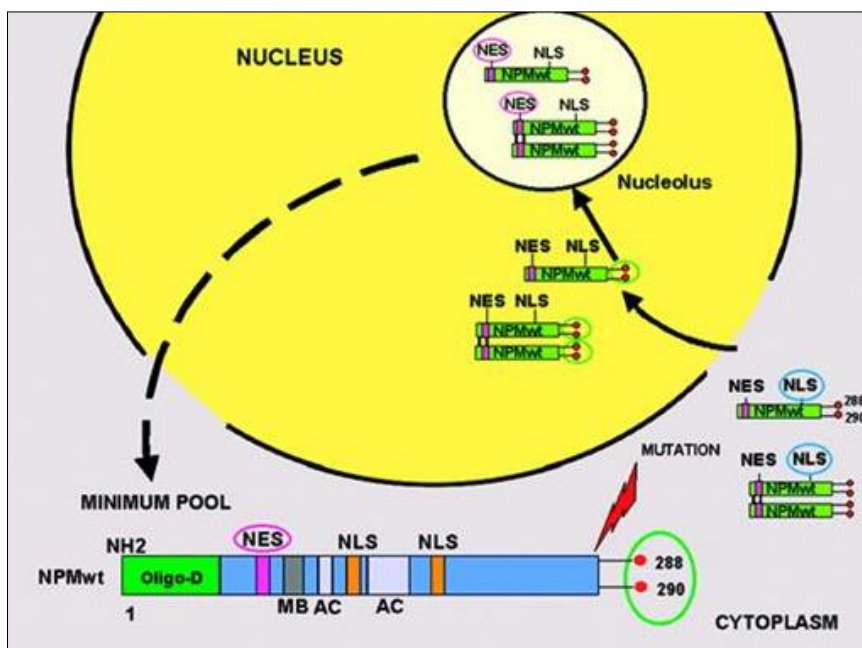


Рисунок 10 – Механизм транспорта белка NPM1

Сигнал NLS направляет нуклеофосмин из цитоплазмы в ядро, а затем через ядрышко связывающий домен (триптофаны 288 и 290) он проникает в ядрышко. Ядерный экспорт NPM1 опосредуется Crm1 (exportin 1) [60]. Однако, несмотря на мотивы NES, NPM1 остается локализованным в ядрышках, то есть в норме ядерный импорт преобладает над экспортом, т.к. мотив NES имеет слабое взаимодействие с Crm1.

1.6 Диагностические мутации в гене *NPM1*

Мутации, возникающие в гене белка нуклеофосмин, приводят к накоплению aberrантного белка в цитоплазме (рисунок 11). В одном случае может возникнуть дополнительный NES сигнал на С-конце белка, что увеличит его взаимодействие с Crm1. Второй вариант приводит к потере одного или двух триптофанов 288 и 290 и, как следствие, потери связи с ядрышком. Оба варианта приведут к активному экспорту мутантного белка в цитоплазму [61].

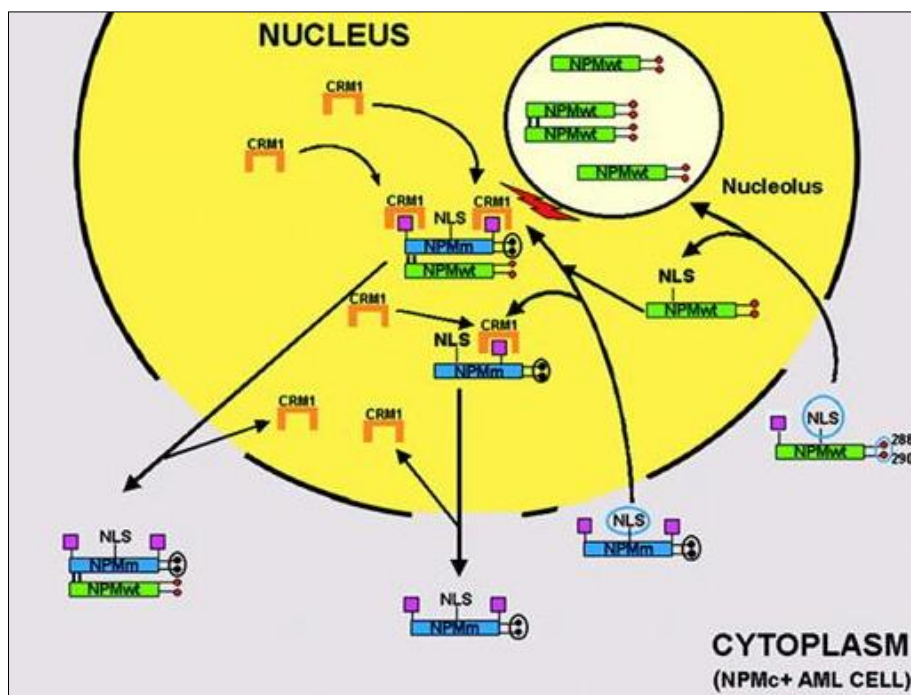


Рисунок 11 – Механизм транспорта цитоплазматического NPM1

Такой белок стали называть цитоплазматическим нуклофосмином [62]. Горячие точки мутаций расположены в 12 экзоне, причем подавляющее их большинство представляет собой вставку из четырех нуклеотидов и вызывает сдвиг рамки считывания, что приводит к потере какого-либо из триптофанов 288 или 290 [63]. Мутации в гене *NPM1* встречаются в 25% случаев у детей и 35% у взрослых с ОМЛ [64, 65], причем чаще у M1 подтипа [66].

На сегодняшний день обнаружено 37 различных мутаций, ассоциированных с локализацией белка в цитоплазме (рисунок 12). 75-80% приходится на мутацию А – дупликацию TCTG, остальные 15-20% на мутации В, D и остальные [67]

NPM1 mutation type	Nucleotide Insertion	Frequency in de novo AML
Mutation A	c.860_863dupTCTG	~72%
Mutation B	c.862_863insCATG	~12%
Mutation D	c.863_864insCCTG	~4%
Mutation G	c.863_864insTTTG	<1%
Mutation I	c.863_864insTAAG	<1%
Mutation J	c.863_864insCTTG	<1%
Mutation K	c.863_864insTATG	<1%
Others	-	<1%

Рисунок 12 – Частота встречаемости основных мутаций в гене *NPM1*

Прогностически важно не само наличие мутаций в гене *NPM1*, а скорее его сочетание с мутацией *FLT3*-ITD, о котором несколько раз говорилось ранее. Однако *NPM1* используют как диагностический маркер минимальной остаточной болезни при ОМЛ из-за его стабильной экспрессии в ходе заболевания [68].

1.7 Молекулярные методы, используемые для определения мутаций в гене *FLT3*

Для анализа мутаций в гене *FLT3* требуются эффективные, специфические и чувствительные молекулярные методы. Важно определить как длину дублируемого участка, так и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля. Также важно учитывать, что проведение анализа мутаций в гене *FLT3* требует хорошей оснащённости молекулярно-генетической лаборатории. Учитывая рекомендации Национальной всеобщей онкологической сети США и ELN, тестирование мутаций в гене *FLT3* должно проводиться на этапе постановки диагноза, то есть в кратчайшие сроки для попадания в терапевтическое окно [69, 4].

Следует отметить, что для выявления *FLT3*-ITD мутаций может быть достаточно детекции продуктов ПЦР электрофорезом в агарозном геле. Но при таком подходе встает вопрос относительно обнаружения мутантного продукта с небольшим дублированным участком. Что касается *FLT3*-TKD мутации, то их также важно детектировать в агарозном геле, но с дополнительным этапом ПДРФ анализа. Однако важно, что оба варианта могут быть использованы лишь для скрининга мутаций, а не для их количественного анализа (определения уровня аллельной нагрузки). С этой целью начали применять фрагментный анализ, который позволяет оценить аллельную нагрузку для обоих типов мутаций и определить длину tandemного повтора [70]. В обзоре литературы для своего исследования Зайкова и др [51]. акцентировали внимание, что как в России, так и за рубежом отсутствуют унифицированные протоколы определения мутаций. Несмотря на, казалось бы, эффективный фрагментный анализ, коллеги из США и других стран предпочитают лишь скрининг с помощью ПЦР-теста и электрофореза в агарозном геле [71]. В России также предпочтение отдается скрининговой методике, что можно объяснить невозможностью приобретения лабораториями прибора для капиллярного электрофореза. Говорить об полногеномном или полноэкзонном NGS методике в России по этой же причине не приходится, хотя этот метод также применялся для анализа мутаций *de novo* за рубежом [72], однако имеет недостаток в виде продолжительности анализа, исключающий его использование в рамках терапевтического окна.

Зайкова и др. приводят примеры готовых коммерческих наборов для анализа мутаций в гене *FLT3*: два набора для скрининга мутаций ПЦР в режиме реального времени компаний MyBiosource и 3B BlackBio Biotech India Ltd, а также наборы компании Invivoscribe с определением ПЦР-продукта в агарозном геле и с проведением фрагментного анализа [73]. Именно последние наборы зарекомендовали себя по всему миру, в особенности это важно, потому что именно фрагментный анализ на сегодняшний день является рекомендованным методом для анализа мутаций в гене *FLT3* [4]. Однако, учитывая реалии, чувствительность доступного и простого метода ПЦР с детекцией в агарозном геле можно повысить, если в анализ брать наибольшее число мутантных клеток. Это можно достичь за счет использования материала костного мозга [74], желательно свежеприготовленного, во избежание деградации ДНК.

Научно-практическая лаборатория молекулярно-генетических методов исследований в г. Красноярске имеет в своем распоряжении 8-канальный секвенатор «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), что позволяет провести фрагментный анализ мутаций в гене *FLT3* на ее базе.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Исследование было выполнено на базе НПЛМГМИ СФУ в г. Красноярске. В анализ было включено 18 пациентов с подтвержденным диагнозом ОМЛ. Из них 15 составляли дети с разными фенотипическими типами ОМЛ и 3 взрослых (таблица 3). Диагноз был установлен согласно стандартам ВОЗ [3, 6], в том числе на основании цитогенетического исследования костного мозга по анализу хромосомных аберраций.

Таблица 3 – Выборка пациентов с диагнозом ОМЛ

№ пациента	Диагноз	Хромосомные аномалии	Исход заболевания на момент исследования
Дети			
1	ОМЛ (M4)	t (8;21)	ремиссия
2	ОМЛ (M2)	t (8;21)	неизвестно
3	ОМЛ (M4)	-	умерла
4	ОМЛ (M4)	-	неизвестно
5	ОМЛ (M5a)	t (10;11)	ремиссия
6	ОМЛ (M1)	t (8;21)	ремиссия
7	ОМЛ (M3)	t (15;17)	неизвестно
8	ОМЛ (M2)	t (8;21)	ремиссия
9	ОМЛ (M4)	inv 16	ремиссия
10	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
11	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
12	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
13	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
14	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
15	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
Взрослые			
16	ОМЛ (исход из МДС)	-	первый рецидив
17	ОМЛ (не уточнен)	-	неизвестно
18	а	ОМЛ (не уточнен)	первый рецидив
	б	ОМЛ (не уточнен)	второй рецидив

В качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК от 18 пациентов (19 образцов), выделенная из клеток костного мозга детей и из лейкоцитов цельной крови взрослых пациентов. Материал костного мозга от 15 детей, находившихся на стационарном лечении в отделении онкологии и гематологии КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства» в разные периоды с 09.2012 г. по 06.2017 г, находился в архиве лаборатории НПЛМГМИ СФУ. Ранее у этих пациентов магистрантом кафедры защиты и современных технологий мониторинга лесов и сотрудником лаборатории НПЛМГМИ СФУ А.А. Фалеевой было проведено генетическое исследование костного мозга по выявлению хромосомных аномалий с использованием биологических микрочипов. Взятие крови у одного взрослого пациента №16, поступившего с рецидивом ОМЛ (исход из МДС) в КГБУЗ «Краевая клиническая больница» г. Красноярска 01.2020 г., осуществляли из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Три образца ДНК, выделенных фенол-хлороформным методом, от двух взрослых пациентов (2 образца от одного пациента во время первого и второго рецидива ОМЛ), были предоставлены лабораторией молекулярной гематологии НИИЦ гематологии, г. Москва.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови и клеток костного мозга проводили с помощью набора реагентов ДНК-Сорб-В (АмплиСенс, Россия). Далее целевые участки ДНК амплифицировали с помощью набора «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Для анализа *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD мутаций участки 14-15 и 20 экзонов соответственно амплифицировали с флуоресцентно-мечеными праймерами с целью проведения далее фрагментного анализа. Ампликоны участка 20 экзона дополнительно гидролизовали рестриктазой EcoRV (СибЭнзим, Россия). Продукты ПЦР и рестрикты смешивали с GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США) и подвергали капиллярному электрофорезу с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США). Обработку результатов фрагментного анализа проводили в GeneMarker software (SoftGenetics, США). Дополнительно *FLT3*-положительные образцы амплифицировали (без меченных праймеров) и подвергали секвенирующей ПЦР с прямого и обратного праймеров с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Капиллярный электрофорез также проводили с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), а обработку результатов секвенирования – в Sequence Scanner software (Applied Biosystems, США).

2.2 Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия)

ДНК из цельной крови и клеток костного мозга (выделенных и сохраненных ранее в реагенте «Раствор Д») выделяли с помощью набора ДНК-сорб-В (АмплиСенс, Россия).

Лейкоциты цельной крови предварительно отмывали реагентом ГЕМОЛИТИК (АмплиСенс, Россия): к 1 мл гемолитика добавляли 250 мкл предварительно перемешанного образца крови; оставляли пробирки при комнатной температуре на 5 мин, перемешивали и снова оставляли на 5 мин; центрифугировали пробы (8 тыс. об/мин, 2 мин); отбирали надосадочную жидкость, содержащую разрушенные эритроциты.

Из отмывтых лейкоцитов выделяли ДНК по следующему протоколу:

1. Предварительно Лизирующий раствор и Раствор для отмывки 1 нагревали на термостате до 65°C.

2. В каждую пробирку с осадком лейкоцитов вносили по 300 мкл лизирующего раствора. Пробы перемешивали на вортексе, прогревали в течение 5 мин на термостате при 65 °С и центрифугировали (5 тыс об/мин, 5 сек).

3. Предварительно сорбент универсальный ресуспендировали на вортексе.

4. В каждую пробирку вносили по 25 мкл сорбента, перемешивали на вортексе, оставляли при комнатной температуре на 2 мин, перемешивали и снова оставляли на 5 мин. Пробы центрифугировали (5 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем.

5. В каждую пробирку вносили по 300 мкл Раствора для отмывки 1, перемешивали до полного ресуспендирования сорбента на вортексе; центрифугировали (5 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем.

6. В каждую пробирку вносили по 500 мкл Раствора для отмывки 2, перемешивали до полного ресуспендирования сорбента на вортексе; центрифугировали (10 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; удаляли надосадочную жидкость вакуумным отсасывателем. Повторяли указанную процедуру отмывки еще раз с последующим удалением надосадочной жидкости.

7. Для подсушивания сорбента открытые пробирки помещали в термостат на 5-10 мин при 65 °С.

8. Для элюции ДНК из сорбента в каждую пробирку вносили по 50 мкл ТЕ-буфера, перемешивали на вортексе и возвращали пробирки с закрытыми крышками в термостат на 5 мин при 65°C, периодически встряхивая на вортексе.

9. Пробирки центрифугировали (13 тыс об/мин, 1 мин). В надосадочной жидкости находилась очищенная ДНК.

2.3 Измерение концентрации ДНК с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3 (Invitrogen, США)

Концентрацию выделенной ДНК измеряли с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3. (Invitrogen, США).

Принцип метода основан на специфичном связывании флуоресцентного красителя с молекулой-мишенью (в нашем случае с ДНК). По уровню флуоресценции, детектируемым прибором, определяется концентрация ДНК в пробе.

Концентрацию ДНК измеряли по следующему протоколу:

1. Предварительно все реагенты размораживали при комнатной температуре.
2. Рабочую смесь готовили из расчета на N+2 проб (где N – число образцов, а 2 – число стандартов для калибровки прибора): $1*(N+2)$ мкл концентрированного реагента + $199*(N+2)$ мкл буфера для разведения.
3. В пробирки на 0,5 мл вносили для стандартов – 190 мкл Рабочей смеси и 10 мкл Стандарта; для образцов – 198 мкл Рабочей смеси и 2 мкл ДНК.
4. Пробы тщательно вортиксировали 2-3 сек, сбрасывали капли и инкубировали 2 мин.
5. На флуориметре Qubit 3.0 выбирали анализ dsDNA HS Assay.
6. Калибровку производили с помощью Стандартов №1 и №2.
7. После измеряли концентрацию исследуемых образцов в пмоль/мкл.

2.4 Проведение ПЦР с помощью набора реагентов «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Москва) на приборе CFX 96 (BioRad, США)

ПЦР проводили с помощью набора «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия) на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Программа амплификации и схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлены в таблице 4. Общая реакционная смесь готовилась в одной отдельной пробирке из расчета на N+1 проб (образцы + холостая проба) и раскапывалась по 22 мкл в каждую пробирку, затем в эти пробирки вносилось по 3 мкл ДНК. Продукты амплификации детектировали методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Таблица 4 – Протокол реакции ПЦР

Программа амплификации			Реакционная смесь объемом 25 мкл (1 проба)		
95 °С	3 мин	1 цикл	ddH ₂ O		
95 °С	30 сек	30 циклов	10x ПЦР буфер Б + EVA Green		2,5 мкл
			dNTP, 2,5 мМ		2,5 мкл
			MgCl ₂ , 25 мМ		1,5 мкл
62 °С	40 сек		10 пмоль/мкл	Прямой	1 мкл
				Обратный	1 мкл
72 °С	30 сек		SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл		0,25 мкл
72 °С	5 мин	1 цикл	Образец ДНК, ~50 нг		3 мкл

В таблице 5 представлены последовательности праймеров для анализа мутаций в гене *FLT3*, использованные в настоящем исследовании и заимствованные из указанных в таблице статей.

Таблица 5 – Последовательности праймеров

Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер фрагмента	Источник
<i>FLT3</i> -ITD forward	TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA	326 bp	[75]
<i>FLT3</i> -ITD reverse	TTCCATAAGCTGTTGCGTTCATCAC		
<i>FLT3</i> -ITD-FAM forward	FAM-TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA		
<i>FLT3</i> -TKD forward	CCGCCAGGAACGTGCTTG	114 bp	[76]
<i>FLT3</i> -TKD reverse	GCAGCCTCACATTGCCCC		
<i>FLT3</i> -TKD-HEX forward	HEX-CCGCCAGGAACGTGCTTG		
<i>FLT3</i> -TKD-FAM reverse	FAM-GCAGCCTCACATTGCCCC		

Для исследования мутаций *FLT3*-ITD амплифицировали участок 14-15 экзона длиной 326 bp, захватывающего все известные тандемные повторы JM домена. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительный прямой праймер, который на 5'-конце имел флуоресцентную FAM метку.

Для исследования мутаций *FLT3*-TKD амплифицировали участок 20 экзона длиной 114 bp. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительные прямой и обратный праймеры, которые на 5'-конце были флуоресцентно-мечеными: прямой праймер – HEX меткой, обратный – FAM меткой. В данном случае маркировались оба праймера с целью детекции двух типов рестриктов, образующихся при гидролизе рестриктазой в ходе анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ анализа).

Для секвенирования по Сэнгеру *FLT3*-положительных образцов использовались те же пары праймеров, но без флуоресцентных меток.

2.5 Проведение ПДРФ анализа для исследования *FLT3*-TKD мутаций с помощью рестриктазы *EcoRV* (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США)

Для исследования *FLT3*-TKD мутаций ампликоны участка 20 экзона подвергали ПДРФ-анализу с помощью рестриктазы *EcoRV* (СибЭнзим, Россия) на приборе MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлена в таблице 6. Пробы инкубировались 1 час 30 мин при 37 °С, а затем 20 мин при 80 °С для инактивации фермента. Продукты рестрикции детектировали методом электрофореза в 8% полиакриламидном (ПААГ) геле.

Таблица 6 – Протокол реакции рестрикции

Реакционная смесь объемом 20 мкл (1 проба)	
ddH ₂ O	10,5 мкл
10x буфер W	2 мкл
BSA, 1 мг/мл	2 мкл
Рестриктаза <i>EcoRV</i> , 20000 е.а./мл	0,5 мкл (10 е.а.)
Образец ампликонов, ~100 нг	5 мкл

Схема рестрикционного анализа для поиска *FLT3*-TKD мутаций, использованная в данной работе, представлена на рисунке 13.

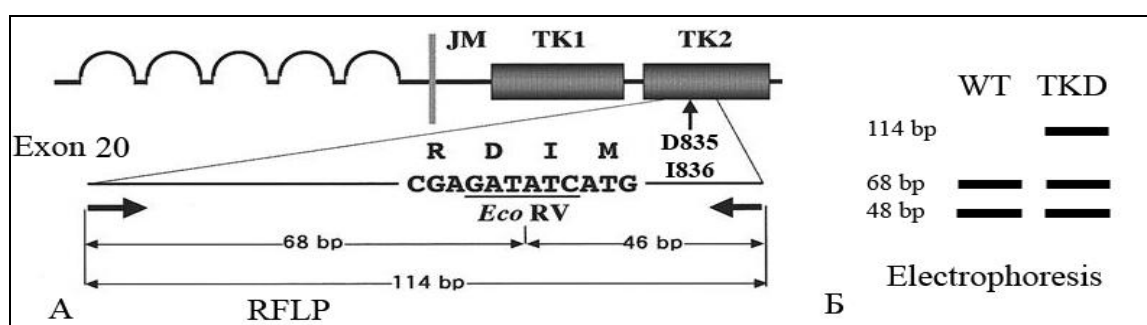


Рисунок 13 – Схема рестрикционного анализа для обнаружения *FLT3*-TKD мутаций: А – сайт узнавания рестриктазы *EcoRV* [77], Б – теоретическое электрофоретическое разделение продуктов рестрикции для мутантного (TKD) и нормального аллеля (WT)

В основе ПДРФ анализа лежит использование эндонуклеаз рестрикции (рестриктазы) – специфические клеточные ферменты бактерий, входящих в систему рестрикции-

модификации для защиты собственной ДНК от чужеродных нуклеиновых кислот и ферментов. За счет свойства рестриктаз расщеплять двуцепочечную молекулу ДНК в строго специфическом для себя сайте узнавания, их стали использовать в молекулярной генетике в качестве молекулярных ножниц, в особенности рестриктазы второго типа. Для анализа точечных мутаций или небольших делеций или инсерций подбирают рестриктазу так, чтобы мутация либо изменяла естественный сайт узнавания фермента, либо, наоборот, из-за мутации возникал новый сайт узнавания. В итоге различные по длине рестрикты для мутантного и нормального аллелей можно легко дифференцировать при электрофорезе.

2.6 Проведение фрагментного анализа с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)

Для проведения фрагментного анализа 0,5 мкл флуоресцентно-меченных продуктов амплификации (*FLT3*-ITD) или рестрикции (*FLT3*-TKD) смешивали с 0,5 мкл GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США) и 9 мкл Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, США). В постановку был включен отрицательный контроль – образец пациента без мутаций в гене *FLT3*. Приготовленные смеси нагревали в термостате при 95 °С в течение 3 мин и остужали до 4 °С в течение 2 мин. Затем пробы переносили по 10 мкл в 96-луночный планшет генетического анализатора, откручивали на центрифуге для сброса капель и помещали в прибор. Капиллярный электрофорез проводили на 8-капиллярном приборе «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), полимер POP-7 (Applied Biosystems, США). Обработку результатов фрагментного анализа проводили в GeneMarker software (SoftGenetics, США). Схема фрагментного анализа для данного исследования представлена на рисунке 14.

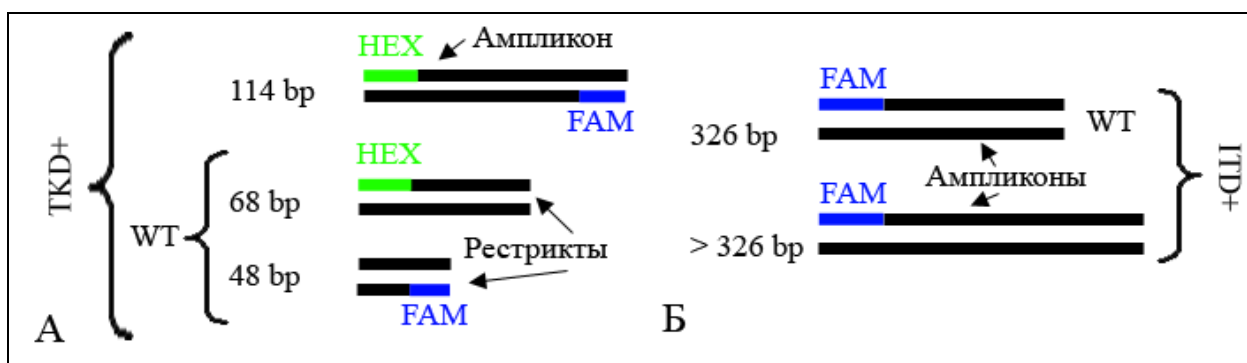


Рисунок 14 – Фрагментный анализ для исследования мутаций в гене *FLT3*: А – для *FLT3*-TKD мутаций, Б – для *FLT3*-ITD мутаций: HEX, FAM – праймеры с соответствующими флуоресцентными метками, WT – дикий тип

Аллельная нагрузка для положительных образцов рассчитывалась по формуле:

$$\frac{\text{Высота пика } mt}{\text{Высота пика } WT + \text{высота пика } mt} * 100\%,$$

– где *WT* – фрагмент, соответствующий нормальному аллелю, *mt* – фрагмент, соответствующий мутантному аллелю, высота пика выражена в относительных единицах флуоресценции

Фрагментный анализ представляет собой серию методов, в которых флуоресцентно-меченные амплифицированные фрагменты ДНК разделяют с помощью капиллярного электрофореза с определением их длины относительно стандартов размера (рисунок 15). Фрагментный анализ позволяет определять длину фрагмента относительно стандартов в отличие от секвенирования, которое позволяет определять последовательность анализируемого фрагмента ДНК.

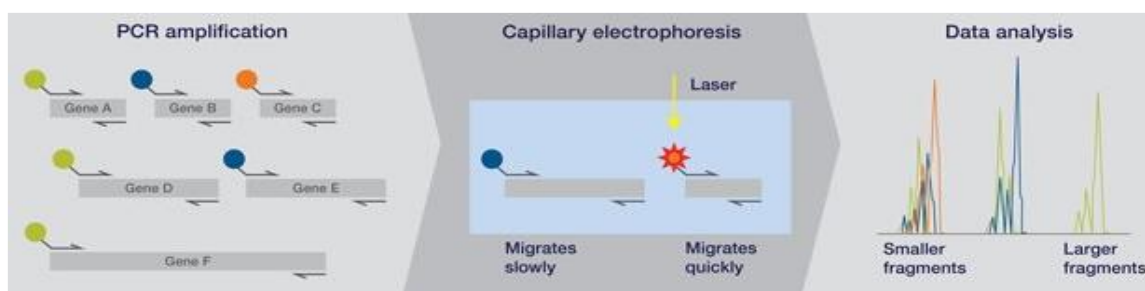


Рисунок 15 – Этапы фрагментного анализа [78]

На первом этапе фрагментного анализа нарабатывается целевой фрагмент ДНК в реакции ПЦР с присоединением к нему флуоресцентной метки. Фрагменты могут маркироваться двумя способами: за счет включения 5'-меченного ген-специфического праймера или меченных dNTPs. Для выполнения данной работы, в связи с необходимостью определения уровня аллельной нагрузки были выбраны флуоресцентно-меченные праймеры, поскольку если выбрать меченые dNTPs, то они могут неравномерно распределиться в разных цепях ДНК. Так, для анализа *FLT3*-ITD использовали один меченый праймер, а для анализа *FLT3*-TKD мутаций – два меченных праймера. При этом уровень аллельной нагрузки определяется по высоте накопления флуоресцентного сигнала, соответствующего количеству специфически провзаимодействованных молекул меченного праймера и одной из цепей ДНК. Это свойство также повышает точность анализа [78]. Второй этап включает разделение меченных фрагментов с помощью капиллярного электрофореза, например на секвенаторе «Генетический анализатор 3500». Для этого к образцу добавляют стандарты

размера, которые по аналогии с маркерами молекулярного веса представляют собой фрагменты ДНК разной, уже известной длиной, но при этом, также как и образцы, флуоресцентно-меченные. При капиллярном электрофорезе пробы забираются за счет электрокинетической инъекции (заряд высокого напряжения) в капилляр диаметром 20-100 мкм, заполненный полимером (пористый матрикс). За счет отрицательного заряда фосфатных остатков в нуклеотидах фрагменты ДНК движутся по капилляру, короткие фрагменты движутся быстрее, а длинные медленнее. Недалеко от анода расположен детекторный блок с лазером, вызывающий флуоресценцию красителей, которая детектируется CCD камерой. Третьим этапом специализированные программы переводят информацию о моменте времени детекции сигнала в длину фрагмента относительно уже известных длин фрагментов в стандарте. Для корректного анализа образцов программой в постановку всегда включают отрицательный контроль. Представленная схема фрагментного анализа может включать и дополнительные методы, например рестрикционный анализ как в данном исследовании, или модификации, например мультиплексный MPLA-анализ с зондами.

2.7 Проведение секвенирования по Сэнгеру с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)

FLT3 положительные продукты ПЦР очищали с помощью реагента ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США). Реагент очищает ампликоны от неиспользованных dNTPs (щелочная фосфатаза) и праймеров (экзонуклеаза I), оставшихся в смеси продуктов ПЦР, для их использования в последующей секвенирующей ПЦР.

Чистку ампликонов проводили по следующему протоколу:

1. Реагент ExoSAP-IT хранится в морозильнике при -20°C , поэтому реактив нельзя размораживать.
2. В новых пробирках к 5 мкл ПЦР-продукта вносили 2 мкл ExoSAP-IT-реагента.
3. Пробы переносили в MJ Mini Thermal Cycler (Bio-Rad, США) и инкубировали по следующей программе: при 37°C в течение 15 минут для чистки и при 80°C в течение 15 минут для инактивирования ExoSAP-IT реагента.

Секвенирующую ПЦР проводили с помощью набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на приборе Veriti (Applied Biosystems, США). Программа амплификации и схема приготовления реакционной смеси на одну пробу представлены в таблице 7. Число пробирок составляло $N*2$ – на каждый образец приходилось по две пробирки для прямого и обратного праймера в отдельности.

Таблица 7 – Протокол секвенирующей ПЦР

Программа амплификации			Реакционная смесь объемом 10 мкл (1 проба)	
96 °С	1 мин	1 цикл	dH ₂ O	3 мкл
96 °С	10 сек	25 циклов	Смесь реакционного буфера и mix*	3 мкл
50 °С	5 сек			
60 °С	4 мин			
			АМЛИКОНЫ**	2 мкл

*Отдельно готовили смесь на все пробы N*2. На одну пробирку: 1 мкл 5X Sequencing Buffer и 2 мкл BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction Mix.

**Если полоска ампликонов была слабая на электрофорезе, то вносили 3,5 мкл ампликонов и 1,5 мкл dH₂O.

Продукты секвенирующей ПЦР очищали с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) по следующему протоколу:

1. В новые пробирки к 5 мкл сиквенс-продукта добавляли 22,5 мкл реагента SAM™ Solution (для производительности второго компонента).
2. Суспендировали реагент XTerminator™ Solution и вносили по 5 мкл (для удаления меченных ddNTPs).
3. Пробирки переносили на 30 минут в шейкер.
4. После пробы пипетировали и переносили по 31,5 мкл в плашку севенатора и центрифугировали для сброса капель и осаждения XTerminator™ Solution на дне плашки.

Капиллярный электрофорез также проводили с помощью прибора «Генетический анализатор 3500» (Applied Biosystems, США), а обработку результатов секвенирования – в Sequence Scanner software (Applied Biosystems, США).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Дизайн исследования мутаций в гене *FLT3*

Как упоминалось выше, *FLT3*-ITD мутации могут встречаться у пациентов с ОМЛ вне зависимости от наличия хромосомных аномалий, а также оказывают большое влияние на исход заболевания. Особенно важна при таких мутациях длина tandemного повтора и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля (в рекомендациях ELN 2017 г. [4] пациенты с уровнем аллельной нагрузки выше 0,5 или 50% имеют неблагоприятный исход). В исследовании Liu et al. [50] пациенты из группы с повторами длиной более 39 bp у пациента имела исход хуже группы с длиной повтора меньше 39 bp (39 bp было медианой в выборке). По этим причинам *FLT3*-ITD мутации являются прогностически значимыми и обязательными при постановке диагноза и лечения. *FLT3*-TKD мутации же пока не внесены как обязательные маркеры ОМЛ, но при этом они также играют роль в развитии заболевания и формировании резистентности к препаратам.

В данной работе исследовались оба типа *FLT3* мутаций. Подход для анализа мутаций, разработанный нами, представлен на рисунке 16. Стоит отметить, что в данной работе в качестве основного метода, позволяющего определить не только длину повтора, но и уровень аллельной нагрузки использовался фрагментный анализ. В качестве дополнительного метода, позволяющего проанализировать последовательность и уточнить локализацию мутации, использовали секвенирование по Сэнгеру.

Также, независимо от данного исследования бакалавром кафедры медицинской биологии Д.В. Курочкиным был проведен скрининговый анализ *FLT3*-ITD мутаций для всех пациентов с ОМЛ методами гетеродуплексного анализа и HRM.

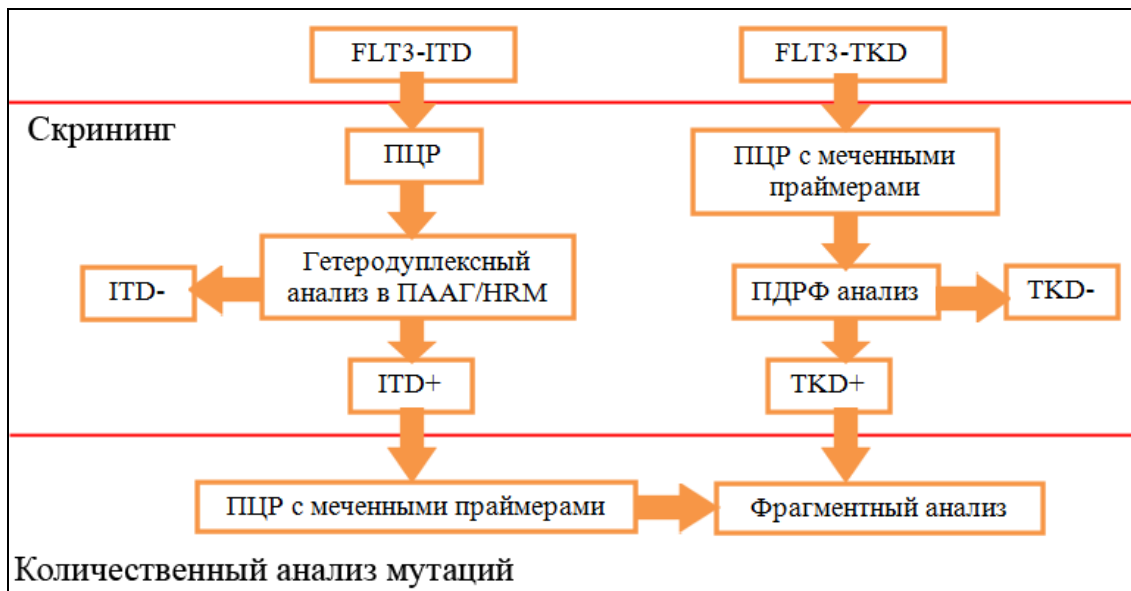


Рисунок 16 – Дизайн исследования для обнаружения мутаций в гене *FLT3*

Важно отметить, что в работе для анализа *FLT3*-ITD мутаций использовались праймеры, которые фланкируют участок, захватывающий все известные тандемные повторы JM домена по данным COSMIC (рис. 17), дата последнего обращения 12.06.20 г.

Что касается *FLT3*-TKD мутаций, то ампликон составил 114 bp и соответствует всей последовательности аминокислот петли активации бела (согласно 3D структуре белка Zorn et al. [79]).

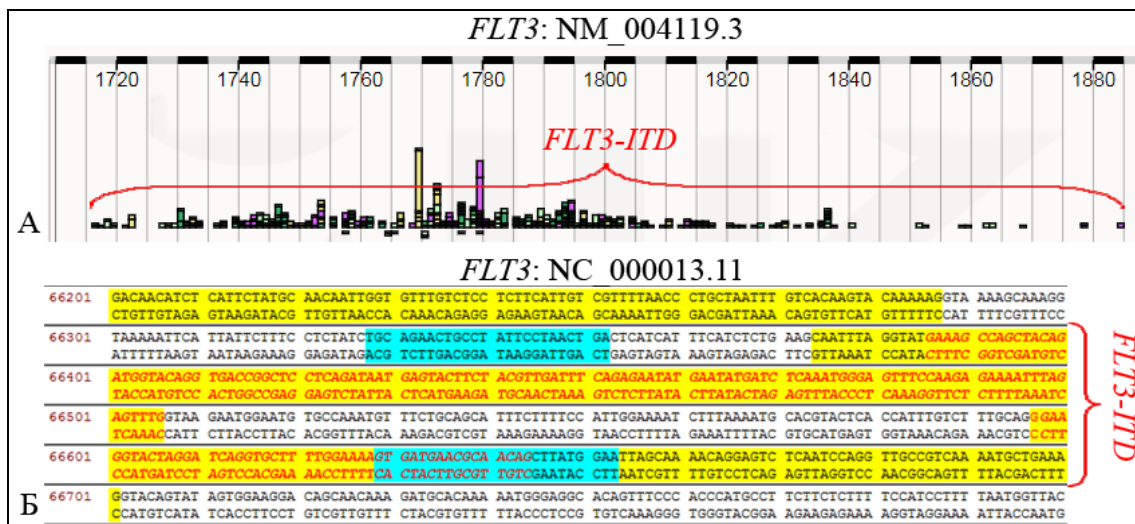


Рисунок 17 – Участок сосредоточения всех известных мутаций *FLT3*-ITD: А – участок с 1717 по 1885 нуклеотид для мРНК NM_004119.3 в базе данных COSMIC; Б – этот же участок на последовательности гена *FLT3* в формате Genbank в Vector NTI software выделен красным полужирным курсивом (интрон не входит в участок). Желтое выделение – часть 13 экзона,

14 и 15 экзоны полностью; голубое выделение – прямой и обратный праймеры, используемые в данном исследовании.

Фрагментный анализ на сегодняшний день стал более предпочтительным для анализа протяженных делеций или инсерций нежели секвенирование по Сэнгеру за счет своей простоты, скорости выполнения и экономичности. Также с помощью секвенирования по Сэнгеру невозможно проанализировать длинные дубликации из-за ограниченности длины ампликона. Для назначения таргетных препаратов не обязательно знать последовательность дублицированного участка, а важно определение уровня аллельной нагрузки [4]. Учитывая, что без дополнительных программных обеспечений определить уровень аллельной нагрузки секвенированием по Сэнгеру не представляется возможным, то нами был выбран фрагментный анализ, который к тому же может выявить малоцентный мутантный аллель (от 5% [80] против 15-20% при секвенировании по Сэнгеру [81]). Рестрикционный анализ меченного фрагмента 20 экзона гена позволил также выявлять *FLT3*-TKD мутации фрагментным анализом с определением аллельной нагрузки. Однако при использовании рестриктазы *EcoRV* (для других рестриктаз ситуация аналогична) любое изменение первичной структуры в сайте рестрикции GATATC приводит к потере этого сайта и, как следствие, не расщеплению ампликона ферментом. Тем самым для определения того, какой именно из 6 нуклеотидов был заменен, требуется секвенирование участка. Существуют коммерческие TaqMan тест-системы для двух часто встречаемых мутаций D835Y и D835V с количественным определением аллеля, однако такие системы упускают другие возможные варианты мутаций TKD [82].

Несмотря на необходимость использования фрагментного анализа и секвенирования для анализа *FLT3* мутаций исследователи все ещё часто ограничиваются проведением анализа в скрининговом формате с использованием разделения продуктов ПЦР в агарозном геле для ИТД или ПДРФ анализа с последующим разделением рестриктов в агарозном геле для TKD. Например, коммерческая мультиплексная тест-система скрининга LeukoStrat™ *FLT3* MutationAssay предназначена для определения обоих типов мутаций в гене *FLT3*. В данной тест системе используется мультиплексная ПЦР для амплификации продуктов с целью скрининга обоих типов мутаций, с последующей обработкой продукта рестриктазой *EcoRV* и разделением фрагментов в агарозном геле. Второй вариант этой тест-системы направлен уже на выявление мутаций методом фрагментного анализа [73].

3.2 Анализ *FLT3*-ITD мутаций методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру

В результате проведения фрагментного анализа из 18 пациентов *FLT3*-ITD мутации были обнаружены у 5 пациентов (27,8%), что близко к литературным данным по распространенности данного типа мутаций у пациентов с ОМЛ [53].

Электрофоретический профиль образца дикого типа при проведении фрагментного анализа представлен одним пиком, соответствующим фрагменту размером 326 bp (рисунок 18). Все *FLT3*-ITD-отрицательные образцы имели аналогичный профиль. При дупликации происходит увеличение ампликона на длину дублированного участка, тем самым мутантный аллель будет давать дополнительный продукт большего размера. Причем по литературным данным тандемные повторы имеют длину, кратную 3-м [44].

Нужно отметить, что на всех представленных здесь и ниже профилях присутствует задвоение пиков ПЦР продукта (фрагменты «-1»), что, по всей видимости, связано с аденилтрансферазной активностью полимеразы (добавляется единичный аденин на 3'-конце цепи).

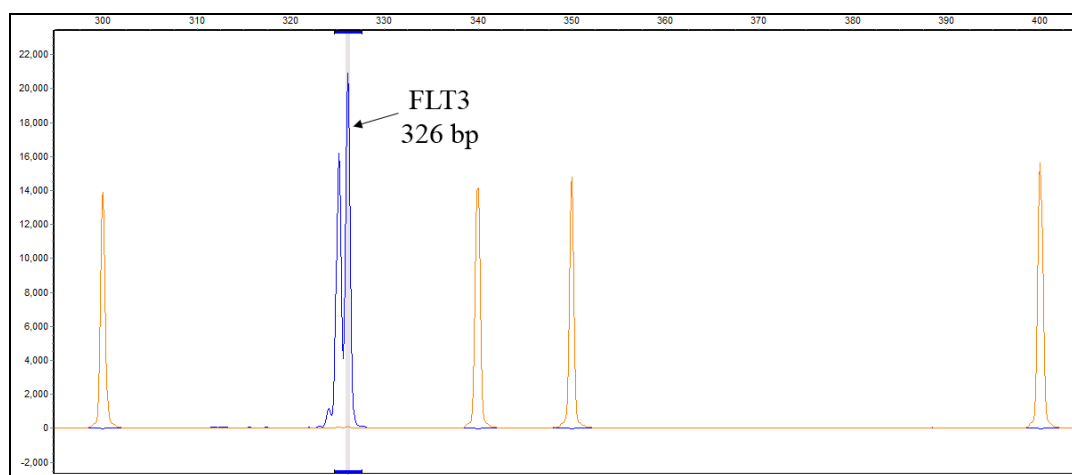


Рисунок 18 – Фрагментный анализ контрольного образца: синий пик – продукт ПЦР дикого типа, оранжевые пики – стандарт размера GeneScan 500 LIZ

FLT3-ITD-положительные образцы дополнительно были секвенированы по Сэнгеру. На рисунке 19 показаны примеры последовательностей ДНК для образцов №3 и №16 и соответствующих секвенограмм (общий вид).

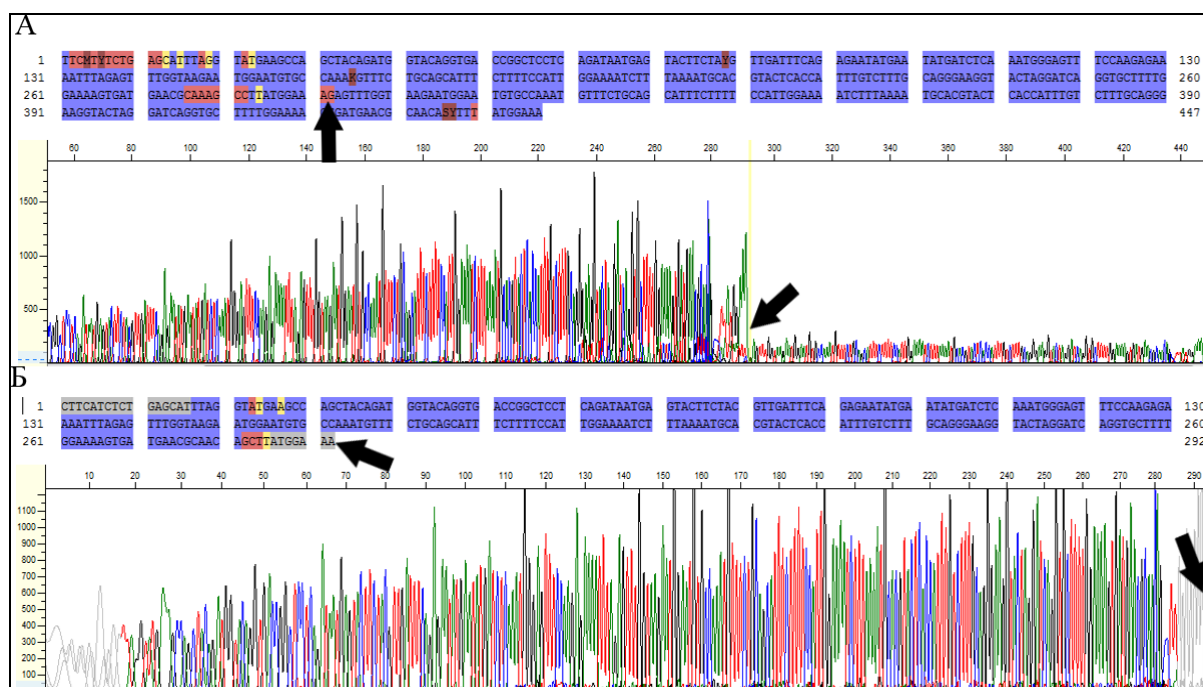


Рисунок 19 – Результат секвенирования по Сэнгеру образцов №16 (А) и №3 (Б). Стрелками показаны места окончания прочтения фрагмента дикого типа

Стоит обратить внимание, что секвенированная последовательность будет меньше ожидаемой. Это объясняется тем, что первые 40-50 нуклеотидов ампликона не «прочитываются» при анализе и автоматически отбрасываются программой. Поэтому для образца №16 секвенированная последовательность составляет не 480 bp (мутантный продукт), а 447 bp. Также на секвенограмме видно, где заканчивается прочтение продукта дикого типа. Для образцов, выделенных из материала костного мозга детей, секвенирован фрагмент, который обрывается сразу после окончания фрагмента дикого типа (при этом «чистое» прочтение последовательности останавливается до момента обрыва). Это можно объяснить частичной деградацией ДНК в ходе долгого хранения клеточного материала.

3.2.1 Количественный анализ *FLT3-ITD* мутаций у детей

В результате проведения фрагментного анализа из 15 пациентов-детей *FLT3-ITD* мутации были обнаружены у 2 пациентов №3 и №4 (13,3%), что соответствует литературным данным по распространенности данного типа мутаций у детей с ОМЛ [2]. Стоит обратить внимание, что оба ребенка имели М4 подтип ОМЛ и не имели хромосомных аномалий в кариотипе. В частности ранее было проведено 2 исследования: 1) цитогенетическое исследование (г. Москва) и 2) анализ ассоциированных с острым лейкозом хромосомных транслокаций методом биологических микрочипов (г. Красноярск, г. Москва).

Для образца №3 фрагментный анализ позволил выявить мутантный продукт размером 371 bp. Учитывая, что длина ампликона дикого типа составляет 326 bp можно заключить, что длина дублированного участка составила 45 bp. Уровень аллельной нагрузки был определен как 5% (рисунок 20).

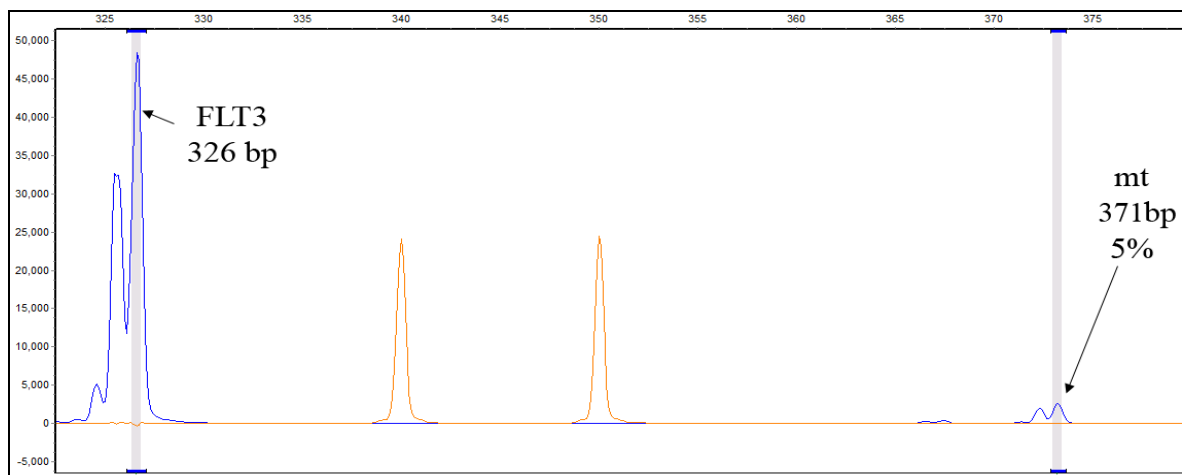


Рисунок 20 – Фрагментный анализ образца №3: mt – мутантный продукт

Важно отметить, что при проведении секвенирования для данного образца в связи с низким уровнем аллельной нагрузки (ниже порога обнаружения метода секвенирования по Сенгеру) пики, соответствующие мутантному аллелю, сложно интерпретируемы. Из-за этого невозможно было определить последовательность тандемного повтора, однако место вставки повтора (третий А на рисунке 21 обозначен стрелкой) соответствует 1806 нуклеотиду в мРНК (NM_004119.3).

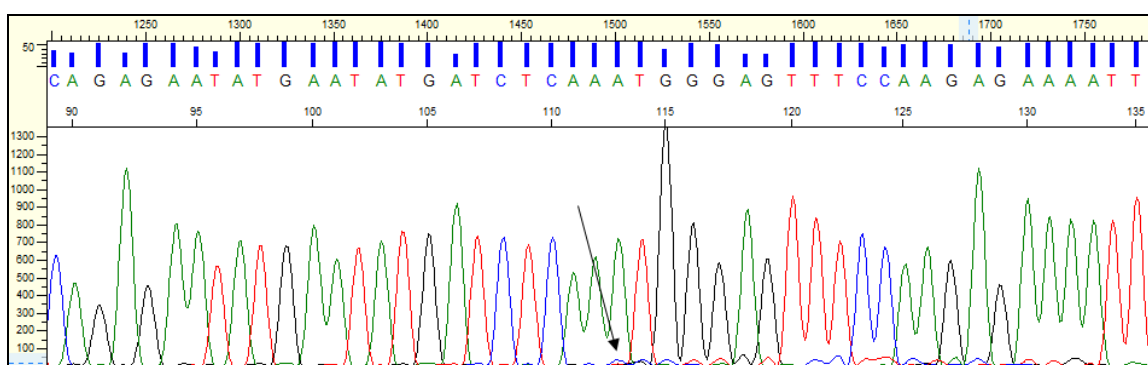


Рисунок 21 – Секвенограмма образца №3: стрелкой обозначено место вставки тандемного повтора

Для образца №4 фрагментный анализ позволил выявить мутантный продукт размером 374 bp. Учитывая, что длина ампликона дикого типа составляет 326 bp можно заключить, что

длина дуплицированного участка составила 48 bp. Уровень аллельной нагрузки был определен как 7% (рисунок 22).

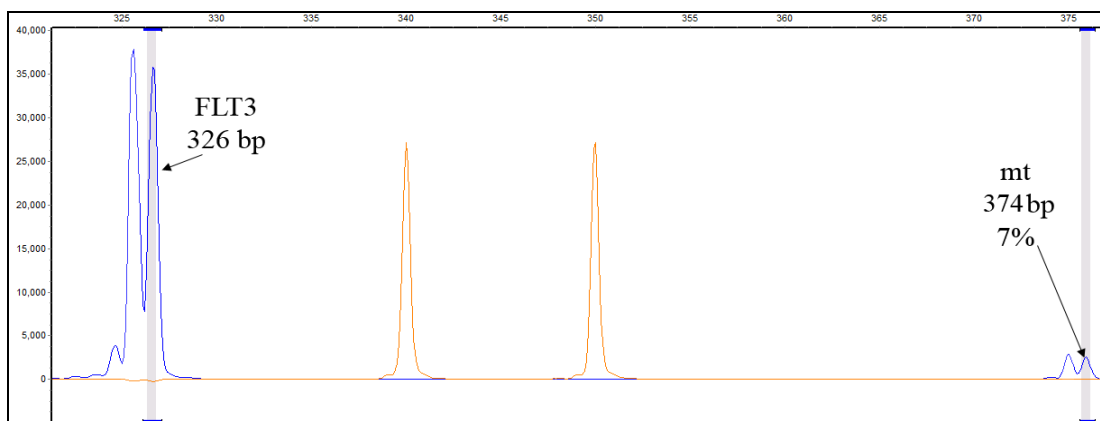


Рисунок 22 – Фрагментный анализ образца №4: mt – мутантный продукт

При проведении секвенирования для данного образца в связи с низким уровнем аллельной нагрузки пики, соответствующие мутантному аллелю, сложно интерпретируемы. Из-за этого невозможно было определить последовательность тандемного повтора. Кроме того по секвенограмме сложно четко определить положение вставки повтора из-за дополнительных шумовых пиков: предполагаемая позиция на рисунке 23 обозначена стрелкой и соответствует 1799 нуклеотиду в мРНК (NM_004119.3).

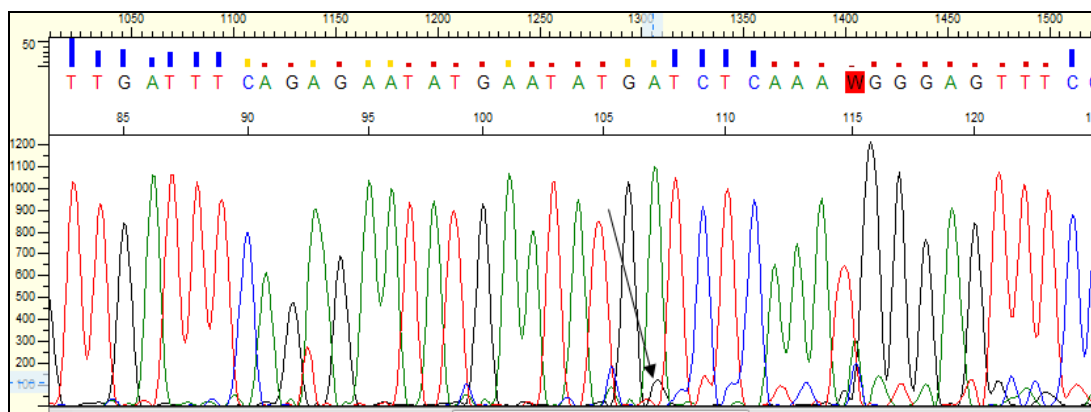


Рисунок 23 – Секвенограмма образца №4: стрелкой обозначено предполагаемое место вставки тандемного повтора

Учитывая, что длина тандемного повтора в обоих образцах небольшая и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля меньше 50%, можно говорить о благоприятном исходе заболевания. Однако пациент №3 на момент исследования умер. Здесь можно упомянуть следующие моменты: 1) *FLT3*-ITD мутация у данного пациента выявлена в образце костного мозга от 2014 г., а ребенок умер в 2015 г, то есть за это время уровень

аллельной нагрузки выявленной мутации мог вырасти и внести свой вклад в прогрессию заболевания; 2) ранее методом Биочипов у данного пациента не было выявлено ассоциированных с ОМЛ транслокаций. Но важно отметить, что при этом были проанализированы лишь самые часто встречающиеся хромосомные перестройки и соответственно у данного пациента мог присутствовать какой-либо редкий вариант (например, $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; *RPN1-EVII*, встречающаяся в М4 и ассоциированная с неблагоприятным исходом)

Исход заболевания пациента №4 неизвестен.

3.2.2 Количественный анализ FLT3-ITD мутаций взрослых пациентов

В результате проведения фрагментного анализа все 3 взрослых пациента были *FLT3*-ITD-положительными. Стоит обратить внимание, что пациенты №16 и №17 не имели хромосомных аномалий в кариотипе. Для пациента №18 информация о статусе кариотипа отсутствовала, но при этом он был *NPM1*-положительным, что взаимно исключает хромосомные аномалии [64].

Для образца №16 фрагментный анализ позволил выявить мутантный продукт размером 479 bp. Учитывая, что длина ампликона дикого типа составляет 326 bp можно заключить, что длина дуплицированного участка составила 153 bp. Уровень аллельной нагрузки был определен как 18% (рисунок 24).

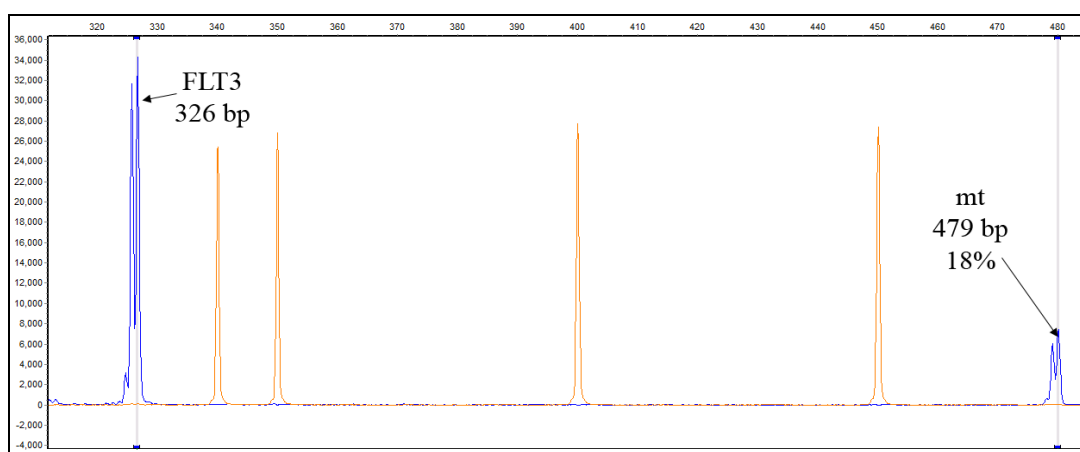


Рисунок 24 – Фрагментный анализ образца №16: mt – мутантный продукт

Секвенирование данного образца позволило определить последовательность тандемного повтора и идентифицировать мутацию как *c.1775_1837dup, p.F612_G613insVDFREYEYDLKWEFPRENLEF* (мутация отсутствует в базе COSMIC). Причем следует учитывать, что тандемный повтор в 153 bp при данной мутации покрывает

63 bp 14 экзона и всю длину 14 интрона, а место вставки повтора (второй G на рисунке 25 обозначен стрелкой) соответствует 1838 нуклеотиду в мРНК (NM_004119.3) – первому нуклеотиду в 15 экзоне.

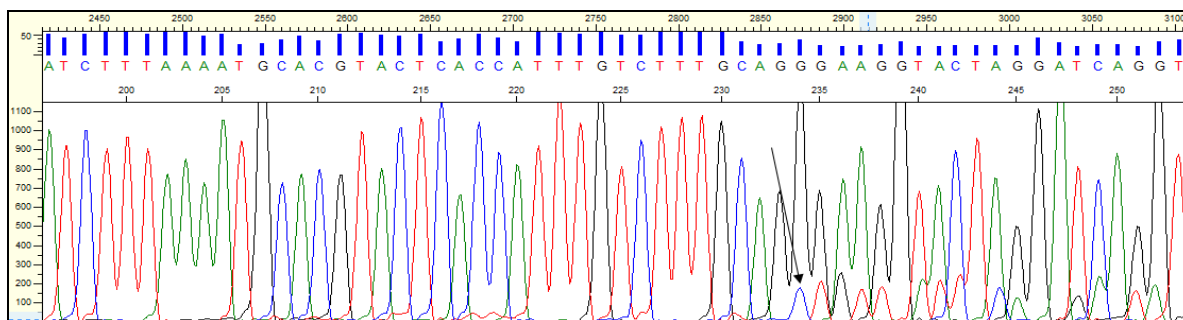


Рисунок 25 – Секвенограмма образца №16 с мутацией с.1775_1837dup, р.F612_G613insVDFREYEYDLKWEFPRENLEF: стрелкой обозначено место вставки тандемного повтора

Для образца №17 фрагментный анализ позволил выявить сразу 3 мутантных продукта размерами 344 bp, 353 bp и 404 bp. Учитывая, что длина ампликона дикого типа составляет 326 bp можно заключить, что длины дублицированных участков составили 18 bp, 27 bp и 78 bp. Уровень аллельной нагрузки был определен как 4%, 19% и 4% соответственно. (рисунок 26).

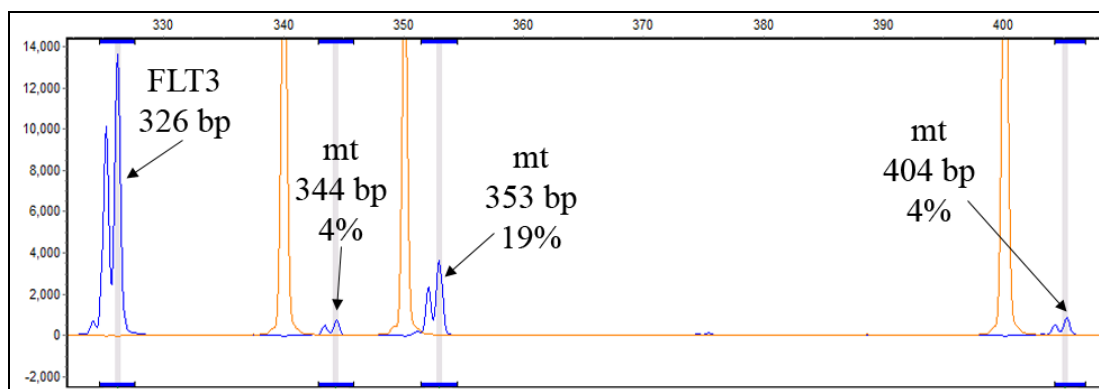


Рисунок 26 – Фрагментный анализ образца №17: mt – мутантный продукт

Из-за присутствия в смеси 4 разных ПЦР-продуктов (одного дикого типа и трех мутантных) и низкого уровня аллельной нагрузки у двух из них, определить последовательности тандемных повторов секвенированием оказалось невозможно. Однако место начала мутации определить возможно (Т на рисунке 27 обозначен стрелкой) соответствует 1807 нуклеотиду в мРНК (NM_004119.3).

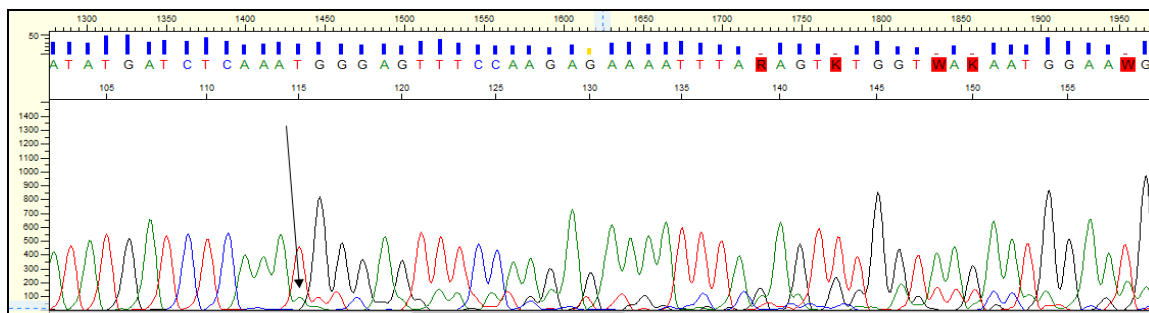


Рисунок 27 – Секвеннограмма образца №17: стрелкой обозначено место начала дупликации

Для пациента №18 в данной работе были проанализированы два образца, полученные во время первого (18а) и второго (18б) рецидива ОМЛ. На рисунках 28-29 представлены результаты фрагментного анализа этих образцов, который позволил выявить мутантный продукт размером 401 bp. Учитывая, что длина ампликона дикого типа составляет 326 bp можно заключить, что длина дублицированного участка составила 75 bp. Уровень аллельной нагрузки был определен для образца №18а как 87%, для №18б – 68%.

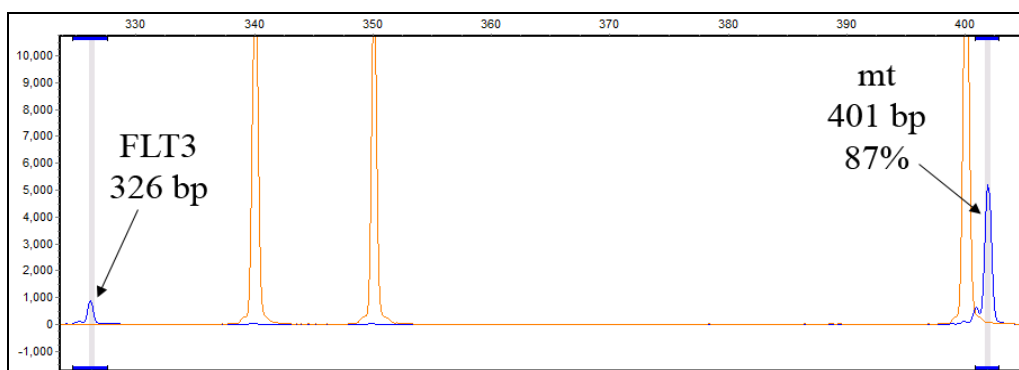


Рисунок 28 – Фрагментный анализ образца №18а от пациента во время первого рецидива:

mt – мутантный продукт

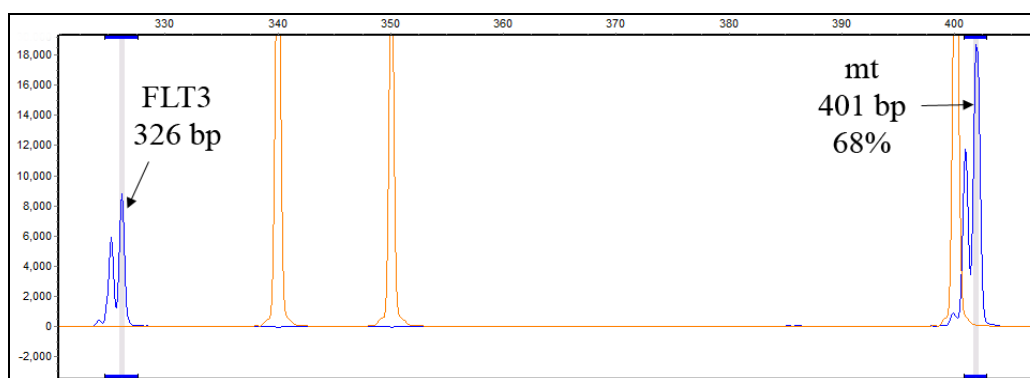


Рисунок 29 – Фрагментный анализ образца №18б от пациента во время второго рецидива:

mt – мутантный продукт

Секвенирование проводили для образца №18б, которое позволило определить последовательность tandemного повтора и идентифицировать мутацию как с.1759_1833dup, р.N587_E611dup (ID в базе данных COSMIC: COSV54078504). Место вставки повтора (мутантный G на рисунке 30 обозначен стрелкой) соответствует 1834 нуклеотиду в мРНК (NM_004119.3).

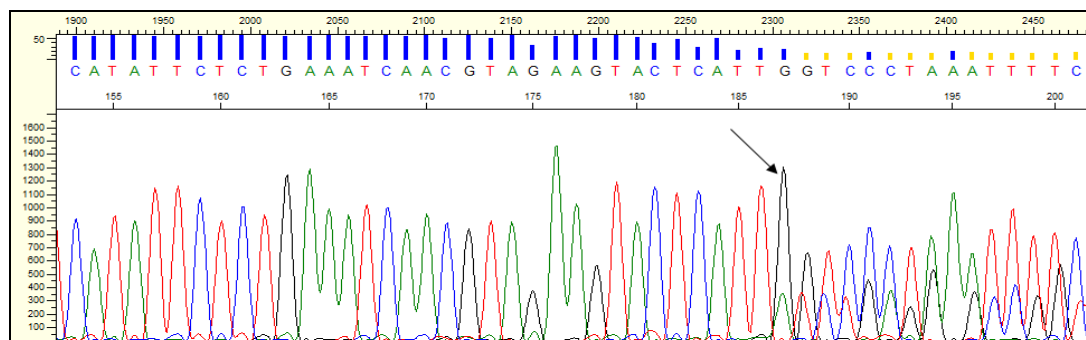


Рисунок 30 – Секвенограмма образца №18а с мутацией с.1759_1833dup, р.N587_E611dup: стрелкой обозначено место вставки tandemного повтора

Таким образом, для пациента №16, у которого дублированный фрагмент был протяженным и захватывал интрон, несмотря на низкий уровень аллельной нагрузки, можно предположить, что в отсутствии хромосомных аномалий именно *FLT3-ITD* мутация могла привести к бластному кризу в ходе течения миелодиспластического синдрома и его переходу во вторичный ОМЛ, а также к последующему рецидиву после лечения.

Исход заболевания пациента №17 нам неизвестен. В соответствии с рекомендациями ELN [4] отсутствие у пациента хромосомных аномалий, наличие мутации в гене *NPM1* и низкий уровень аллельной нагрузки *FLT3-ITD* мутаций позволяет говорить о благоприятном исходе заболевания. В то же время наличие одновременно трех разных мутантных *FLT3-ITD* клонов возможно окажет свое влияние на исход заболевания, поскольку суммарный уровень аллельной нагрузки составляет примерно 30%

Высокая аллельная нагрузка в обоих образцах во время двух рецидивов у пациента №18, не смотря на отсутствие хромосомных аномалий, но с учетом мутации в гене *NPM1*, говорит о промежуточном исходе заболевания.

3.3 Количественный анализ *FLT3*-TKD мутаций фрагментным анализом

В результате проведения фрагментного анализа все 18 пациентов оказались *FLT3*-TKD-отрицательными, по этой причине секвенирование участка 20 экзона не проводилось.

Электрофоретический профиль образца дикого типа при фрагментном анализе представлен двумя пиками, соответствующим рестриктам размерами 46 bp и 68 bp (рисунок 31). Все исследуемые образцы имели аналогичный профиль. Мутантный фрагмент должен был быть представлен не рестриктированным ПЦР-продуктом длиной 114 bp.

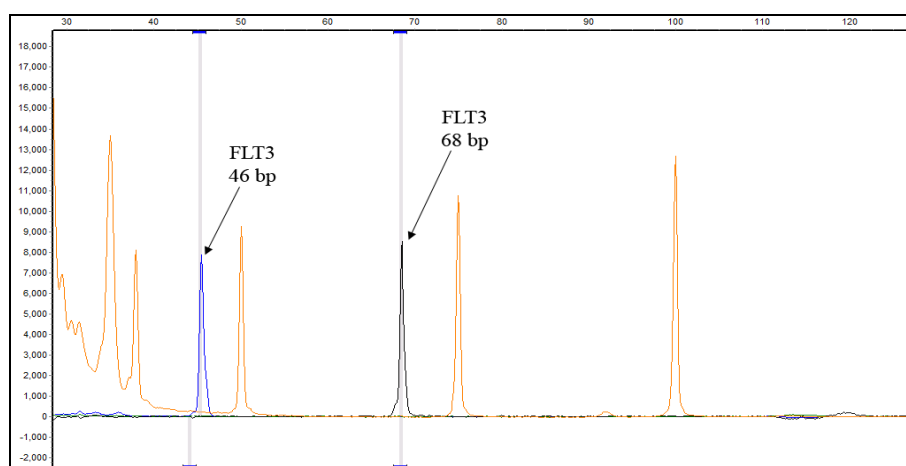


Рисунок 31 – Фрагментный анализ контрольного образца: синий пик – рестрикт 46 bp, черный пик – рестрикт 68 bp, оранжевые пики – стандарт размера GeneScan 500 LIZ

Стоит отметить, что в ходе работы с использованием ПДРФ анализа по схеме, представленной на рисунках 13-14, может возникнуть риск ложноположительного результата в ходе недорестрикции ампликона. С этой целью в дальнейшем планируется использовать «хвостатые» праймеры (праймеры с дополнительными не комплементарными амплифицируемой последовательности участками) с искусственно введенным дополнительным сайтом рестрикции для рестриктазы *EcoRV*, что позволит дифференцировать недорестрикты от мутантных продуктов.

3.4 Сравнение результатов анализа мутаций в гене *FLT3*, полученных при использовании фрагментного анализа с соответствующими результатами, полученными при проведении других молекулярно-генетических технологий

Результаты полученные при использовании фрагментного анализа сравнивали с соответствующими результатами, полученными при проведении скрининговых методов

(гетеродуплексный анализ в ПААГ и HRM-анализ) для *FLT3*-ITD мутаций и с результатами ПДРФ анализа с детекцией в ПААГ для *FLT3*-TKD мутаций. Также выше были представлены результаты анализа некоторых *FLT3*-положительных образцов дополнительно методом секвенирования по Сенгеру.

На рисунке 32 представлен пример анализа *FLT3*-ITD мутаций методом гетеродуплексного анализа для образцов №17, №18а и №18б в двух повторностях. В данном случае в процессе прохождения ПЦР помимо продуктов дикого и мутантного типов образуются гетеродуплексы – их сочетание, образующие шпильчатую структуру – которые имеют большую молекулярную массу [83]. При разделении продуктов ПЦР в полиакриламидном геле по наличию гетеродуплексов мы можем судить о наличии мутации. Так для образца дикого типа видна только полоса основного продукта ПЦР. Для образца №17 мутантного продукта почти не видно (скорее всего, тонкая полоса соответствует фрагменту 353 bp с 19% уровнем аллельной нагрузки), но присутствие гетеродуплексов говорит о наличии мутации. Для образца №18а с высоким уровнем аллельной нагрузки наоборот не видно продукта дикого типа, а для образца №18б все продукты ПЦР видны. Таким образом, результаты гетеродуплексного анализа соответствуют результатам фрагментного анализа.

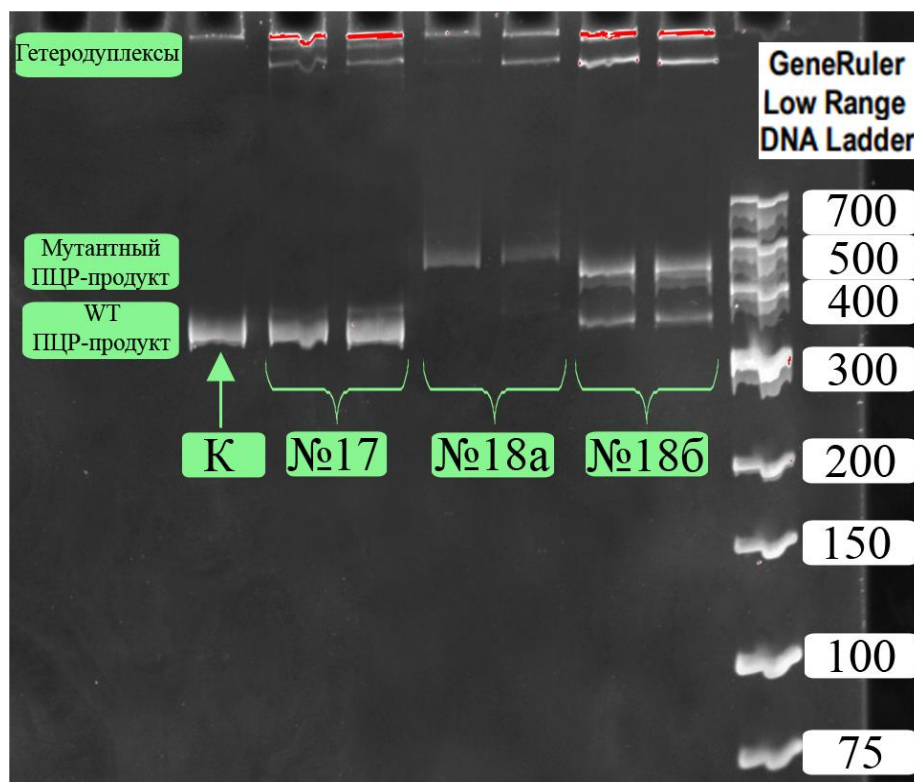


Рисунок 32 – Гетеродуплексный анализ в ПААГ для скрининга *FLT3*-ITD мутаций:

К – образец дикого типа

На рисунке 33 представлен пример HRM анализа для некоторых, включенных в данную работу образцов. High Resolution Melt (плавление с высоким разрешением) – метод, в котором сразу после основной ПЦР температуру постепенно повышают с 65 °С до 95 °С. Из-за разницы в первичной структуре дикого и мутантного продуктов, образцы при изменении температуры плавятся по-разному, что приводит к различию кривых плавления [84]. Образцы №5, №7, №9 по результатам HRM анализа не имеют мутаций (красный кластер). Зеленый (№3 и №16) и синий (№4) кластеры соответствуют мутантным продуктам, причем образцы №3 и №16 имеют разные формы кривых плавления (в двух повторностях) в одном кластере, что говорит о разной первичной структуре (а, следовательно, разных мутациях). Это соответствует результатам фрагментного анализа.

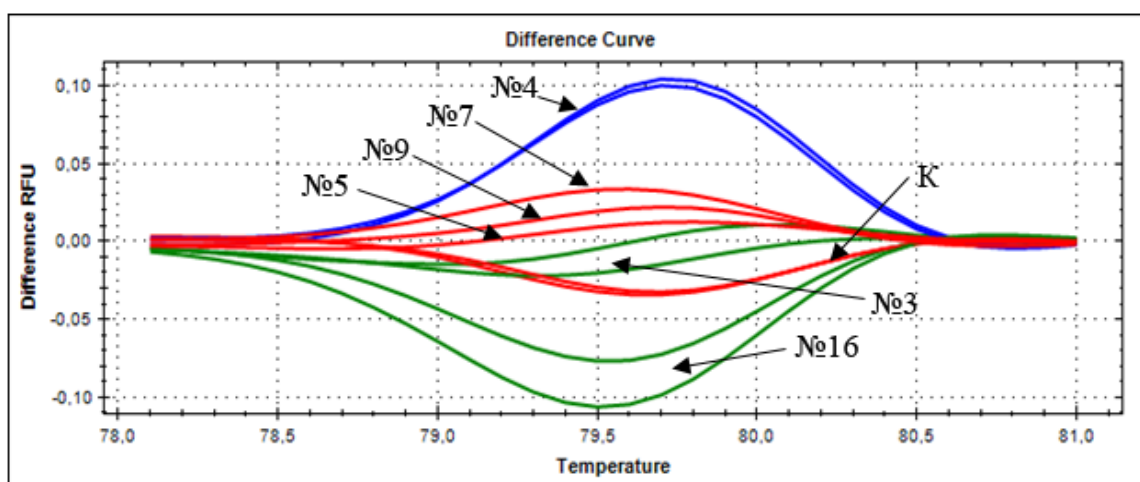


Рисунок 33 – Кривые плавления ПЦР-продуктов для скрининга *FLT3-ITD* мутаций: красный кластер – дикий тип, синий и зеленый кластер – мутантный тип

На рисунке 34 представлен пример проведения рестрикционного анализа для образцов №4-№9. Также для контроля рестриктирования помимо рестриктов в полиакриламидный гель был внесен не обработанный рестриктазой ампликон. Все образцы соответствовали дикому типу, что подтверждает фрагментный анализ.

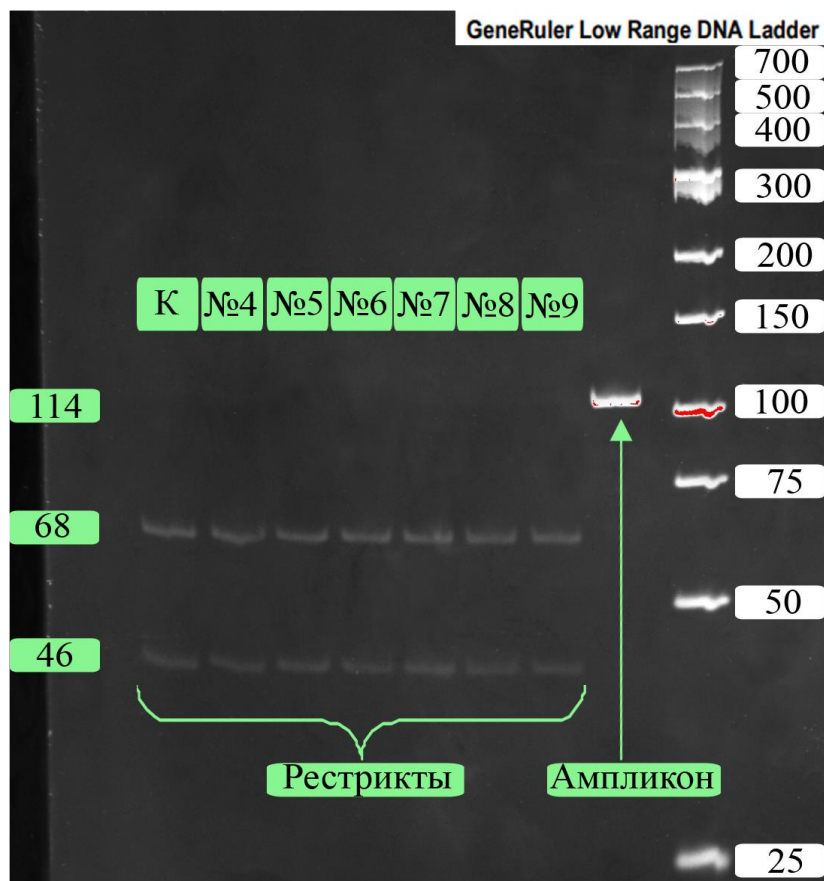


Рисунок 34 – ПДРФ анализ в ПААГ для скрининга *FLT3*-TKD мутаций

Что касается использования секвенирования по Сэнгеру для анализа *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD мутаций, то можно отметить следующее. По литературным данным фрагментный анализ способен определять мутации с уровнем аллельной нагрузки от 5% [80]. Секвенирование по Сэнгеру в свою очередь имеет порог обнаружения мутантного аллеля от 15-20% [81]. То есть недостатком секвенирования по Сэнгеру в приложении к анализу соматических мутаций является невозможность определения уровня аллельной нагрузки без использования дополнительного программного обеспечения. Фрагментный анализ же не способен определить последовательность мутантного фрагмента. Однако при планировании тактики лечения для пациентов с *FLT3* мутациями в первую очередь обращают внимание на количество мутантного аллеля, а не на последовательность мутантного фрагмента.

Фрагментный анализ для определения *FLT3*-ITD мутаций в нашем исследовании включал два этапа: амплификацию целевого фрагмента ДНК с мечеными праймерами и капиллярный электрофорез, – и занимал около 2 часов (для определения ТКД мутаций время увеличивалось на 1,5 часа для ПДРФ-анализа). В свою очередь секвенирование по Сэнгеру состояло из большего количества этапов и занимало в среднем 6 часов: амплификация целевого фрагмента ДНК, очистка ПЦР-продукта, секвенирующая ПЦР, очистка секвенс-продукта и проведение капиллярного электрофореза.

Для проведения фрагментного анализа, исключая комплектующие секвенатора, большую стоимость имеют лишь стандарт размера и флуоресцентно-меченные праймеры. Тогда как для проведения секвенирования по Сэнгеру требуются дорогостоящий коммерческий набор для проведения секвенирующей ПЦР, реактивы для очистки ПЦР-продукта и сиквенс-продукта. Расчет себестоимости анализа *FLT3*-ITD мутаций для одного пациента без учета расходных материалов, этапа выделения ДНК и комплектующих секвенатора представлен в таблице 8.

Таблица 8 – Себестоимость анализа *FLT3*-ITD мутаций для одного пациента методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру

Фрагментный анализ			Секвенирование по Сэнгеру		
Этап	Набор	Цена, руб	Этап	Набор	Цена, руб
ПЦР	«Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия)	12	ПЦР	«Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Россия)	12
	2 пары праймеров + 1 FAM-метка	8		2 пары праймеров	6,5
Капиллярный электрофорез	GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard (Applied Biosystems, США)	50	Чистка ПЦР-продукта	ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США)	400
			Секвенирующая ПЦР	BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США)	1130*2=2260
	Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, США)	2,5	Чистка сиквенс-продукта	BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США)	300*2=600
	POP7™ Polymer (Applied Biosystems, США)	84	Капиллярный электрофорез	POP7™ Polymer (Applied Biosystems, США)	84*2=168
Итого		156,5	Итого		3446,5

Таким образом, можно сделать вывод, что метод фрагментного анализа чувствительнее, быстрее, экономичнее и проще секвенирования по Сэнгеру и оптимально подходит под задачи данного исследования.

Также стоит добавить, что согласно рекомендациям ELN 2017 г, мутации *NPM1* и *FLT3-ITD* оказывают совместное влияние на исход ОМЛ [4]. Поэтому в ближайшее время нами планируется исследование мутаций в гене *NPM1*, которых на сегодняшний день насчитывается 37 вариантов, и представлены они в большинстве случаев 4-нуклеотидными инсерциями, что позволяет выявить их с помощью фрагментного анализа по аналогичной схеме, что и *FLT3-ITD*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны тест-системы для выявления и количественного анализа ITD и TKD мутаций в гене *FLT3* на основе фрагментного анализа.
2. Использование разработанной тест-системы позволило выявить *FLT3*-ITD мутации у 5 пациентов (2 из которых дети) из 18 случаев ОМЛ, определить длину tandemного повтора у каждого образца и уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля.
3. Среди 18 пациентов, проанализированных разработанной тест-системой, *FLT3*-TKD мутаций не было обнаружено.
4. Результаты, полученные при использовании фрагментного анализа, полностью соответствуют результатам, полученным при проведении других молекулярно-генетических технологий. На примере 19 образцов было показано преимущество использования фрагментного анализа для исследования мутаций в гене *FLT3* перед секвенированием по Сэнгеру.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

bp – base pair

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

ELN – Европейской классификации риска лейкемии

FL – лиганд FLT3

FLT3 – fms-подобная тирозинкиназа 3

FLT3-ITD – мутации в гене *FLT3*, представленные внутренними тандемными повторами

FLT3-TKD – мутации в гене *FLT3*, представленные однонуклеотидными заменами в петле активации

HRM – High Resolution Melt (плавление с высоким разрешением)

JM – юкстамембранный домен

KL – лиганд Kit

mt – мутантный продукт

NES – сигнал ядерного экспорта

NLS – сигнал ядерной локализации

NPM1 – нуклеофосмин

WT – диким типом

A-петля – петля активации фермента

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

МДС – миелодиспластический синдром

МПН – миелопролиферативные новообразования

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ПААГ – полиакриламидный гель

ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

ПЦР – полимеразная+ цепная реакция

РТК – рецепторные тирозинкиназы

ТК – тирозинкиназный домен

ФАБ – франко-американо-британская система классификации ОМЛ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Nakao M. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia / M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, [et al]. // *Leukemia*. – 1996. – V.10. – I.12. – P.1911-1918.
- 2 Meshinchi S. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML / S. Meshinchi, T.A. Alonzo, D.L. Stirewalt, [et al]. // *Blood*. – 2006. – V.108. – I.12. – P.3654-3661.
- 3 Arber D.A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian, [et al] // *Blood*. – 2016. – V.127. – I.20. – P.2391-2405.
- 4 Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade, [et al] // *Blood*. – 2017. – V.129. – I.4. – P.424-447.
- 5 Паровичникова Е.Н.. Итоги многоцентрового исследования по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко, В.Г. Исаев, [и др.] // *Терапевтический архив*. – 2007. – Т.79. – №7. – С.14-9.
- 6 Vardiman J.W. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes / J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, [et al] // *Blood*. – 2009. – V.114. – I.5. – P. 937-951.
- 7 Домнинский Д.А. Гемобластозы миелоидного происхождения / Д.А. Домнинский // *Онкогематология*. – 2011. – Т.6. – №3. – С.82-93.
- 8 Савченко В.Г. Острые лейкозы / В.Г.Савченко, Е.Н.Паровичникова // *Клиническая онкогематология: руководство для врачей*. Под ред. Волковой М.А.. 2-е изд., перераб. и доп. – 2007. – P. 409-502.
- 9 Kulsoom B. Clinical presentation of acute myeloid leukaemia - A decade-long institutional follow-up/ B. Kulsoom // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2017. – V. 67. – I.12. – P. 1837–1842.
- 10 Клинические рекомендации 2020 г. «Острые миелоидные лейкозы» / Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России» [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://oncology-association.ru/files/clinical-guidelines-2020/ostrye_mieloidnye_lejkozy.pdf
- 11 Juliusson G. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry / G. Juliusson, P. Antunovic, A. Derolf, [et al] // *Blood*. – 2009. – V.113. – I.18. – P. 4179-87
- 12 Kantarjian H. Questions regarding frontline therapy of acute myeloid leukemia / H. Kantarjian, S. O'Brien // *Cancer*. – 2010. – V.116. – I.21. – P.4896-901.
- 13 Estey E.H. How I treat older patients with AML / E.H. Estey // *Blood*. – 2000. – V.96. – P.1670–1673.
- 14 Ok, C. Y. Mutational profiling of therapy-related myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia by next generation sequencing, a comparison

with de novo diseases / C. Y. Ok, K. P. Patel, G. Garcia-Manero // *Leukemia research*. – 2015. – V.39. – I.3. – P.348-354.

15 Burnett A.K. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia / A.K. Burnett, M. Wetzler, B. Lowenberg // *J Clin Oncol*. – 2011. – V.29. – I.5. – P.487-494.

16 Breems D.A. Acute myeloid leukemia and the position of autologous stem cell transplantation / D.A. Breems, B. Lowenberg // *Semin Hematol*. – 2007. – V.44. – I.4. – P.259-266.

17 Schlenk R.F. Risk adapted post-remission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German Multicenter AML HD93 treatment trial / R.F.Schlenk, A. Benner, F. Hartmann, [et al]. // *Leukemia*. – 2003. – V.17. – I.8. – P.1521-1528.

18 Грицаев С.В. Возраст и кариотип – факторы риска у больных первичным острым миелоидным лейкозом / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, Л.С. Мартыненко, [и др] // *Клиническая онкогематология/ Фундаментальные исследования и клиническая практика*. – 2010. – Т.3. – №4. – С.359-364.

19 Флейшман Е.В. Возрастные особенности цитогенетических изменений при острых миелоидных лейкозах / Е.В. Флейшман, О.И. Сокова, А.В. Попа // *Онкогематология*. – 2007. – Т.4. – С.12-6.

20 Lowenberg B. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group / B. Lowenberg, R. Zittoun, H. Kerkhofs, [et al] // *J Clin Oncol*. – 1989. – V.7. – P.1268–1274.

21 Pulsoni A. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia / A. Pulsoni, L. Pagano, R. Latagliata, [et al] // *Haematologica*. – 2004. – V.89. – P.296-302.

22 Ковалева Л.Г. Острые лейкозы. – 2-е изд., перераб. и доп. / Ковалева Л.Г. - М.: Медицина, 1990. – 272 с.

23 Appelbaum F.R. Age and acute myeloid leukemia / F.R. Appelbaum, H. Gundacker, D.R. Head, [et al] // *Blood*. – 2006. – V.107. – I.9. – P.3481-5.

24 Sekeres M.A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes / M.A. Sekeres // *Hematol Oncol Clin North Am*. – 2010. – V.24. – I.2. – P.287-94.

25 Shallis R.M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges / R.M. Shallis, [et al]. // *Blood*. – Rev. 2019. – V. 36. – P. 70–87.

26 Parkin D.M. Cancer Incidence in Five Continents / D.M. Parkin, J. Ferlay, L. Raymond, J. Young // *IARC Scientific Pub*. – 1997. – V.7. – I.143.

27 Lemmon M. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / M. Lemmon, J. Schlessinger // *Cell*. – 2010. – V.141. – P.1117-34.

28 Toffalini F. New insights into the mechanisms of hematopoietic cell transformation by activated receptor tyrosine kinases / F. Toffalini, J.B. Demoulin // *Blood*. – 2010. – V.116. – P.2429-37.

29 Krivtsov A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development / A. Krivtsov, S. Armstrong // *Nat Rev Cancer*. – 2007. – V.7. – P.823-33.

30 Bullinger L. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways / L. Bullinger, K. Döhner, H.Döhner // *J Clin Oncol*. – 2017. – V.35. – I.9. – P.934-46.

31 Szankasi P. A new DNA-based test for detection of nucleophosmin exon 12 mutations by capillary electrophoresis / P. Szankasi, M. Jama, D.W. Bahler // *J Mol Diagn* – 2008. – V.10. – I.3. – P.236-241.

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

33 Metzeler K.H. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia / K.H. Metzeler, T. Herold, M. Rothenberg-Thurle, [et al] // *Blood*. – 2016. – V. 128. – №5. – P.686-698.

34 Radtke I. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia / I. Radtke, C. Mullighan, M. Ishii, [et al] // *PNAS*. – 2009. – V.106. – P.12944-9.

35 Tripon, F. Simultaneous FLT3, NPM1 and DNMT3A mutations in adult patients with acute myeloid leukemia – case study / F. Tripon, G. Crauciuc, V. Moldovan, [et al] // *Revista Romana de Medicina de Laborator*. – 2019. – V.27. – I.3. – P. 245-254.

36 Mevatee P. FLT3-ITD, NPM1, and DNMT3A Gene Mutations and Risk Factors in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndrome Patients in Upper Northern Thailand / P. Mevatee, A. Tantiworawit, P. Traisathit, [et al] // *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2017. – V.18. – I.11. – P.3031-9.

37 Loghavi S. Clinical features of de novo acute myeloid leukemia with concurrent DNMT3A, FLT3 and NPM1 mutations / S. Loghavi, Z. Zuo, F. Ravandi, [et al] // *J Hematol Oncol*. – 2014. – V.7. – P.74.

38 Chou W.C. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution / W.C. Chou, J.L. Tang, [et al] // *Cancer Res*. – 2006. – V.66. – P. 3310-3316.

39 Matthews, W. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations / W. Matthews, C. T Jordan, G. W. Wiegand, [et al] // *Cell*. – 1991. – V.65. – I.7. – P.1143-1152.

40 Gilliland, D.G. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / D.G. Gilliland, J.D. Griffin // *Blood*. – 2002. – V.100. – I.5. – P.1532-1542.

41 Hannum, C. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs / C. Hannum, J. Culpepper, D.Campbell, [et al] // *Nature*. – 1994. – V.368. – I.6472. – P.643.

42 Janke, H. Activating FLT3 Mutants Show Distinct Gain-of-Function Phenotypes In Vitro and a Characteristic Signaling Pathway Profile Associated with Prognosis in Acute Myeloid Leukemia / H. Janke, F. Pastore, D. Schumacher, [et al] // PLOS ONE. – 2014. – V.9. – I.3. – P.e89560.

43 Schnittger S. Diversity of the juxtamembrane and TKD1 mutations (Exons 13–15) in the FLT3 gene with regards to mutant load, sequence, length, localization, and correlation with biological data / S. Schnittger, U. Bacher, C. Haferlach, [et al] // Genes Chromos Cancer. – 2012. – V.51. – I.10. – P.910–24.

44 Kayser S. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome / S. Kayser, R.F. Schlenk, M.C. Londono, [et al] // Blood. – 2009. – V.114. – I.12. – P.2386-2392.

45 Matsumura I. Roles for deregulated receptor tyrosine kinases and their downstream signaling molecules in hematologic malignancies / I. Matsumura, M. Mizuki, Y. Kanakura // Cancer Sci. – 2008. – V.99. – P.479-85.

46 Griffith J. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain / J. Griffith, J. Black, C. Faerman, [et al] // Mol Cell – 2004. – V.13. – P.169-78.

47 Gu T. Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia / T. Gu, J. Nardone, Y. Wang, [et al]. // PLoS ONE. – 2011. – V.6. – I.4. – e19169.

48 Chan P.M. Differential signaling of FLT3 activating mutations in acute myeloid leukemia: a working model. / P.M. Chan // Protein Cell. – 2011. – V.2. – I.2. – P.108-115

49 Kottaridis P. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials / P. Kottaridis, R. Gale, M. Frew, [et al] // Blood. – 2001. – V.98. – I.6. – P.1752-9.

50 Liu S.B. Impact of FLT3-ITD length on prognosis of acute myeloid leukemia. / S.B. Liu, H.J. Dong, X.B. Bao, [et al] // Haematologica. – 2019. – V.104. – I.1. – P.9-12

51 Зайкова Е.К. Молекулярная диагностика мутаций гена FLT3 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами / Е.К. Зайкова, Е.В. Белоцерковская, Д.В. Зайцев, [и др] // Клиническая онкогематология. – 2020. – Т.13. – №2. – С.150-60.

52 Bagrintseva K. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L) / K. Bagrintseva, S. Geisenhof, R. Kern, [et al]. // Blood. – 2005. – V.105. – I.9. – P.3679-85.

53 Wang W. Prevalence and prognostic significance of FLT3 gene mutations in patients with acute leukaemia: analysis of patients from the Shanghai Leukaemia

Co-operative Group. / W. Wang, X.Q. Wang, X.P. Xu, G.W. Lin // J Int Med Res. – 2010. – V.38. – I.2. – P.432-442

54 Гук Л.В. Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов FLT3, с-KIT и NPM1 у детей с острым миелобластным лейкозом / Л.В. Гук, Т.В. Савицкая, Д.А. Домнинский //Онкогематология. – 2009. – № 4. – С.27-32

55 Thiede C. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis / C. Thiede, C. Steudel, B. Mohr, [et al]. // Blood – 2002. – V.99. – I.12. – P.4326-35.

56 Lin P. Activating FLT3 mutations are detectable in chronic and blast phase of chronic myeloproliferative disorders other than chronic myeloid leukemia. / P. Lin, D. Jones, L.J. Medeiros, [et al] // Am J Clin Pathol. – 2006. – V.126 –I.4 – P.530-533

57 Deeb K.K. Deletion and deletion/ insertion mutations in the juxtamembrane domain of the FLT-3 gene in adult acute myeloid leukemia / K.K. Deeb, M.T. Smoskey, H.C. Defedericis, [et al]. // Leuk Res Rep. – 2014. –V.3. – I.2. – P.86-9.

58 Falini B. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features / B. Falini, I. Nicoletti, M. F. Martelli, [et al] // Blood. – 2007. – V.109. – I.3. – P.874-885.

59 Yu Y. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export / Y. Yu, L.B. Maggi Jr, S.N. Brady, [et al] // Mol Cell Biol. – 2006. – V.26. – P.3798-3809.

60 Fukuda M. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal / M. Fukuda, S. Asano, T. Nakamura, [et al]. // Nature. – 1997. – V.390. – P.308-311.

61 Falini B. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML / B. Falini, N. Bolli, J. Shan, [et al]. // Blood. – 2006. – V.107. – P.4514-4523.

62 Falini B. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype / B. Falini, C. Mecucci, E. Tiacci,[et al].// N Engl J Med. – 2005. – V.352. – P.254-266.

63 Lin L. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias / L. Lin, T. Lin, W. Chou, [et al] // Leukemia – 2006. – V.20. – P.1899-1903

64 Wertheim G. Nucleophosmin(NPM1) mutations in acute myeloid leukemia: An ongoing (cytoplasmic) tale of dueling mutations and duality of molecular genetic testing methodologies. / G. Wertheim, A. Bagg // J Mol Diagnost. – 2008. – V.10. – I.3. – P.198-202.

65 Meshinchi S. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukemia. / S. Meshinchi, R.Arceci // Oncologist. – 2007. – V.12. – P.341-55.

66 Силин А. Е. Мутационный анализ генов FLT3 и NPM1 в группе взрослых пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым

нелимфобластным лейкозом / А. Е. Силин, Ж. М. Козич, В. К. Шпудейко // Проблемы здоровья и экологии. – 2011. – С. 85-90.

67 Kumar D. NPM1 Mutation Analysis in Acute Myeloid Leukemia: Comparison of Three Techniques - Sanger Sequencing, Pyrosequencing, and Real-Time Polymerase Chain Reaction. / D. Kumar, A. Mehta, M.K. Panigrahi, [et al] // Turk J Haematol. – 2018. – V.35. –I.1. – P.49-53.

68 Huet S. New Quantitative Method to Identify NPM1 Mutations in Acute Myeloid Leukaemia / S. Huet , L. Jallades, C. Charlot // Leukemia Research and Treatment. –2013. – ID 756703.

69 O'Donnell M.R. Acute myeloid leukemia, version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. / M.R. O'Donnell, M.S. Tallman, C.N. Abboud, [et al]. // J Natl Compr Canc Netw. – 2017. – V.15. – I.7. – P.926-57.

70 Kim Y. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length / Y. Kim, G.D. Lee, J. Park, [et al]. // Blood Cancer J. – 2015. – V.5. – I.8. – e336.

71 Thiede C. FLT3 mutation Assay Laboratory Cross Validation: Results from the CALGB 10603/Ratify Trial in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML). / C. Thiede, T. Prior, S. Lavgna, [et al]. // Blood. – 2018. – V.132. – Suppl_1:2800.

72 Daver N. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence / N. Daver, R.F. Schlenk, N.H. Russell, [et al]. // Leukemia. – 2019. – V.33. – I.2. – P.299-312.

73 LeukoStrat® CDx FLT3 Mutation Assay [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://invivoshop.wpengine.com/product/leukostrat-cdx-flt3-mutation-assay/>

74 Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? / M. Levis // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2013. – V.2013. – P.220-6.

75 Tan, A.Y. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 - internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia / A.Y. Tan, D.A. Westerman, D.A. Carney, [et al] // J Hematol Oncol. – 2008. – V.1. – I.10.

76 Chang, T.L. Simplified capillary electrophoresis detection of the Flt-3 internal tandem duplications and D835 point mutations in acute myeloid leukemia / T.L. Chang, M. Salto-Tellez, Y.K. Kueh, [et al] // Haematologica. – 2003. – V.88. – I.2. – ELT04.

77 Yamamoto, Y. Nakano, Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies / Y. Yamamoto, H. Kiyoi, Y. Nakano // Blood. – 2001. – V.97. – I.8. – P.2434-2439.

78 DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide, [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/global/forms/fragment-analysis-guide-registration-form.html>

79 Zorn J.A. Crystal structure of the FLT3 kinase domain bound to the inhibitor Quizartinib (AC220) / J.A. Zorn, Q. Wang, E. Fujimura, [et al] // PLoS One. – 2015. – V.10. – I.4. – e0121177.

80 Jones A.V. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. / A.V. Jones, D. Ward, M. Lyon, [et al.] // LeukRes. – 2015. – V.39. – I.1. – P. 82-87.

81 Shuji O. Sensitive Sequencing Method for KRAS Mutation Detection by Pyrosequencing. / O. Shuji, K. Takako, B. Mohan, [et al]. // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2005. – V.7. – I.3. – P.413-21

82 Тест-системы «Онкоскрин-Q» [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://genetechnology.ru/node/100>

83 Субботина, Т.Н. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена JAK2 / Т.Н. Субботина и др. // Лабораторная служба. – 2017. – Т. 6. – №. 1. – С. 29-33.

84 Farrar, J.S. High-resolution melting curve analysis for molecular diagnostics / J.S. Farrar, C.T. Wittwer // Molecular Diagnostics. – 2017. – V.47. – P. 79-102.