

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
«_____» _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ драйверных мутаций при остром миелоидном лейкозе

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный
руководитель

подпись, дата

доцент, канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

Выпускник

подпись, дата

О.С. Леванова

Рецензент

подпись, дата

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

Красноярск 2021

АННОТАЦИЯ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – клональное опухолевое заболевание кроветворной ткани, ассоциированное с мутацией в гемопоэтической стволовой клетке, следствием которой становятся блок дифференцировки и бесконтрольная пролиферация незрелых миелоидных клеток. В патогенезе заболевания ключевую роль играют генетические аномалии, связанные как с нарушением целостности, или числа хромосом, так и молекулярно-генетические мутации. Мутации, которые способствуют прогрессированию заболевания, называются драйверными. Вклад в развитие ОМЛ вносят разнообразные мутации: как диагностические, так и прогностические. Наиболее распространенными прогностическими мутациями при ОМЛ являются мутации в генах *FLT3* и *NPM1*. Частота встречаемости для *FLT3* составляет 30-40%, а для *NPM1* – 25-30%. Мутации *FLT3* представлены внутренними тандемными дупликациями (ITD) в юкстамембранном домене, а также однонуклеотидными заменами в положении D835 и I836 в домене тирозинкиназы (TKD). *NPM1* мутации представляют собой вставки 4 нуклеотидов, возникающие в участке, кодирующем сигнал ядерного экспорта. Мутация А (вставка TCTG) – наиболее часто встречающийся вариант, обнаруживаемый примерно в 72% всех случаев ОМЛ с мутацией *NPM1*. ВОЗ и ELN рекомендуют к определению мутации *FLT3* и *NPM1*, поскольку их прогностическое значение определяет стратегии терапии. Важным моментом, при выявлении этих мутаций является количественная оценка результатов, а именно: уровень аллельной нагрузки и размеры вставок. Наиболее подходящим методом в данном случае является фрагментный анализ, который способен определить размер вставки вплоть до 1 нуклеотида.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы был анализ соматических мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* методом фрагментного анализа у пациентов с ОМЛ.

Выявление мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* проводилось с использованием метода фрагментного анализа с определением уровня аллельной нагрузки мутантного аллеля, а также секвенирования по Сэнгеру в качестве дополнительного метода. Из 10 пациентов с ОМЛ у 2 пациентов (20%) были обнаружены *FLT3*-ITD мутации, у 1 из этих пациентов была выявлена ассоциация *FLT3*-ITD с мутацией *NPM1*. Также 1 образец из выборки оказался положительным по *FLT3*-TKD.

Ключевые слова: ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3*-ITD МУТАЦИИ, *FLT3*-TKD МУТАЦИИ, ГЕН *NPM1*, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ драйверных мутаций при ОМЛ» содержит 59 страниц текстового документа, 23 иллюстрации, 7 таблиц и 53 использованных источника.

ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ, ГЕН *FLT3*, *FLT3*-ITD МУТАЦИИ, *FLT3*-TKD МУТАЦИИ, ГЕН *NPM1*, СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ, ДРАЙВЕРНЫЕ МУТАЦИИ, ФРАГМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ, АЛЛЕЛЬНАЯ НАГРУЗКА.

Цель исследования – анализ соматических мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* методом фрагментного анализа у пациентов с ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной на основе фрагментного анализа тест-системы на наличие *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной на основе фрагментного анализа тест-системы на наличие *NPM1* мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Сопоставить полученные данные о наличии мутаций с клинико-лабораторными данными.

Актуальность диссертационной работы состоит в том, что мутации в гене *NPM1* являются иницирующими для такого заболевания, как ОМЛ, в то же время, мутации гена *FLT3* являются вторичными и дают конкурентное преимущество мутировавшему клону. В конечном итоге, мутации *FLT3*-ITD в сочетании и без *NPM1* мутаций дают неблагоприятный исход течения заболевания при высоком уровне аллельной нагрузки. Для выявления этих мутаций был использован метод фрагментного анализа, поскольку он способен выявить мутации в образце начиная от 5% присутствия мутантного аллеля.

Ранее в нашей лаборатории были разработаны тест-системы для выявления и количественного анализа мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* на основе фрагментного анализа. Использование разработанной тест-системы позволило выявить у 3 из 10 пациентов *FLT3* и/или *NPM1* мутации; определить уровень аллельной нагрузки мутантного аллеля и длину tandemного повтора в случае *FLT3*-ITD мутаций. Результаты, полученные при использовании фрагментного анализа соответствуют результатам, полученным при проведении других молекулярно-генетических технологий (секвенирование по Сенгеру и др.). На основании клинико-лабораторных данных и исходов заболевания можно предположить вклад мутаций в эволюцию заболевания.

ABSTRACT

Master's dissertation on "Analysis of driver mutations in AML" contains 59 pages of a text document, 23 illustrations, 7 tables and 53 used sources.

ACUTE MYELOID LEUKEMIA, *FLT3* GENE, *FLT3*-ITD MUTATIONS, *FLT3*-TKD MUTATIONS, *NPM1* GENE SOMATIC MUTATIONS, DRIVER MUTATIONS, FRAGMENT ANALYSIS, ALLELE BURDEN.

Aim of the work – to analysis of somatic mutations in the *FLT3* and *NPM1* genes by fragment analysis in patients with AML.

Based on this goal, the following objectives were formulated:

1. To analyze the DNA of patients diagnosed with AML using a test system developed on the basis of fragment analysis for the presence of *FLT3*-ITD and *FLT3*-TKD mutations with the determination of the level of allelic burden.
2. Analyze the DNA of patients diagnosed with AML using a test system developed on the basis of fragment analysis for the presence of *NPM1* mutations with the determination of the level of allelic burden.
3. Compare the obtained data on the presence of mutations with clinical and laboratory data.

The relevance of the Master's dissertation is that mutations in the *NPM1* gene are initiators for a disease such as AML, at the same time, mutations in the *FLT3* gene are secondary and give a competitive advantage to the mutated clone. Ultimately, *FLT3*-ITD mutations in combination with and without *NPM1* mutations give an unfavorable outcome of the course of the disease at a high level of allelic burden. To identify these mutations, the fragment analysis method was used, since it is able to detect mutations in the sample starting from 5% of the presence of the mutant allele.

Previously, our laboratory developed test systems for the detection and quantitative analysis of mutations in the *FLT3* and *NPM1* genes based on fragment analysis. The use of the developed test system made it possible to detect *FLT3* and / or *NPM1* mutations in 3 out of 10 patients; determine the level of allelic load of the mutant allele and the length of the tandem repeat in the case of *FLT3*-ITD mutations. The results obtained using fragment analysis correspond to the results obtained when carrying out other molecular genetic technologies (Sanger sequencing, etc.). On the basis of clinical and laboratory data and the outcomes of the disease, it is possible to assume the contribution of mutations to the evolution of the disease.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 Острый миелоидный лейкоз	9
1.2 Роль мутаций в клональной эволюции ОМЛ.....	14
1.3 Белок FLT3.....	17
1.4 Мутации FLT3	18
1.5 Белок Нуклеофозмин	20
1.6 Мутации NPM1	22
1.7 Резистентность к химиотерапии.....	23
1.8 Резистентность к таргетной терапии	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1 Объект исследования.....	28
2.2 Выделение ДНК из клинического материала с помощью набора «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия).....	30
2.3 Измерение концентрации ДНК с помощью набора Quant-iT™ dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 3 (Invitrogen, США).....	31
2.4 Проведение ПЦР с помощью набора реагентов «Для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (СИНТОЛ, Москва) на приборе CFX 96 (BioRad, США)	32
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).....	34
2.6 Проведение фрагментного анализа с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)	36
2.7 Проведение секвенирования по Сэнгеру с помощью «Генетического анализатора 3500» (Applied Biosystems, США)	39
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	41
3.1 Дизайн исследования мутаций в генах FLT3 и NPM1	41
3.2 Анализ <i>FLT3</i> -ITD мутаций методами фрагментного анализа и секвенирования по Сэнгеру	41
3.3 Количественный анализ <i>FLT3</i> -TKD мутаций фрагментным анализом.....	41
3.4 Количественный анализ NPM1 мутаций	41

3.5 Сопоставление молекулярно-генетических и клинико- лабораторных результатов	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	44
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	46

ВВЕДЕНИЕ

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) является наиболее распространенным острым лейкозом у взрослых, на него приходится ~ 80% случаев в этой группе заболеваний [1]. Крупные хромосомные транслокации, а также мутации в генах, участвующих в гемопоетической пролиферации и дифференцировке, приводят к накоплению низкодифференцированных миелоидных клеток. Подобно большинству спорадических злокачественных новообразований человека, ОМЛ представляет собой сложное динамическое заболевание, характеризующееся множественными соматически приобретенными мутациями-драйверами, сосуществующими конкурирующими клонами и эволюцией заболевания с течением времени. ОМЛ – очень неоднородное заболевание; хотя случаи могут быть разделены на группы благоприятного, промежуточного и неблагоприятного риска на основе их цитогенетического профиля, прогноз в рамках этих категорий широко варьируется [2].

Наиболее распространенными и прогностически и диагностически значимыми считаются мутации в генах *FLT3* и *NMP1*. Мутации в *FLT3* чаще всего возникают в виде ITD внутри рамки считывания, локализованных в аутоингибиторном юкстамембранном домене рецептора, и реже в виде точечных мутаций в домене тирозинкиназы (TKD). Исследования современной литературы показывают, что статус *FLT3* развивается в зависимости от континуума заболевания (клональная эволюция), например, когда ОМЛ приобретают *FLT3* мутации при рецидиве, тогда как на момент постановки диагноза их не было [3]. Клинически мутации *FLT3*-ITD связаны с более ранним временем до рецидива и более низкой общей выживаемостью (ОВ). *FLT3*-TKD мутации часто связывают с резистентностью к таргетным препаратам. При мутации *NMP1* происходит вставка 4 нуклеотидов, которая способствует возникновению дополнительного сигнала ядерного экспорта. Мутации *NMP1* характеризуют благоприятный прогноз, если выявляются без *FLT3* –ITD.

Выявление повторяющихся генетических мутаций в генах *FLT3* и *NPM1*, помогает уточнить индивидуальный прогноз и выбрать правильную стратегию лечения [4].

Таким образом, целью данной работы явился анализ соматических мутаций в генах *FLT3* и *NPM1* методом фрагментного анализа у пациентов с ОМЛ.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной на основе фрагментного анализа тест-системы на наличие *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
2. Проанализировать ДНК пациентов с диагнозом ОМЛ с использованием разработанной на основе фрагментного анализа тест-системы на наличие *NPM1* мутаций с определением уровня аллельной нагрузки.
3. Сопоставить полученные данные о наличии мутаций с клинико-лабораторными данными.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Острый миелоидный лейкоз

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – злокачественное клональное заболевание, характеризующееся изменениями и низким уровнем производства здоровых гемопоэтических клеток; эти изменения подавляют дифференцировку клеток и вызывают пролиферацию или накопление бластных клеток [5]. Бласты заменяют нормальную кроветворную ткань, провоцируя появление цитопении. Накопление незрелых клеток начинается в костном мозге, но в большинстве случаев также быстро накапливается в крови, а иногда распространяется на другие части таких органов, как лимфатические узлы, селезенка, печень, яички и центральная нервная система [6].

Классификация Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (2016) подразделяет все ОМЛ, основываясь на их цитогенетических и молекулярно-генетических особенностях, и именно эти особенности формируют клинико-патологические группы ОМЛ с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями [7]:

- ОМЛ с $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1*
 - ОМЛ с $inv(16)(p13.1q22)$ или $t(16;16)(p13.1;q22)$; *CBFB-MYH11*
 - Острый промиелоцитарный лейкоз с $t(15;17)(q22;q12)$; *PML-RARA*
 - ОМЛ с $t(9;11)(p22;q23)$; *MLLT3-MLL*
 - ОМЛ с $t(6;9)(p23;q34)$; *DEK-NUP214*
 - ОМЛ с $inv(3)(q21q26.2)$ или $t(3;3)(q21;q26.2)$; *RPN1-EVII*
 - ОМЛ (мегакариобластный) с $t(1;22)(p13;q13)$; *RBM15-MKL1*
 - ОМЛ с *BCR/ABL1*
- ОМЛ с генными мутациями:

- ОМЛ с мутированным геном *NPM1*
- ОМЛ с биаллельной мутацией гена *CEBPA*
- ОМЛ с мутированным геном *RUNX1*
- ОМЛ с изменениями, связанными с миелодисплазией
- Миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей ХТ
- ОМЛ, по-другому не специфицированные (NOS)
- Миелоидная саркома (синоним: экстрамедуллярная миелоидная опухоль, гранулоцитарная саркома, хлорома)
- Миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна
- Опухоль из плазмацитоидных дендритных клеток
- Острые лейкозы неопределенной линии дифференцировки

Франко-американско-британская классификация (ФАБ) подразделяет ОМЛ на 9 подвидов, от M0 по M8, основываясь на типах клеток – предшественниц лейкоцитов, и на степени зрелости изменённых клеток. Определение злокачественных клеток проводят на основании внешних признаков при световой микроскопии и/или цитогенетически, выявляя лежащие в основе отклонений изменения в хромосомах. В зависимости от подвида различается прогноз и ответ на лечение. Несмотря на преимущества классификации ВОЗ, система ФАБ до сих пор широко применяется. По ФАБ существует девять подтипов ОМЛ (таблица 1) [8].

Таблица 1 – Франко-американско-британская классификация ОМЛ

Подвид	Название	Цитогенетические изменения
M0	минимально-дифференцированный острый миелобластный лейкоз	
M1	острый миелобластный лейкоз без созревания	
M2	острый миелобластный лейкоз с созреванием	t(8;21)(q22;q22), t(6;9)
M3	острый промиелоцитарный лейкоз	t(15;17)
M4	острый миеломоноцитарный лейкоз	inv(16)(p13q22), del(16q)
M4eo	острый миеломоноцитарный лейкоз с	inv(16), t(16;16)

	эозинофилией костного мозга	
M5	острый монобластный лейкоз (M5a) или острый моноцитарный лейкоз (M5b)	del (11q), t(9;11), t(11;19)
M6	острые эритроидные лейкозы, включая острый эритролейкоз (M6a), очень редкий острый чистый эритроидный лейкоз (M6b) и острый смешанный эритролейкоз и чистый эритроидный лейкоз (M6c)	
M7	острый мегакариобластный лейкоз	t(1;22)
M8	острый базофильный лейкоз	

Международная группа экспертов (European Leukemia Net – ELN) в 2010 г. предложила стандартизованную систему корреляции цитогенетических и молекулярных аномалий при ОМЛ с исходом терапии. Следствием этого явилось распределение пациентов с ОМЛ при цитогенетически нормальном кариотипе (НК-ОМЛ) на три прогностические группы на основании молекулярно- генетических изменений (таблица 2)[8].

Таблица 2 – Прогностические группы, основанные на цитогенетических и молекулярных нарушениях

Прогностическая группа	Цитогенетические нарушения	Молекулярные нарушения
Благоприятный прогноз	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11	Мутации <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> и с низкой аллельной нагрузкой* Биаллельная мутация <i>CEBPA</i>
Промежуточный прогноз	t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2Ad Цитогенетические аномалии, которые не относятся к категории благоприятного прогноза или неблагоприятного прогноза	Мутации <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с высокой аллельной нагрузкой* Дикий тип гена <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> или с <i>FLT3-ITD</i> и с низкой аллельной нагрузкой (при отсутствии цитогенетических критериев неблагоприятного прогноза)
Неблагоприятный прогноз	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); перестройки KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3)(q21.3;q26.2);	Дикий тип гена <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с высокой аллельной нагрузкой* Мутации RUNX1 Мутации ASXL1 Мутации TP53

	GATA2,MECOM(EVI1) -5 или del(5q); -7; -17/abn(17p) Комплексный кариотип Моносомный кариотип	
--	---	--

* аллельная нагрузка – это соотношение числа мутантных аллелей к аллелям дикого типа. Аллельная нагрузка > 0.5 является клинически значимой и требует более интенсивного лечения, так как является прогностически неблагоприятной.

ОМЛ может развиваться *de novo*, как первичное заболевание, или через бластную трансформацию миелопролиферативных неоплазий. ОМЛ также может развиваться как вторичное онкологическое заболевание после химиотерапии или лучевой терапии по поводу различных видов рака [8].

Статистические данные заболеваемости по России составляют 1,32 случая на 100 тыс. населения. Однако они считаются недостоверными, поскольку диагностика ОМЛ на недостаточно высоком уровне. По общемировым данным средняя заболеваемость составляет 3–5 человек на 100 тыс. населения в год. При численности населения 140 млн жителей в России расчетный показатель заболеваемости (по данным Европейских и Американских исследователей) должен составлять около 5 тыс. заболевших. При этом заболеваемость резко возрастает в возрасте старше 60 лет и составляет 12–13 случаев на 100 тыс. населения у лиц в возрасте старше 80 лет. Медиана возраста диагностики ОМЛ для России составляет 53 года, что более чем на 10 лет меньше, чем в западных странах. Такие показатели свидетельствуют о меньшей продолжительности жизни населения в нашей стране [8,9].

Диагностика ОМЛ основана на анализе костного мозга (КМ) и периферической крови (ПК) (полный анализ крови и бластов). Диагноз устанавливается при наличии 20% бластных клеток либо независимо от процентного содержания бластных клеток при наличии патогномоничных для

ОМЛ хромосомных аномалий: t(8;21)(q22; q22) AML/ETO, t(15;17)(q12; q11-12) PML/RAR- α , inv(16) или t(16;16)(p12; q23) CBF/MYH11, t(1;22) [8].

Клинические проявления связаны с замещением нормальной гемопоэтической ткани опухолевыми клетками (анемия, тромбоцитопения, гранулоцитопения), инфильтрацией ими различных органов и продукцией различных цитокинов. Дебют ОМЛ может быть острым со значительным повышением температуры тела, резкой слабостью, интоксикацией, кровоточивостью, тяжелыми инфекциями. Однако нередко диагноз устанавливают случайно при профилактическом осмотре или в случае госпитализации по другой причине [8].

При всех лейкозах существует несколько основных этапов терапии – индукция ремиссии, консолидация, поддерживающая терапия и профилактика нейрорлейкемии для некоторых вариантов. Период начального лечения, целью которого являются максимально быстрое и существенное сокращение опухолевой массы и достижение полной ремиссии (ПР), называется периодом индукции ремиссии (обычно 1–2 курса). Именно в этот период на фоне применения цитостатических средств количество лейкоэмических клеток в костном мозге уменьшается примерно в 100 раз, т. е. в момент констатации ПР в костном мозге морфологически определяется менее 5 % опухолевых клеток. После стандартной индукционной терапии «7 + 3» или терапии аналогичной интенсивности оценка ответа обычно осуществляется на 21–28 день после начала терапии либо на момент восстановления показателей периферической крови. Если ПР после 2 курсов индукции не достигнута, констатируется первичная резистентность, и пациентам проводят терапию по программам лечения рефрактерных форм лейкемии [8].

Вторым этапом терапии ОМЛ является консолидация ремиссии (закрепление достигнутого противоопухолевого эффекта). В настоящее время в большинстве случаев консолидация – наиболее агрессивный и высокодозный этап при лечении ОМЛ. Задачей этого периода является по возможности еще

большее уменьшение числа остающихся после индукции лейкемических клеток [8].

После консолидации (обычно 1–2 курса) следует период противорецидивного или поддерживающего лечения. При разных вариантах ОЛ длительность, интенсивность и состав поддерживающей терапии различны, но принцип ее одинаков для всех видов ОМЛ – продолжение цитостатического или таргетного воздействия на возможно остающийся опухолевый клон [8].

Для многих пациентов с ОМЛ ключевым этапом лечения является алло-ТГСК. Под этим термином объединена ТГСК костного мозга, периферической крови, пуповинной (плацентарной) крови. Этот этап обладает наиболее высокой эффективностью при выполнении в период 1-й (реже 2-й) ПР ОМЛ. Результаты алло-ТГСК вне ПР крайне неудовлетворительны [8].

1.2 Роль мутаций в клональной эволюции ОМЛ

ОМЛ – это генетически гетерогенное заболевание, которое характеризуется мутациями множества генов, кодирующих миелоидные факторы транскрипции, гены-супрессоры опухолей, эпигенетические модификаторы и факторы сплайсинга, изменяющие нормальную гематопозитическую функцию миелоидных клеток-предшественников. В общей сложности было описано более 60 генов мутирующих при ОМЛ. Помимо всего прочего, лейкозы очень гетерогенны не только между пациентами, но и внутри самих пациентов. По данным современной литературы, молекулярный профиль ОМЛ меняется во время болезни, поскольку многочисленные исследования описали генетическую и эпигенетическую эволюцию ОМЛ от диагноза до рецидива (рисунок 1) [10].

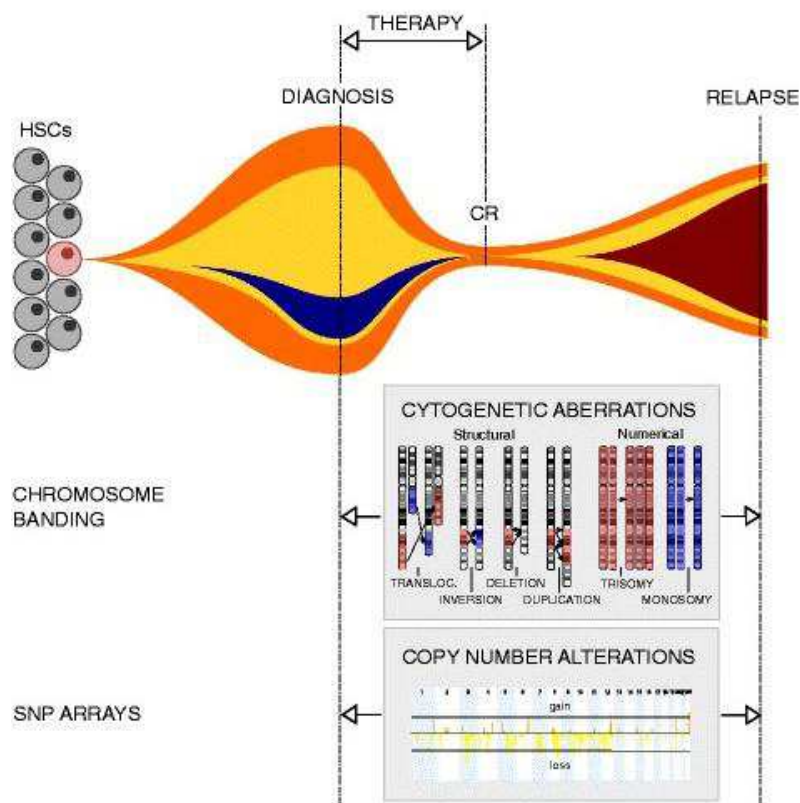


Рисунок 1. Генетические и молекулярные события от постановки диагноза до рецидива ОМЛ

HSC – гемопоэтические стволовые клетки, CR – полная ремиссия, SNP – однонуклеотидный полиморфизм

Диаграмма, представляющая клональную эволюцию у гипотетического пациента с ОМЛ, показана на верхней панели. На других панелях представлены генетические и молекулярные изменения между диагнозом и рецидивом ОМЛ; методы, используемые для исследования этих aberrаций, указаны слева от соответствующих панелей [11].

Считается, что ОМЛ происходит от одной гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника (HSC), которая со временем приобретает соматические мутации, которые приводят к блокировке дифференцировки, но также обеспечивают свойства неограниченного самообновления, подобные стволовым клеткам, что позволяет мутированным гемопоэтическим стволовым клеткам расти клонально (рисунок 2) [12,13].

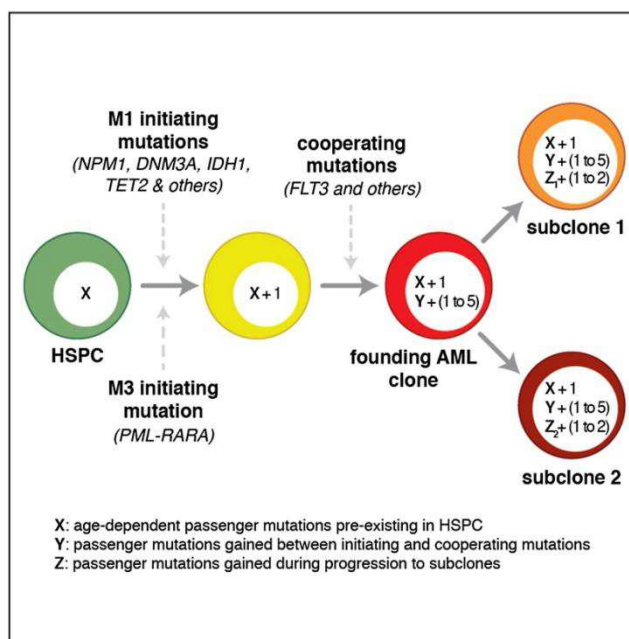


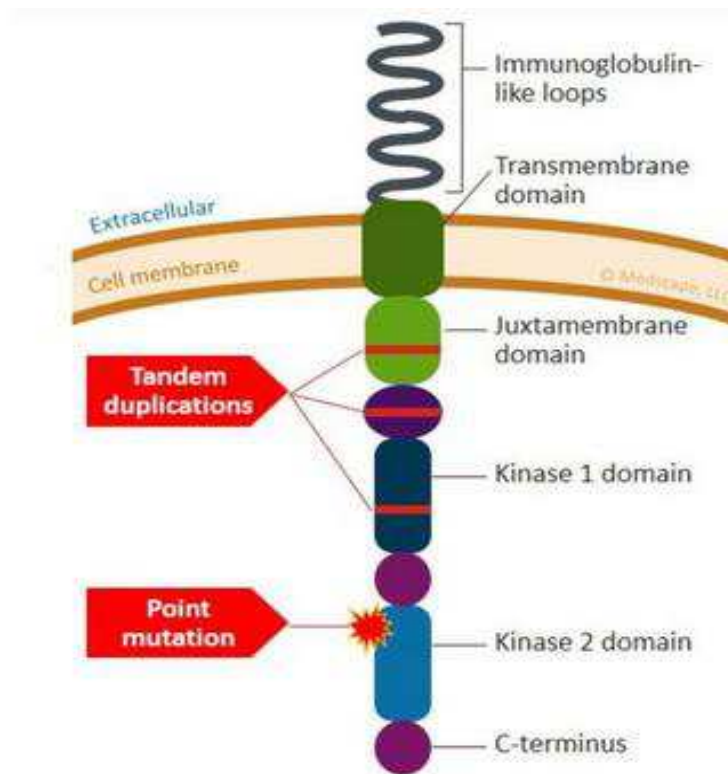
Рисунок 2 – Интегрированная модель происхождения драйверных и пассажирских мутаций в ходе эволюции ОМЛ [14]

До событий, вызывающих лейкоз, регуляторы эпигенетических меток (например, *DNMT3A*, *TET2* и *ASXL1*) обычно приобретают мутации, которые могут обеспечить преимущество роста, но их недостаточно для индукции лейкемии, и поэтому их обычно называют предлейкемией [15,16,17]. Иницирующие мутации, обеспечивающие лейкемический потенциал, часто обнаруживаются в гене нуклеофозмина (*NPM1*) и генах, связанных с активацией передачи сигналов, например, *FLT3*. Каждая мутация увеличивает генетическую сложность и, наконец, повышенная клональная гетерогенность связана с неблагоприятным исходом ОМЛ [18].

Аналогичным образом, недавний анализ образцов ОМЛ de novo с использованием полногеномного секвенирования показал, что рецидив после химиотерапии связан с клональной эволюцией и приобретением новых мутаций [19].

1.3 Белок FLT3

Ген *FLT3* на хромосоме 13q12 кодирует FMS-подобную тирозинкиназу 3-го типа. Белок FLT3 состоит из пяти иммуноглобулиноподобных доменов, трансмембранного, юкстамембранного, двух тирозинкиназных доменов, а также вставочной области киназного домена (рисунок 3) [20].



Pemmaraju N, et al. *Cancer*. 2011;117:3293-3304.

Рисунок 3 – Структурная организация белка FLT3

Этот белок функционирует как рецепторная тирозинкиназа, которая при связывании с лигандом запускает каскад сигнальной трансдукции, активирующий сигнальные пути STAT5, RAS/MAP, PI3K/AKT, которые регулируют рост, пролиферацию и продолжительность жизни гемопоэтических клеток [21]. Мутации в гене *FLT3* приводят к независимой от лиганда активации рецептора, в результате чего каскад реакций становится более продолжительным и происходит неконтролируемая активация генов,

ответственных за пролиферацию клеток, в частности сигнальных путей STAT5, RAS/MAP, PI3K/АКТ [22].

1.4 Мутации FLT3

Мутации *FLT3* встречаются в 30% случаев ОМЛ. Мутации включают внутренние тандемные дупликации (ITD), присутствующие в клетках ОМЛ примерно у 30% пациентов, и точечные мутации в домене тирозинкиназы (TKD), присутствующие примерно в 7% (рисунок 4). Мутации как ITD, так и TKD активируют, вызывая независимую от лиганда или конститутивную передачу сигналов рецептора FLT3, и, таким образом, способствуют выживанию и пролиферации цитокин-независимых клеток ОМЛ [20].

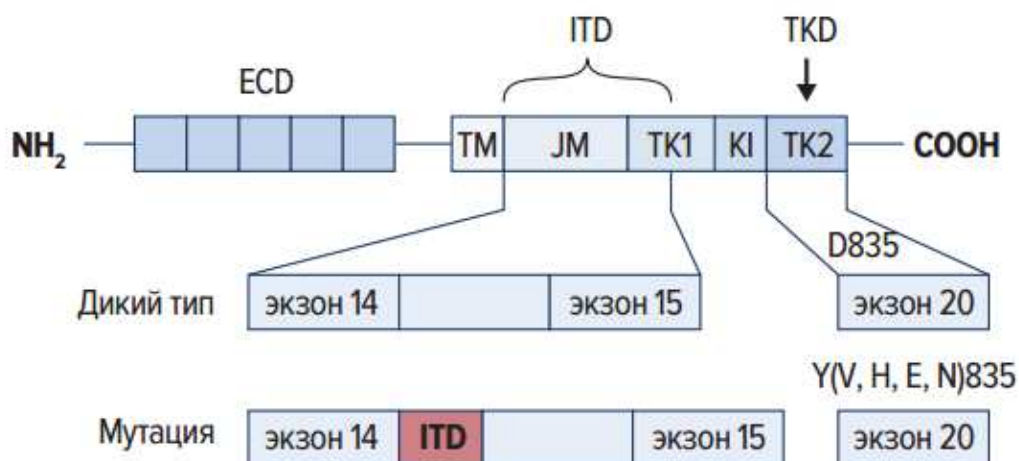


Рисунок 4 – Схема локализации мутаций в юкстамембранном и тирозинкиназном доменах гена *FLT3*

ECD – внеклеточный домен; ITD – внутреннее тандемное удвоение; JM – юкстамембранный домен; KI – вставочная область киназного домена; TKD (TK) – тирозинкиназный домен; TM – трансмембранный домен [20]

Внутренние тандемные дупликации внутри гена *FLT3* (FLT3-ITD) чаще всего встречаются в экзоне 14, кодирующем юкстамембранный (JM) домен. Домен JM ингибирует активацию рецептора за счет стерических препятствий, не позволяя TKD принимать активную конформацию. Присутствие ITD

вызывает потерю этого ингибирующего эффекта, что приводит к активации TKD [23]. ITD имеют переменный размер от 3 до 1236 нуклеотидов; потеря эффекта ингибирования FLT3 не зависит от размера дупликации внутри рецептора [24]. Кроме того, передача сигналов FLT3, активируемая ITD, является aberrантной, особенно активируя преобразователь сигнала и активатор транскрипции (STAT) 5 и его нижестоящие эффекторы, включая киназу Pim-1. Aberrантная передача сигналов происходит в связи с частичным удержанием *FLT3-ITD* в эндоплазматическом ретикулуме (ER), с перемещением рецептора из ER в аппарат Гольджи, нарушенным присутствием дублированного домена [25].

Точечные мутации в TKD встречаются реже; они присутствуют в клетках ОМЛ примерно у 7% пациентов. Точечные мутации TKD вызывают аминокислотные замены, вызывающие изменения в активационной петле, которые способствуют активной конформации киназы [26].

При изучении мутационного статуса больных ОМЛ в динамике заболевания было выявлено, что примерно у 30 % пациентов тип мутации *FLT3-ITD* в дебюте заболевания может отличаться от типа мутации при рецидиве лейкоза. Кроме того, нередко *FLT3-ITD* выявляется впервые только при рецидиве болезни. Вероятно, эта мутация образуется в отдельном субклоне лейкозных клеток, отражая процесс прогрессии и клональной эволюции лейкоза. Данные о нестабильности мутации *FLT3-ITD* позволяют предположить патогенетическую трансформирующую роль мутации, которая, по-видимому, является вторичным событием в развитии лейкоза и поддерживает создание новых клонов лейкозных клеток [27].

Достаточно высокая частота и важное прогностическое значение сделали мутацию *FLT3* перспективной терапевтической мишенью. В настоящее время разработан или изучается в клинических исследованиях целый ряд препаратов, направленных против тирозинкиназной активности FLT3. Различные препараты характеризуются разной степенью эффективности. Кроме того, нередко выявляется резистентность при монотерапии. Одним из механизмов

приобретенной резистентности к некоторым ингибиторам тирозинкиназы является присутствие мутации *FLT3-TKD* при рецидиве заболевания. Более того, есть сообщения, что бласты с мутацией *FLT3-TKD* не проявляют достаточной чувствительности к ингибиторам тирозинкиназы [21].

1.5 Белок Нуклеофозмин

Нуклеофозмин (NPM) представляет собой повсеместно экспрессируемый ядрышковый фосфопротеин, который непрерывно перемещается между ядром и цитоплазмой [28].

Ген *NPM1* содержит 12 экзонов и у человека кодируется на хромосоме 5q35. Белок NPM существует в двух альтернативно сплайсированных формах B23.1, изоформа, преобладающая во всех тканях, содержит 294 аминокислоты, тогда как B23.2, усеченный белок, не имеет последних 35 С-концевых аминокислот B23.1. и выражается на очень низком уровне. Хотя биологическое значение короткой изоформы остается неясным, ее экспрессия увеличивается в нечувствительных к радиации линиях клеток, и продукт локализуется в цитоплазме, а также в ядре [29]. Молекула NPM содержит отдельные домены которые отвечают за его многочисленные биохимические функции (рисунок 5). В белке N-конец характеризуется неполярным доменом, ответственным за олигомеризацию и гетеродимеризацию. В этой области присутствуют мотивы функционального ядерного экспортного сигнала (NES) и металлсвязывающий домен (MB). Центральная часть белка содержит 2 кислых участка (Ac), которые важны для связывания с гистонами, и сигнал двудольной ядерной локализации (NLS); эта область придает рибонуклеазную активность. С-конец белка проявляет рибонуклеазную активность и содержит основные области, участвующие в связывании нуклеиновых кислот. За последними следует ароматический участок, уникальный для изоформы NPM1, который содержит 2 остатка триптофана (288 и 290), которые необходимы для ядрышковой локализации белка (NoLS) [28].

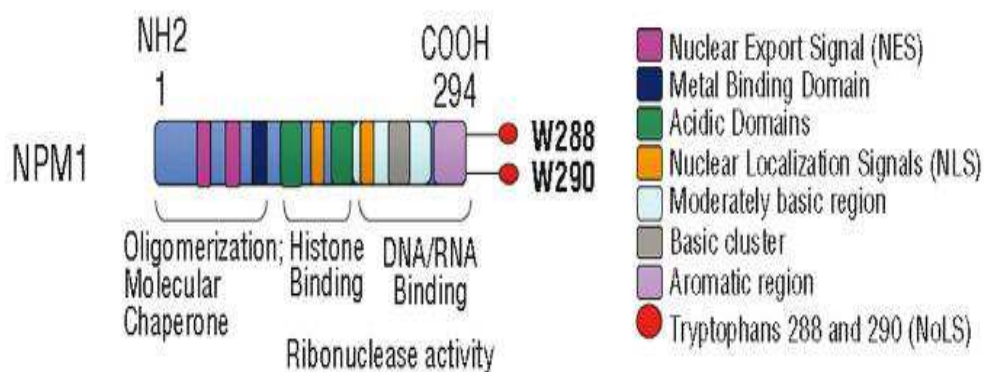


Рисунок 5 – Структура и функциональные домены NPM1 дикого типа

NPM1, многофункциональный фосфопротеин, локализован преимущественно в гранулярных областях ядрышка. Белок может перемещаться между ядром, нуклеоплазмой и цитоплазмой во время клеточного цикла и участвует в нескольких биологических процессах, таких как биогенез рибосом, подавление опухоли, реакция ядрышка на стресс и апоптоз клеток (рисунок 6) [30].

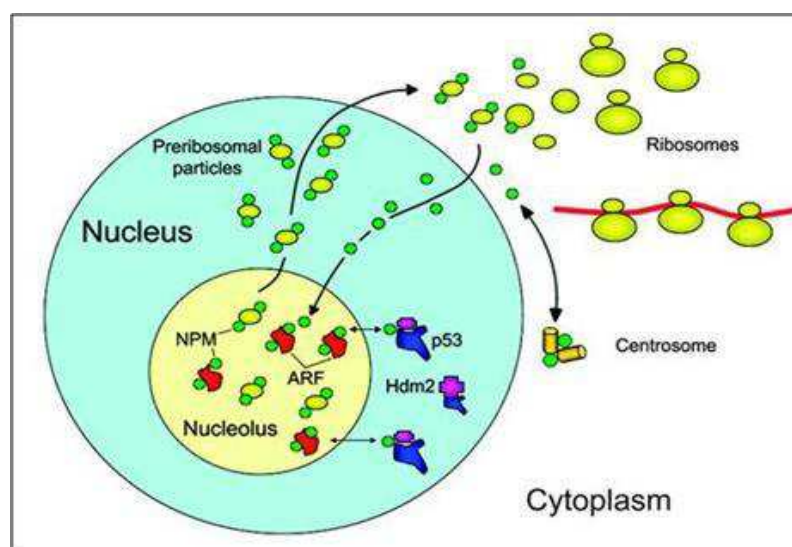


Рисунок 6 – Функциональное значение белка *NPM1*

Челночный транспорт играет фундаментальную роль в биогенезе рибосом, поскольку NPM транспортирует прерибосомные частицы. В цитоплазме NPM связывается с недуплицированной centrosомой и регулирует ее дупликацию во время деления клетки. Кроме того, NPM взаимодействует с

p53 и его регуляторными молекулами (ARF, Hdm2 / Mdm2), влияя на онкосупрессивный путь ARF-Hdm2 / Mdm2-p53 [30].

1.6 Мутации NPM1

Мутации *NPM1*, обнаруженные в экзоне 12, кодируют концевую область СООН. Мутации сдвига рамки в гене *NPM1* приводят к удлинению белка, который содержит дополнительный сигнал ядерного экспорта и приводит к аномальной цитоплазматической локализации белка. Эти мутации участвуют в лейкемогенезе и выявляются примерно в 30% случаев ОМЛ [31]. Выявлено шесть типов вариантов мутации *NPM1*: мутация А *NPM1* (с.860_863dupTCTG), мутация В (с.862_863insCATG), мутации D (с.863_864insCCTG), мутации I (с.863_864insTAAG), мутации J (с.863_864insCTTG) и мутации К (с.863_864insTATG). Мутация А (вставка TCTG) – наиболее часто встречающийся вариант, обнаруживаемый примерно в 72% всех случаев ОМЛ с мутацией *NPM1* (рисунок 7) [31].

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 7 – Частота встречаемости разных видов мутаций в гене *NPM1*

ОМЛ с мутированным геном *NPM1* является отдельным подтипом в соответствии с классификацией Всемирной организации здравоохранения

(ВОЗ) 2016 года из-за его специфического мутационного профиля, иммунофенотипа, клинического поведения и взаимной исключительности по отношению к другим повторяющимся геномным изменениям [32].

Мутации *NPM1* сохраняются на протяжении всего курса ОМЛ и исчезают с ремиссией. Это открытие подчеркивает их клиническую значимость и возможность использования для мониторинга минимальной или измеримой остаточной болезни (МОБ) после лечения. МОБ предоставляет мощную прогностическую информацию и все чаще используется в рутинном ведении ОМЛ. Обнаруживаемая МОБ неизменно связана с повышенным риском рецидива и ухудшением отдаленных результатов [33].

1.7 Резистентность к химиотерапии

Схема «3 + 7», сочетающая даунорубицин (DNR) и цитарабин (Ara-C), по-прежнему является основой индукционного лечения взрослых пациентов с ОМЛ. Однако первичные рефрактерные заболевания или нарушения индукции (PIF), определяемые как сохранение не менее 5% бластов в костном мозге (BM) пациентов, получающих 1 или 2 цикла индукционной терапии, по-прежнему представляют собой результаты одной трети случаев ОМЛ и показывают ужасный долгосрочный и краткосрочный прогноз [34]. Более того, пациенты, достигшие полного ответа (ПО) на ранних этапах терапии, могут впоследствии рецидивировать позже, приобретя вторичную резистентность. Технологии полногеномного секвенирования ДНК и РНК продемонстрировали неоднородность причин, ведущих к химиотерапии. Действительно, анализ генетических и транскриптомных профилей рефрактерных субпопуляций показал дифференциальную экспрессию в нескольких путях, вовлеченных в транскрипцию / трансляцию, метаболизм, микроокружение, повреждение ДНК и клеточный цикл (рисунок 7). Выделяют примеры двух основных механизмов, лежащих в основе химиотерапии: 1) биология заболевания: а) возникновение точечных мутаций в киназном домене *FLT3*, приводящих к конститутивной

активации и запуску клеточной пролиферации, б) онкогенная активация в результате активности повреждения ДНК на фосфорилирование p53; 2) факторы хозяина: а) вариации в аллелях для конкретных генов, кодирующих ферменты, участвующие в метаболизме лекарств (Ara-C + DNR) и б) регуляция микроокружения опухоли (лейкемические стволовые клетки, лимфатические узлы, селезенка для ОМЛ), особенно в модуляция иммунной системы после трансплантации костного мозга. Здесь мы остановимся на механизмах, связанных с интересующими нас генами [35].

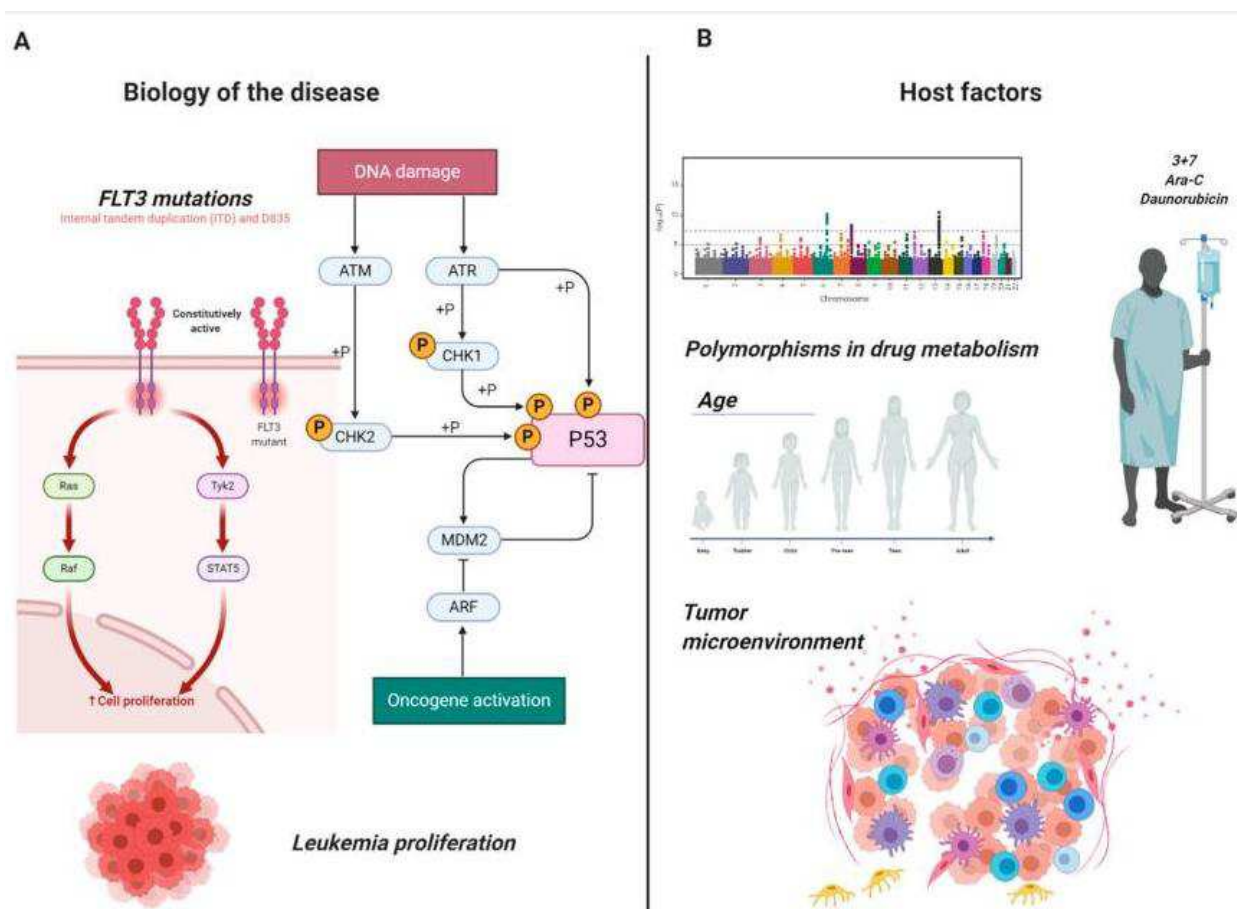


Рисунок 8. Механизмы химиорезистентности при ОМЛ.

Примеры гетерогенности механизмов, вызывающих химиорезистентность при остром миелоидном лейкозе у взрослых: (А) Биология заболевания: конститутивная активация FLT3, приводящая к гиперпролиферации и онкогенной активации p53 через индукцию повреждения ДНК. (В) Факторы-хозяева: полиморфизм аллелей, приводящий к устойчивости к даунорубину и цитозинарабинозиду (Ara-C) и микроокружению опухоли

Обе мутации в *FLT3* гене приводят к усилению регуляции нижестоящих сигнальных путей, создавая гиперпролиферативный фенотип. Исследования также прояснили, что, хотя только *FLT3-ITD* имеет явное влияние на прогноз заболевания, *FLT3-TKD* не имеет четко определенной роли в характеристиках заболевания с точки зрения терапевтического ответа и прогноза. Для понимания химиорезистентности было исследовано участие других генных сетей, представляющих нижестоящие мишени FLT3. Например, было показано, что экспрессия *RUNX3* может влиять на устойчивость к Ara-C у пациентов с мутациями *FLT3-ITD*. Исследования, проведенные на лейкозе человека K562, трансдуцированном с помощью *FLT3-ITD* и профилирование по экспрессии генов показали индукцию транскрипции *RUNX3* в этой модели. Более того, подавление экспрессии *RUNX3* в этих клетках увеличивало чувствительность к Ara-C [36].

В последние годы было одобрено множество ингибиторов FLT3 для преодоления генетического недостатка этой категории ОМЛ.

Следует отметить, что, в отличие от взрослого аналога, в педиатрической популяции мутации гена ОМЛ *FLT3*, по-видимому, не связаны с первичной химиотерапевтической устойчивостью, в то время как подмножество мутаций в других генах, таких как *ASXL1*, *SETBP1* и *WT1*, определяет определенные группы пациентов испытывает PIF [37].

Большое исследование, проведенное на 4601 пациенте с ОМЛ, показало, что возраст и работоспособность пациента (хозяина) вместе с другими переменными заболевания, такими как количество лейкоцитов (WBC), онтогенез заболевания (первичный против вторичного), цитогенетика и *FLT3* и *NPM1* мутационный статус может предсказать терапевтическую резистентность [38].

1.8 Резистентность к таргетной терапии

Было выяснено, что наличие мутаций во 2 домене тирозинкиназы вызывает устойчивость к действию ингибиторов тирозинкиназ. Ингибиторы тирозинкиназ нового поколения связываются с FLT3 в области DGF-мотива, локализованного в петле активации. От конформации DGF-мотива напрямую зависит успешность действия ингибитора. Некоторые мутации в положении 835 приводят к образованию DGF-in конформации, при которой связывание с ингибитором затруднено. Кроме того, D835, по прогнозам, играет критическую роль в стабилизации конформации DGF-out, служа аминоконцевым кэпирующим остатком для короткой однооборотной α -спирали, охватывающей остатки 835–839.

В зависимости от аминокислоты, на которую заменился аспарагин, различают разные виды чувствительности к ингибиторам. Так, например, *FLT3*-ITD D835V / Y / F мутации вызывают высокую степень устойчивости ко всем ингибиторам нового поколения. Это объясняется тем, что объемные гидрофобные аминокислоты не способны образовывать водородные связи с S838. Вследствие этого, образование α -спирали, поддерживающей конформацию, благоприятную для связывания с ингибитором (DFG-out) невозможно (рисунок 9). Удаление остатка D835 или замена объемным остатком изолейцином приводили к высокой степени устойчивости по тем же причинам. Замена D835H вызвала промежуточную устойчивость к ингибиторам нового поколения. Промежуточная устойчивость мутации D835H является следствием ее неспособности как приспособиться к режиму связывания ингибиторов типа II, так и сохранять водородные связи, которые стабилизируют короткую α -спираль в аутоингибированной конформации. В целом, мутации D835A / E / G / N придали наименьшую степень устойчивости к ингибиторам нового поколения. Это связано с тем, что данные аминокислоты способны образовывать водородные связи с гидроксильной группой боковой цепи S838, амидной группой основной цепи S838 или амидной группой

основной цепи M837. В результате короткая α -спираль и, таким образом, конформация DFG-out сохраняются, сохраняя связывание ингибитора [39].

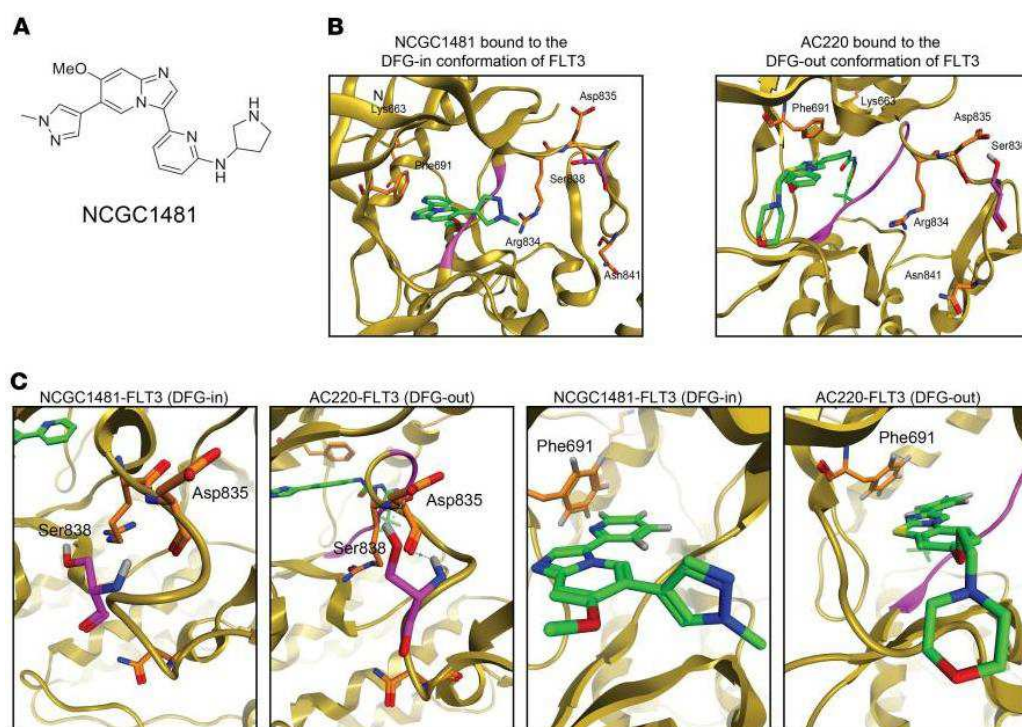


Рисунок 9 – Молекулярная модель связывания ингибиторов *FLT3* при наличии мутаций в тирозинкиназном домене.

Данный факт усложняет применение таргетных препаратов в терапии ОМЛ и ухудшает показатели выживаемости пациентов [40].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Исследование было выполнено на базе НПЛМГМИ СФУ в г. Красноярске. В исследование было включено 8 взрослых пациентов с диагнозом ОМЛ, для 2 пациентов (№7 и №10) на сегодня диагноз ещё не подтвержден (таблица 3). Медиана возраста составила 60, что на 5 лет меньше, чем в Европейских странах. Диагноз был установлен согласно стандартам ВОЗ [41,32], в том числе на основании цитогенетического исследования костного мозга по анализу хромосомных aberrаций.

Таблица 3 – Выборка пациентов с диагнозом ОМЛ

№ пациента	Возраст	Пол	Диагноз	Генетические нарушения	Исход заболевания
1	65	Женский	ОМЛ (исход из МДС)	<i>FLT3-ITD, NPM1</i>	умерла
2	48	Женский	ОМЛ (М3)	<i>PML-RARA, FLT3-TKD D835Y</i>	умерла
3	56	Мужской	ОМЛ (М2)	-	умер
4	44	Мужской	ОМЛ (М0)	WT1	неизвестно
5	19	Женский	ОМЛ (М4)	-	готовится к аллогенной трансплантации
6	27	Женский	ОМЛ (не уточнен)	t (3;3) и inv (3) (3q26), <i>FLT3-ITD</i>	умерла
7	64	Женский	ОМЛ?	-	неизвестно
8	67	Мужской	ОМЛ (не уточнен)	-	проходит химиотерапевтическое лечение
9	88	Мужской	ОМЛ (М3)	-	проходит химиотерапевтическое лечение
10	70	Женский	ОМЛ?	-	неизвестно

В качестве объекта исследования использовалась геномная ДНК от 10 пациентов, выделенная из лейкоцитов цельной крови пациентов. Взятие крови осуществляли из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Образцы поступали из

гематологического отделения КГБУЗ «Краевой клинической больницы» г. Красноярск в период с 01.2020 г. по 06.2021 г.

Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови и клеток костного мозга (для пациента №5) 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. Также, амплификации с мечеными праймерами подвергался 12 экзон 5 хромосомы для анализа *NPM1* мутаций. Ампликоны участка 20 экзона дополнительно подвергались ПДРФ анализу 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* и *NPM1*-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; инкубировали пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин, перемешивали и снова оставляли на 5 мин; центрифугировали пробы (8 тыс. об/мин, 2 мин); отбирали супернатант, содержащий разрушенные лейкоциты.

Из отмывтых лейкоцитов выделяли ДНК по следующему протоколу:

1. Лизирующий раствор и Раствор для отмывки 1 предварительно нагревали на термостате до 65°C.
2. В каждую пробирку с осадком лейкоцитов вносили по 300 мкл лизирующего раствора. Пробу перемешивали на вортексе, прогревали в течение 5 мин на термостате при 65 °С и центрифугировали (5 тыс об/мин, 5 сек).
3. Универсальный сорбент предварительно 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. Пробу центрифугировали (5 тыс об/мин, 30 сек) для осаждения сорбента; вакуумным отсасывателем удаляли надосадочную жидкость.
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; надосадочную жидкость удаляли 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 супернатант вакуумным отсасывателем. Повторяли указанную процедуру отмывки еще раз с последующим удалением надосадочной жидкости.

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

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°С, периодически встряхивая на вортексе.

9. Пробирки центрифугировали (13 тыс об/мин, 1 мин). Из надосадочной жидкости можно собрать очищенную 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 следующий: в образец вводится флуоресцентный зонд, который специфически связывает целевую молекулу, образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества. Прибор измеряет интенсивность свечения и рассчитывает концентрацию. Измерение проходит в обычных тонкостенных пробирках на 0,5 мл [42].

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 откручивали на вортексе в течение 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	13,25 мкл	
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	Праймеры,	Прямой	1 мкл
				Обратный	1 мкл

72 °C	30 сек		SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,25 мкл
72 °C	5 мин	1 цикл	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

Тип анализа	Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона	Источник
ПЦР для <i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> -ITD forward	TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA	326 bp	43
	<i>FLT3</i> -ITD reverse	TTCCATAAGCTGTTGCGTTCATCAC		
Фрагментный анализ для <i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> -ITD-FAM forward	FAM- TGCAGAACTGCCTATTCCTAACTGA		
ПЦР для <i>FLT3</i> -TKD	<i>FLT3</i> -TKD forward	GTA AAAACGACGGCCAGCCGCCAGGAA CGTGCTTG	152 bp	44
	<i>FLT3</i> -TKD reverse	CAGGAAACAGCTATGACGATATCAGC CTCACATTGCCCC		
Фрагментный анализ для <i>FLT3</i> -TKD	<i>FLT3</i> -TKD-FAM forward	FAM- GTA AAAACGACGGCCAGCCGCCAGGAA CGTGCTTG		
ПЦР для <i>NPM1</i>	<i>NPM1</i> forward	GATGTCTATGAAGTGTTGTGGTTCC	169 bp	45
	<i>NPM1</i> reverse	GGACAGCCAGATATCAACTG		
Фрагментный анализ для <i>NPM1</i>	<i>NPM1</i> -FAM forward	FAM- GTA AAAACGACGGCCAGCCGCCAGGAA CGTGCTTG		

Для исследования мутаций *FLT3*-ITD амплифицировали участок 14-15 экзона длиной 326 bp, захватывающий все известные тандемные повторы JM домена. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительный прямой праймер, который на 5'-конце имел флуоресцентную FAM метку [43].

Для исследования мутаций *FLT3*-TKD амплифицировали участок 20 экзона длиной 152 bp. Прямой праймер для ПЦР, на 5'-конце содержал прямую последовательность варибельного участка M13 (M13F). Обратный праймер ПЦР имеет обратную последовательность M13 (M13R). Кроме того, сайт разрезания *Eco* RV был сконструирован в обратный праймер D835 для ПЦР между кодирующей последовательностью и последовательностью M13R праймера. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительный прямой праймер, который на 5'-конце был флуоресцентно-мечен FAM меткой [44].

Для исследования мутаций *NPM1* амплифицировали участок 12 экзона 5 хромосомы длиной 169 bp. Для проведения фрагментного анализа использовали дополнительный прямой праймер с флуоресцентной меткой FAM на 5'-конце [45].

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 *Eco*RV (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 *Eco*RV (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 °C, а затем 20 мин при 80 °C 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.)
100 нг	5 мкл

Схема рестрикционного анализа для поиска *FLT3*-TKD мутаций, использованная в данной работе, представлена на рисунке 10.

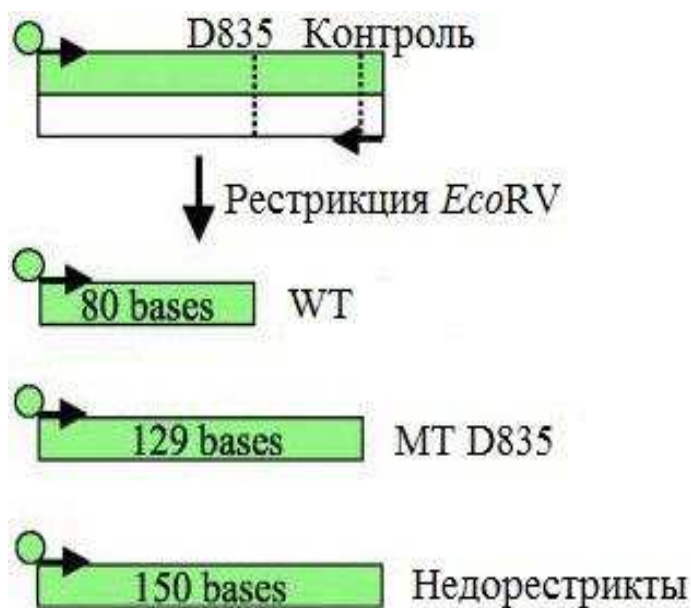


Рисунок 10 – Схема рестрикционного анализа для обнаружения *FLT3*-TKD мутаций [44]: D835 – сайт узнавания рестриктазы *EcoRV*, Контроль – дополнительный сайт рестрикции, возникающий при мутации, WT – нормальный аллель, MT D835 – мутантный аллель

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов – метод, основанный на способности бактериальных эндонуклеаз рестрикции расщеплять ДНК в строго специфичном сайте узнавания. Эволюционно, этот механизм позволял бактериям защититься от вирусов. Эндонуклеазы рестрикции широко используются для обнаружения точечных мутаций или небольших делеций или инсерций, а также в генной инженерии для создания вирусных векторов. Для анализа мутаций, подбирается рестриктаза, специфичная к участку с мутацией, утрачивающая сайт в случае мутации либо в результате мутации возникает дополнительный сайт. Таким образом, при электрофоретической детекции, по размерам получившихся рестриктов можно судить о наличии мутации.

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 и *NPM1*) 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* и *NPM1*. Приготовленные смеси нагревали в термостате при 95 °C в течение 3 мин и остужали до 4 °C 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 11.

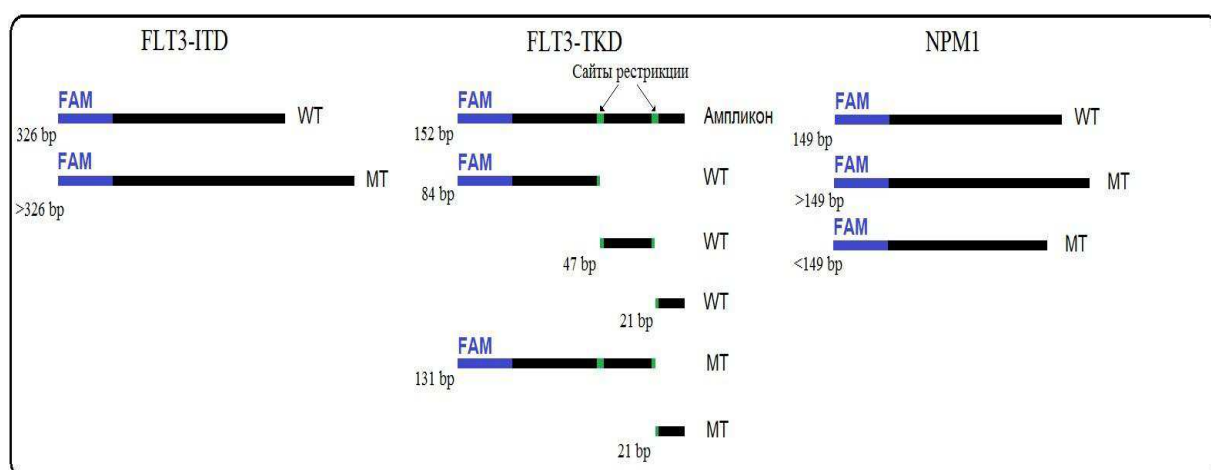


Рисунок 11 – Фрагментный анализ для исследования мутаций в генах *FLT3* и *NPM1*: FAM – праймеры с соответствующими флуоресцентными метками, WT – дикий тип, MT – мутантный аллель

Фрагментный анализ позволяет разделить флуоресцентно-меченые фрагменты ДНК и определить их длины относительно размерных стандартов (рисунок 12). Секвенирование же, способно определять последовательность анализируемого фрагмента ДНК без количественной оценки.

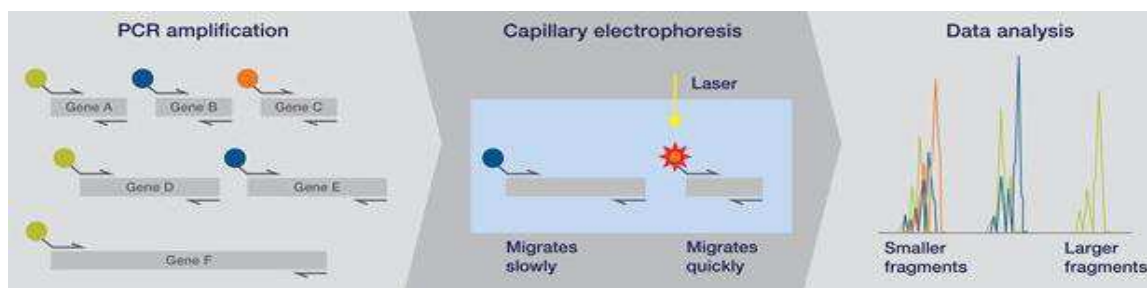


Рисунок 12 – Этапы фрагментного анализа [46]

Фрагментный анализ ДНК состоит из следующих этапов:

1. Проводят ПЦР с парами праймеров, в каждой из которых один праймер содержит на 5-м конце флуоресцентный краситель. Для одного образца методом ПЦР могут быть амплифицированы различные по размеру фрагменты ДНК, содержащие флуоресцентные красители разных цветов. Для определения длин амплифицированных фрагментов ДНК обязательно используется набор фрагментов ДНК с известными размерами (размерный стандарт), помеченных флуоресцентным красителем со спектром флуоресценции, отличным от спектра флуоресцентных красителей, которые используются для амплификации исследуемых фрагментов ДНК [47]. Так, для анализа *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD и *NPM1* мутаций использовали по одному праймеру с меткой FAM. При этом уровень аллельной нагрузки определяется по высоте накопления флуоресцентного сигнала, соответствующего количеству специфически провзаимодействовавших молекул меченого праймера и одной из цепей ДНК [48]. Это свойство также повышает точность анализа.

2. Разделение флуоресцентно-меченных фрагментов ДНК в секвенаторе методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флуоресценции, индуцированной лазером. В данном случае разделение проводилось 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[47].

3. Анализ результатов исследования с помощью специализированного программного обеспечения (определение размера фрагментов ДНК, определение генотипов на основании соотношения различных аллелей анализируемых маркеров). 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. Фрагментный анализ позволяет оценить количественные параметры мутации: размер вставки вплоть до 1 нуклеотида и процент мутантных аллелей по отношению к нормальным – аллельную нагрузку [47].

Уровень аллельной нагрузки для положительных образцов рассчитывалась по формуле:

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

Аллельное соотношение считается высоким при значениях $\geq 0,5$ и низким – при значениях < 0.5 . Прогностически значимыми считаются результаты с высокой аллельной нагрузкой, поскольку она говорит о предполагаемом плохом прогнозе ОМЛ и играет ключевую роль в выборе стратегии лечения.

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

FLT3 и *NPM1* 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			
			Ампликоны**	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 электрофореграмме, 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 генах *FLT3* и *NPM1*

[изъято 2 страницы]

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

[изъято 3 страницы]

3.3 Количественный анализ *FLT3*-TKD мутаций фрагментным анализом

[изъято 2 страницы]

3.4 Количественный анализ *NPM1* мутаций

[изъято 2 страницы]

3.5 Сопоставление молекулярно-генетических и клиничко- лабораторных результатов

[изъято 2 страницы]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые в Красноярском регионе было проведено исследование ассоциированных с диагнозом ОМЛ соматических мутаций, с использованием фрагментного анализа.

2. Среди десяти обследованных пациентов с ОМЛ, у трех были выявлены мутации в генах *FLT3* и *NPM1*.

3. Предполагается, что у первого положительного пациента мутация в гене *NPM1* была инициатором лейкомогенеза, а *FLT3-ITD* – обеспечила выживание доминирующему клону и привела к рецидиву. У второго положительного пациента, предположительно, иницирующей мутацией стала хромосомная аномалия PML-RARA. У третьего пациента была выявлена мутация *FLT3-ITD* с низкой аллельной нагрузкой, что подтверждает необходимость использования фрагментного анализа для анализа изучаемых мутаций.

4. Выявленная у пациента №1 мутация c.1774_1838-1dup, не зарегистрирована в базе данных COSMIC.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ac – кислые участки

Ara-C – цитарабин

BM – костный мозг

bp – пары оснований

CR – полная ремиссия

DGF – высококонсервативный мотив состоящий из аспарагина, фенилаланина и глутамина

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

DNR – даунорубицин

ELN – Европейская классификация риска лейкемии

ER – эндоплазматический ретикулум

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)

HSC – гемопоэтические стволовые клетки

JM – юкстамембранный домен

MB – металлсвязывающий домен

Mt – мутантный продукт

NES – сигнал ядерного экспорта

NLS/ NoLS – сигнал ядерной локализации

NPM1 – нуклеофосмин

PIF – первичные нарушения индукции

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

TKD – тирозинкиназный домен

WBC – лейкоциты

WT – дикий тип

алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КМ – костный мозг

МДС – миелодиспластический синдром

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МПН – миелопролиферативные новообразования

НК-ОМЛ – острый миелоидный лейкоз с цитогенетически нормальным кариотипом

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ПААГ – полиакриламидный гель

ПДРФ-анализ – анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

ПК – периферическая кровь

ПО – полный ответ

ПР – полная ремиссия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

ФАБ – франко-американо-британская система классификации ОМЛ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Зуховицкая Е.В. Прогностическая значимость цитогенетических и молекулярных изменений у пациентов с острым миелоидным лейкозом часть 1 влияние новых молекулярных генетических маркеров на принятие решения при лечении острого миелоидного лейкоза / Е.В. Зуховицкая, А.Т. Фиясь // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – № 1 (45). – С. 5–8.

2 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.

3 Mosquera Orgueira A. FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: current status and future perspectives / A. Mosquera Orgueira, L. Bao Perez, A. Mosquera Torre, [et al] // Minerva Medica. – 2020. – V.111 – I.5 – P.427–42.

4 Smith C. C. The growing landscape of FLT3 inhibition in AML / C.C. Smith // Hematology American Society Hematology Education Program. – 2019. – V.1 – P.539–547.

5 Parikh S.A. Adult acute myeloid leukemia adult acute myeloid leukemia: introduction epidemiology, etiology, and risk factors / S.A. Parikh, E. Jabbour, C.A. Koller // MD Anderson manual of medical oncology. – 2014. – P.1-25.

6 Prada-Arismendy J. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia / J.Prada-Arismendy, J. C.Arroyave, S. Röthlisberger // Blood. – 2017. – V.31 – I.1 – P.64–76.

7 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.

8 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

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

10 Vosberg S. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse / S. Vosberg, P. A. Greif // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2019. – V.58 – I.12 – P.839–849.

11 Hackl H. Molecular and genetic alterations associated with therapy resistance and relapse of acute myeloid leukemia / H. Hackl, K. Astanina, R. Wiese // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2017. – V.10 – Article number 51.

12 Dick J.E. Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells / J.E. Dick, T. // *International Journal of Hematology*. – 2005. – V.82 – I.5 – P.389-396.

13 Short N.J. Acute myeloid leukaemia / N.J. Short, M.E. Rytting, J.E. Cortes // *Lancet*. – 2018. – V.392 – I.10147 – P.593-606.

14 Welch J.S. The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia / J.S. Welch, T.J. Ley, D.C. Link, [et al] // *Cell*. – 2012. – V.150 – I.2 – P.264-278.

15 Corces-Zimmerman M.R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission / M.R. Corces-Zimmerman, W.J. Hong, I.L. Weissman, [et al] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – V.111 – I.7 – P.2548-2553.

16 Genovese G. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence / G. Genovese, A.K. Kahler, R.E. Handsaker, [et al] // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – V.371 – I.26 – P.2477–2487.

17 Jaiswal S. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes / S. Jaiswal, P. Fontanillas, J. Flannick, [et al] // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – V.371 – I.26 – P.2488-2498.

18 Bochtler T. Clonal heterogeneity as detected by metaphase karyotyping is an indicator of poor prognosis in acute myeloid leukemia / T. Bochtler, F. Stolzel, C.E. Heilig, [et al] // *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2013. – V.31 – I.31 – P.3898-3905.

19 Walter M.J. Clonal Architecture of Secondary Acute Myeloid Leukemia / M.J. Walter, D. Shen, L.Ding, [et al] // *The New England Journal of Medicine*. – 2012. – V.366 – P.1090–1098.

20 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 – P.150–160.

21 Блау О.В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах / О.В. Блау // *Клиническая онкогематология*. – 2016. – Т.9 – №3 – С.245–56.

22 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.

23 Larrosa-Garcia M. FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: Current status and future directions / M. Larrosa-Garcia, M. R. Baer // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2017. – V.16 – I.6 – P.991–1001.

24 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 Chromosomes Cancer*. – 2012. – V.51 – P.910–924.

25 Choudhary C. Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes / C. Choudhary, J.V. Olsen, C. Brandts, [et al] // *Molecular Cell*. – 2009. – V.36 – P.326–339.

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

27 Kottaridis P.D. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. / P.D. Kottaridis, R.E. Gale, S.E. Langabeer, [et al] // *Blood*. – 2002. – V.100 – I.7 – P.2393–2398.

28 Falini B. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias / B. Falini, I. Nicoletti, N. Bolli, [et al] // *Haematologica*. – 2007. – V. 92 – I.4 – P.519–532.

29 Naoe T. Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies / T.Naoe, T.Suzuki, H. Kiyoi, [et al] // *Cancer science*. – 2007. – V.97 – I.10 – P.963–969.

30 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.

31 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] // *Turkish journal of hematology*. – 2018. – V. 35 – I. 1 – P. 49–53.

32 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 – P. 2391–2405.

33 Zarka J. Nucleophosmin 1 Mutations in Acute Myeloid Leukemia / J. Zarka, N.J. Short, R. Kanagal-Shamanna, [et al] // *Genes (Basel)* – 2020. – V.11 – I.6 – P.649.

34 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 – P. 424–447.

35 Gurnari C. Deciphering the Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia / C. Gurnari, S. Pagliuca, V. Visconte1 // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21 – I.22 – P.8505.

36 Damdinsurena A. FLT3-ITD drives Ara-C resistance in leukemic cells via the induction of RUNX3 / A. Damdinsurena, H. Matsushita, M. Ito, [et al] // *Leukemia Research*. – 2015. – V.39 – I.12 – P. 1405–1413.

37 McNeer N.A. Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia / N.A. McNeer, J. Philip, H. Geiger, [et al] // *Leukemia*. – 2019. – V.33– P. 1934–1943.

38 Walter R B. Effect of genetic profiling on prediction of therapeutic resistance and survival in adult acute myeloid leukemia / R B Walter, M Othus, E M Paietta, [et al] // *Leukemia*. – 2015. – V.29 – I.10 – P. 2104–2107.

39 Smith C.C. FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors / C.C. Smith, K. Lin, A. Stecula, [et al] // *Leukemia*. – 2015. – V.29 – P. 2390–2392.

40 Jones L.Q.M. Targeting AML-associated FLT3 mutations with a type I kinase inhibitor / L.Q. M. Jones, K. Melgar, L. Bolanos [et al] // *The Journal of Clinical Investigation* . – 2020. – V.130 – I. 4 – P. 2017–2023.

41 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.

42 Флуориметр Qubit 4.0 с расширенным стартовым комплектом реагентов [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://interlabservice.ru/catalog/oborud/?sid=2327&id=11318>

43 Tan A.Y.C. Detection of NPM1 exon 12 mutations and FLT3 – internal tandem duplications by high resolution melting analysis in normal karyotype acute myeloid leukemia / A.Y.C. Tan, D.A. Westerman, D.A. Carney, [et al]. // Journal of Hematology & Oncology. – 2008. – V.1. – I.10.

44 Murphy K.M. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay / K.M. Murphy, M. Levis, M.J. Hafez, [et al]. // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2003. – V.5 – I.2 – P.96–102.

45 Szankasi P. A New DNA-Based Test for Detection of Nucleophosmin Exon 12 Mutations by Capillary Electrophoresis / P. Szankasi, M. Jama, D.W. Bahler // The Journal of Molecular Diagnostics. – 2008. – V.10 – I.3 – P.236–241.

46 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>

47 Заруцкий И.В. Метод поиска пиков размерного стандарта при фрагментном анализе ДНК / И.В. Заруцкий, В.В. Манойлов, Н.С. Самсонова, [и др.] // Журнал технической физики. – 2018. – Т.88 – №9 – С.1407–1412.

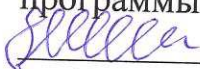
48. Chang T.L Simplified capillary electrophoresis detection of the Flt-3 internal tandem duplications and D835 point mutations in acute myeloid leukemia / T.L. Chang, M. Salto-Tellez, Y.K. Kueh, [et al]. // Haematologica. – 2003. – V.88 – I.2 – P.21–22.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской
программы

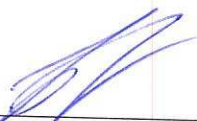
 Е. И. Шишацкая
« 24 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ драйверных мутаций при остром миелоидном лейкозе

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.05 – Реконструктивная биоинженерия

Научный
руководитель



подпись, дата

доцент, канд-т биол. наук
Т.Н. Субботина

Выпускник



подпись, дата

О.С. Леванова

Рецензент



подпись, дата

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

Красноярск 2021