

Частота и спектр инсерций в 12-м экзоне гена *NPM1* у пациентов с *de novo* острым миелоидным лейкозом, проживающих в крупном сибирском мегаполисе

Е.Н. Воропаева^{1,2}, М.В. Бурундукова³, И.А. Кузнецова², И.Н. Нечунаева³,
Е.В. Воронцова⁴, В.Н. Максимов^{1,2}, Т.И. Поспелова¹

¹ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, г. Новосибирск, Красный пр., 52

² НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

³ Городская клиническая больница № 2
630051, г. Новосибирск, ул. Ползунова, 21

⁴ Государственная Новосибирская областная клиническая больница
630087, г. Новосибирск, ул. Немiroвича-Данченко, 130

Резюме

В ходе лейкозогенеза наблюдается последовательное накопление драйверных aberrаций, приводящих к развитию острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Поскольку мутации в гене *NPM1* при отсутствии сопутствующей мутации FLT3-ITD имеют положительную прогностическую ценность и могут служить самостоятельными мишенями для оценки минимальной остаточной болезни при данном заболевании, требуется их быстрая и точная идентификация у лиц с впервые выявленным ОМЛ. В настоящее время в литературе имеются результаты нескольких отечественных исследований мутационного спектра *NPM1* на взрослой когорте пациентов, имеющих «узкую» географию. Цель данной работы – изучить частоту и спектр вставок в 12-м экзоне гена *NPM1* в выборке пациентов с *de novo* острым миелоидным лейкозом, проживающих в крупном сибирском мегаполисе. **Материал и методы.** Группу исследования составили 128 первичных больных ОМЛ г. Новосибирска. Для скрининга применялся метод ПЦР с фланкирующими праймерами, для установления последовательности и места вставки – прямое секвенирование по Сенгеру методом капиллярного электрофореза. **Результаты и их обсуждение.** Частота мутаций в 12-м экзоне гена *NPM1* в группе исследования составила 14,8 %, 84,4 % находок представлены вставками типа А, в одном случае (5,2 %) выявлена вставка типа В. Идентифицированы две новые ранее не описанные инсерции, с.863_864insTGCT и с.868_869insAAGC. Первая из них по своему функциональному эффекту аналогична изменениям, наблюдающимся при классических вставках типа А и В: приводит к удлинению кодируемого белка, сдвигу рамки считывания, утрате мотива сигнала ядрышковой локализации с формированием типичного мотива сигнала экспорта нуклеофосмина из ядра. Отличительной особенностью инсерции с.868_869insAAGC являлось частичное сохранение сигнала ядрышковой локализации благодаря присутствию триптофана в 288-м положении. **Заключение.** С применением разработанного набора праймеров можно проводить скрининг мутаций в 12-экзоне *NPM1* у пациентов с ОМЛ в течение одного рабочего дня, а также их дальнейшую точную идентификацию методом прямого секвенирования в течение первого индукционного цикла лечения.

Ключевые слова: острый миелобластный лейкоз, ген *NPM1*, мутации, ПЦР, секвенирование.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена за счет средств Государственного задания № 1024022700390-6.3.2.6;3.2.21, по бюджетной теме № FWNR-2024-0004.

Автор для переписки. Воропаева Е.Н., e-mail: vena.81@mail.ru

Для цитирования. Воропаева Е.Н., Бурундукова М.В., Кузнецова И.А., Нечунаева И.Н., Воронцова Е.В., Максимов В.Н., Поспелова Т.И. Частота и спектр инсерций в 12-м экзоне гена *NPM1* у пациентов с *de novo* острым миелоидным лейкозом, проживающих в крупном сибирском мегаполисе. *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(4):171–180. doi: 10.18699/SSMJ20250418

Frequency and spectrum of insertions in the *NPM1* gene exon 12 in patients with *de novo* acute myeloid leukemia living in a large Siberian metropolis

E.N. Voropaeva^{1,2}, M.V. Burundukova³, I.A. Kuznetsova², I.N. Nechunaeva³,
E.V. Vorontsova⁴, V.N. Maksimov^{1,2}, T.I. Pospelova¹

¹ Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52

² Research Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Borisa Bogatkova st., 175/1

³ City Clinical Hospital №2
630051, Novosibirsk, Polzunova st., 21

⁴ State Novosibirsk Regional Clinical Hospital
630087, Novosibirsk, Nemirovicha-Danchenko st., 130

Abstract

During leukemogenesis, there is a consistent accumulation of driver aberrations leading to the development of acute myeloid leukemia (AML). Since mutations in the *NPM1* gene in the absence of a concomitant *FLT3*-ITD mutation have favorable prognostic value and can serve as independent targets for assessing minimal residual disorder in this disease, their rapid and accurate identification in patients with newly diagnosed AML is required. Currently, the literature contains the results of several domestic studies of the mutation spectrum of *NPM1* in an adult cohort of patients with a “narrow” geography. The aim of the work was to study the frequency and spectrum of insertions in the 12th exon of the *NPM1* gene in a sample of patients with *de novo* acute myeloid leukemia living in a large Siberian metropolis. **Material and methods.** The study group consisted of 128 primary patients with AML in Novosibirsk. The PCR method with flanking primers was used for screening, and direct Sanger sequencing by capillary electrophoresis was used to establish the sequence and insertion site. **Results and discussion.** The frequency of mutations in the 12th exon of the *NPM1* gene in the study group was 14.8 %, 84.4 % of the findings were inserts of type A, in one case (5.2 %) an insert of type B. Two new insertions previously undescribed were identified, c.863_864insTGCT and c.868_869insAAGC. The first of them is similar in its functional effect to the changes observed with classical inserts of type A and B: it leads to an elongation of the encoded protein, a shift in the reading frame, and the loss of the nucleolar localization signal motif with the formation of a typical nucleophosmin export signal motif from the nucleus. A distinctive feature of c.868_869insAAGC insertion was the partial preservation of the nucleolar localization signal due to the presence of tryptophan in the 288th position. **Conclusions.** Using the developed set of primers, it is possible to screen mutations in *NPM1* exon 12 in patients with AML within one working day, as well as their further accurate identification by direct sequencing during the first induction treatment cycle.

Key words: acute myeloblastic leukemia, *NPM1* gene, mutations, PCR, sequencing.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out at the expense of the State Budget Task No 1024022700390-6-3.2.6;3.2.21, No FWNR-2024-0004.

Correspondence author. Voropaeva E.N., e-mail: vena.81@mail.ru

Citation. Voropaeva E.N., Burundukova M.V., Kuznetsova I.A., Nechunaeva I.N., Vorontsova E.V., Maksimov V.N., Pospelova T.I. Frequency and spectrum of insertions in the *NPM1* gene exon 12 in patients with *de novo* acute myeloid leukemia living in a large Siberian metropolis. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(4):171–180. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20250418

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) по своим молекулярно-генетическим и клиническим характеристикам является крайне гетерогенным заболеванием. После публикации третьего пересмотра классификации ВОЗ в 2001 г. признание

получил тот факт, что не только перестройки или числовые аномалии хромосом, но и генные мутации участвуют в развитии лейкозного процесса. Понимание высокой значимости генных мутаций в лейкозогенезе проложило путь к генетической характеристике многих случаев ОМЛ без цитогенетических нарушений [1]. В дальнейшем укре-

пилося понимание, что целый ряд генетических аномалий связан с клиническими, морфологическими и/или фенотипическими особенностями ОМЛ. Многие молекулярно-генетические нарушения в опухолевых клетках оказались мощными прогностическими маркерами и важными мишенями таргетного лечения [1]. Так, в классификации ВОЗ 2008 г. категория «ОМЛ с рецидивирующими генетическими аномалиями» стала охватывать уже около 60 % случаев заболевания. Начиная с данного же пересмотра классификации в качестве отдельного варианта лейкозов были выделены случаи заболевания с мутациями в гене *NPM1* [2].

Ген *NPM1* человека картирован на хромосоме 5q35, содержит 12 экзонов и в результате альтернативного сплайсинга кодирует три изоформы нуклеофосмина NPM, две из которых представлены в клетках в незначительных количествах [3]. Наиболее распространенная изоформа представляет собой белок из 294 аминокислот массой около 37 кДа (рис. 1). Он имеет консервативный N-концевой домен, регулирующий олигомеризацию и шаперонную активность NPM по отношению к нуклеиновым кислотам, гистонам и другим белкам. Средняя часть нуклеофосмина содержит два кислотных участка, которые имеют решающее значение для связывания гистонов; сегмент между кислотными участками проявляет рибонуклеазную активность. С-концевой домен имеет области, которые участвуют в связывании нуклеиновых кислот и обеспечивают активность рибонуклеазы [3]. Нуклеофосмин, таким образом, участвует в биогенезе рибосом, синтезе и созревании РНК, remodelировании хроматина, а также поддержании стабильности генома за счет регуляции репарации ДНК и апоптоза [4].

В средней части нуклеофосмина и на границе с С-концевым доменом расположены мотивы сигнала ядерной локализации (nuclear localisation signal, NLS). Далее следует короткий ароматический участок – мотив сигнала ядрышковой локализации (nucleolus-localizing signal, NoLS), включающий триптофаны в положениях 288 и 290. Все они имеют решающее значение для переноса

NPM из цитоплазмы в ядро, где далее нуклеофосмин транслоцируется в ядрышко. Также в белке NPM в N-концевом домене идентифицированы высококонсервативные мотивы сигнала экспорта из ядра (nuclear export signal, NES), в аминокислотах 94–102 и 42–61, с лейцином 42 и 44 положены в качестве критических остатков для ядерного экспорта. Однако, несмотря на это, в физиологических условиях ядерный импорт данного белка значительно преобладает над экспортом, и NPM остается локализованным в ядрышках [3].

Мутации в *NPM1* являются наиболее распространенными генетическими изменениями при ОМЛ. У взрослых они выявляются в каждом четвертом–третьем случае заболевания, по разным оценкам достигая частоты до 50–85 % случаев лейкоза с нормальным кариотипом [2]. На сегодняшний день идентифицировано более 50 типов мутаций в гене *NPM1*, практически все они представляют собой инсерции различной протяженности и группируются в 12-м экзоне. Несмотря на молекулярную гетерогенность, данные мутации вызывают однотипные изменения на С-конце мутантного белка, а именно потерю триптофана в положениях 288 и/или 290, приводящую к нарушению мотива NoLS и формированию нового (дополнительного) мотива сигнала экспорта из ядра (new nuclear export signal, nNES) [3]. В результате этого кодируемый геном белок aberrантно накапливается в цитоплазме лейкозных клеток, утрачивая возможность выполнять канонические функции в ядре [5, 6]. Редкие мутации *NPM1* описаны в экзонах 5, 9 и 11. Они также вызывают аномальную цитоплазматическую локализацию нуклеофосмина [7].

Инсерция типа А (дупликация нуклеотидов TCTG в 288 триплет) в гене *NPM1* выявляется в 75–80 % случаев, тогда как следующие по частоте инсерции типа В (вставка CATG) и D (вставка CCTG) – в 10 и 5 % случаев соответственно. Другие типы мутаций у взрослых встречаются очень редко в отличие от пациентов с ОМЛ детского возраста [8]. При этом мутированный статус *NPM1* у детей встречается гораздо реже (около 8 %), практически никогда не обнаруживается

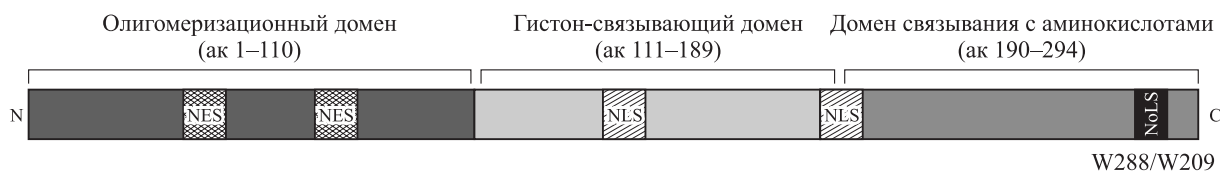


Рис. 1. Доменное строение нуклеофосмина

Fig. 1. Domain structure of nucleophosmin

у детей младше трех лет и по разным оценкам всего в 11–50 % случаев представлен инсерцией типа А [6].

Предложено несколько методов выявления мутаций в 12-м экзоне гена *NPM1*, включая качественные и количественные молекулярно-генетические подходы от ПЦР с фланкирующими праймерами [9], аллель-специфичной ПЦР [8] и анализа кривых плавления высокого разрешения [10] до прямого секвенирования по Сенгеру [11], фрагментного анализа [12, 13], высокопроизводительного секвенирования [11, 14], а также такие, как иммуногистохимическое окрашивание, вестерн-блоттинг и проточная цитометрия [15–17]. Все они, скорее, дополняют друг с друга, чем конкурируют; каждый имеет свои преимущества и недостатки [11–13, 18]. Выбор метода для выявления мутаций *NPM1* при постановке диагноза может основываться на опыте и финансовых возможностях, доступности оборудования, применении трепанобиопсии при диагностике ОМЛ в том или ином лечебном учреждении и т.д. [3].

Основным препятствием для повсеместного применения большинства высокотехнологичных методик, позволяющих точно идентифицировать мутации при ОМЛ, является недостаточная оснащенность диагностических лабораторий специализированным оборудованием и реактивной базой для проведения подобных исследований, а также их дороговизна и длительность ожидания результата. Так, ОМЛ считается неотложной клинической ситуацией: генетическое тестирование, определение прогноза заболевания и начало терапии следует начинать как можно в более короткие сроки. Длительная отсрочка индукционной химиотерапии в ожидании получения результатов молекулярно-генетического тестирования значительно ухудшает исход заболевания [19]. Кроме того, не все представленные методы позволяют проводить точную идентификацию типа мутации для дальнейшего использования ее в качестве мишеней для оценки минимальной остаточной болезни (МОБ) [20].

В ходе литературного поиска найдено несколько отечественных исследований мутационного спектра *NPM1* на взрослой когорте пациентов [21–26], имеющих «узкую» географию. Публикации описывают частоту и спектр мутаций в гене *NPM1* при ОМЛ у пациентов европейской части нашей страны. Цель исследования – изучить частоту и спектр вставок в 12-м экзоне гена *NPM1* в выборке пациентов с *de novo* острым миелоидным лейкозом, проживающих в крупном сибирском мегаполисе.

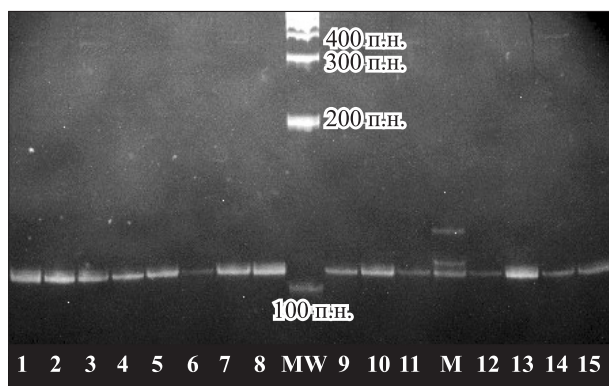
Материал и методы

Группу исследования составили 128 первичных больных ОМЛ Городского гематологического центра и Областной клинической больницы г. Новосибирска. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 150 от 16.02.2023). Все пациенты, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

Экстракция ДНК из клеток костного мозга пациентов выполнялась коммерчески доступным набором для выделения ДНК из биоматериала на магнитных частицах (Biolabmix, Россия). Специфические последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции мутаций p.W288Cfs*12 в гене *NPM1* подбирали с помощью программы Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, США): 5'-tttttccagggtattcaag-3' – прямой праймер; 5'-ctgttacagaaatgaaataagacgg-3' – обратный праймер (синтезированы ООО «Биосинтез», г. Новосибирск). В ходе подбора добивались максимального уменьшения длины амплифицируемого продукта с целью улучшения визуализации при электрофорезе разницы в длине нормальной и мутантной аллели и при этом сохранения возможности проведения прямого секвенирования.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20, 1 мкл тотальной ДНК, по 0,5 мкМ каждого праймера, 1,25 mM MgCl₂, 0,5 mM каждого из dNTP, 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы («Синтол», г. Москва). Амплификацию проводили на термоциклере «Терцик» (ЗАО НПФ «ДНК-Технология», г. Москва). Параметры ПЦР были следующими: денатурация 30 с при 95 °C; отжиг 20 с при 52 °C; синтез 15 с при 72 °C, всего 35 циклов.

Результаты ПЦР подвергали электрофорезу в камере НПФ БИОКЛОН (г. Москва) при постоянном напряжении 50 В в 8%-м полиакриламидном геле с окрашиванием бромистым этидием в течение трех минут. Разделенные фрагменты ДНК визуализировали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с помощью системы геледокументирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Сохранение и обработка изображений электрофоретических гелей проводились с помощью программы Quantity One (Bio-Rad). Размер амплифицированного в ходе ПЦР фрагмента гена *NPM1* составил в случае наличия мутации 111 п.н. и более в зависимости от длины инсерции, в случае нормы (отсутствие мутации) – 107 п.н. (рис. 2). Для точной верификации вставки ампликоны,



полученные в результате ПЦР, после очистки от солей остаточных праймеров и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов подвергали прямому секвенированию по Сенгеру с использованием обратного праймера и набора BigDye® Terminator v1.3 (Applied Biosystems, США) методом капиллярного электрофореза на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Анализ результатов секвенирования и выравнивание фрагментов осуществляли с применением программы Chromas (Technelysium Pty Ltd., Австралия).

Результаты

В обследованной нами группе больных ОМЛ в ходе скрининга методом ПЦР с фланкирующими праймерами мутации в гене *NPM1* выявлены в 19 из 128 (14,8 %) случаев. Все они в дальнейшем были подтверждены и точно идентифицированы методом прямого секвенирования. Вставки типа А (p.W288Cfs*12, c.860_863dup) имели место у 16 человек, типа В (p.W288Cfs*12, c.863_864insCATG) – у одного человека. Два пациента имели мутации, представленные новыми, ранее не описанными в литературе и в базе данных The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) [27] вставками: p.W288Cfs*12 c.863_864insTGCT и p.W290Kfs*10 c.868_869insAAGC (таблица, рис. 3).

Дальнейший анализ показал, что в результате трансляции кодирующей последовательности гена *NPM1* с новой мутацией p.W288Cfs*12 c.863_864insTGCT будет синтезироваться белок, имеющий на С-конце аминокислоты LCAAVEEYSL. Сочетание аминокислот лейцин-***-валин-**-валин-*-лейцин является типичным мотивом сигнала экспорта нуклеофосмина из ядра. Аналогичные изменения, приводящие к сдвигу рамки считывания и утрате триптофана в 288 и 290 положениях, наблюдаются при классических вставках типа А и В. Отличительной особенностью второй выявленной нами новой инсерции типа p.W290Kfs*10 c.868_869insAAGC

Рис. 2. Электрофореграмма результатов скринирующего исследования образцов ДНК на наличие мутации p.W288Cfs*12 гена *NPM1*: образец М – наличие мутации в гетерозиготном состоянии (фрагменты 107 п.н., 111 п.н. и гетеродуплекс – двухцепочечный фрагмент ДНК, который образовался из мутантного и нормального аллеля), образцы 1–15 – нормальные гомозиготы (фрагмент 107 п.н.), MW – маркер молекулярных весов

Fig. 2. Electropherogram of the DNA samples screening results for the presence of the p.W288Cfs*12 mutation of the *NPM1* gene: sample M – the presence of a mutation in a heterozygous state (fragments of 107 b.p., 111 b.p. and heteroduplex – a double-stranded DNA fragment that was formed from a mutant and normal allele), samples 1–15 – normal homozygotes (fragment 107 b.p.), MW – molecular weight marker

являлось частичное сохранение мотива NoLS за счет того, что триптофан в положении 288 оставался неизменным: LWQKLEEVSL (лейцин-триптофан-*****-валин-*-лейцин).

Обсуждение

В ходе лейкозогенеза имеет место последовательное накопление драйверных aberrаций, приводящих к развитию ОМЛ. Мутации в гене *NPM1* присущи всему опухолевому клону, являются частыми и стабильными в течении заболевания. Кроме того, они специфичны для ОМЛ и, в соответствии с действующими рекомендациями European Leukemia Network 2022 года, могут служить самостоятельными мишенями для оценки МОБ при данном заболевании [28]. Так, продемонстрирована клиническая ценность количественной оценки мутаций *NPM1* каждые 4–6 месяцев на основе ПЦР в реальном времени для оценки эффективности терапии и прогнозирования рецидива ОМЛ [29]. Более того, если у пациентов с ОМЛ младше 60 лет мутации гена нуклеофосмина предсказывают благоприятный прогноз при отсутствии сопутствующей мутации *FLT3-ITD*, то у больных ОМЛ в возрасте 70 лет и старше мутации *NPM1*, по-видимому, являются единственным фактором, влияющим на прогноз [30].

В настоящее время не существует надежных суррогатных методов выявления мутантного статуса *NPM1*, которые могли бы заменить молекулярно-генетическое тестирование. Так, несмотря на то что в большинстве случаев ОМЛ с мутированным статусом данного гена метод иммуногистохимического окрашивания трепанобиоптатов костного мозга выявляет нуклеофосмин в ядре и

Типы мутаций в гене *NPM1*, выявленные у пациентов с ОМЛ
Types of mutations in the *NPM1* gene identified in patients with AML

Мутация	Тип вставки	Фрагмент 12-го экзона транскрипта гена <i>NPM1</i>				Аминокислотная последовательность
Норма	–	GATCTCTG		GCAGT	GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWIRKSL
p.W288Cfs*12	A	GATCTCTG	TCTG	GCAGT	GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLCLAVEEVSRLK
p.W288Cfs*12	B	GATCTCTG	CATG	GCAGT	GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL C MAVEEVSRLK
p.W288Cfs*12	c.863_864insTGCT	GATCTCTG	TGCT	GCAGT	GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DL C AAVEEVSRLK
p.W290Kfs*12	c.868_869insAAGC	GATCTCTG		GCAG	TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	DLWQKLEEVSLRK

цитоплазме, в ряде случаев имеют место расхождения между результатами данного метода и молекулярно-генетического анализа [31]. При этом генетическое тестирование на наличие мутаций гена *NPM1* у больных ОМЛ в реальной клинической практике также связано с целым рядом сложностей. Несмотря на то, что NGS является незаменимым инструментом для понимания общего мутационного ландшафта в каждом конкретном случае ОМЛ, данный метод остается дорогостоящим, и он не пригоден для получения результатов за время (24–48 ч), рекомендованное European Leukemia Network для определения мутационного статуса *NPM1* и *FLT3* у первичных больных [7, 32]. Использование прямого секвенирования для быстрого скрининга мутаций в рутинной лабораторной практике у первичных больных ОМЛ, нуждающихся в неотложном определении прогноза заболевания и тактики лечения, также затруднено. Более того, в случае мутаций в 12-м экзоне гена *NPM1* наличие поли-Т-фрагмента затрудняет проведение прямого секвенирования последовательности в обе стороны. Дальнейший мониторинг МОБ методами NGS малодоступен в силу их дороговизны, тогда как количественная ПЦР требует использования аллель-специфичных зондов/праймеров, а следовательно, предварительной точной идентификации мутации [18].

Разработан новый дизайн праймеров для анализа мутаций в 12-м экзоне гена *NPM1*, пригодных как для быстрого скрининга методом ПЦР с фланкирующими праймерами, так и для дальнейшей точной идентификации типа вставки с помощью секвенирования по Сенгеру. В ходе подбора последовательности праймеров, фланкирующих область инсерций, мы стремились к максимальному уменьшению длины амплифицируемого продукта с целью улучшения визуализации разницы в длине нормальной и мутантной аллели на электрофореграмме. При этом в случае выявления инсерции нарабатываемый ампликон должен был оставаться пригодным для выполнения прямого секвенирования по Сенгеру. При применении обратного праймера в ходе секвенирования достигалось исключение влияния на результаты определения нуклеотидной последовательности близлежащего поли-Т-фрагмента.

В ходе исследования с применением данных праймеров в группе из 128 пациентов с ОМЛ установлено, что частота мутации в гене *NPM1* составила 14,8 %. Полученное значение соответствует мировым данным по взрослым больным ОМЛ (18,1 %) [33, 34] и укладывается в описанный в отечественной литературе диапазон 14,3–20,5 % [22–24]. Вставки типа А составили 84,4 % находок, в одном случае (5,2 %)

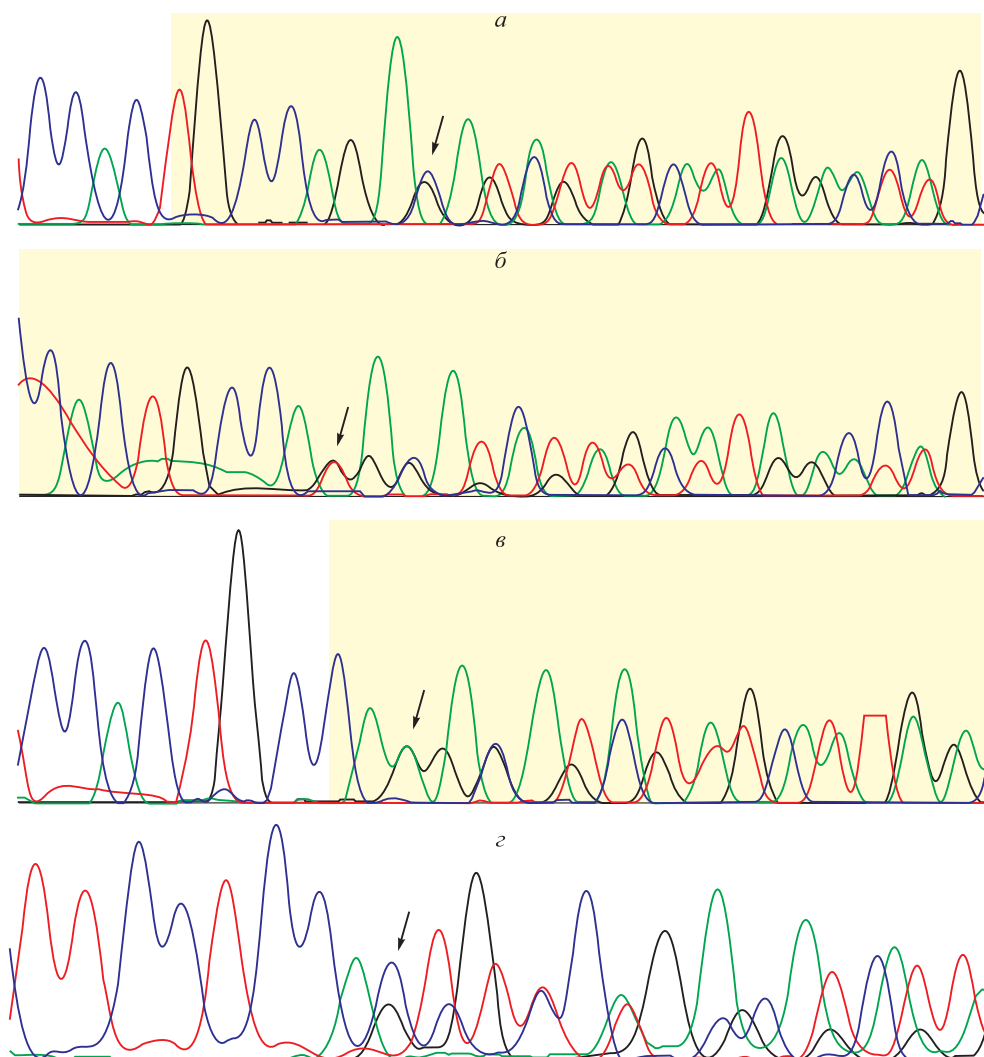


Рис. 3. Фрагменты хроматограмм секвенса образцов ДНК, содержащих мутации в гене NPM1 p.W288Cfs*12 типа А (а), p.W288Cfs*12 типа В (б), p.W288Cfs*12 нового типа c.863_864insTGCT (в) и p.W290Kfs*10 типа c.868_869insAAGC (получены с применением обратного праймера, стрелкой указано начало вставки)

Fig. 3. Fragments of sequence chromatograms of DNA samples containing mutations in the NPM1 gene p.W288Cfs*12 type A (a), p.W288Cfs*12 type B (б), p.W288Cfs*12 new type c.863_864insTGCT (в) and p.W290Kfs*10 type c.868_869insAAGC (obtained using reverse of the primer, the arrow indicates the beginning of the insertion)

выявлена вставка типа В. Кроме того, идентифицированы две новые, ранее не описанные в литературе и базе данных COSMIC [27] инсерции (10,4 %): p.W288Cfs*12 (c.863_864insTGCT) и p.W290Kfs*10 (c.868_869insAAGC).

Согласно анализу, результатом вставок типа А, В и новой инсерции p.W288Cfs*12 (c.863_864insTGCT) на уровне аминокислотной последовательности является идентичная замена мотива сигнала ядрышковой локализации NPM на мотив NoLS. Вторая выявленная нами новая вставка p.W290Kfs*10 (c.868_869insAAGC) при-

водила лишь к частичной утрате мотива NoLS и формированию мотива NES. В литературе имеются данные о том, что функциональный эффект данной инсерции также может заключаться в эктопическом накоплении нуклеофосмина в цитоплазме, несмотря на сохранение триптофана в 288-м положении. Так, в случае описанной ранее А.В. Виноградовым и соавт. новой инсерции GCTG в 288 триплете также имела место аналогичная выявленной нами частичная утрата мотива NoLS. При этом по данным проведенного российскими авторами исследования костного мозга

пациента с данной мутацией в лейкозных клетках определялось нарушение накопления NPM в ядре в пользу его цитоплазматической локализации [23].

Заключение

С применением разработанного нами набора праймеров можно проводить не только быстрый – в течение одного рабочего дня – скрининг мутаций в 12-экзоне NPM1 у пациентов с ОМЛ, но и их дальнейшую точную идентификацию методом прямого секвенирования в течение первого цикла лечения. Применение данной методики в лабораторной диагностике дает возможность более точного прогноза заболевания, особенно для пожилых пациентов, персонализации лечения, а также последующей оценки ее эффективности и отслеживания МОБ [35].

Список литературы / References

- Vardiman J. Who's next? The who classification of myeloid neoplasms. XXXVI. Ulusal Hematoloji Kongresi: proc. conf., 3–7 Kasım 2010, Belek, Antalya. 2010. P. 149–154.
- Falini B., Martelli M.P., Pileri S.A., Mecucci C. Molecular and alternative methods for diagnosis of acute myeloid leukemia with mutated NPM1: flexibility may help. *Haematologica*. 2010;95(4):529–534. doi: 10.3324/haematol.2009.017822
- Yuan W., Payton J.E., Holt M.S., Link D.C., Watson M.A., DiPersio J.F., Ley T.J. Commonly dysregulated genes in murine APL cells. *Blood*. 2007;109(3):961–970. doi: 10.1182/blood-2006-07-036640
- Box J.K., Paquet N., Adams M.N., Boucher D., Bolderson E., O'Byrne K.J., Richard D.J. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol. Biol.* 2016;17(1):19. doi: 10.1186/s12867-016-0073-9
- Albiero E., Madeo D., Bolli N., Giarretta I., Bona E.D., Martelli M.F., Nicoletti I., Rodeghiero F., Falini B. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 NPM1 mutation. *Leukemia*. 2007;21(5):1099–1103. doi: 10.1038/sj.leu.2404597
- Tregnago C., Benetton M., Padrin D., Polato K., Borella G., Da Ros A., Marchetti A., Porcù E., Del Bufalo F., Mecucci C., Locatelli F., Pigazzi M. NPM1 mutational status underlines different biological features in pediatric AML. *Cancers (Basel)*. 2021;13(14):3457. doi: 10.3390/cancers13143457
- Hindley A., Catherwood M.A., McMullin M.F., Mills K.I. Significance of NPM1 Gene Mutations in AML. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(18):10040. doi: 10.3390/ijms221810040
- Yao Y., Lin X., Wang C., Gu Y., Jin J., Zhu Y., Wang H. Identification of a novel NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol. Oncol.* 2023;12(1):87. doi: 10.1186/s40164-023-00449-4
- Силин А.Е., Козич Ж.М., Шпудейко В.К., Тропашко И.Б., Силина А.А., Мартинков В.Н., Мартыненко С.М., Скрябин А.М., Воропаева А.В. Мутационный анализ генов FLT3 и NPM1 в группе взрослых пациентов с миелодиспластическим синдромом и острым нелимфобластным лейкозом. *Пробл. здоровья и экол.* 2011;(3):85–90. doi: 10.51523/2708-6011.2011-8-3-17
- Silin A.E., Kozich Zh.M., Shpudeyko V.K., Tropashko I.B., Silina A.A., Martinkov V.N., Martynenko S.M., Skryabin A.M., Voropaeva A.V. Mutational analysis of FLT3 and NPM1 genes in the group of adult patients with myelodysplastic syndrome and acute non-lymphoblastic leukemia. *Problemy zdorov'ya i ekologii = Health and Environment Issues*. 2011;(3):85–90. [In Russian]. doi: 10.51523/2708-6011.2011-8-3-17
- Huet S., Jallades L., Charlot C., Chabane K., Nicolini F.E., Michallet M., Magaud J.P., Hayette S. New quantitative method to identify NPM1 mutations in acute myeloid leukaemia. *Leuk. Res. Treatment*. 2013;2013:756703. doi: 10.1155/2013/756703
- Kumar D., Mehta A., Panigrahi M.K., Nath S., Saikia K.K. NPM1 mutation analysis in acute myeloid leukemia: comparison of three techniques – sanger sequencing, pyrosequencing, and real-time polymerase chain reaction. *Turk. J. Haematol.* 2018;35(1):49–53. doi: 10.4274/tjh.2017.0095
- Severina N., Sidorova Y., Risinskaya N., Biderman B., Pshenychnyy A., Ryzhikova N., Lukianova I., Kashlakova A., Sudarikov A. PB1792: NGS vs PCR for the detection of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia. *Hemasphere*. 2022;6(Suppl.):1672–1673. doi: 10.1097/01.HS9.0000850020
- Маслюкова И.Е., Курочкин Д.В., Мартынова Е.В., Бахтина В.И., Субботина Т.Н. Сравнение методов фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза для обнаружения мутаций FLT3-ITD у пациентов с острым миелоидным лейкозом. *Онкогематология*. 2022;17(4):118–125. doi: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125
- Maslyukova I.E., Kurochkin D.V., Martynova E.V., Bakhtina V.I., Subbotina T.N. Comparison of fragment analysis and PCR electrophoresis methods for the detection of FLT3–ITD mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology*. 2022;17(4):118–125. [In Russian] doi: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125
- Gebhard C., Glatz D., Schwarzfischer L., Wimmer J., Stasik S., Nuetzel M., Heudobler D., Andresen R., Ehninger G., Thiede C., Rehli M. Profiling of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia reveals subclasses of CG-rich regions with epigenetic or genetic association. *Leukemia*. 2019;33(1):26–36. doi: 10.1038/s41375-018-0165-2
- El-Gamal R.A.E., Hashem A.E., Habashy D.M., Abou Elwafa M.A.Z., Boshnak N.H. Flow cytometry in detection of Nucleophosmin 1 mutation in acute myeloid leukemia patients: A reproducible tertiary hospital

- experience. *Int. J. Lab. Hematol.* 2021;43(1):68–75. doi: 10.1111/ijlh.13317
16. Rastogi P., Naseem S., Varma N., Varma S. Immunohistochemical detection of *NPM1* mutation in acute myeloid leukemia and its association with cup-like nuclear morphology of blasts. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2016;24(4):261–267. doi: 10.1097/PAI.0000000000000182
17. Martelli M.P., Manes N., Liso A., Pettrossi V., Verducci Galletti B., Bigerna B., Pucciarini A., de Marco M.F., Pallotta M.T., Bolli N., ... Falini B. A western blot assay for detecting mutant nucleophosmin (*NPM1*) proteins in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2008;22(12): 2285–2288. doi: 10.1038/leu.2008.149
18. Северина Н.А., Сидорова Ю.В., Бидерман Б.В., Рисинская Н.В., Ликольд Е.Б., Глинщикова О.А., Пшеничный А.С., Судариков А.Б. Сопоставление различных методик выявления нестандартной вставки гена *NPM1* у больных ОМЛ. *Вестн. гематол.* 2021;17(2):75–76.
- Severina N.A., Sidorova Yu.V., Biderman B.V., Risinskaya N.V., Likold E.B., Glinshchikova O.A., Pshenichny A.S., Sudarikov A.B. Comparison of various methods for detecting non-standard *NPM1* gene insertion in AML patients. *Vestnik gematologii = Bulletin of hematology*. 2021;2:75–76. [In Russian].
19. Sekeres M.A., Elson P., Kalaycio M.E., Advani A.S., Copelan E.A., Faderl S., Kantarjian H.M., Estey E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 2009;113(1):28–36. doi: 10.1182/blood-2008-05-157065
20. Shi Y., Chen X., Jin H., Zhu L., Hong M., Zhu Y., Wu Y., Qiu H., Wang Y., Sun Q., ... Qiao C. Clinical prognostic value of different *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia patients. *Ann. Hematol.* 2024;103(7):2323–2335. doi: 10.1007/s00277-024-05786-w
21. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р., Иощенко С.Е., Сергеев А.Г. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена *NPM1* при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода. *Вестн. Урал. мед. акад. науки.* 2013;(4):124–127.
- Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Salakhov D.R., Ioshchenko S.E., Sergeyev A.G. Comparative analysis of the results of typing molecular damage of the *NPM1* gene in acute myeloid leukemia using direct automatic sequencing and immunohistochemical method. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2013;(4):124–127. [In Russian].
22. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сазонов С.В., Сергеев А.Г. Клинико-патогенетическая характеристика мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* и *WT1* у больных острыми миелоидными лейкозами в возрастной группе 15–45 лет. *Гены и клетки.* 2018;13(3):70–74. doi: 10.23868/201811036
- Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G. Clinical and pathological features *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53* and *WT1* genes mutations detection in acute myeloid leukemia patients aged 15–45 years old. *Geny i kletki = Genes and Cells*. 2018;13(3):70–74. [In Russian]. doi: 10.23868/201811036
23. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р., Изотов Д.В., Иощенко С.Е., Сергеев А.Г. Детекция мутаций генов *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NPM1*, *TP53* и *WT1* при острых миелоидных лейкозах с нормальным кариотипом бластных клеток. *Вестн. Урал. мед. акад. науки.* 2016;(2):89–101. doi: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101
- Vinogradov A.V., Rezaykin A.V., Salakhov D.R., Izotov D.V., Ioschenko S.E., Sergeev A.G. *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NPM1*, *TP53* and *WT1* genes mutations detection in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Journal of Ural Medical Academic Science*. 2016;(2):89–101. [In Russian]. doi: 10.22138/2500-0918-2016-14-2-89-101
24. Петрова Е.В., Мартынкевич И.С., Полушкина Л.Б., Мартыненко Л.С., Иванова М.П., Цыбакова Н.Ю., Клейна Е.В., Шабанова Е.С., Чечеткин А.В., Абдулкадыров К.М. Клинические, гематологические и молекулярно-генетические особенности острых миелоидных лейкозов с мутациями в генах *FLT3*, *CKIT*, *NRAS* и *NPM1*. *Гематол. и трансфузиол.* 2016;61(2):72–80. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-72-80
- Petrova E.V., Martynkevich I.S., Polushkina L.B., Martynenko L.S., Ivanova M.P., Tsybakova N.Yu., Kleina E.V., Shabanova E.S., Chechetkin A.V., Abdulkadyrov K.M. Clinical, hematological and molecular-genetic features of acute myeloid leukemia with mutations in *FLT3*, *CKIT*, *NRAS* and *NPM1*. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*. 2016;61(2):72–80. [In Russian]. doi: 10.18821/0234-5730-2016-61-2-72-80
25. Белоцерковская Е.В., Зайкова Е.К., Петухов А.В., Демидов О.Н., Левчук К.А., Будаева И.Г., Зайцев Д.В., Роговая Ю.Д., Шатилова А.А., Богданов К.В., ... Гиршова Л.Л. Выявление мутаций генов эпигенетической регуляции генома *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* и их сочетания с мутациями *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* у пациентов с острыми миелоидными лейкозами. *Клин. онкогематол.* 2021;14(1):13–21. doi: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21
- Belotserkovskaya E.V., Zaykova E.K., Petukhov A.V., Demidov O.N., Levchuk K.A., Budayeva I.G., Zaytsev D.V., Rogovaya Yu.D., Shatilova A.A., Bogdanov K.V., ... Girshova L.L. Identification of mutations in *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* genes of genome epigenetic regulation and their co-occurrence with *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* mutations in acute myeloid leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology*. 2021;14(1):13–21. [In Russian]. doi: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21

26. Грицаев С.В., Мартынкевич И.С., Чубукина Ж.В., Петрова Е.В., Кострома И.И., Иванова М.П., Мартыненко Л.С., Потихонова Н.А., Бубнова Л.Н., Абдулкадыров К.М. Особенности иммунофенотипа бластных клеток у больных *de novo* острым миелоидным лейкозом с нормальным кариотипом и мутацией FLT3-ITD. *Терапевт. арх.* 2014;86(3):71–73.

Gritsaev S.V., Martynkevich I.S., Chubukina Zh.V., Petrova E.V., Kostroma I.I., Ivanova M.P., Martynenko L.S., Potikhonova N.A., Bubnova L.N., Abdulkadyrov K.M. The specific features of the immunophenotype of blast cells in patients with *de novo* normal karyotype acute myeloid leukemia and FLT3-ITD mutation. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive.* 2014;86(3):71–77. [In Russian].

27. Sondka Z., Dhir N.B., Carvalho-Silva D., Jupe S., McLaren M.K., Starkey M., Ward S., Wilding J., Ahmed M., Argasinska J., ... Teague J. COSMIC: a curated database of somatic variants and clinical data for cancer. *Nucleic Acids Research.* 2024;52(D1):D1210–D1217. doi: 10.1093/nar/gkad986

28. Heuser M., Freeman S.D., Ossenkoppele G.J., Buccisano F., Hourigan C.S., Ngai L.L., Tetters J.M., Bachas C., Baer C., Béné M.C., ... Cloos J. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2021;138(26):2753–2767. doi: 10.1182/blood.2021013626

29. Sahasrabudhe K.D., Mims A.S. MRD in AML: who, what, when, where, and how? *Blood.* 2024;143(4):296–298. doi: 10.1182/blood.2023022226

30. Lachowiec C.A., Loghavi S., Kadia T.M., Davenport N., Borthakur G., Pemmaraju N., Naqvi K., Alvarado Y., Yilmaz M., Short N., ... DiNardo C.D. Outcomes of older patients with NPM1-mutated AML: current

treatments and the promise of venetoclax-based regimens. *Blood Adv.* 2020;4(7):1311–1320. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001267

31. Wei Q., Wang S.A., Loghavi S., Fang H., Medeiros L.J., Wang W. Diagnostic utility of immunohistochemistry in detection of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia with a patchy distribution. *EJHaem.* 2024;5(2):379–382. doi: 10.1002/jha2.866

32. Wessex Regional Genetics Laboratory. NHS England Target Report Turnaround Times. Available at: clk.ru/3N5z3e

33. Gao J., Aksoy B.A., Dogrusoz U., Dresdner G., Gross B., Sumer S.O., Sun Y., Jacobsen A., Sinha R., Larsson E., ... Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci. Signal.* 2013;6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088

34. Воропаева Е.Н., Бурундукова М.В., Лызлова А.А., Чухонцева И.А., Максимов В.Н., Поспелова Т.И. Мутации в «горячих» точках генов FLT3, NPM1, IDH1, IDH2 и DNMT3A при остром миелоидном лейкозе. *Сиб. онкол. ж.* 2025;24(1):125–141. doi: 10.21294/1814-4861-2025-24-1-125-141

Voropaeva E.N., Burundukova M.V., Lyzlova A.A., Chukhontseva I.A., Maksimov V.N., Pospelova T.I. Mutations in the “hot spots” of the FLT3, NPM1, IDH1, IDH2 and DNMT3A genes in acute myeloid leukemia. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology.* 2025;24(1):125–141. [In Russian]. doi: 10.21294/1814-4861-2025-24-1-125-141

35. Клинические рекомендации. Острые миелоидные лейкозы. Режим доступа: clk.ru/3N5ypH

Clinical guidelines. Acute myeloid leukemia. Available at: clk.ru/3N5ypH [In Russian].

Сведения об авторах:

Воропаева Елена Николаевна, д.м.н., ORCID: 0000-0001-7542-7285, e-mail: vena/81@mail.ru

Бурундукова Марина Викторовна, e-mail: mo_8@rambler.ru

Кузнецова Ирина Андреевна, e-mail: anda4@yandex.ru

Нечунаева Ирина Николаевна, к.м.н., ORCID: 0000-0003-3157-9775, e-mail: nechir@mail.ru

Воронцова Екатерина Валерьевна, ORCID: 0000-0003-1336-2580, e-mail: Voroncovaek@yandex.ru

Максимов Владимир Николаевич, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-7165-4496, e-mail: medik11@mail.ru

Поспелова Татьяна Ивановна, д.м.н., проф., ORCID: 0000-0002-1261-5470, e-mail: postatgem@mail.ru

Information about the authors:

Elena N. Voropaeva, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0001-7542-7285, e-mail: vena/81@mail.ru

Marina V. Burundukova, e-mail: mo_8@rambler.ru

Irina A. Kuznetsova, e-mail: anda4@yandex.ru

Irina N. Nechunaeva, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-3157-9775, e-mail: nechir@mail.ru

Ekaterina V. Vorontsova, ORCID: 0000-0003-1336-2580, e-mail: Voroncovaek@yandex.ru

Vladimir N. Maksimov, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-7165-4496, e-mail: medik11@mail.ru

Tatyana I. Pospelova, doctor of medical sciences, professor, ORCID: 0000-0002-1261-5470, e-mail: postatgem@mail.ru

Поступила в редакцию 31.03.2025

После доработки 23.04.2025

Принята к публикации 15.07.2025

Received 31.03.2025

Revision received 23.04.2025

Accepted 15.07.2025