

Гук Лариса Викторовна

**Анализ мутаций в генах *FLT3*, *KIT*, *MLL*, *NPM1* у детей с острым миелоидным
лейкозом**

14.01.21 - гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва 2010

**Работа выполнена в Федеральном научно-клиническом центре
детской гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития**

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор

Масчан Алексей Александрович

Научный консультант

Кандидат биологических наук

Савицкая Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Мякова Наталья Валерьевна

доктор медицинских наук, профессор

Маякова Светлана Александровна

Ведущая организация:

ГУ Научный центр здоровья детей РАМН.

Защита состоится в часов на заседании диссертационного совета в ФНКЦ гематологии, онкологии и иммунологии Росздрава по адресу 117997, Москва, Ленинский проспект, 117, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ФНКЦ ДГОИ и на сайте www.niidg.ru

Автореферат разослан « 22 » сентября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Чернов Вениамин Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой гетерогенную группу заболеваний, морфологическим субстратом которых являются миелоидные бластные клетки. К лейкозной трансформации при ОМЛ приводит накопление приобретенных соматических генетических изменений в кроветворных клетках-предшественниках.

Спектр молекулярных и генетических aberrаций при ОМЛ очень широкий: это изменения числа и структуры хромосом, мутации генов, эпигенетические нарушения регуляции их активности. Клеточные процессы, которые подвергаются патологическим изменениям в результате этих молекулярных нарушений, включают регуляцию пролиферации, дифференцировки и выживания клеток, а также клеточные реакции, отвечающие за репарацию ДНК, стабильность и модулирование хроматина. Несмотря на широкую генетическую гетерогенность ОМЛ, современные модели лейкомогенеза предполагают, что в каждом конкретном случае развитие заболевания может быть вызвано двумя генетическими aberrациями. Была предложена «двухударная» теория патогенеза лейкозов (Gilliland D. 2001). По этой теории, гены, вовлеченные в патогенез ОМЛ, делятся на функциональные группы. Первая группа (класс I) включает гены, мутации в которых вызывают активацию определенных путей сигнальной трансдукции, что приводит к повышенной пролиферации и/или выживанию лейкозных клеток-предшественников. К этой группе относятся мутации, ведущие к активации тирозинкиназных рецепторов FLT3 или KIT, а также мутации генов семейства *RAS*, *JAK2* и других. Вторая группа (класс II) включает мутации и/или хромосомные изменения, которые воздействуют на активность и специфичность факторов транскрипции или компонентов комплекса активации транскрипции и модулирования хроматина. Такие мутации приводят к возникновению блока дифференцировки кроветворных клеток-предшественников. Результатом мутаций II класса являются химерные гены, возникающие при хромосомных транслокациях t(8;21), inv(16), t(16;16) и t(15;17), а также при многочисленных хромосомных aberrациях, затрагивающих локус 11q23 (ген *MLL*). В эту же группу относятся и мутации в генах *CEBPA* и, возможно, *NPM1* (Dohner H., 2007). К «наработке» лейкомического клона приводит только сочетание мутаций I и II класса.

Хотя при большинстве лейкозов удается выявить повторяющиеся или «случайные» нарушения кариотипа, примерно у 30 % больных с ОМЛ никаких цитогенетических отклонений выявить не удастся, и такие лейкозы условно носят название лейкозов с «нормальным кариотипом». В последние годы у таких больных был выявлен целый спектр

онкогенных мутаций, представляющих собой в основном точечные мутации и дупликации небольших генных фрагментов. Сегодня эти мутации стали существенным фактором прогноза ОМЛ и определения стратегии лечения (Dohner H., 2007). К наиболее часто наблюдаемым подобным мутациям относятся:

- мутации в гене нуклеофосмина (*NPM1*, хромосомная локализация – 5q35), который кодирует ядерный фосфопротеин с многочисленными функциями (Grisendi S., 2005). Мутации в гене *NPM1* являются самой распространенной генетической аберрацией при ОМЛ у взрослых людей (около 35% всех случаев ОМЛ и около 60% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом). У детей *NPM1* мутации встречаются реже (около 10% всех случаев ОМЛ и приблизительно 25% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом) и связаны с благоприятным прогнозом (Wertheim G., 2008).

- ген *FLT3* (13q12.2) кодирует тирозинкиназный рецептор III класса. Наиболее распространенными мутациями в гене *FLT3* являются внутренние тандемные дупликации (ITD) в околосмембранном домене и точечные мутации в тирозинкиназном домене (TKD), которые приводят к активации рецептора и ассоциируются с высоким риском рецидива и низкой общей выживаемостью (Бавыкин А., 2006; Kaspers G., 2007; Krstovski N., 2009). Мутации *FLT3/ITD* у взрослых с ОМЛ встречаются более чем в 30% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом, в то время как *FLT3/TKD* – в 10-15% случаев (Schlenk R., 2008). У детей *FLT3/ITD* и *FLT3/TKD* типы мутаций встречаются примерно с одинаковой частотой – 5-10% (Kaspers G., 2007; Krstovski N., 2009). Если *FLT3/ITD* связаны с неблагоприятным прогнозом, то *FLT3/TKD* мутации не оказывают влияния на частоту ремиссий, но снижают общую и безрецидивную выживаемость (Thiede Ch., 2002; Thiede Ch., 2003). По мнению других авторов, мутации *FLT3/TKD* не влияют на показатели общей и безрецидивной выживаемости (Frohling S., 2002; Yamamoto Y., 2001).

Ген с- *KIT* – также как и ген *FLT3* кодирует рецепторную тирозинкиназу, которая вместе со своим лигандом – фактором стволовых клеток (stem cell factor, SCT), играет ключевую роль в выживании, пролиферации и дифференцировке кроветворных клеток-предшественников (Lennartsson J., 2005; Ronnstrand L., 2004]. Мутации в гене *KIT* найдены приблизительно в 30% случаев ОМЛ с геномными нарушениями в *CBF* генах и реже при других вариантах ОМЛ. У детей частота встречаемости мутаций в *KIT* гене при ОМЛ – около 5% (Kaspers G., 2007). Мутации в гене *KIT* обычно ассоциируются с высоким риском рецидива и снижением общей выживаемости

(Shimada A., 2006);

MLL (myeloid/lymphoid = mixed lineage leukemia, 11q23) – ген, кодирующий ДНК-связывающий белок, который регулирует генную экспрессию при гемопоэзе. *MLL* является ключевым белком модулирования хроматина, который входит в комплекс транскрипции многих генов (Krivtsov A., 2007; Slany R., 2009). Ген *MLL* имеет более 100 хромосомных транслокаций, с образованием химерных генов, которые ассоциированы со многими вариантами острого лейкоза, в том числе обусловленными действиями терапии (therapy related leukemia; t-AML или t-ALL) (Daser A., 2005; Liedtke M., 2009). У пациентов с 11q23/*MLL* – реаранжировкой прогноз расценивается как «промежуточный» и плохой; частота достижения ремиссии у этих больных высокая, но выживаемость низкая. Прогноз у взрослых пациентов и у детей с t(9;11)(p21;q23) лучше, чем у больных с другими транслокациями, в которые вовлечен ген *MLL*. В гене *MLL* выявлен другой тип абберации, при котором происходит копирование небольшого кодирующего участка 5' области гена, получившей название «частичная тандемная дупликация» (PTD). *MLL*/PTD абберация выявляется приблизительно в 5-10% случаев ОМЛ с нормальным кариотипом, и связана с неблагоприятным прогнозом (Bausecke J., 2006).

Мутации отдельных генов при ОМЛ не всегда являются однозначными факторами прогноза, и зачастую течение болезни определяется комбинацией генных мутаций и соотношением экспрессии мутантного и нормального аллелей, а так же тактикой терапии. В частности, это справедливо для мутаций генов *FLT3* и *NPM1*. Исследование мутаций в некоторых важнейших генах миелопоэза у детей с ОМЛ и стало предметом данного исследования.

Цель исследования:

Охарактеризовать мутации генов *KIT*, *FLT3*, *MLL*, *NPM1*, оценить их частоту и прогностическое значение у детей больных ОМЛ.

Задачи исследования:

1. Сравнить частоту выявления мутаций в генах *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *MLL* в архивном материале (препараты костного мозга больных на предметных стеклах, замороженные образцы венозной крови и костного мозга) и в свежеприготовленном костном мозге у детей с ОМЛ.

2. Оценить частоту и характеристики мутаций в генах *FLT3*, *KIT*, *NPM1* и *MLL* у пациентов с ОМЛ в сравнении со здоровыми донорами – добровольцами.
3. Сравнить клиничко-гематологические характеристики ОМЛ с мутациями *FLT3*, *KIT*, *NPM1* и *MLL* с ОМЛ без мутаций в данных генах.
4. Провести оценку результатов терапии у детей с ОМЛ в зависимости от выявленных мутаций.

Научная новизна:

Оптимизированы методики для выявления молекулярных изменений в генах *FLT3*, *KIT*, *NPM1* и *MLL*. Молекулярно-генетический анализ нуклеотидных последовательностей в клетках здоровых доноров и пациентов позволил выявить ранее не описанные нейтральные точечные замены в нуклеотидных последовательностях генов *KIT*, *NPM1*, а также мутации в генах *FLT3* и *KIT*.

Показано неблагоприятное влияние внутренних тандемных дупликаций в гене *FLT3* на прогноз детей с ОМЛ, несмотря на проведение интенсивной химиотерапии с высокой «плотностью» дозы.

Практическое значение:

Внедрение в практику методик по выявлению мутаций гена *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *MLL* расширяет представление о патогенетических механизмах ОМЛ, позволяет осуществлять дифференцированный подход к лечению больных и создает методологическую основу для разработки эффективной терапии.

Скрининг указанных генов в контрольной группе исключает ошибочную интерпретацию факта не описанных ранее изменений нуклеотидных последовательностей как мутаций, связанных с развитием ОМЛ у детей.

Положения, выносимые на защиту

При молекулярно-генетическом исследовании у 14,5 % (18/124) пациентов обнаружены мутации гена *FLT3*.

Наличие мутаций гена *FLT3* у больных с ОМЛ ассоциировано со статистически значимым снижением безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами без мутаций: 0.22 против 0.52 соответственно, $p=0,03$.

В генах *NPM1* и *KIT* были обнаружены ранее не описанные изменения нуклеотидной

последовательности, являющиеся аллельными полиморфизмами, что было показано в результате скрининга контрольной группы.

У 1 (55) пациента в гене *KIT* обнаружена вставка шести нуклеотидов, не приводящая к сдвигу рамки считывания. Для оценки влияния мутаций гена *KIT* на развитие ОМЛ у детей требуется дальнейшее исследование.

При молекулярно-генетическом исследовании гена *MLL* у исследуемой группы пациентов не были выявлены внутренние tandemные дубликации.

Апробация диссертации

Основные положения диссертации доложены на VII Международном симпозиуме «Биологические основы терапии онкогематологических заболеваний» (Москва, январь 2009 г.). Апробация работы состоялась 30.06.2010 г. на совместном заседании лаборатории молекулярной биологии ФНКЦ ДГОИ, отдела координации и планирования научных исследований ФНКЦ ДГОИ, отделом молекулярной и экспериментальной гематологии, онкологии и иммунологии ФНКЦ ДГОИ и отделений гематологии и трансплантации костного мозга.

По материалам диссертации опубликовано 3 печатных работы.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии Федерального научно-клинического центра гематологии, онкологии и иммунологии Минздравсоцразвития на базе Российской детской клинической больницы Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из 4 глав: обзора литературы, главы материалы и методы, главы собственных результатов исследования и обсуждения, выводов, приложения, указателя литературы, включающего 7 отечественных и 68 иностранных источника. Работа изложена на 90 страницах машинописного текста, иллюстрирована 23 таблицами и 38 рисунками.

Содержание работы

Материалы и методы исследования

Пациенты. В исследование были включены 124 ребёнка, в возрасте от 1 месяца до

18 лет (медиана 10,70 лет), поступивших в клиники-участницы исследования с 1999 года по 2009 год, мальчиков 79 (63,7%), девочек 45 (36,8%). Соотношение пациентов мужского и женского пола – 1,75:1. Шестьдесят девять детей были включены в исследование в РНПЦ ДОГ, Республика Беларусь, Минск; 48 – в ФГУ ФНКЦ ДГОИ на базе РДКБ, Москва; 7 – в МДГКБ Москва.

Морфологические характеристики. В табл. 1 представлена частота различных вариантов ОМЛ в группе детей, включённых в исследование.

Таблица 1. Структура морфологических характеристик ОМЛ в исследуемой группе.

Вариант ОМЛ	Количество пациентов (n=124)
M0	2,4% (3)
M1	15,3% (19)
M2	33% (41)
M3	5,6% (7)
M4	16,1% (20)
M4E0	1,6% (2)
M5	16,9% (21)
M6	4,8% (6)
M7	2,4% (3)
MX	1,6% (2)

Как видно из табл. 1, M2 вариант ОМЛ встречается у 33% больных, следующим по частоте идёт вариант M5 - 16,9%, M4 - 16,1% больных, M1 - 15,3%, M3 - 5,6%, M6 - 4,8%, M7 - 2,4%, M0 - 2,4%, MX - 1,6%, M4E0 - 1,6% пациентов.

Терапия исследуемой группы пациентов. Терапия исследуемой группы пациентов представлена в табл. 2. Содержание протоколов представлено в приложениях 1-7.

Таблица 2. Протоколы лечения исследуемой группы пациентов

Протокол	Количество пациентов ((n=124)
AML-BFM-87 (приложение 1)	1,6% (2)
AML-BFM -93 (приложение 2)	4% (5)

ОМЛ-ММ - 2000 (приложение 3)	75% (93)
ОМЛ-ММ -2006 (приложение 4)	10,4% (13)
APL-2003 (приложение 5)	4% (5)
APL-98 (приложение 6)	1,6% (2)
TRIAL-Relapsed AML 2001/2002. (приложение 7)	5,6% (7)

Цитогенетические характеристики больных. Хромосомный анализ был проведён у 108/124 (87,1%) больных. Аномалии кариотипа были обнаружены у 80/124 больных (64,5%) (табл. 3). Подробное описание индивидуального кариотипа представлено в диссертационной работе на стр.34.

Таблица 3. Аномалии кариотипа выявленные в исследуемой группе пациентов

Кариотип	Число больных
Вся группа	108
Нормальный кариотип	30
Аномалии региона 11q23	15
Сложный кариотип	10
Потеря хромосом	6
t(8;21)	26
t(15,17)	8
inv(16)	10
t(3;5)	1
t(4;10)	1
t(6;14)	1

Молекулярно-генетические характеристики больных. Молекулярно-генетическое исследование на наличие в клетках костного мозга (к.м.) больных химерных онкогенных мРНК (транскриптов) было проведено у 116/124 (93,5%) пациентов. Аномальные транскрипты обнаружены у 57/116 (59,1%) (табл. 4).

Таблица 4. Аномальные транскрипты выявленные в исследуемой группе больных ОМЛ

Аномальные транскрипты	Число больных
AML1/ETO	28

CBFB/MYH1	9
MLL/AF9	8
MLL/AF10	3
NPM/ML	1
SET/SCAN	1
dup11MLL/MLL	2
PML/RARA	5

Диагностика ОМЛ. Морфологические исследования у больных ОМЛ (гемограмма, миелограмма с цитохимическим исследованием, анализ иммунофенотипа и исследование ликвора) проводили в лаборатории морфологии ФГУ ФНКЦ ДГОИ, Москва (заведующая – к.м.н. Л.В. Байдун) и в клиничко-диагностической лаборатории РНПЦ ДОГ, Минск (заведующая – Н.В. Липай).

Хромосомный анализ лейкемических клеток, методом G-окрашивания, проводили в лаборатории цитогенетики Института Канцерогенеза ГУ РОИЦ им. Блохина РАМН, Москва (руководитель научной группы – д.м.н. Е.В. Флейшман) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ, Минск (заведующий лабораторией - к.б.н. Т.В. Савицкая).

Молекулярно-генетическое исследование химерных генов методом мультиплексной ПЦР кДНК генов слияния AML/ETO, CBFB-MYH11, PML-RAR α , MLL/AF4, MLL/AF9, MLL/ELL, MLL/AF1q, MLL/AF6, MLL/MLL проводили в Центре биологических микрочипов НИИ Молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва (руководитель научной группы - д.б.н. Т.В. Наседкина) и в лаборатории молекулярно-генетических исследований научного отдела РНПЦ ДОГ, Минск (заведующий лабораторией - к.б.н. Т.В. Савицкая).

Диагностические критерии ОМЛ. Диагноз ОМЛ ставили согласно критериям ВОЗ (1999 год) при обнаружении 20% и более лейкемических бластов в аспирате костного мозга. Пациенты с цитогенетическими аномалиями t(8;21) (q22;q22), inv (16)(p13q22) или с t(16;16)(p13;q11), t(15;17)(q22;q21) считаются ОМЛ независимо от содержания бластных клеток.

Цитохимическое исследование: если 3% и более бластов дают при окраске положительную реакцию на миелопероксидазу или Судан чёрный В, диагностируется ОМЛ. Если бласты пероксидазонегативны, но позитивны в реакции на бутират или

неспецифическую нафтил ацетат эстеразу, то так же диагностируется ОМЛ.

Иммунологические характеристики миелоидной дифференцировки: линейно неспецифические маркёры гемопоэтических предшественников CD34, HLA-DR; панмиелоидные маркёры CD13, CD33, CD56; маркёры, ассоциированные с моноцитами и гранулоцитами CD14, CD15; линейно специфические мегакариоцитаные маркёры CD41, CD61; внутриклеточная миелопероксидаза МПО.

Контрольная группа. В качестве контрольной группы использовались замороженные образцы венозной крови 32 взрослых здоровых доноров-добровольцев, не являющихся родственниками пациентов.

Получение материала и его характеристика.

В качестве материала использовали архивные и свежеприготовленные образцы:

- замороженные образцы костного мозга больных (11 образцов).
- замороженные образцы венозной крови больных (при наличии лейкоэмических клеток в периферической крови) (3 образца).
- препараты костного мозга больных на предметных микроскопических стеклах (41 образец).
- свежеприготовленные образцы костного мозга (69 образцов).

Выделение ДНК. ДНК из архивных образцов выделяли с использованием набора «ДНК-сорб-В» (производства АмплиСенс, Москва) ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора в соответствии с методикой производителя. ДНК из свежеприготовленных образцов выделяли с использованием протеинкиназы К и фенольной экстракции (Маниатис Т., 1984).

Проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Таблица 5. Последовательность праймеров, использованных для проведения ПЦР

Название	5г-3г последовательность
FLT/ITD 11F	GCA ATT TAG GTA TGA AAG CCA GC
FLT/ITD 12R	CCT TCA GCA TTT TGA CGG CAA CC
FLT3 14exF	GAC TCA TCA TTT CAT CTC TGA AGC
FLT3 14exR	CAT TTG GCA CAT TCC ATT CTT AC
FLT3 15exF	ACG TAC TCA CCA TTT GTC TTT GC
FLT3 15exR	TGC TGT CCT TCC ACT ATA CTG TAC C
FLT3 20exF	ACT CTG GTG TCA TTC TTG ACA GTG
FLT3 20exR	GAA ATA GCA GCC TCA CAT TGC

FLT3 AL F	CCG CCA ACG TGC TTG
FLT3 AL R	CAC AGT AAT ATT CCA TAT GAC CAG <i>A</i> TC
CKIT 8exF	ACA TAT GGC CAT TTC TGT TTT CC
CKIT 8exR	TGC CAA AAA TAA TCA TCT CAC CTC
CKIT 9exF	TTC TTC CCT TTA GAT GCT CTG C
CKIT 9exR	ATA TGG TAG ACA GAG CCT AAA CAT CC
CKIT 10-11exF	TCC ACA TTT CTC TTC CAT TG TAGA G
CKIT 10-11exR	AGC CCC TGT TTC ATA CTG ACC
CKIT 17exF	TCT CCT CCA ACC TAA TAG TGT ATT CAC
CKIT 17exR	TCA AGC AGA GAA TGG GTA CTC AC
CKIT 18exF	TGT GCT TCT ATT ACA GGC TCG AC
CKIT 18exR	TGG CAA GGA TCA TTT TAC CTA AAG
NPM1 12exF	GAA GTG TTG TGG TTC CTT AAC CAC
NPM1 12exR	CAG TTA AAT AAG TCA ATA GAA ACC GTG C
MLL 2exF	FAM – CCT TTG TTG TAG GAT GAG CAA TTC
MLL 2exR	AGA AGG CAA GAG GAA GCC AC
MLL 4exF	FAM – TAT TGT TTT TGG ATT GCC TCA TAT TC
MLL 4exR	TGA CCT TCT TGA CCT ACC ATC ATT C
MLL 6exF	FAM – TTG TTT TCC TAG GAT GAG AAA ATG TC
MLL 6exR	TTT AAC AAC ACT ACC TTT AGC TTG CTT C
MLL 22exF	FAM – GAG ATG TGA ATT CTG CCA AAA GC
MLL 22exR	CCT TTG ATC AAA TCC CGA TGT C
B2M 2exF	FAM – TAT TCC TCA GGT ACT CCA AAG ATT CAG
B2M 2exR	AAA GAA TGT AAG ACT TAC CCC ACT TAA CTA TC

В праймер *FLT3* AL R, внесена нуклеотидная замена (G на T), которая приводит к появлению сайта узнавания рестриктазой *EcoRV* (выделена жирным шрифтом и курсивом).

ПЦР из архивных образцов проводили по стандартной двухпраймерной схеме.

Последовательность праймеров представлена в табл. 5.

Реакционная смесь для генов *FLT3*, *KIT*, *NPM1* и *MLL* в конечном объеме 25 мкл содержала: 0,25 мкг ДНК, по 5 пкмоль каждого праймера, по 25 ммоль дНТФ, 1 единица активности *Taq* ДНК-полимеразы (производства «ИЗОГЕН»), ПЦР буфер (производства «ИЗОГЕН»), $MgCl_2$ в соответствии с условиями, подобранными при оптимизации ПЦР.

ПЦР проводили в автоматическом режиме, используя амплификатор Dyad. Амплификацию для генов *FLT3*, *KIT*, *NPM1* и *MLL* проводили в следующем режиме:

95°C – 5 мин

Анализ мутаций проводился методом прямого секвенирования.

Анализ мутаций в гене *FLT3* из свежеприготовленных образцов проводился по описанной ранее методике (Mills K., 2005). Последовательность праймеров для выявления тандемной дупликации гена *FLT3* (FLT/ITD) и для амплификации последовательности, кодирующей киназный домен (FLT3 AL) представлена в табл. 5.

Длина ITD определялась как разница длины ПЦР фрагмента нормального гена *FLT3* и длины мутантного ПЦР фрагмента.

В петле активации киназного домена *FLT3* определяли точечные мутации, замены остатка аспарагиновой кислоты в позиции 835 и/или остатка изолейцина в позиции 836 (D835/I836). Эти мутации приводят к потере сайта узнавания для рестриктазы EcoRV (GATATC), что позволяет различать нормальную и мутантную формы гена *FLT3*.

Очистка продуктов амплификации генов *FLT3*, *KIT*, *NPM1*. Очистку продукта амплификации проводили осаждением 96% этиловым спиртом в присутствии ацетата аммония. Качество продукта ПЦР и его концентрацию определяли методом вертикального электрофореза. После очистки 2 мкл растворенного в воде амплификата смешивали с буфером для электрофореза, содержащим бром-феноловый и ксилен-цианоловый красители, и наносили на 8%-ный полиакриламидный гель (соотношение акриламида и бис-акриламида 29:1,3). Гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,1мкг/мл) в течение 10 минут и визуализировали продукты ПЦР в ультрафиолетовом свете.

Проведение реакции секвенирования. Реакция секвенирования проводилась по протоколу фирмы – производителя Applied Biosystems с использованием набора реагентов Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing *KIT*, 3 - 25нг продукта ПЦР и 5 пкмоль праймера. Очистку продукта секвенирования проводили осаждением 96% этиловым спиртом в присутствии ЭДТА.

Электрофорез проводили на приборе Applied Biosystems 3130xl согласно протоколу фирмы – производителя RapidSeq36_POP7_1. Анализ первичных данных осуществлялся по протоколу фирмы – производителя 3130_POP7_BDv1. Определение нуклеотидной последовательности проводилось в программе Sequencing Analysis 5.2.

Фрагментный анализ гена *MLL* проводили на приборе Applied Biosystems 3130xl согласно протоколу фирмы – производителя FragmentAnalysis36_POP7_1 в присутствии GeneScan – 500 LIZ Size Standard. Для анализа результатов использовали программу Gene Mapper v.4.0. Оценка результатов проводилась по протоколу Loss of Heterozygosity Analysis фирмы – производителя.

Результаты исследования

Оптимизированы методики для выявления мутаций в генах *FLT*, *KIT*, *NPM1* и дупликаций в гене *MLL*.

Для уточнения частот встречаемости мутаций в указанных генах использовалась электронная база данных Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk).

В соответствии с этими данными были разработаны и оптимизированы полимеразные цепные реакции для амплификации последовательностей тех экзонов генов *FLT*, *KIT*, *NPM1*, в которых данным мутации у взрослых пациентов встречались не реже чем в 1% образцов (табл. 6).

Таблица 6. Экзоны генов *FLT*, *KIT*, *NPM1*, в которых мутации у взрослых пациентов встречались не реже чем в 1% образцов

№	Ген	Экзон
1.	<i>NPM1</i>	12
2.	<i>FLT3</i>	14, 15, 20
3.	<i>KIT</i>	8, 10 + 11, 17, 18

Наличие мутаций определялось методом прямого секвенирования.

По литературным данным внутренняя дупликация гена *MLL* приводит к тандемному удвоению семи экзонов (с 3 по 9) (Caligiuri M.A., 1997; Dohner K., 2005). Для выявления дупликации были подобраны условия для попарных амплификаций 2, 4, 6 и 22 экзонов. При этом один экзон из области дупликации (4 или 6) амплифицировался одновременно с одним контрольным экзonom, расположенным за пределами дупликации (2 или 22). ПЦР-реакции были оптимизированы на образцах доноров таким образом, чтобы в каждой реакции эффективность амплификации экзона из области дупликаций и контрольного экзона были одинаковы.

После ПЦР с мечеными праймерами проводился фрагментный анализ

ПЦР-продуктов.

Анализ мутаций в исследуемой и контрольной группах. В табл. 7 представлено количество проанализированных пациентов и доноров.

Таблица 7. Количество пациентов и здоровых доноров-добровольцев проанализированных по 8, 9, 10-11, 17, 18 экзонам гена *KIT*, 14, 15, 20 экзонам гена *FLT3*, 12 экзону гена *NPM1*, 2, 4, 6, 10, 22 экзонам гена *MLL*

Проанализированные экзоны	Количество пациентов	Количество здоровых доноров - добровольцев
Ген <i>KIT</i>		
8,17,11 экзоны	65	32
9,10,18 экзоны	55	32
Ген <i>FLT3</i>		
14,15 экзоны	124	32
20 экзон	84	32
Ген <i>NPM1</i>		
12 экзон	55	32
Ген <i>MLL</i>		
2, 4, 6, 10, 22 экзоны	23	32

Результаты исследования контрольной группы

При тестировании контрольной группы из 32 здоровых доноров-добровольцев у двоих человек был выявлен ранее не описанный аллель гена *KIT*: замена аденина на цитозин в положении 1621, приводящая к замене метионина на лейцин в кодоне 541 в 10 экзоне, частота 3,1 % (2 из 64 хромосом). Указанный аллель в гетерозиготном состоянии был также выявлен у 2 пациентов, частота составляет 1,8% (2 из 110 хромосом).

При тестировании контрольной группы у 19 человек была выявлена ранее не описанная делеция тимина в положении 1621 в 5' некодирующей области мРНК гена *NPM1* в гетерозиготном состоянии. Та же делеция была выявлена в гетерозиготном состоянии у 6 пациентов. Аллельная частота составляет 18,7 % (6 из 32 хромосом).

Результаты исследования пациентов с ОМЛ

В результате молекулярно-генетического исследования, мутации гена *FLT3* обнаружены у 14,5% пациентов. Из них: внутренняя тандемная дупликация обнаружена у 12,9% пациентов (15/124) и у 3,6% (3/84) – мутации в 835 кодоне последовательности, кодирующей киназный домен. В табл. 8 представлена частота встречаемости мутаций гена

FLT3 и вариант ОМЛ при котором эта мутация встречается, у исследуемой группы пациентов.

Таблица 8. Частота встречаемости мутаций гена *FLT3* у исследуемой группы пациентов при различных вариантах ОМЛ

Вариант ОМЛ.	Частота встречаемости мутаций гена <i>FLT3</i> .	FLT3/ITD	FLT3/TDK
M1	22,2% (4/18)	4/4	
M2	50% (9/18)	8/9	1/9
M3	5,5% (1/18)	1	
M4	11% (2/18)	1/2	1/2
M5	11% (2/18)	1/2	1/2

Как видно табл. 8, мутации гена *FLT3* встречаются при M2 варианте ОМЛ в 50% случаев, M1 – 22,2%, M4 – 11%, M5 – 11%, M3– 5,5%.

Клиническая характеристика 18 пациентов с мутацией гена *FLT3* представлена в табл. 9 - 10.

Таблица 9. Характеристика 18 пациентов с мутацией гена *FLT3*

	№ пациента								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Пол	м	м	м	м	м	м	ж	м	м
Возраст (годы)	13	11	13	1	5	14	8	15	14
ФАВ	M2	M2	M2	M3	M2	M5	M4	M2	M1
Цитогенетика	46XY	данных нет	46XY	46XY,t(15;17)	46XY - 13 мет.,46XY,del(9)(p13p22) -4 мет.	46XY	46XX	47,XY,+8	46XY,t(6;14)(q23-24;q32) - 27 мет.,45XY,t(6;14)(q23-24;q32),-21 - 3 мет.,43XY,t(6;14)(q23-24;q32), -14, -16, -21 2 мет.
Молекулярная биология	del(16) q23	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	нет
Мутация гена <i>FLT3</i>	ITD	ITD	ITD	ITD	ITD	ITD	D835-Y835	ITD	ITD
Бластоз в к/м	41%	40,8%	55,6%	67%	44%	86%	92%	85,5%	90%
Лейкоциты (тыс/мкл)	4	29	41	120	4,4	22,2	102	102	73,8
Бласты п/к	67%	71%	74%	92%	0	42	87%	87%	41%
Печень (см)	0	0,5	1,5-1	4	2	2,5	2	5	3
Селезёнка (см)	0	0	0,5	2	0	0	5	3	0,5
Поражение ЦНС	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС IV	ЦНС I
Терапия ОМЛ (протокол)	AML-BFM-87	AML-BFM-87	AML-BFM-93	APL-98	ОМЛ-2000	ОМЛ-2000	ОМЛ-2000	ОМЛ-2000	ОМЛ-2000
Ремиссия после индукции (да/нет)	нет	да	да	да	да	да	да	да	да
ППР	нет	11,2	8,8	3,3	13,66	9,3	62,23	9,23	14,46
Рецидив: к/м, к/м+ЦНС	рефрактерность	к/м	к/м	нет	к/м	к/м	к/м	к/м	к/м
Исход заболевания:	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива	смерть в ремисии	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива

Таблица 10. Характеристика 18 пациентов с мутацией гена *FLT3*. (продолжение табл.9)

	№ пациента								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Пол	м	м	ж	м	ж	ж	м	м	м
Возраст (годы)	1	15	9	11	17	15	11	17	4
ФАВ	M5	M1	M1	M2	M2	M4	M2	M1	M2
Цитогенетика	46,XY, t(9;11)(p22;q23) - 13 метафаз, 47,XY,t(9;11)(p22; q23),+19 - 7 метафаз.	46 XY, t(4;10)	47XX,+8	45 X,-Y,t (8;21)(q22;q 22)- 9 мет., 46 XY- 6 мет	46XX	47,XX,+8	данных нет	46 XY	46,XY, t(9;11)
Молекулярная биология	MLL/ AF9	данных нет	нет	AML1/E TO	нет	AML1/ET O	данных нет	нет	MLL/AF9
Мутация гена <i>FLT3</i>	D835- H835	ITD	ITD	ITD	D835- Y835	ITD	ITD	ITD	ITD
Бластоз в к/м	74,5%	90%	89,5%	47%	85%	62,5%	66,5%	70%	85%
Лейкоцитоз	220	34,2	325	3,1	11,3	10,6	2,6	28,1	6,3
Бласты п/к	51%	64%	94%	26%	64%	52%	4%	76%	26%
Печень (см)	9	1	4	2	2	2	1	0	2
Селезёнка (см)	4	0	4	1	1,5	0	0	0	0
Поражение ЦНС	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС IV	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I	ЦНС I
Терапия ОМЛ (протокол)	ОМЛ-200 0	ОМЛ-20 06	ОМЛ-20 06	ОМЛ-20 00	ОМЛ-20 00	ОМЛ-200 0	ОМЛ-20 06	ОМЛ-200 0	ОМЛ-200 0
Ремиссия после индукции (да/нет)	да	да	да	да	да	да	да	да	да
ППР	8,7	14,46	15	70,4	71,83	18,4	11,95	6,63	6,03
Рецидив: к/м, к.м.+ЦНС	к/м	к/м	нет	нет	нет	к/м	к/м	к/м	к/м
Исход заболевания:	Смерть от рецидива	II CCR	смерть в ремиссии	I CCR	I CCR	Смерть от рецидива	II CCR	Смерть от рецидива	Смерть от рецидива

Из таблиц 9 – 10 видно, что у детей с ОМЛ с нормальным кариотипом мутации гена *FLT3* встречаются в 33,33% случаев (6/18). Основную группу больных с мутацией гена *FLT3* составляют больные с M1 и M2 - вариантами ОМЛ – на их долю приходится 72,2% среди всех обследованных больных с данной мутацией. В результате исследования не выявлено возрастных различий у детей с ОМЛ с мутациями гена *FLT3* и без мутаций, что составляет 12,48 и 10,35 лет соответственно. У взрослых пациентов с мутацией гена *FLT3*, выше количество лейкоцитов и процент бластных клеток в крови и костном мозге. В то же время у детей с *FLT3/ITD* не обнаружено ни характерного для взрослых более высокого лейкоцитоза, ни более высокого процента бластных клеток в крови и костном мозге. Дети с ОМЛ и мутацией гена *FLT3* не имеют ни морфологических, ни генетических отличий по сравнению с детьми с ОМЛ и без мутации гена *FLT3*.

Результаты ТГСК у 8 больных с мутацией гена *FLT3*. После ТГСК рецидивировали 75% (6/8), рефрактерные 12,5% (1/8), в ремиссии 12,5% (1/8), умерли 87,5 (7/8). Несмотря на то, что количество пациентов вошедших в исследование с ТГСК и мутацией гена *FLT3* небольшое, можно сделать вывод, что включение в лечебную программу ТГСК не дает преодолеть негативное влияние мутации гена *FLT3*.

Результаты терапии всей группы пациентов с мутацией и без мутации гена *FLT3* представлены в табл. 11. На рис. 1-3 представлена вероятность бессобытийной (EFS), безрецидивной (RFS) и общей выживаемости (OS) больных.

Таблица 11. Результаты терапии в группе с мутацией и без мутации гена *FLT3*

Результаты терапии	Число больных с мутацией гена <i>FLT3</i> .	Число больных без мутации гена <i>FLT3</i> .
Число больных во всей группе	18	106
Смерть в индукции	0/18	9/106 (8,4%)
Ремиссия	17/18 (94,44%)	91/106 (86 %)
Рефрактерность	1/18 (5,5%)	4/106 (3,7%)
Потерян	0/18	2/106 (1,9%)
I ППР	2/18 (11,1%)	41/106 (38,6%)
Медиана I ППР, мес	56,2	74,5
Смерть в ремиссии	2/18 (11,11%)	11/106 (10,37%)
Рецидивы	14/18 (77,7%)	41/106 (38,6%)
EFS	0,16±0,07	0,43±0,05

RFS	0,22 ± 0,10	0,52 ± 0,05
OS	0,17±0,10	0,54± 0,05

Рисунок 1. Вероятность EFS у 106 пациентов без мутации гена *FLT3* составляет $0,43 \pm 0,05$ и у 18 пациентов с мутацией гена *FLT3* $0,16 \pm 0,07$, достоверность $p > 0,05$.

Рисунок 2. Вероятность OS у 106 пациентов без мутации гена *FLT3* составляет $0,54 \pm 0,05$ и у 18 пациентов с мутацией гена *FLT3* $0,17 \pm 0,10$, достоверность $p > 0,05$.

Рисунок 3. Вероятность RFS у 106 пациентов без мутации гена *FLT3* составляет $0,52 \pm 0,05$ и у 18 пациентов с мутацией гена *FLT3* $0,22 \pm 0,10$, достоверность $p < 0,05$.

Как видно из приведённых данных, в группе детей без мутации гена *FLT3* вероятность долгосрочной бессобытийной выживаемости была выше, чем в группе детей с мутацией гена *FLT3* ($0,43 \pm 0,05$ и $0,16 \pm 0,07$, $p = 0,07$). Более высокая вероятность долгосрочной общей выживаемости ($0,54 \pm 0,05$) наблюдалась в группе пациентов без мутаций гена *FLT3*, по сравнению с группой пациентов с мутацией гена *FLT3* ($0,17 \pm 0,10$) $p = 0,07$. Данные не являются статистически достоверными.

Частота ремиссий при современной терапии у больных с мутацией гена *FLT3* не отличалась от больных без мутации гена *FLT3*, 94,44% (17/18) и 86% (91/106) соответственно. Но продолжительность безрецидивной выживаемости у пациентов с нативной структурой гена *FLT3* была достоверно выше, чем у пациентов с мутацией гена *FLT3* ($0,52 \pm 0,05$ и $0,22 \pm 0,10$, $p = 0,03$).

Результаты химиотерапии группы пациентов с мутацией и без мутации гена *FLT3* представлены в табл. 12. На рис. 4-6 представлена вероятность бессобытийной (EFS), безрецидивной (RFS) и общей выживаемости (OS) больных.

Результаты терапии	Число больных с мутацией гена <i>FLT3</i> .	Число больных без мутации гена <i>FLT3</i> .
Число больных во всей группе	18	106
Смерть в индукции	0/18	9/106 (8,4%)
Ремиссия	17/18 (94,44%)	91/106 (86 %)
Рефрактерность	1/18 (5,5%)	4/106 (3,7%)

Потерян	0/18	2/106 (1,9%)
I ППР	2/18 (11,1%)	45/106 (42,45%)
Медиана I ППР, мес	56,2	33,36
Смерть в ремиссии	2/18 (11,11%)	7/106 (6,6%)
Рецидивы	7/18 (38,8%)	34/106 (32,07%)
EFS	0,12±0,08	0,34±0,05
RFS	0,14 ± 0,06	0,47 ± 0,06
OS	0,15± 0,13	0,85±0,03

Рисунок 4. Вероятность бессобытийной выживаемости (EFS) у 106 пациентов без мутаций и у 18 пациентов с мутацией *FLT3*, получавших только химиотерапию. EFS $0,34 \pm 0,05$ vs $0,12 \pm 0,08$, достоверность $p=0,03$.

Рисунок 5. Вероятность общей выживаемости у 106 пациентов без мутаций и у 18 пациентов с мутацией *FLT3*, получавших только химиотерапию. $0,85 \pm 0,03$ vs $0,15 \pm 0,13$, достоверность $p < 0,047$.

Рисунок 6. Вероятность безрецидивной выживаемости у 106 пациентов без мутации гена *FLT3* и у 18 пациентов с мутацией *FLT3*, получавших только химиотерапию. RFS составляет $0,47 \pm 0,06$ vs $0,14 \pm 0,12$, достоверность $p > 0,05$.

Как видно из приведённых данных, в группе детей с ОМЛ без мутации гена *FLT3*, получавших только химиотерапию, вероятность долгосрочной бессобытийной выживаемости была достоверно выше, чем в группе детей с мутацией гена *FLT3* ($0,34 \pm 0,05$ и $0,12 \pm 0,08$, $p = 0,03$). Долгосрочная общая выживаемость составила ($0,85 \pm 0,03$) в группе пациентов без мутаций гена *FLT3*, по сравнению с группой пациентов с мутацией гена *FLT3* ($0,15 \pm 0,13$) $p = 0,047$. Данные являются статистически достоверными. Продолжительность безрецидивной выживаемости у пациентов с нативной структурой гена *FLT3* была выше, чем у пациентов с мутацией гена *FLT3* ($0,47 \pm 0,06$ и $0,14 \pm 0,12$, $p = 0,07$), данные не являются статистически достоверными.

При молекулярно-генетическом исследовании 8, 9, 10, 11, 12, 17 и 18 экзонов гена *KIT* у одного пациента была выявлена инсерция 6 нуклеотидов в 9 экзоне, у другого пациента точечная замена в кодоне 546 гена *KIT* (замена аденина на гуанин в положении 1638, что не приводит к замене лизина в 546 кодоне ($p.546 \text{ Lys} > \text{Lys}$, $c.1638 \text{ A} > \text{G}$) в 10 экзоне. Очевидно, что у второго пациента выявлена нейтральная мутация в 10 экзоне, т. к. в этом случае замены аминокислоты в белковой молекуле не происходит. Данные о пациентах с выявленными мутациями гена *KIT* представлены в табл. 13.

Таблица 13. Данные о пациентах с выявленными мутациями гена *KIT*

Возраст/Ds	Цитогенетика	Мутация	Исход
5 лет ОМЛ М2	t(8;21)AML/ETO	9 экзон инсерция 6 нуклеотидов	Смерть от прогрессии заболевания.
1 мес. ОМЛ М5a	данных нет	10 экзон замена с.1638 A>G p.546 Lys>Lys	данных нет

В отношении значения инсерции в гене *KIT* выводы делать не представляется возможным, учитывая небольшое число пациентов вошедших в исследование.

Результаты терапии пациентов с полиморфизмом и без полиморфизма гена *NPM1*

представлены в табл. 14. При молекулярно-генетическом исследовании 12 экзона гена *NPM1* у пациентов не были выявлены мутации. Обнаруженная ранее у доноров делеция одного нуклеотида в 5' некодирующей части 12 экзона гена *NPM1* была выявлена в гетерозиготном состоянии у 6 пациентов. Аллельная частота составляет 18,7 % (6 из 32 хромосом).

Таблица 14. Результаты терапии в группе детей с полиморфизмом и без полиморфизма гена *NPM1*

Результаты терапии	Число больных с полиморфизмом гена <i>NPM1</i> .	Число больных без полиморфизма гена <i>NPM1</i> .
Число больных во всей группе	13	42
Смерть в индукции	0/13	2/42 (4,7%)
Ремиссия	11/13 (84,6%)	36/42 (85,7%)
Рефрактерность	1/13 (7,69%)	3/42 (7,1%)
Выбыли из исследования	1/13 (7,69%)	1/42 (2,3%)
I ППР	6/13 (46,15%)	11/42 (26,2%)
Смерть в ремиссии	1/13 (7,69%)	5/42 (11,9%)
Рецидивы	5/13 (38,4%)	22/42 (52,38%)
EFS	0,32 ± 0,06	0,39 ± 0,15
RFS	0,37 ± 0,08	0,53 ± 0,15
OS	0,48 ± 0,07	0,45 ± 0,18

На рис. 7-9 представлена вероятность бессобытийной, безрецидивной и общей выживаемости больных. Как видно из приведённых данных, в группе детей, с полиморфизмом гена *NPM1* EFS была выше, чем в группе детей, без полиморфизма гена *NPM1* (0,39±0,15 и 0,32±0,06, p=0,2). Также недостоверные различия были получены в отношении вероятности долгосрочной RFS (0,53±0,15 и 0,37±0,08 соответственно p=0,3) и долгосрочной OS (0,45±0,18 и 0,48±0,07 соответственно, p=0,4). Приведённые данные могут косвенно свидетельствовать, что полиморфизм гена *NPM1* не влияет на прогноз основного заболевания.

Рисунок 7. Вероятность EFS у 42 пациентов без полиморфизма гена *NPM1* составляет 0,32 ± 0,06 и у 13 пациентов с полиморфизмом гена *NPM1* 0,39 ± 0,15, достоверность p>0,05.

Рисунок 8. Вероятность OS у 42 пациентов без полиморфизма гена *NPM1* составляет 0,48 ± 0,07 и у 13 пациентов с полиморфизмом гена *NPM1* 0,45 ± 0,18 достоверность p>0,05 .

Рисунок 9. Вероятность RFS у 42 пациентов без полиморфизма гена *NPM1* составляет 0,37 ±

0,08 и у 13 пациентов с полиморфизмом гена *NPM1* $0,53 \pm 0,15$, достоверность $p > 0,05$.

При молекулярно-генетическом исследовании гена *MLL* в исследуемой группе пациентов тандемные мутации обнаружены не были.

Результаты исследования в зависимости от использованного материала. В табл. 15 представлен материал, который использовался в данном исследовании (архивный материал высушенные на воздухе мазки к.м. пациентов, замороженные без криопротекторов образцы к.м. и венозной крови пациентов, а так же свежеприготовленный материал к.м. пациентов) и какие изменения из этого материала удалось выявить при молекулярно – генетическом исследовании в изучаемых генах (подробно описано выше).

Таблица 15. Результаты исследования в зависимости от использованного материала

Материал	Ген <i>FLT3</i>	Ген <i>c-KIT</i>	Ген <i>NPM1</i>	Ген <i>MLL</i>
Архивный материал (высушенные на воздухе мазки к.м. пациентов).	0/41	0/41	9,7% (4/41) Аллельный полиморфизм	0/9
Архивный материал (замороженные без криопротекторов образцы к.м. и венозной крови пациентов).	3/14 (21,4%) ITD	2/14 (14,2%) мутации в 9,10 экзонах	64,2% (9/14) Аллельный полиморфизм	0/14
Свежеприготовленный материал к.м. пациентов.	12/69 (17,3%) ITD 3/27 (11%) D385	не использовался	не использовался	не использовался

В связи с ограниченностью материала в мазках для молекулярно – генетического исследования желательно использовать свежеприготовленный материал к.м. пациентов, либо замороженные без криопротекторов образцы к.м. и венозной крови пациентов.

На основании данного исследования можно говорить о необходимости скрининга пациентов для выявления мутаций в гене *FLT3* при ОМЛ у детей. Это вызвано, с одной стороны, крайне неблагоприятным прогностическим значением этих мутаций, с другой стороны, наличием препаратов, ингибирующих функцию FLT3 тирозинкиназы (сорафениб), которые могут быть использованы в составе комбинированной терапии. В отношении значения мутаций в гене *KIT* выводы делать не представляется возможным, учитывая небольшое число пациентов. Тем не менее, данные, полученные у взрослых пациентов, говорят о необходимости продолжения исследований. Мутации гена *NPM1* являются благоприятным прогностическим маркером, исключение составляют только случаи совместного присутствия FLT3/ITD и *NPM1* мутаций.

Выводы:

1. Проведен анализ молекулярных изменений в генах *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *MLL* у взрослых доноров-добровольцев и пациентов с различными вариантами ОМЛ. Обнаружены следующие мутации:
 - 1.1. внутренние tandemные дупликации гена *FLT3* в 12,9% (15/124) и мутации в области, кодирующей киназный домен *FLT3*, в 3,5% (3/84).
 - 1.2. инсерция шести нуклеотидов в гене *KIT* выявлена у одного пациента.
 - 1.3. в генах *NPM1* и *MLL* мутации выявлены не были.
 - 1.4. при анализе контрольной группы были выявлены ранее не описанные аллельные полиморфизмы в гене *KIT* (замена аденина на гуанин в 10 экзоне) и *NPM1* (делеция одного нуклеотида в 5' некодирующей части 12 экзона), такие же аллели были обнаружены и у пациентов.
2. У пациентов с мутацией гена *FLT3*, включение в лечебную программу ТГСК не дает преодолеть негативное влияние мутации гена *FLT3*.
 - 2.1. Наличие мутаций гена *FLT3* у детей с ОМЛ ассоциировано со статистически значимым снижением безрецидивной выживаемости по сравнению с пациентами без мутаций: $0,22 \pm 0,10$ против $0,52 \pm 0,05$, $p=0,03$.
 - 2.2. Полиморфизм гена *NPM1* на прогноз основного заболевания не повлиял.
3. ОМЛ с мутацией гена *FLT3* у детей не имеют ни гематологических, ни клинических отличий от ОМЛ без мутаций гена *FLT3*.
4. Частота молекулярных изменений из свежеприготовленных образцов составила 21,9% (15/69), замороженных без криопротекторов образцов к.м. и венозной крови - 92,8% (13/14), а из архивных препаратов к/м на предметных стеклах частота молекулярных изменений составила 9,7% (4/14).

Практические рекомендации

1. Всем пациентам с первичным ОМЛ необходимо проводить скрининг на наличие активирующих мутаций гена *FLT3*, учитывая неблагоприятное влияние на долгосрочную бессобытийную, общую и безрецидивную выживаемость по сравнению с пациентами без мутаций гена *FLT3*.
2. Больным ОМЛ, с нормальным кариотипом, с наличием мутации гена *FLT3*, учитывая низкую эффективность стандартной химиотерапии, необходимо рассмотреть вопрос об альтернативных методах терапии.

3. Больным с первичным ОМЛ, для поиска мутаций в генах *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *MLL*, рекомендуется использовать свежесобранные образцы к.м., венозной крови (при наличии лейкоэмических клеток в периферической крови более 40%), либо замороженные (при температуре – 20°C) без криопротекторов образцы к.м. и венозной крови пациентов.

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Гук Л. В. Анализ мутаций в гене *KIT* у детей с острым миелобластным лейкозом (тезисы). Онкогематология 2008; 4: 43.
2. Гук Л. В. Анализ мутаций в гене *FLT3* у детей с острым миелобластным лейкозом (тезисы). Онкогематология 2008; 4: 43 – 44.
3. Гук Л.В., Савицкая Т.В., Домнинский Д.А., Бобрынина В.О., Шнейдер М.М., Масчан А.А., Алейникова О.В. Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов *FLT3*, *KIT* и *NPM1* у детей с острым миелобластным лейкозом. Онкогематология 2009; 4: 27-32.

Список сокращений

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
к/м	Костный мозг
МДГКБ	Морозовская Детская Городская Клиническая Больница
ОМЛ	Острый миелобластный лейкоз
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНПЦ ДОГ	Республиканский Научно-Практический Центр Детской Онкологии и Гематологии
ФГУ ФНКЦ ДГОИ	Федеральный Научно-Клинический Центр Детской Гематологии, Онкологии и Иммунологии
ЦНС	Центральная нервная система
AML1/ETO	аномальный транскрипт при t(8;21)
CBF/MYH11	аномальный транскрипт при inv(16) или t(16;16)(p12;q23)
СЕВРА (С/ЕВР α)	ген кодирует фактор транскрипции (ССААТ/участок ДНК связывающий белок α)
EFS	бессобытийная выживаемость
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
inv	инверсия
ITD	внутренняя тандемная дупликация
KIT	v- <i>KIT</i> feline sarcoma viral oncogene homolog
MLL	myeloid/lymphoid = mixed lineage leukemia
NPM1	нуклеофосмин
OS	общая выживаемость
PTD	частичная тандемная дупликация

RFS	безрецидивной выживаемости
t	транслокация