

## МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

## MYELOID TUMORS

### Молекулярная диагностика мутаций гена *FLT3* у пациентов с острыми миелоидными лейкозами

### Molecular Diagnosis of *FLT3* Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients

Е.К. Зайкова<sup>1,2</sup>, Е.В. Белоцерковская<sup>1,2</sup>, Д.В. Зайцев<sup>1</sup>,  
А.В. Петухов<sup>1,2</sup>, О.А. Федорова<sup>2</sup>, Д.В. Моторин<sup>1</sup>,  
В.В. Иванов<sup>1</sup>, А.Ю. Зарицкий<sup>1</sup>, Л.Л. Гиршова<sup>1</sup>

EK Zaikova<sup>1,2</sup>, EV Belotserkovskaya<sup>1,2</sup>, DV Zaytsev<sup>1</sup>,  
AV Petukhov<sup>1,2</sup>, OA Fedorova<sup>2</sup>, DV Motorin<sup>1</sup>, VV Ivanov<sup>1</sup>,  
AYu Zaritskey<sup>1</sup>, LL Girshova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

<sup>1</sup> VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

<sup>2</sup> Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

#### РЕФЕРАТ

#### ABSTRACT

**Актуальность.** Ген *FLT3* является важным прогностическим молекулярным маркером при острых миелоидных лейкозах (ОМЛ). Однако выявление мутаций *FLT3* вызывает определенные трудности.

**Background.** *FLT3* gene is an important prognostic molecular marker in acute myeloid leukemia (AML). However, the detection of *FLT3* mutations presents a challenge.

**Цель.** Сравнительный анализ методик, используемых для выявления мутации *FLT3*. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей быстро и надежно определять мутационный статус *FLT3*.

**Aim.** To compare techniques used for the detection of *FLT3* mutations, and to develop a test-system based on polymerase chain reaction (PCR) for quick and reliable determination of *FLT3* mutation status.

**Материалы и методы.** В исследовании использовали образцы костного мозга, полученные от пациентов с ОМЛ. Для определения мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD выполняли ПЦР с последующей визуализацией с помощью электрофореза в агарозном геле. Результаты верифицировали методом секвенирования по Сэнгеру. Данные, полученные при использовании разработанной нами тест-системы, сравнивали с широко применяемым коммерческим набором *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection компании Invivoscribe.

**Materials & Methods.** Bone marrow samples obtained from AML patients were subjected to examination. To detect *FLT3*-ITD and *FLT3*-TKD mutations PCR was performed with subsequent agarose gel electrophoresis visualization. The results were verified by Sanger sequencing. The data obtained using our test-system were compared with widely applied commercial kit '*FLT3* Mutation Assay for Gel Detection' by Invivoscribe.

**Результаты.** Разработан ПЦР-тест для определения мутационного статуса гена *FLT3*. Данный метод был апробирован на 22 образцах костного мозга от пациентов с ОМЛ. Мутация *FLT3*-ITD обнаружена у 4 пациентов, в то время как *FLT3*-TKD — у 3. У 1 больного одновременно присутствовали обе мутации. Результаты полностью согласовались с данными молекулярно-генетического анализа гена *FLT3*, выполненного с помощью коммерческого набора *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection. Анализ данных, полученных методом секвенирования по Сэнгеру, позволил валидировать выбранную методику.

**Results.** To determine the *FLT3* mutation status a PCR test was developed. This technique was validated on 22 bone marrow samples obtained from AML patients. *FLT3*-ITD mutation was detected in 4 patients, 3 patients showed *FLT3*-TKD mutation. In 1 patient both mutations were identified. These results fully corresponded to the molecular genetic analysis of *FLT3*, performed by '*FLT3* Mutation Assay for Gel Detection'. The chosen technique was validated using Sanger sequencing data analysis.

**Заключение.** В статье приведен обзор всех существующих методик скрининга мутаций *FLT3*, а также описан опыт собственной разработки ПЦР-теста для выявления мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD. Выбранный метод представляется доступным по стоимости и более простым в исполнении по сравнению с другими. Настоящее исследование носит прикладной характер и может служить руководством как для врачей, так и научных сотрудников.

**Conclusion.** The article offers the review of all existing *FLT3* mutation screening techniques and describes the experience of developing the PCR test for *FLT3*-ITD and *FLT3*-TKD mutation detection. The chosen technique is affordable and easy to use compared with the others. This study can be used as a guide for both doctors and researchers.

**Ключевые слова:** острые миелоидные лейкозы, мутации FLT3-ITD и FLT3-TKD.

**Keywords:** acute myeloid leukemia, FLT3-ITD and FLT3-TKD mutations.

**Получено:** 10 января 2020 г.

**Принято в печать:** 27 марта 2020 г.

**Received:** January 10, 2020

**Accepted:** March 27, 2020

*Для переписки:* Екатерина Васильевна Белоцерковская, канд. биол. наук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

*For correspondence:* Ekaterina Vasil'evna Belotserkovskaya, PhD in Biology, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

*Для цитирования:* Зайкова Е.К., Белоцерковская Е.В., Зайцев Д.В. и др. Молекулярная диагностика мутаций гена FLT3 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами. Клиническая онкогематология. 2020;13(2):150–60.

*For citation:* Zaikova EK, Belotserkovskaya EV, Zaytsev DV, et al. Molecular Diagnosis of FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients. Clinical oncohematology. 2020;13(2):150–60 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-150-160

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-150-160

## ВВЕДЕНИЕ

Ген *FLT3* кодирует FMS-подобную тирозинкиназу 3-го типа. Белок FLT3 состоит из пяти иммуноглобулино-подобных доменов, трансмембранного, юкстамембранного, двух тирозинкиназных доменов, а также вставочной области киназного домена [1]. 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 [2]. 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/AKT [3].

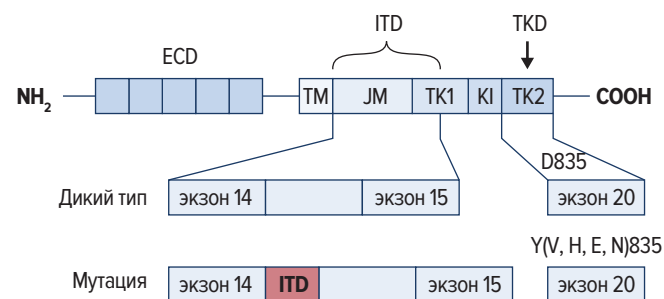
При острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) выделяют два наиболее важных типа мутаций: FLT3-ITD и FLT3-TKD. В литературе также описаны случаи делеций и делеций/инсерций в юкстамембранном домене, но такие мутации являются достаточно редкими и плохо описанными до настоящего времени [4, 5]. Мутация FLT3-ITD (Internal Tandem Duplication — внутреннее тандемное удвоение) — одна из наиболее часто встречающихся у больных ОМЛ с нормальным кариотипом. Около  $\frac{1}{3}$  взрослых пациентов с ОМЛ являются носителями данной мутации [6, 7]. Большинство тандемных дупликаций возникает в пределах экзонов 14 и 15 гена *FLT3*, соответствующих юкстамембранному домену белка (рис. 1). Длина вставок варьирует от 3 до 1236 пар нуклеотидов (п. н.) [8]. Пациенты с данной мутацией характеризуются повышенным риском рецидивов и более короткой средней продолжительностью жизни [9].

Второй тип мутаций — FLT3-TKD (Tyrosine Kinase Domain) — представляет собой точечные мутации в тирозинкинажном домене, в частности D885, I836, G881, R834 (см. рис. 1) [2]. Среди них наиболее часто встречается мутация D835, обнаруживаемая с частотой около 10 % [6, 10]. Данные о прогностическом вкладе мутации FLT3-TKD противоречивы [11]. Однако,

несмотря на это, важность выявления этой мутации актуальна в связи с тем, что она вовлечена в механизм резистентности к ингибиторам тирозинкиназ [12].

Следует отметить, что у 1–2 % пациентов с ОМЛ мутации FLT3-ITD и FLT3-TKD обнаруживаются одновременно. Согласно литературным данным, эти пациенты могут быть резистентными к ингибиторам тирозинкиназ и некоторым цитостатикам [13].

Анализ мутационного статуса гена *FLT3* наряду с цитогенетическим статусом используется для оценки прогностического риска, подбора таргетных препаратов. Согласно рекомендациям NCCN (Национальная всеобщая онкологическая сеть США) и ELN (Европейская сеть по изучению лейкозов), генетическое тестирование *FLT3* должно проводиться на этапе постановки диагноза [14, 15]. Кроме того, ELN рекомендует наряду со скринингом FLT3-ITD диагностировать аллельную нагрузку FLT3-ITD (соотношение мутантного и нормального аллелей), а также тестирование точечной мутации в тирозинкинажном домене D835. В настоящее время для определения мутационного статуса *FLT3* адаптирован широкий спектр методов молекулярно-генетического анализа.



**Рис. 1.** Схема локализации мутаций в юкстамембранном и тирозинкинажном 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.

**Fig. 1.** Localization of mutations in juxtamembrane and tyrosine kinase domains of *FLT3* gene

ECD — extracellular domain; ITD — internal tandem duplication; JM — juxtamembrane domain; KI — kinase insertion domain; TKD (TK) — tyrosine kinase domain; TM — transmembrane domain.

### Методы определения мутационного статуса гена *FLT3*

Первый метод идентификации мутаций *FLT3*-ITD включал полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с последующим определением продукта амплификации в агарозном геле, а также секвенирование области гена *FLT3*, несущей мутацию *FLT3*-ITD [1, 16].

В настоящее время для выявления мутации *FLT3* рекомендуется метод фрагментного анализа или метод флуоресцентно меченной ПЦР. Он включает проведение стандартной ПЦР, последующую амплификацию полученного ПЦР-продукта с использованием флуоресцентно меченных праймеров. Полученные флуоресцентно меченные ПЦР-продукты разделяют методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе. Данный метод позволяет не только установить точный размер вставки ITD, но и оценить аллельную нагрузку [6, 17].

В литературе описана модификация флуоресцентно меченной ПЦР под названием «Tandem Duplication» ПЦР, или амплификация тандемной дупликации. Этот метод представляет собой модифицированную гнездовую ПЦР с использованием трех пар праймеров, за счет которых достигается высокая чувствительность и специфичность реакции [18, 19].

Известен также еще один вариант фрагментного анализа гена *FLT3*, при котором используется два набора флуоресцентно меченных праймеров для одновременного выявления мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD [20]. Однако данная разновидность фрагментного анализа не получила широкого распространения.

Кроме того, для определения мутаций в гене *FLT3* разработаны тесты на основе количественной ПЦР в режиме реального времени [21, 22]. Благодаря более высокой чувствительности количественной ПЦР по сравнению со стандартной, требующей идентификации продуктов амплификации в агарозном геле, тесты на основе количественной ПЦР могут быть использованы для мониторинга прогрессирования заболевания. Важно отметить, что эти ПЦР-системы были разработаны с использованием праймеров, специфичных для конкретных пациентов [21, 22]. Эта особенность лишает указанные методы универсальности и возможности стандартизации. Вероятно, данная группа методов может успешно применяться в научных целях.

Методы на основе ПЦР широко используются для определения мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD, их отличает быстрота получения ответа и достаточно высокая чувствительность. Однако данные методы направлены строго на обнаружение известных мутаций и не пригодны для скрининга редких и ранее не описанных мутаций в гене *FLT3*. Для этой цели используются более чувствительные и дорогостоящие методы, такие как высокопродуктивное секвенирование нового поколения (NGS), позволяющее анализировать несколько молекулярных маркеров одновременно. Для анализа *FLT3* описан опыт применения как полногеномного, так и полноэкзомного NGS [23]. Кроме того, эта группа методов позволяет оценить одновременно несколько показателей: сайт вставки, длину вставки, мутацию в тирозинкиназном домене. Несмотря на огромный потенциал NGS, в настоящее

время данный метод не подходит для широкого применения в клинической практике в силу высокой стоимости, длительности получения ответа [24], необходимости обученного и квалифицированного персонала для анализа получаемых данных.

Одним из важных достоинств NGS является его высокая чувствительность, составляющая около 1–10 % [25, 26]. Имеются данные о том, что метод позволяет изучать мультиклональность, т. е. наличие нескольких клонов, содержащих различные вставки *FLT3*-ITD. Это позволяет проследить изменение мутационного статуса *FLT3*, которое зачастую может происходить от момента установления диагноза до наступления рецидива [27].

К настоящему времени на основе метода NGS разработаны специальные панели генов, предназначенные для анализа наиболее значимых молекулярно-генетических маркеров миелоидных опухолей. Эти панели включают определение мутации *FLT3*-ITD наряду с мутациями *NPM1*, *CEBPA*, *TP53*, *ASXL1* и др. Одним из преимуществ таких генных панелей является возможность обнаруживать редкие мутации в гене *FLT3* [23].

Несмотря на огромный потенциал NGS, важно упомянуть об ограничении этого метода в отношении определения повторяющихся последовательностей, обусловленном алгоритмами обработки данных. Известно, что различные алгоритмы, предназначенные для обработки данных NGS, обеспечивают достоверные результаты в отношении однонуклеотидных замен. Однако в случае вставок среднего размера (15–300 п. н.) возможность алгоритмов для обработки данных NGS точно выявлять такие мутации, как *FLT3*-ITD, изучена недостаточно. При этом следует отметить, что в нескольких публикациях авторы указывают на успешное применение некоторых алгоритмов обработки данных NGS для определения мутаций *FLT3*-ITD [28, 29].

Большое разнообразие методик скрининга *FLT3*-мутаций ставит вопрос об их сильных и слабых сторонах. Сравнительная характеристика методов представлена в табл. 1.

Важно отметить, что общей проблемой диагностики мутаций *FLT3* является необходимость унификации применяемых методик в международной практике. Так, в настоящее время в разных странах мира используют разные подходы при анализе мутаций *FLT3*. В США и многих других странах применяют ПЦР-тест и электрофорез в агарозном геле вместо рекомендованного метода фрагментного анализа [32]. При этом около 60 % образцов анализируют по протоколам, разработанным в каждой конкретной лаборатории.

Кроме того, недостаточно данных о диагностической точности доступных методов установления *FLT3*-мутаций. С этой целью проведено исследование европейских ученых в рамках международного клинического исследования CALGB 10603/RATIFY [32]. Результаты данной работы продемонстрировали высокую сопоставимость (> 95 %) качественной оценки, однако полученные показатели аллельной нагрузки отличались значительной вариабельностью [32].

В отношении методов определения мутационного статуса гена *FLT3*, применяемых в Российской

Таблица 1. Сравнительная характеристика различных методов определения мутаций гена FLT3

| Метод скрининга                                     | Применимость для анализа ITD | Применимость для анализа TKD | Чувствительность* | Срок проведения теста, дни | Определение аллельной нагрузки | Прочие характеристики метода   | Источник     |
|---|------------------------------|------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------|--|--------------|
| ПЦР и гель-электрофорез                             | +                            | +                            | 10 %              | 1–2                        | Нет                            | Широкая доступность, низкая стоимость, простота в исполнении.<br>Проблемы при идентификации вставок малого размера, вероятность ложноположительных результатов.<br>Не позволяет определить нуклеотидную последовательность мутаций, точные длину и место вставки   | [1, 16]      |
| ПЦР и капиллярный электрофорез (фрагментный анализ) | +                            | +                            | 5 %               | 1–2                        | Да                             | Определение точной длины вставки.<br>Не позволяет определить нуклеотидную последовательность мутаций, место вставки.<br>Диагностирование разных вставок ITD при клональной гетерогенности.<br>Мониторинг МОБ.<br>Выявление строго известных мутаций  | [6, 17, 20]  |
| ПЦР в реальном времени, технология TaqMan           | +                            | +                            | 1–5 %             | 1–2                        | Нет                            | Метод требует подбора праймеров для каждого конкретного пациента.<br>Мониторинг МОБ.<br>Не позволяет определить нуклеотидную последовательность мутаций, точные длину и место вставки  | [21, 22, 30] |
| Секвенирование по Сэнгеру                           | +                            | +                            | 20 %              | 1–2                        | Нет                            | Использование метода для верификации мутационного статуса FLT3, установленного с помощью ПЦР, фрагментного анализа.<br>Дороговизна, трудоемкость, необходимость экспертной оценки при анализе результатов  | [1, 16, 30]  |
| Высокопродуктивное секвенирование нового поколения  | +                            | +                            | 1–10 %            | 2–7                        | Да                             | Самый дорогостоящий метод, необходимость экспертной оценки при анализе результатов.<br>Точное определение длины и места вставки, ее нуклеотидной последовательности.<br>Проблемы при идентификации длинных вставок.<br>Определение полного спектра мутаций, в т. ч. возможность выявления ранее не описанных мутаций гена FLT3.<br>Диагностика разных вставок ITD при клональной гетерогенности.<br>Мониторинг МОБ | [25–27, 31]  |

МОБ — минимальная остаточная болезнь; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

\* Чувствительность метода определяется как наименьшее количество мутантных аллелей ITD, обнаруживаемое данным методом, по отношению к общему числу аллелей в исследуемом материале, выраженное в процентах [23].

Федерации, анализ литературных источников свидетельствует об отсутствии унифицированных протоколов. Следует отметить, что разные научные группы используют различный клинический материал (красный костный мозг, периферическая венозная кровь), тип нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), олигонуклеотиды и соответствующие им условия реакции ПЦР, методы визуализации ПЦР-продукта (электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле) [33–36].

В настоящее время для выявления мутаций FLT3-ITD и FLT3-TKD на рынке представлена панель наборов компании Invivoscribe (США), включающая как тесты с определением ПЦР-продуктов в агарозном геле, так и наборы для проведения фрагментного анализа (<https://invivoscribe.com>).

Кроме того, известна разработка набора TRUPCR® FLT3 Mutation Detection Kit индийской компании 3B BlackBio Biotech India Ltd, позволяющего выявлять мутации FLT3-ITD и FLT3-TKD посредством традиционной ПЦР и ПЦР в реальном времени.

Human Leukemia FLT3-TKD Mutation Real Time RT-PCR Kit — набор для скрининга мутации FLT3-TKD в лейкоцитах посредством ПЦР в реальном времени, разработанный компанией MyBiosource, Inc (США).

Наборы для выявления мутаций FLT3-ITD и FLT3-TKD компании Invivoscribe получили наиболее широкое распространение и к настоящему времени не имеют аналогов по используемым методикам.

Данная публикация посвящена обзору современных методов молекулярной диагностики мутаций гена *FLT3* с детальным описанием собственного опыта разработки ПЦР-системы, позволяющей успешно оценивать мутационный статус *FLT3*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материал для исследования

Молекулярно-генетическое исследование гена *FLT3* проводилось на 22 клинических образцах замороженного красного костного мозга, полученных от пациентов с ОМЛ. Все пациенты дали письменное информированное согласие во время прохождения лечения в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ на забор биообразцов и выполнение молекулярно-генетических исследований. Верификация диагноза ОМЛ проводилась с использованием морфологических, цитофлуориметрических, цитогенетических и молекулярно-биологических методов исследования, согласно критериям ВОЗ 2016 г.

### Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК из клинических образцов красного костного мозга проводили с помощью

коммерческого набора ExtractDNA Blood («Евроген», Россия), согласно протоколу производителя. Качество и количество выделенной ДНК оценивали на приборе NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

### Определение мутации FLT3-ITD

Для выявления мутации FLT3-ITD проводили ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров (табл. 2), подобранных с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Данные праймеры комплементарны области экзона 14 и 15 гена *FLT3*.

Аmplификацию проводили на приборе T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с использованием коммерческой смеси реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). В ПЦР-смесь добавляли по 0,4 мкмоль каждого из праймеров и 50–100 нг геномной ДНК. Режим амплификации включал предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 3 мин; затем 31 цикл, состоящий из денатурации (95 °С, 30 с), отжига (64,5 °С, 20 с), элонгации (72 °С, 40 с); заключительную элонгацию при температуре 72 °С в течение 5 мин.

Полученные продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле в 1х буфере ТАЕ. Для визуализации использовали этидия бромид в концентрации 1 мкг/мл.

### Определение мутации FLT3-TKD

Определение точечной мутации D835 в тирозинкиназном домене гена *FLT3* осуществляли методом ПЦР с праймерами, подобранными на участок гена *FLT3*, включающий экзон 20 (табл. 3).

Состав реакционной смеси был сходным с использованным при выявлении мутации FLT3-ITD (см. выше). Режим амплификации включал предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 3 мин; затем 36 циклов, состоящих из денатурации (95 °С, 30 с), отжига (68 °С, 20 с), элонгации (72 °С, 2 мин); заключительную элонгацию при температуре 72 °С в течение 5 мин.

Продукты амплификации обрабатывали рестриктазой EcoRV (GATATC) (Thermo Scientific, США), согласно рекомендациям производителя. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. Контролем рестрикции служил образец ДНК от здорового донора. Полученные продукты рестрикции визуализировали с помощью электрофореза в 2%-м агарозном геле в 1х буфере ТАЕ.

### Определение мутаций в гене *FLT3* коммерческим набором

Набор *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection компании Invivoscribe включает две ПЦР-смеси, одна из которых предназначена для выявления мутации

**Таблица 2.** Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные для определения мутации FLT3-ITD

| Праймер | Олигонуклеотидная последовательность |
|---------|--------------------------------------|
| Forward | 5'-TTGGTGTTTGTCTCCTCTTCATTGTCGT-3'   |
| Reverse | 5'-AAAAGAGAAGAAGGCATGGGTGGGA-3'      |

**Таблица 3.** Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованные для определения мутации FLT3-TKD

| Праймер | Олигонуклеотидная последовательность   |
|---------|--|
| Forward | 5'-GTGCAGGTAGATGGCACTGAAAAAAGTGGGTA-3' |
| Reverse | 5'-AGACTCGGGGCTCAGACTATTCTGTTCAGT-3'   |

FLT3-ITD, другая — для FLT3-TKD. В случае обнаружения мутации FLT3-ITD полученные продукты амплификации разделяли методом электрофореза ДНК в 2%-м агарозном геле в 1x буфере TAE.

Для определения точечных мутаций в кодоне D835 тирозинкиназного домена ПЦР-продукты обрабатывали рестриктазой EcoRV (Thermo Scientific, США) по протоколу, описанному выше, с последующей идентификацией в 2%-м агарозном геле.

#### Идентификация мутации FLT3-ITD методом секвенирования по Сэнгеру

Для подтверждения мутационного статуса FLT3-ITD проводили секвенирование экзонов 14 и 15 по Сэнгеру с помощью праймеров, использованных для ПЦР (см. табл. 2). Секвенирование осуществляли на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500XL (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов BigDye™ Terminator v3.1. Данные секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения SnapGene, версия 4.3 (<https://www.snapgene.com>), баз данных NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org>). В качестве референсной последовательности гена FLT3 использовали NG\_007066.1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

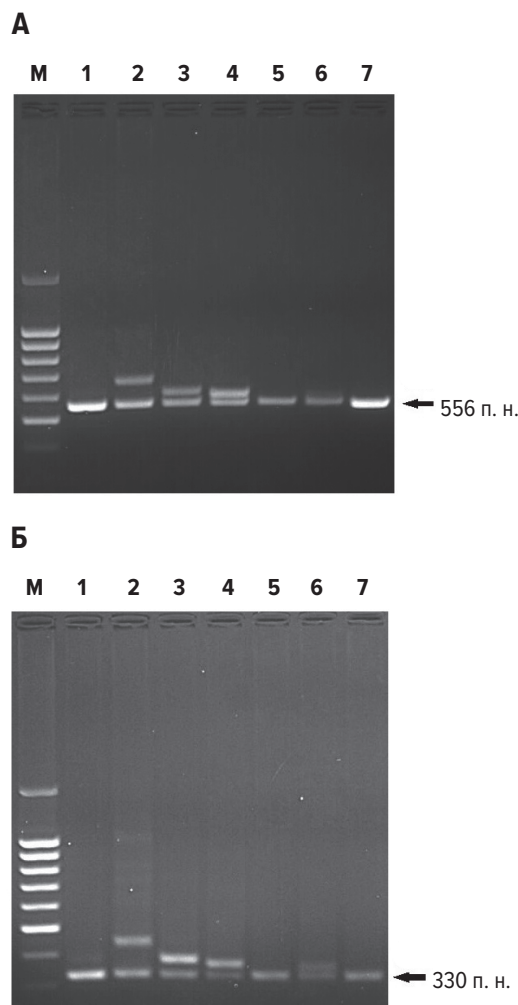
Для выявления мутации FLT3-ITD методом ПЦР мы подобрали собственные праймеры, поскольку использование олигонуклеотидов, опубликованных в литературе [37, 38], не позволяло добиться отсутствия неспецифических продуктов амплификации. С помощью разработанного нами ПЦР-тест можно установить наличие вставки ITD по размеру ПЦР-продукта: в случае аллеля дикого типа длина фрагмента соответствовала 556 п. н., при наличии мутации размер ПЦР-продукта превышал данное значение. Таким образом, если пациент гетерозиготен по мутации FLT3-ITD, то на электрофореграмме наблюдались две полосы, одна из которых соответствовала аллелю дикого типа (556 п. н.), а вторая, на более высоком уровне, — мутантному аллелю (рис. 2, А).

Разработанная нами ПЦР-система была апробирована на 22 клинических образцах от пациентов с ОМЛ. При этом мутация ITD выявлена в 4 (18,18 %) образцах.

С целью проверить результаты анализа мутационного статуса гена FLT3, полученные при использовании разработанных нами ПЦР-тестов, проведено исследование мутаций FLT3-ITD и FLT3-TKD с помощью коммерческого набора FLT3 Mutation Assay for Gel Detection. В случае FLT3-ITD длина аллеля дикого типа составляла 330 п. н., тогда как при наличии дупликации размер ампликонов превышал 330 п. н. (рис. 2, Б).

По результатам проведенного анализа дупликация ITD была обнаружена также в 4 образцах.

Следует отметить, что ограничением выбранной нами методики для обнаружения мутаций FLT3-ITD является малый размер дупликации (< 18 п. н.), что,



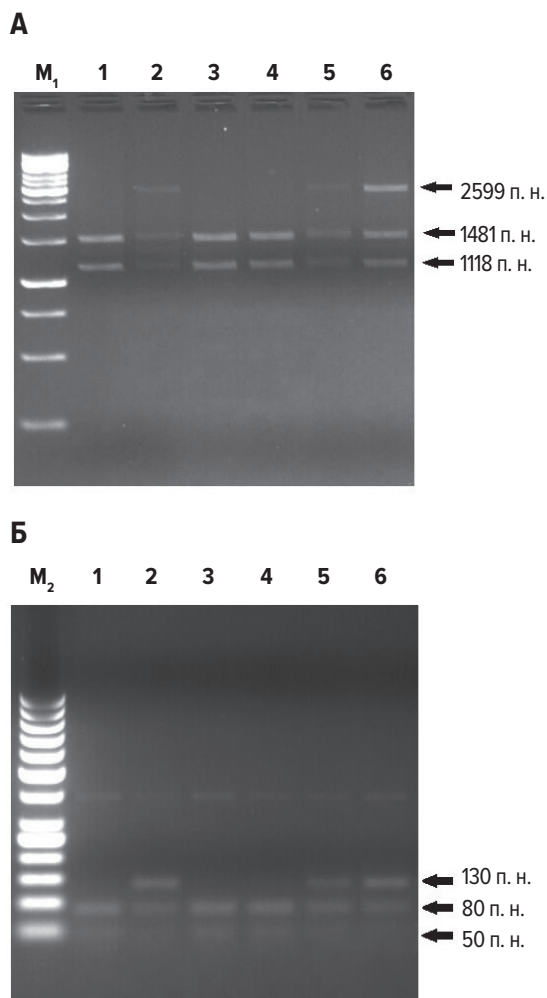
**Рис. 2.** Электрофореграмма продуктов амплификации при выявлении мутации FLT3-ITD с использованием (А) разработанной ПЦР-системы и (Б) набора FLT3 Mutation Assay for Gel Detection. М — маркер молекулярной массы 100 bp+ («Евроген», Россия); дорожки 1, 5, 7 — образцы без мутации FLT3-ITD; дорожки 2, 3, 4, 6 — образцы с мутацией FLT3-ITD.

**Fig. 2.** Electrophoregram of amplification products in FLT3-ITD mutation detection using (A) the developed PCR system and (B) 'FLT3 Mutation Assay for Gel Detection'.

М — 100 bp+ molecular weight marker (Evrogen, Russia); lanes 1, 5, 7 — samples without FLT3-ITD mutation; lanes 2, 3, 4, 6 — samples with FLT3-ITD mutation.

согласно литературным источникам, составляет менее 2,1 % всего разнообразия длины дупликаций [8].

Идентификация однонуклеотидной замены в кодоне D835 тирозинкиназного домена (FLT3-TKD) проводилась в два этапа, включавших постановку ПЦР с последующей рестриктазной обработкой полученных ПЦР-продуктов. Выявление мутантных аллелей FLT3-TKD основано на том, что при мутации в кодоне D835 происходит утрата сайта узнавания эндонуклеазы EcoRV. В случае отсутствия мутации (аллель дикого типа) на геле визуализировались две полосы размером 1118 и 1481 п. н. (рис. 3, А, дорожки 1, 3, 4). Аллелю мутантного типа соответствовала одна полоса размером 2599 п. н. В силу гетерозиготной природы мутации FLT3-TKD в образцах с мутацией наблюдалось три полосы, соответствующие аллелю мутантного типа (2599 п. н.)



**Рис. 3.** Электрофореграмма продуктов рестрикции при выявлении мутации FLT3-TKD с использованием (А) разработанной ПЦР-системы и (Б) набора *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection. M<sub>1</sub> — маркер молекулярной массы 1 kb (GeneRuler); M<sub>2</sub> — маркер молекулярной массы 50 bp (GeneRuler); дорожки 1, 3, 4 — образцы без мутации FLT3-TKD; дорожки 2, 5, 6 — образцы с мутацией FLT3-TKD.

**Fig. 3.** Electrophoregram of restriction products in FLT3-TKD mutation detection using (A) the developed PCR system and (B) '*FLT3* Mutation Assay for Gel Detection'

M<sub>1</sub> — 1 kb molecular weight marker (GeneRuler); M<sub>2</sub> — 50 bp molecular weight marker (GeneRuler); lanes 1, 3, 4 — samples without FLT3-TKD mutation; lanes 2, 5, 6 — samples with FLT3-TKD mutation.

и аллелям дикого типа (1118 и 1481 п. н.) (рис. 3, А, дорожки 2, 5, 6).

С помощью описанного выше метода мутация FLT3-TKD была обнаружена у 3 (13,64 %) пациентов, при этом один из пациентов одновременно был носителем дупликации FLT3-ITD.

При выявлении мутации в тирозинкиназном домене FLT3-TKD с помощью набора *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection обработка эндонуклеазой приводила в случае аллеля дикого типа к появлению дополнительного фрагмента длиной 80 п. н., тогда как при аллеле с мутацией визуализировался фрагмент длиной 130 п. н. (рис. 3, Б).

Использование коммерческого набора позволило обнаружить мутацию FLT3-TKD в 3 образцах. Таким образом, результаты молекулярно-генетического анализа гена *FLT3*, проведенного с помощью коммер-

ческого набора *FLT3* Mutation Assay for Gel Detection, оказались полностью сопоставимыми с данными, полученными при использовании ПЦР-системы, разработанной нами.

В отношении выявления мутации FLT3-TKD разработанный нами ПЦР-тест позволяет получить четко определяемые продукты рестрикции, тогда как коммерческий набор — продукты рестрикции малого размера, плохо визуализируемые в агарозном геле.

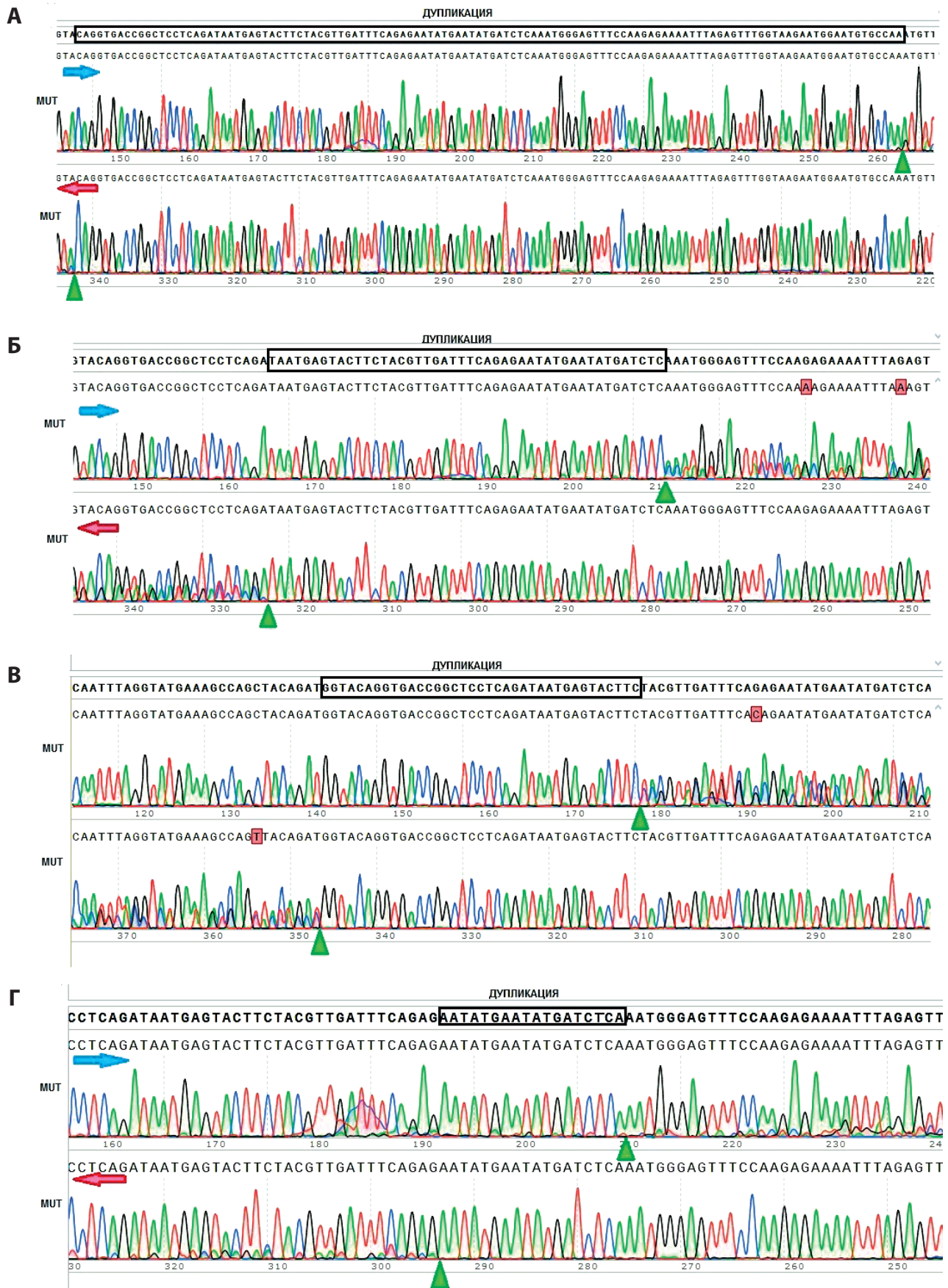
Для валидации результатов исследования мутации FLT3-ITD, полученных с помощью нашей ПЦР-системы, мы использовали метод прямого секвенирования по Сэнгеру. Данные секвенирования свидетельствовали о наличии мутации FLT3-ITD в образцах № 2, 3, 4 и 6 (рис. 4). При этом размер вставки варьировал от 18 до 119 п. н. Таким образом, результаты секвенирования по Сэнгеру полностью согласовывались с данными нашей ПЦР-системы.

Выбранный нами метод имеет ряд преимуществ по сравнению с зарубежным коммерческим набором, а именно его финансовая доступность (в 25 раз экономичнее коммерческого набора), а также отсутствие необходимости в сложной и длительной процедуре закупки и транспортировки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Важное прогностическое значение мутаций в гене *FLT3*, наряду с высокой распространенностью этих мутаций среди пациентов с ОМЛ, указывает на необходимость определения мутационного статуса гена *FLT3* при диагностировании ОМЛ, что согласуется с рекомендациями ELN и NCCN [14, 15]. Скрининг мутаций в гене *FLT3* позволяет своевременно выявлять пациентов с ОМЛ, которым показана терапия ингибиторами тирозинкиназ (мидостаурин, Novartis) [39], а также в значительной степени влияет на определение показаний к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [40], проведению CAR T-клеточной терапии.

В настоящее время рекомендованным методом определения мутации FLT3-ITD является ПЦР с последующим проведением капиллярного электрофореза или фрагментный анализ, позволяющий не только обнаруживать дупликацию ITD, но и оценивать ее аллельную нагрузку [14]. Однако наиболее популярным подходом к тестированию *FLT3* для большинства лабораторий мира по-прежнему остается метод ПЦР с идентификацией в агарозном или полиакриламидном геле. Этот метод считается самым доступным и простым в выполнении из всех существующих, не требует больших временных затрат, наличия сложного и дорогостоящего оборудования, что делает возможным его применение во всех регионах нашей страны. Основным ограничением метода ПЦР при выявлении мутации FLT3-ITD является относительно невысокая его чувствительность вследствие гетерозиготности мутации. Тщательное внимание к каждому этапу анализа позволит максимально повысить чувствительность ПЦР при обнаружении вставки ITD.



**Рис. 4.** Хроматограммы секвенирования области вставки FLT3-ITD в образцах № 2 (А), 3 (Б), 4 (В) и 6 (Г). Представлены прямая и обратная последовательности, обозначенные синей и красной стрелками соответственно. Зеленые треугольники указывают начальную точку вставки. Рамкой сверху выделена нуклеотидная последовательность дупликации ITD  
MUT — последовательность образцов с мутацией FLT3-ITD.

**Fig. 4.** Chromatograms of the FLT3-ITD insertion site sequencing in samples No. 2 (A), No. 3 (B), No. 4 (B), and No. 6 (Г). Forward and reverse sequences are marked with blue and red arrows, respectively. Green triangles indicate the starting point of the insertion. Nucleotide sequence of ITD duplication is boxed  
MUT — sequence of samples with FLT3-ITD mutation.



1. *Подготовка материала для исследования.* Для успешного выявления мутаций *FLT3* необходимо использовать биологический материал, содержащий максимальное число клеток с мутацией. Как правило, для тестирования используется геномная ДНК, выделенная из периферической венозной крови или костного мозга. Чем больше клеток с мутацией по отношению к клеткам, не содержащим мутации, тем больше вероятность обнаружения мутации методом ПЦР. В этой связи анализ материала костного мозга предпочтительнее по сравнению с клетками крови [41], при этом наилучшие результаты будут достигнуты при использовании свежеприготовленных образцов костного мозга. Результаты нашего исследования подтверждают возможность использования замороженного материала костного мозга для выделения ДНК, качество и количество которой достаточны для успешного проведения последующего ПЦР-теста.
2. *Адекватный режим амплификации.* Поскольку аллели дикого типа *FLT3* короче мутантных, они получают преимущество при амплификации в ходе ПЦР. В литературе данное явление носит название «смещение» ПЦР. Таким образом, чем больше длина вставки, тем больше «смещение» ПЦР [41]. Решение такой проблемы заключается в удлинении стадии элонгации. Еще одной сложностью в амплификации *FLT3* является накопление неспецифических продуктов реакции. При разработке нашей ПЦР-системы данная проблема была решена за счет увеличения длины подобранных нами праймеров, а также использования повышенной температуры отжига.
3. *Этап визуализации полученных продуктов амплификации также вносит вклад в разрешающую способность скрининга.* В ряде публикаций при скрининге *FLT3-ITD* в качестве метода определения продукта амплификации используется полиакриламидный гель [33, 34]. Проведение вертикального электрофореза в полиакриламидном геле — более дорогостоящая, длительная и трудоемкая процедура по сравнению с электрофоретическим разделением ДНК в агарозном геле. Как правило, полиакриламидный гель используют для визуализации ПЦР-продукта при необходимости повысить разрешающую способность метода. В случае методики, предлагаемой нами, полученные ПЦР-продукты успешно определяются с применением агарозного геля. При этом следует отметить, что процентная концентрация агарозы в геле имеет важное значение. Так, при определении мутации *FLT3-ITD* стоит отдавать предпочтение 2–3%-м гелям в силу обеспечения наилучшего разрешения и разделения молекул с низкой молекулярной массой. Благодаря такому подходу можно максимально избежать ложноотрицательных результатов

в случае, когда размер дупликации составляет несколько нуклеотидов. Если же при вставке малого размера описанный выше подход не позволяет сделать однозначный вывод о наличии дупликации, то возможным решением проблемы может стать проведение электрофоретического разделения ПЦР-продукта в полиакриламидном геле либо тестирование вставки *ITD* альтернативным методом, таким как секвенирование по Сэнгеру. Так, в проводимом нами исследовании в случае образца № 6 на электрофореграмме наблюдалась едва визуализируемая дополнительная полоса, соответствующая вставке *ITD* (см. рис. 2, А, дорожка 6). При этом данные электрофореграммы не позволяли сделать достоверный вывод о наличии вставки. Результаты секвенирования подтвердили предполагаемую вставку *ITD*, размер которой составлял 18 п. н. (см. рис. 4, Г).

В настоящее время наиболее популярным методом выявления однонуклеотидной замены в тирозинкиназном домене остается проведение ПЦР-теста с последующей рестриктазной обработкой продуктов амплификации. Данная методика более трудоемкая по сравнению с описанным выше анализом вставки *ITD*, поскольку включает дополнительную процедуру рестрикции. Однако следует отметить, что постановка рестрикции не вызывает сложности, а анализ результатов данной реакции прост в интерпретации.

В качестве недостатка методов выявления мутации *FLT3-TKD*, описанных в литературе, следует отметить небольшой размер продуктов амплификации (около 300 п. н.), что затрудняет визуализацию ДНК в агарозном геле после проведения рестрикции и зачастую требует электрофоретического разделения продуктов рестрикции в полиакриламидном геле. В этой связи для увеличения разрешающей способности метода мы выбрали олигонуклеотидные праймеры, позволяющие получить ПЦР-продукты большой длины (2599 п. н.).

Таким образом, разработанная нами ПЦР тест-система для молекулярно-генетического анализа гена *FLT3* позволяет обнаруживать мутации *FLT3-ITD* и *FLT3-TKD*, что подтверждается результатами, полученными при использовании коммерческого набора, а также данными секвенирования. Основным достоинством предлагаемого нами метода является его доступность и возможность проведения теста в любой молекулярно-генетической лаборатории нашей страны.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на востребованность скрининга мутации *FLT3-ITD* методом ПЦР, в международной и российской практике до сих пор отсутствуют стандартизованные протоколы проведения данной процедуры. Предлагаемый нами метод ПЦР позволяет надежно устанавливать мутации *FLT3* и может стать основой для разработки диагностической тест-системы.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке компании «Новартис», гранта РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00049 и гранта РНФ № 18-75-10076.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** Л.Л. Гиршова, А.Ю. Зарицкий.

**Сбор и обработка данных:** Е.К. Зайкова, А.В. Петухов, Е.В. Белоцерковская.

**Предоставление материалов исследования:** Л.Л. Гиршова, В.В. Иванов.

**Анализ и интерпретация данных:** Е.В. Белоцерковская, Е.К. Зайкова, О.А. Федорова.

**Подготовка рукописи:** Е.К. Зайкова, Е.В. Белоцерковская, Д.В. Зайцев.

**Окончательное одобрение рукописи:** Д.В. Моторин, А.Ю. Зарицкий, Л.Л. Гиршова.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kiyoi H, Naoe T, Yokota S, et al. Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 1997;11(9):1447–52. doi: 10.1038/sj.leu.2400756.
- Блау О.В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах. Клиническая онкогематология. 2016;9(3):245–56. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-245-256.  
[Blau OV. Genetic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2016;9(3):245–56. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-245-256. (In Russ)]
- Gu T, Nardone J, Wang Y, et al. Survey of Activated FLT3 Signaling in Leukemia. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e19169. doi: 10.1371/journal.pone.0019169.
- Deeb KK, Smonskey MT, Defedericis H-C, et al. Deletion and deletion/insertion mutations in the juxtamembrane domain of the FLT-3 gene in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. 2014;3(2):86–9. doi: 10.1016/j.lrr.2013.09.003.
- Sandhofer N, Bauer J, Reiter K, et al. The new and recurrent FLT3 juxtamembrane deletion mutation shows a dominant negative effect on the wild-type FLT3 receptor. *Sci Rep*. 2016;6(1):28032. doi: 10.1038/srep28032.
- Thiede C, Studel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326–35. doi: 10.1182/blood.v99.12.4326.
- Metzeler K, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686–98. doi: 10.1182/blood-2016-01-693879.
- Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, et al. 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. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(10):910–24. doi: 10.1002/gcc.21975.
- Kottaridis P, Gale R, Frew M, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98(6):1752–9. doi: 10.1182/blood.v98.6.1752.
- Moreno I, Martin G, Bolufer P, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2003;88(1):19–24.
- Bacher U, Haferlach C, Kern W, et al. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood*. 2008;111(5):2527–37. doi: 10.1182/blood-2007-05-091215.
- Moore AS, Faisal A, Gonzalez de Castro D, et al. Selective FLT3 inhibition of FLT3-ITD+ acute myeloid leukaemia resulting in secondary D835Y mutation: a

model for emerging clinical resistance patterns. *Leukemia*. 2012;26(7):1462–70. doi: 10.1038/leu.2012.52.

13. Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R, et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood*. 2005;105(9):3679–85. doi: 10.1182/blood-2004-06-2459.

14. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.

15. O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(7):926–57. doi: 10.6004/jnccn.2017.0116.

16. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996;10(12):1911–8.

17. Kim Y, Lee GD, Park J, et al. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J*. 2015;5(8):e336. doi: 10.1038/bcj.2015.61.

18. Lin PH, Lin CC, Yang HI, et al. Prognostic impact of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with internal tandem duplication of FLT3. *Leuk Res*. 2013;37(3):287–92. doi: 10.1016/j.leukres.2012.10.005.

19. Grunwald MR, Tseng LH, Lin MT, et al. Improved FLT3 internal tandem duplication PCR assay predicts outcome after allogeneic transplant for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(12):1989–95. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.08.015.

20. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay. *J Mol Diagn*. 2003;5(2):96–102. doi: 10.1016/s1525-1578(10)60458-8.

21. Stirewalt DL, Willman CL, Radich JP. Quantitative, real-time polymerase chain reactions for FLT3 internal tandem duplications are highly sensitive and specific. *Leuk Res*. 2001;25(12):1085–8. doi: 10.1016/s0145-2126(01)00087-x.

22. Beretta C, Gaipa G, Rossi V, et al. Development of a quantitative-PCR method for specific FLT3/ITD monitoring in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004;18(8):1441–4. doi: 10.1038/sj.leu.2403409.

23. Dayer N, Schlenk RF, Russell NH, et al. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia*. 2019;33(2):299–312. doi: 10.1038/s41375-018-0357-9.

24. Patnaik MM. The importance of FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018;59(10):2273–86. doi: 10.1080/10428194.2017.1399312.

25. Kamps R, Brandao RD, Bosch BJ, et al. Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *Int J Mol Sci*. 2017;18(2):308. doi: 10.3390/ijms18020308.

26. Chin EL, da Silva C, Hegde M. Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genet*. 2013;14(1):6. doi: 10.1186/1471-2156-14-6.

27. Bibault JE, Figeac M, Helevaut N, et al. Next-generation sequencing of FLT3 internal tandem duplications for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(26):22812–21. doi: 10.18632/oncotarget.4333.

28. Spencer DH, Abel HJ, Lockwood CM, et al. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication in Targeted, Short-Read-Length, Next-Generation Sequencing Data. *J Mol Diagn*. 2013;15(1):81–93. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.08.001.

29. Au CH, Wa A, Ho DN, et al. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms. *Diagn Pathol*. 2016;11(1):11. doi: 10.1186/s13000-016-0456-8.

30. Abdelhamid E, Preudhomme C, Helevaut N, et al. Minimal residual disease monitoring based on FLT3 internal tandem duplication in adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2012;36(3):316–23. doi: 10.1016/j.leukres.2011.11.002.

31. Schranz K, Hubmann M, Harin E, et al. Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(53):30128–45. doi: 10.18632/oncotarget.25729.

32. Thiede C, Prior T, Lavorgna S, et al. FLT3 mutation Assay Laboratory Cross Validation: Results from the CALGB 10603/Ratify Trial in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2018;132(Suppl\_1):2800. doi: 10.1182/blood-2018-99-112127.

33. Сабурова И.Ю., Горбунова А.В., Слободнюк К.Ю. и др. Выявление внутренних tandemных дупликаций и мутации D835Y в гене FLT3 у пациентов с острым миелобластным лейкозом. Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. 2010;XVII(3):48–51.

[Saburova IYu, Gorbunova AV, Slobodnyuk KYu, et al. Detection of FLT3 internal tandem duplications and D835Y mutation in patients with acute myeloid leukemia. *Uchenye zapiski Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta imeni akademika I.P. Pavlova*. 2010;XVII(3):48–51. (In Russ)]

34. Петрова Е.В., Мартынкевич И.С., Полушкина Л.Б. и др. Клинические, гематологические и молекулярно-генетические особенности острых миелобластных лейкозов с мутациями в генах FLT3, СК1Т, NRAS и NPM1. Гематология и трансфузиология. 2016;61(2):72–80. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-72-80.

[Petrova EV, Martynkevich IS, Polushkina LB, et al. Clinical, hematological and molecular-genetic features of acute myeloid leukemia with mutations in

FLT3, KIT, NRAS and NPM1. Russian journal of hematology and transfusiology. 2016;61(2):72–80. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-72-80. (In Russ)]

**35.** Гук Л.В., Савицкая Т.В., Домнинский Д.А. и др. Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов FLT3, с-KIT и NPM1 у детей с острым миелобластным лейкозом. Онкогематология. 2009;4(4):27–32.

[Guk LV, Savitskaya TV, Domninskii DA, et al. Analysis of incidence and prognostic value of FLT3, c-KIT and NPM1 genes mutations in children with acute myeloid leukemia. Onkogematologiya. 2009;4(4):27–32. (In Russ)]

**36.** Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 при острых миелоидных лейкозах. Российский онкологический журнал. 2013;4:34–5.

[Vinogradov AV. Development of the technique for CDKN2A/ARF, FLT3, KIT, NPM1, NRAS, TET2, TP53, WT1 genes mutation detection in acute myeloid leukemia. Rossiiskii onkologicheskii zhurnal. 2013;4:34–5. (In Russ)]

**37.** Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood. 1999;93(9):3074–80.

**38.** Gari M, Abuzenadah A, Chaudhary A, et al. Detection of FLT3 oncogene mutations in acute myeloid leukemia using conformation sensitive gel electrophoresis. Int J Mol Sci. 2008;9(11):2194–204. doi: 10.3390/ijms9112194.

**39.** Sly N, Gaspar K. Midostaurin for the management of FLT3-mutated acute myeloid leukemia and advanced systemic mastocytosis. Am J Health-Syst Pharm. 2019;76(5):268–74. doi: 10.1093/ajhp/zxy050.

**40.** Bazarbachi AH, Hamed RA, Malard F, et al. Allogeneic transplant for FLT3-ITD mutated AML: a focus on FLT3 inhibitors before, during, and after transplant. Ther Adv Hematol. 2019;10:1–14. doi: 10.1177/2040620719882666.

**41.** Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2013;2013:220–6. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.220.

