

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ *FLT3* И МОНИТОРИНГ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ *FLT3*-ПОЗИТИВНОМ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Сидорова Ю.В.^{1*}, Северина Н.А.¹, Бидерман Б.В.¹, Рисинская Н.В.¹, Февралева И.С.¹, Костромина М.А.², Стародуб С.М.³, Кашлакова А.И.¹, Лукьянова И.А.¹, Судариков А.Б.¹, Паровичникова Е.Н.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, г. Москва, Российская Федерация

² Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Введение. Определение мутаций в гене *FMS*-подобной тирозинкиназы 3 (*FLT3*) играет важную роль в диагностике, определении прогноза и тактики терапии острого миелоидного лейкоза (ОМЛ).

Цель: сравнить основные методы, применяемые при диагностике мутаций *FLT3* у больных ОМЛ.

Материалы и методы. Молекулярно-генетическую диагностику мутаций *FLT3* проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с фрагментным анализом (ПЦР-ФА), ПЦР-ФА с двойной меткой, методом тандемной дупликации (ТД-ПЦР), высокопроизводительного секвенирования (ВПС), аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) у больных ОМЛ, у которых устанавливали диагноз ОМЛ или которые наблюдались в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2017 г. по 01.06.2024.

Результаты. С помощью метода ПЦР-ФА были получены надежные результаты выявления внутренних тандемных дупликаций гена *FLT3* (*FLT3-ITD*). Метод ПЦР-ФА с двойной меткой обладает большей чувствительностью и специфичностью, что позволяет выявить *FLT3-ITD* у большего числа больных. ТД-ПЦР применим для определения минимальной остаточной болезни (МОБ) у части больных. ВПС не только позволяет получить информацию о месте вставки ITD и ее нуклеотидном составе, но также расширяет представления о точечных мутациях в первом и втором тирозинкиназных (TKD1 и TKD2) доменах, которые могут служить причиной резистентности к ингибиторам тирозинкиназ.

Заключение. Применение нескольких методов для исследования мутаций *FLT3* позволяет лучше идентифицировать минорные клоны *FLT3-ITD*, определять МОБ и точечные соматические мутации в TKD1 и TKD2 доменах. Даны рекомендации по молекулярно-генетической диагностике мутаций *FLT3* при ОМЛ.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD*, фрагментный анализ, ПЦР, высокопроизводительное секвенирование

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Сидорова Ю.В., Северина Н.А., Бидерман Б.В., Рисинская Н.В., Февралева И.С., Костромина М.А., Стародуб С.М., Кашлакова А.И., Лукьянова И.А., Судариков А.Б., Паровичникова Е.Н. Определение мутаций *FLT3* и мониторинг минимальной остаточной болезни при *FLT3*-позитивном остром миелоидном лейкозе. Гематология и трансфузиология. 2025; 70(1):8–26. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2025-70-1-8-26>

DETERMINATION OF *FLT3* MUTATIONS AND MINIMAL RESIDUAL DISEASE MONITORING IN *FLT3*-POSITIVE ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Sidorova Y.V.¹, Severina N.A.¹, Biderman B.V.¹, Risinskaya N.V.¹, Fevraleva I.S.¹, Kostromina M. A.², Starodub S.M.³, Kashlakova A.I.¹, Lukyanova I.A.¹, Sudarikov A.B.¹, Parovichnikova E.N.¹

¹National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

²Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119048, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. The identification of mutations in the *FLT3* gene is essential for the diagnosis, prognosis, and selection of treatment strategies for acute myeloid leukemia (AML).

Aim: to compare the main methods used in the diagnosis of *FLT3* mutations in patients with AML.

Materials and methods. Identification of *FLT3* gene mutations was carried out using polymerase chain reaction (PCR) with fragment analysis (PCR-FA), double-label PCR-FA, tandem duplication method (TD-PCR), next-generation sequencing (NGS), and allele-specific PCR (AS-PCR) in patients who were diagnosed or observed with AML at the National Medical Research Center for Hematology from 2017 to 01.06.2024.

Results. The PCR-FA method showed reliable results in the testing of internal tandem duplications of *FLT3* gene (*FLT3*-ITD). The double-label PCR-FA method had greater sensitivity and specificity that allowed detection of *FLT3*-ITD in a larger number of patients. TD-PCR was useful for determining minimal residual disease (MRD) in some patients. NGS provided information about the site of ITD insertion and its nucleotide composition, but also expanded our understanding of point mutations in the first and second tyrosine kinase (TKD1 and TKD2) domains, which may cause resistance to tyrosine kinase inhibitors.

Conclusion. The use of several methods to analyze *FLT3* mutations makes it possible to make a more accurate identification of minor *FLT3*-ITD clones, as well as the detection of MRD and somatic point mutations within the TKD1 and TKD2 domains. Recommendations are given on the molecular genetic diagnosis of *FLT3* mutations in AML

Keywords: acute myeloid leukemia, PCR, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD, fragment analysis, next-generation sequencing

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the study was performed without external funding.

For citation: Sidorova Y.V., Severina N.A., Biderman B.V., Risinskaya N.V., Fevraleva I.S., Kostromina M.A., Starodub S.M., Kashlakova A.I., Lukyanova I.A., Sudarikov A.B., Parovichnikova E.N. Determination of *FLT3* mutations and minimal residual disease monitoring in *FLT3*-positive acute myeloid leukemia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2025; 70(1):8–26 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2025-70-1-8-26>

Введение

FMS-подобная тирозинкиназа — трансмембранный рецептор семейства тирозинкиназ 3, который играет ключевую роль в раннем развитии миелоидных и лимфоидных предшественников в костном мозге [1–3]. Активирующие мутации *FLT3* обеспечивают пролиферацию, выживание опухолевого клона [4]. Они встречаются примерно у 25–35% взрослых

больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), ассоциированы с нормальным кариотипом, и частота их обнаружения снижается после 60 лет [5–7]. Большинство мутаций представляет собой внутренние тандемные дубликации (*FLT3*-ITD) в 14–15 экзоне, две трети которых приходится на околосмембранный домен (JMD), и около трети мутаций приходится

на первый тирозинкиназный домен (TKD 1) (рис. 1) [8]. Мутации *FLT3*-ITD являются фактором плохого прогноза и значимо ассоциированы с лейкоцитозом в дебюте ОМЛ, высоким риском рецидива и ухудшением бессобытийной и общей выживаемости [6–10]. Правильная диагностика мутаций *FLT3*-ITD на любом этапе позволяет не только стратифицировать больных на группы риска, но и назначить таргетные препараты — ингибиторы тирозинкиназ, такие как мидостаурин, гилтеритиниб, сорафениб [11–16]. Локализация места вставки варьирует от большого к больному, а длина вставки может быть от 3 пар нуклеотидов (п. н.) до более 300 п. н., что затрудняет молекулярно-генетическую диагностику.

Другая разновидность мутаций *FLT3*-TKD — это точечные мутации в тирозинкиназных доменах, основное количество которых приходится на 835–836-й кодоны 20-го экзона (домен TKD2) [17, 18]. Аминокислотные замены в этих кодонах выявляют у 5–7% больных ОМЛ, общее количество выявляемых точечных соматических мутаций в TKD доменах при ОМЛ составляет 10% и более [17, 18]. Мутации *FLT3*-TKD не влияют на прогноз, однако в последние годы вызывают большой интерес, т. к. могут обуславливать резистентность к ингибиторам тирозинкиназ [15, 17–19].

Цель настоящей работы — сравнить основные методы, применяемые при диагностике мутаций *FLT3* у больных ОМЛ.

Материалы и методы

Больные. Молекулярно-генетическое исследование мутации *FLT3*-ITD методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом (ПЦР-ФА) проведено у 1863 больных ОМЛ, которым проводили диагностику ОМЛ или которые наблюдались в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2017 г. по 01.06.2024 по поводу ОМЛ. Возраст больных был от 19 до 87 лет, медиана — 44 года. Группу риска больных определяли по классификации ELN 2017 [20]. ПЦР-ФА с двойной меткой была применена у 76 больных. Методом ПЦР с tandemной дупликацией (ТД-ПЦР) мутации исследовали у 105 больных, а методом высокопроизводительного секвенирования (ВПС) — у 146 больных, мутации *FLT3*-TKD методом аллель-специфичной ПЦР (АС-ПЦР) были исследованы у 1481 больных, методом ВПС — у 86 больных.

Соблюдение прав больных и правил биоэтики. Протокол исследования соответствовал этическим принципам и одобрен на заседании локального этического комитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Протокол № 153 от 25.02.2021.

Выделение нуклеиновых кислот. Геномную ДНК из клеток костного мозга выделяли по методике, описанной ранее [21]. Концентрацию определяли при помощи флуориметра Qubit (Thermo Fisher Scientific, США).

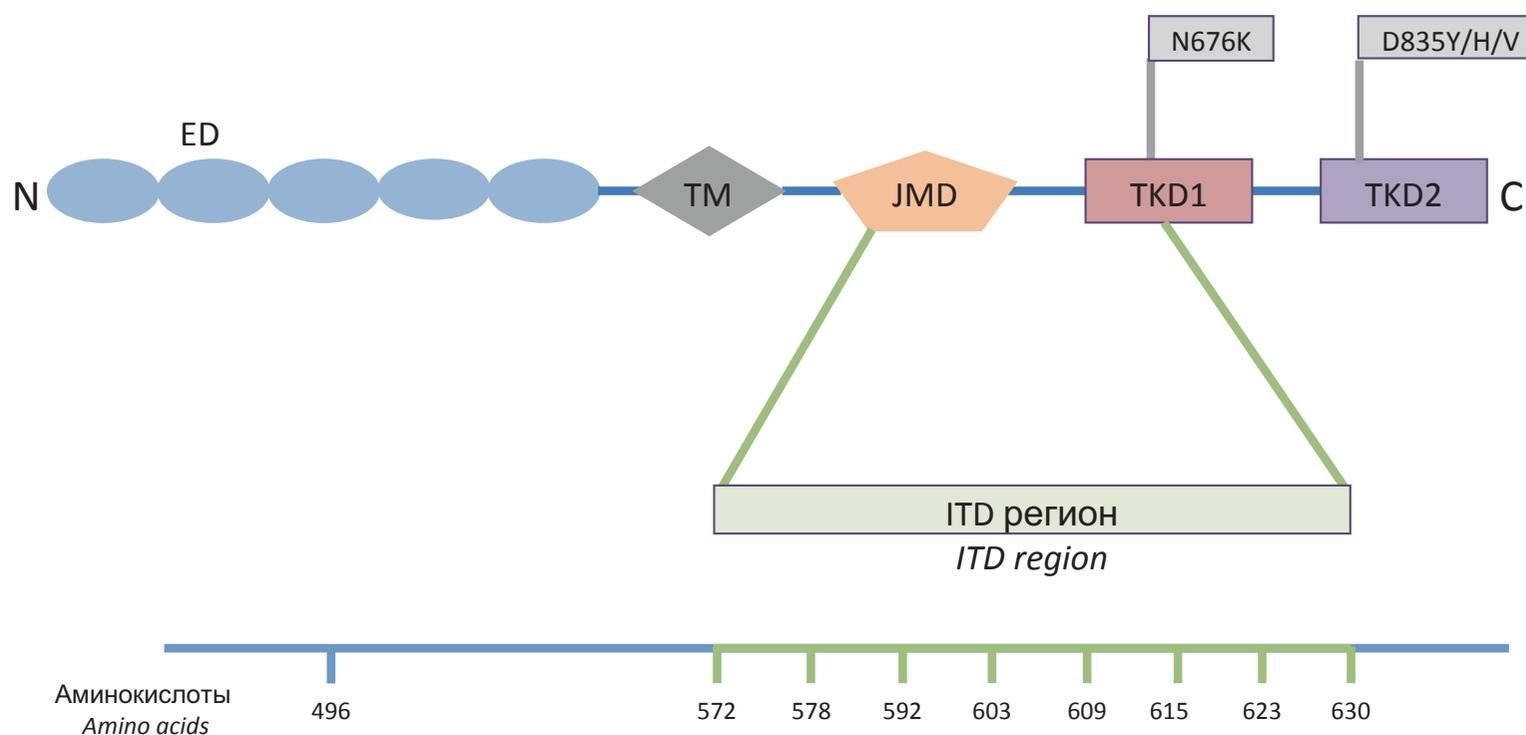


Рисунок 1. Схематичное изображение FMS-подобной тирозинкиназы 3: ED — внеклеточные домены; TM — трансмембранный домен; JMD — околомембранный домен; TKD — тирозинкиназный домен. Отмечены ITD регион, в котором происходят вставки *FLT3*-ITD, и наиболее клинически важные аминокислотные замены N676K и D835Y/H/V в TKD1 и TKD2 регионах соответственно

Figure 1. Schematic illustration of FMS-like tyrosine kinase 3: ED — extracellular domains; TM — transmembrane domain; JMD — juxtamembrane domain; TKD — tyrosine kinase domain. The diagram marks the ITD region, in which *FLT3*-ITD insertions occur and the most clinically important amino acid substitutions are N676K and D835Y/H/V in the TKD1 and TKD2 regions, respectively

ПЦР-ФА и ПЦР-ФА с двойной меткой. Для определения FLT3-ITD методом ПЦР-ФА были использованы последовательности праймеров, опубликованные ранее: FLT3ITD_F 5'FAM-AGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3', FLT3ITD_R 5'-gtttcttCATCTTTGTTGCTGTCSTTCCAC-3' (длина продукта 370 п.н.) [22]. Чтобы избежать аденилирования (присоединения лишнего аденина) при работе Taq полимеразы и возникновения эффекта «двойных» пиков при капиллярном электрофорезе, на 5' конце обратных праймеров была помещена нуклеотидная последовательность gtttctt в соответствии с рекомендациями [23]. Для определения FLT3-ITD методом ПЦР-ФА с двойной меткой были использованы праймеры: FLT3ITD_F 5'FAM-AGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3', FLT3ITD_IP 5'R6G-CAGAAACATTTGGCACATTCSSA-3' (длина продукта 164 п.н.). Условия амплификации и капиллярного электрофореза были одинаковы для ПЦР-ФА и ПЦР-ФА с двойной меткой. Для ПЦР использовали реактивы ЗАО «Синтол» (Россия). 20 мкл реакционной смеси содержали: 100–200 нг ДНК, 5 пмоль прямого и обратного праймеров, dNTP (0,2 мМ), 10 × ПЦР-буфер, MgCl₂ (1,5 мМ), SynTaq ДНК-полимеразу (1 ед.). Для увеличения специфичности определения анализ выполняли в двух повторах. ПЦР 95° 7 мин, затем 30 циклов 95° 45 сек, 60° 45 сек, 72° 60 сек, затем окончательная элонгация 72° 5 мин. ПЦР проводили на амплификаторе «T100» (Bio-Rad Laboratories, США).

Для капиллярного электрофореза и фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот «Нанофор-05»

(Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Для этого 2 мкл разведенного в 50 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 0,2 мкл маркера молекулярного веса СД 450 (ЗАО «Синтол», Россия). После денатурации при 95 °С в течение 3 мин и последующего охлаждения до 4 °С 10 мкл смеси наносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере ПДМА-6 (ЗАО «Синтол», Россия). Время электрофореза составляло 2500 сек.

Флуоресценцию, площадь пиков и распределение амплификатов по длине оценивали при помощи компьютерной программы «GeneMapper v. 4.0» (Applied Biosystems, США). Для количественной оценки при ПЦР-ФА определяли аллельное отношение (АО) как отношение площади мутантного пика (Smt) или суммы площадей всех мутантных пиков к площади пика дикого аллеля (Swt) по формуле $AO = \frac{\sum Smt}{(Swt + Smt)}$, где $\sum Smt = Smt1 + Smt2 + \dots + Smti$, где i — количество мутантных пиков. Для оценки индивидуального вклада каждого мутантного пика в общее аллельное отношение для каждого из них вычислялась аллельная нагрузка (АН) в процентах $АН = (Smt / (Smt + Swt)) \times 100\%$. АО и АН — разные величины; так, при равенстве площадей дикого и мутантного пиков АО = 1, АН = 50%. Клиническое значение при определении группы риска, по рекомендациям ELN 2017 [20], имеет только АО.

Метод тандемной дубликации (ТД-ПЦР). Для ТД-ПЦР использовали принцип тандемной дубликации, описанный ранее, с модифицированными праймерами [24, 25]. Метод ТД-ПЦР позволяет определить

Таблица 1. Праймеры для метода TD-PCR
Table 1. Primers for the TD-PCR method

Номер пробирки Tube number	Название праймера Primers name	Прямые и обратные праймеры Forward and reverse primers	Длина праймера (пн) Length of primer (bp)
1	TD1F TD1R	5'-GTCAAATGGGTGTTTCCAAGA-3' 5' FAM-ACTTGGAATCTCCCATTTGAG-3'	21
2	TD2F TD2R	5'-AGACAAATGGGAGTTTCCAAGAGA-3' 5' FAM-AGACTTGGAAACTCCCATTTGAGA-3'	24
3	TD3F TD3R	5'-GTGAGAATATGAATATGATCTCAA-3' 5'FAM-AAGAGATCATATTCATATTCTCTG -3'	24
4	TD4F TD4R	5'-ATGATCTACGTTGATATCAGAGAA-3' 5' FAM-AAGTCTGAAATCAACGTAGAAGTA-3'	24
5	TD5F TD5R	5'-GTGATAATGAGTACTTCTACGTTG-3' 5' FAM-GTACGTAGAAGTACTCATTATCTG-3'	24
6	TD6F TD6R	5'-ACTCCGGCTCCTCTGATAATGAG-3' 5' HEX-GAGATTATCTGTGGAGCCGGTCA-3'	23
7	TD7F TD7R	5'-CTTCGGCTCCTCAGATAATG-3' 5' FAM-GTTTATCAGAGGAGCCGGTC-3'	20
8	TD8F TD8R	5'-TACAGGAGACCCGGCTCCTCA-3' 5' HEX-TGAGGAGCCGGTCACCTGTA-3'	20

минимальную остаточную болезнь (МОБ) при вставках длиной более 50 п. н. Для анализа в дебюте ОМЛ осуществляли постановку 8-ми отдельных реакций. Последовательности праймеров указаны в таблице 1. Далее определяли наличие специфического продукта по длине. Расчетную длину продукта определяли как сумму длин вставки и праймера. Определение МОБ проводили в трех повторах только с теми праймерами, с которыми амплификация проходила максимально эффективно при первичном исследовании.

Смесь для ПЦР 20 мкл содержала: 50 нг ДНК для первичного анализа или 500 нг ДНК для определения МОБ, 5 пмоль прямого и обратного праймеров, 2 × ПЦР-буфер «DirectGO» (Bioptic, Тайвань). Условия ПЦР: 95° 7 мин, затем 30 циклов для первичного анализа или 35 циклов для определения МОБ: 95° 30 сек, 60° 30 сек, 72° 30 сек, затем окончательная элонгация 72° 5 мин. ПЦР проводили на амплификаторе T100 (Bio-Rad Laboratories, США). Для капиллярного электрофореза и фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот «Нанофор-05» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия), методика капиллярного электрофореза при первичном анализе не отличалась от описанной выше для ПЦР-ФА. Для определения МОБ 2 мкл ПЦР-продукта разводили в 20 раз.

АС-ПЦР в реальном времени для определения мутаций D835 FLT3-ТКД. Для исследования точечных соматических мутаций D835Y/H FLT3-ТКД использовали метод АС-ПЦР в реальном времени с пробой TaqMan. Ставили две параллельные ПЦР-реакции, различающиеся парой аллель-специфических праймеров, участвующих в реакциях. Аллель-специфические праймеры для выявления нормального и мутантного аллелей имели одинаковую нуклеотидную последовательность, кроме нуклеотида на 3'-конце. У праймера для выявления нормального аллеля 3'-конец соответствовал немутантному нуклеотиду, а для выявления мутантного аллеля на 3'-конце был нуклеотид, соответствующий мутации. Обратный праймер и TaqMan-проба в обеих ПЦР были одинаковы. Последовательность

праймеров для АС-ПЦР: D835 Normal sense 5'-САТА GTTGGGAATCACTCATGATAGC-3'; D835Y/H Mutant sense 5'-САТАGTTGGAATCACTCATGATAGR-3' (R = А или G); D835 common antisense 5'-ТССАТСАССGGTACCTCСТА-3'; D835 Probe 5'-FAM-АТАТСТТСАССАСТТТСССGGTGGGTGARTQ1-3' 200 нг ДНК в объеме 5 мкл вносили в 20 мкл реакционной смеси (ЗАО «Синтол», Москва), содержащей по 10 пмоль прямого без мутации и обратного праймеров, 5 пмоль флуоресцентной пробы и 0.1 ед ТАQ-полимеразы. ПЦР проводили в дублях в амплификаторе Real-Time CFX 96 Touch (Bio-Rad, США). Условия ПЦР: 95° 5 мин, затем 45 циклов 95° 30 сек, 63° 20 сек, 72° 20 сек. АС-ПЦР осуществляли в двух повторах для каждого прямого праймера. В качестве отрицательных контролей использовали смесь ДНК здоровых доноров. В качестве положительных контролей — образцы с подтвержденными секвенированием по Сэнгеру мутациями.

Высокопроизводительное секвенирование (ВПС). ВПС проводили у больных с доказанной методом ПЦР-ФА мутацией FLT3 для уточнения места, размера вставки, ее нуклеотидной последовательности и определения точечных соматических мутаций в ТКД доменах. Для ВПС проводили две реакции ПЦР с праймерами, указанными в таблице 2.

Смесь для ПЦР 20 мкл содержала: 100–200 нг ДНК, 5 пмоль прямого и обратного праймеров, 2 × ПЦР-буфер «DirectGO» («Bioptic», Тайвань). Условия ПЦР: 95° 7 мин, затем 30 циклов 95° 45 сек, 60° 45 сек, 72° 60 сек, затем окончательная элонгация 72° 5 мин. ПЦР проводили на амплификаторе T100 («Bio-Rad Laboratories», США). Полученные амплификаты использовали для приготовления библиотеки секвенирования с помощью наборов «Nextera XT DNA Library Prep» и «Nextera XT Index Kit v2» («Illumina», США) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе «MiSeq» («Illumina», США) с использованием набора «MiSeq Reagent Micro Kit v2 300-cycles» («Illumina», США). Фильтрация данных, удаление служебных после-

Таблица 2. Последовательности праймеров и длина продуктов для ВПС

Table 2. Primer sequences and product lengths for NGS

Номер пробирки Tube number	Название праймера Primers name	Прямые и обратные праймеры Forward and reverse primers	Длина продукта (пн) Length of product (bp)
1	FLT3ITD_F	5'-AGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC-3'	370
	FLT3ITD_R	5'-CATCTTTGTTGCTGTCCTTCCAC-3'	
2	TKD16F	5'-GCAGATTGACTCTGAGCTGAGA-3'	339
	TKD16R	5'-GTTTGAGAGTTCACACTGTGAC-3'	
	TKD17F	5'-GCCCTCСТАAGAGTATGTTG-3'	350
	TKD17R	5'-GACTTCACGGTGCCTTTAGA-3'	
	TKD20F	5'-ТССАТСАССGGTACCTCСТА-3'	300
	TKD20R	5'-GTGCAGTTGTTACCATGATAACG-3'	

довательностей, картирование прочтений, поиск и аннотирование вариантов осуществляли при помощи утилит Trimmomatic [26], BWA [27], SAMtools [28], Vardict [29] и Annovar [30]. Информация о патогенности и клинической значимости мутаций была получена из открытых баз данных COSMIC, OncoKB, ClinVar, Franklin. Технически минимальная АН для аннотирования мутации составляла 0,5%, однако нуклеотидные замены с АН менее 1% не анализировались из-за большой доли неспецифических изменений, а все нуклеотидные замены с АН 1–2% перепроверяли повторным проведением ВПС.

Результаты

ПЦР с последующим фрагментным анализом (ПЦР-ФА) является «золотым стандартом» исследования *FLT3*-ITD. Принцип метода основан на амплификации области, в которой происходит абсолютное большинство внутренних тандемных дупликаций (14–15 экзон). При отсутствии вставок в этой области на электрофореграмме определяется один пик дикого типа длиной 370 п.н., а любые дополнительные пики большей длины расцениваются как наличие мутации *FLT3*-ITD (рис. 2). Для повышения специфичности анализ проводят в дублях. Метод позволяет в короткие сроки получить результат с чувствительностью

1–5% и дать расчетные характеристики выявленным нарушениям: оценить длину вставки/делеции по количеству пар нуклеотидов и вычислить аллельное отношение. Было исследовано 1863 образца от больных с *de novo* ОМЛ, среди которых положительный результат определения *FLT3*-ITD был получен у 292 больных. Множественные мутации *FLT3*-ITD (более одного мутантного пика) выявлены у 124 (42,5%) из 292 больных, при этом среди этих мутантных клонов минорные клоны (АН < 5%) выявлены у 33% больных с множественными мутациями. Единственная вставка *FLT3*-ITD выявлена у 168 (57,5%) из 292 больных, частота выявления минорных клонов в этой группе составила 22% (37 из 168). Длина вставок варьировала от 3 до 314 п.н. У 47 больных наблюдали *FLT3*-ITD с АО более 1, что соответствует потере гетерозиготности, состоянию, при котором в опухолевых клетках гомологичный участок хромосомы, содержащий «дикий» аллель, утерян за счет моносомии, делеции, однородительской дисомии и т.д.

Полимеразная цепная реакция с двойной меткой с последующим фрагментным анализом (ПЦР-ФА с двойной меткой). В ПЦР-ФА с двойной меткой оба праймера, прямой и обратный, мечены разными флуорофорами FAM и R6G, поэтому каждая из 2 цепочек синтезированных продуктов амплификации ДНК также мечена

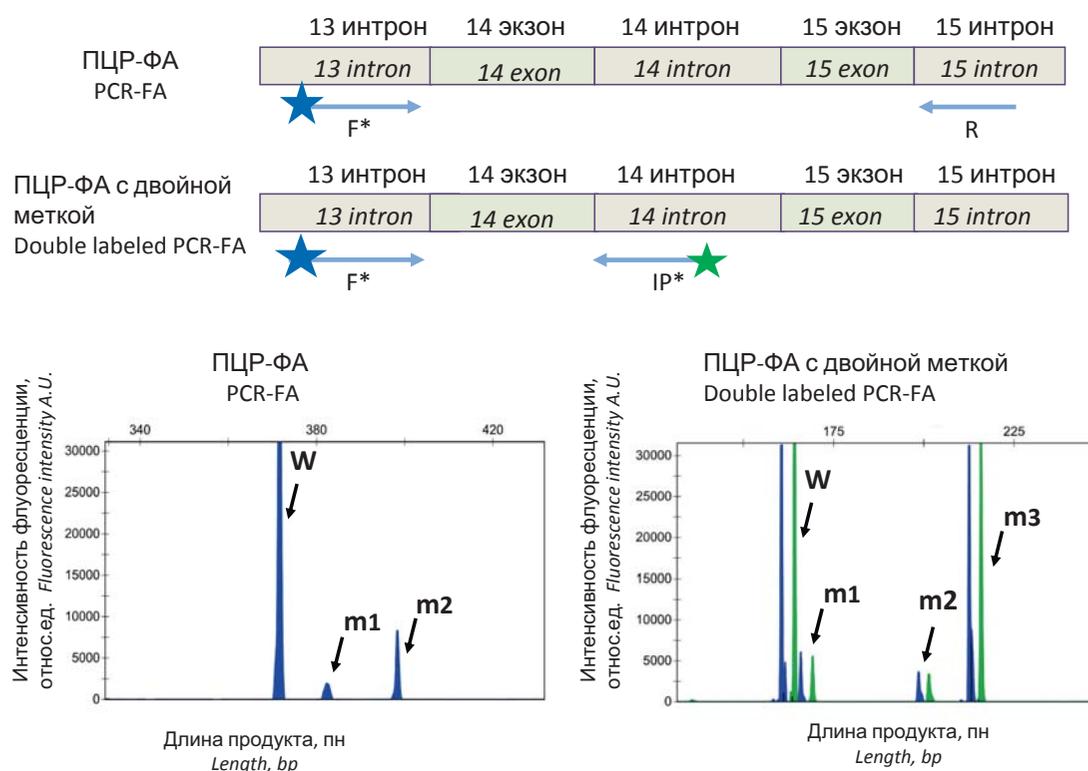


Рисунок 2. На схеме метода ПЦР-ФА показано расположение прямого (F*), меченого флуорофором FAM, и обратного (R) праймеров. На схеме ПЦР-ФА с двойной меткой показано расположение прямого (F*) и обратного (IP*) праймеров, меченых FAM (синий) и R6G (зеленый) флуорофорами соответственно. На электрофореграммах видны пики флуоресцентного сигнала ампликонов дикого (w) и мутантных (m) аллелей большей длины. Флуоресцентный сигнал продуктов ПЦР-ФА дает только синие пики (FAM), а при ПЦР-ФА с двойной меткой каждый продукт дает два пика (FAM и R6G), т.е. синий и зеленый сигнал, с разницей в 4 ± 1 нуклеотида

Figure 2. The diagram of the PCR-FA method shows the location of the forward (F*), labeled with the FAM fluorophore, and reverse (R) primers. The double-label PCR-FA diagram shows the location of the forward (F*) and reverse (IP*) primers labeled with FAM (blue) and R6G (green) fluorophores, respectively. The electropherograms below show peaks of the fluorescent signal of the amplicons of the wild (w) and mutant (m) alleles of greater length. The fluorescent signal of PCR-FA products gives only blue peaks (FAM), and with double-labeled PCR-FA, each product gives two peaks (FAM and R6G), i.e. blue and green signals, with a difference of 4 ± 1 nucleotides

разным красителем. FAM и R6G имеют различную массу, заряд и электрофоретическую подвижность, что дает разницу в длине продукта при капиллярном электрофорезе. На электрофореграмме видны два пика, синий (FAM) и зеленый (R6G), с разницей 4 п.н. ± 1, что увеличивает специфичность определения *FLT3*-ITD (рис. 2). При исследовании образцов 39 больных с выявленной методом ПЦР-ФА мутацией *FLT3*-ITD с помощью этого метода обнаружили большее количество вставок у 22 (56%) из 39 больных. Также были проанализированы 27 образцов костного мозга больных, относящихся к благоприятной группе риска по ELN 2017 [31] (мутация *NPM1* без *FLT3*-ITD), и 10, относящихся к промежуточной группе риска по ELN 2017 [31] (без мутации *NPM1* и без *FLT3*-ITD). ПЦР-ФА с двойной меткой позволил обнаружить мутацию дополнительно у 6 (16%) из 37 больных.

ПЦР методом тандемной дупликации (ТД-ПЦР). В основе метода — система из 8 пар праймеров/реакций, которые перекрывают возможную зону дупликации (рис. 3 А). В каждой паре прямой и обратный праймер комплементарны друг другу, и в случае отсутствия вставки *FLT3*-ITD ПЦР амплификация не происходит. Если есть дупликация *FLT3*, то один из праймеров «садится» на дублированный участок, что приводит к появлению ампликона, равного сумме длин вставки, и праймера (рис. 3 Б, В). При помощи капиллярного электрофореза и фрагментного анализа можно выя-

вить ампликон нужной длины. ТД-ПЦР применим только для больных, у которых длина вставки превышает 50 п.н. Это — 53% всех больных с мутациями *FLT3*-ITD. При вставках меньшей длины недостаточно места для посадки праймера, кроме того, амплификаты малой длины невозможно определить при капиллярном электрофорезе, так как они попадают в область димеров праймеров. Поскольку при таком виде анализа в реакцию амплификации вступает только опухолевая ДНК, содержащая вставку ITD, достигается высокая чувствительность метода, что позволяет определять МОБ у больных с мутацией *FLT3*-ITD. В отдельных экспериментах по 100/1000/10 000-кратным разведениям было показано, что чувствительность определения варьирует от больного к больному, зависит от длины вставки и эффективности праймеров и составляет 10^{-3} – 10^{-5} .

Всего исследовано 105 первичных образцов от больных ОМЛ с *FLT3*-ITD мутацией, наличие которой было доказано методом фрагментного анализа стандартными протоколами. МОБ определяли методом ТД-ПЦР у 65 больных. Пример определения МОБ представлен на рисунке 4.

Сравнение методов определения *FLT3*-ITD (ПЦР-ФА, ПЦР-ФА с двойной меткой, ТД-ПЦР, ВПС). Результаты определения аналитической чувствительности, т.е. предела обнаружения мутантного аллеля, методами ПЦР-ФА, ПЦР-ФА с двойной мет-

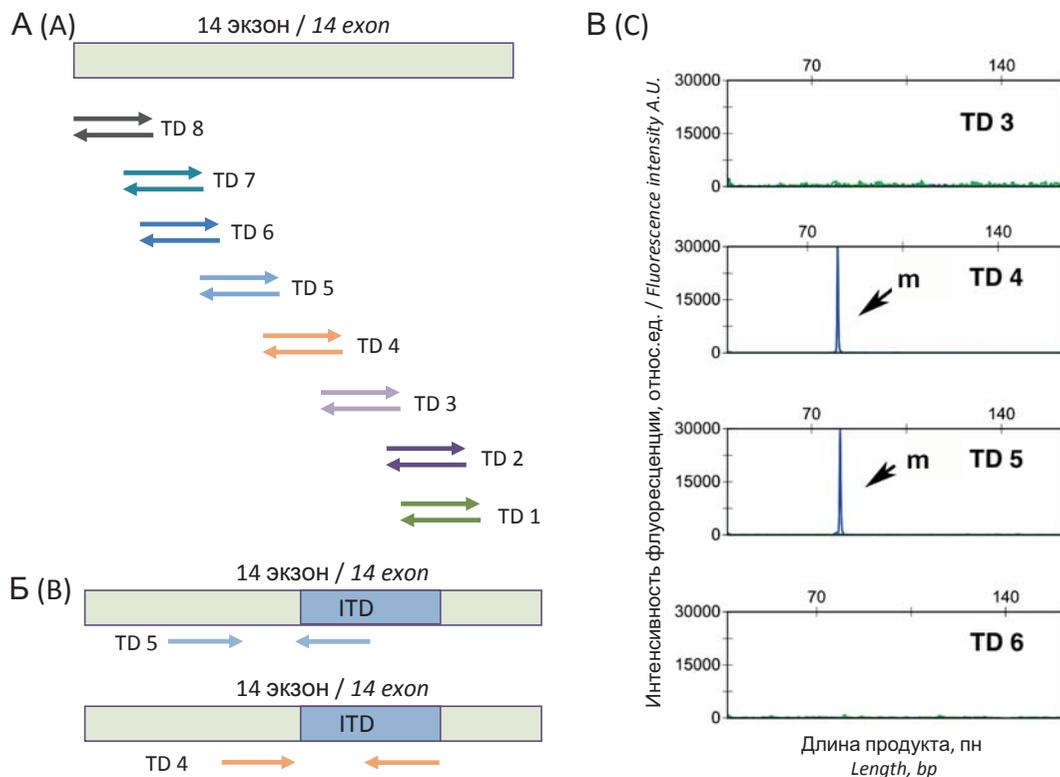


Рисунок 3. Метод ТД-ПЦР. Схематичное изображение мест посадки праймеров внутри 14 экзона (А). Пример посадки праймеров TD4 и TD5 у больного (Б) и соответствующая электрофореграмма (В), на которой стрелкой указан мутантный пик (m). Длина m соответствует длине ITD плюс длина праймера
Figure 3. TD-PCR method. Schematic representation of primer landing sites within exon 14 (A). An example TD 4 and TD5 primers binding in a patient (B) and the corresponding electropherogram, in which the arrow indicates the mutant peak (m) (C). The length of m corresponds to the length of the ITD plus the length of the primer

кой, ТД-ПЦР, представлены на рисунке 5. При серийном двукратном разведении ДНК больного со вставкой длиной 57 п. н. (АН 5%, концентрация ДНК = 230 нг/мкл) в ДНК здорового донора (концентрация ДНК = 230 нг/мкл) в случае ПЦР-ФА с двойной меткой мутантный пик определялся при процентном содержании опухолевой ДНК 0,16%; помимо этого, были обнаружены дополнительные субклоны. Для ПЦР-ФА это значение составило 0,31%. Таким образом, ПЦР-ФА с двойной меткой обладает большей чувствительностью по сравнению со стандартным ПЦР-ФА, что можно объяснить меньшей длиной продукта и большей специфичностью при определении ИТД.

Определение чувствительности в этой работе носит сравнительный характер. Чем длиннее определяемая вставка, тем ниже будет чувствительность определения у обеих методик. ТД-ПЦР показал наибольшую чувствительность, в этих серийных разведениях не был достигнут предел чувствительности. Чувствительность ВПС не определяли, однако наименьший размер АН составил 1%. Метод ВПС нельзя использовать для первичной диагностики, т.к. результат по выявлению *FLT3*-ИТД непредсказуем. При множественных вставках (более одной) методом ВПС было обнаружено меньшее количество вставок у 60 (41%) из 146 больных, не обнаружены вставки у 7

(5%) из 146 больных. При этом значение ВПС сложно переоценить, т.к. только этот метод позволяет точно выявить длину, последовательность и место вставки. Методы ФА в большинстве случаев не определяли точную длину вставок, в 90% случаев различия с ВПС по длине вставок попадали в диапазон ± 3 нуклеотида, при этом наибольшие различия наблюдались у больных с длинными (более 80 нуклеотидов) и короткими (менее 20 нуклеотидов) вставками.

Сравнение методов определения FLT3-ТКД (аллель-специфичной ПЦР и ВПС). Поскольку наибольшее количество точечных соматических мутаций в области ТКД располагаются в кодоне D835, был разработан метод АС-ПЦР, который позволяет выявить наиболее частые аминокислотные замены D835Y и D835H. Из 1481 больных, проанализированных методом АС-ПЦР, мутации ТКД были выявлены только у 58 больных. Для расширения спектра мутаций и исследуемой области (ТКД1 + ТКД2) был применен метод ВПС у 82 неселектированных больных ОМЛ. Методом ВПС у 16 (19,5%) из 82 больных были выявлены мутации *FLT3*-ТКД, тогда как методом АС-ПЦР только у 5 из 82 (6,1%) (табл. 3). У 6 (37,5%) из 16 больных методом ВПС были выявлены множественные мутации *FLT3*-ТКД. Обращает на себя внимание наличие клонов/субклонов с малой аллельной нагрузкой (<5%) у 9 (56%) из 16 больных.

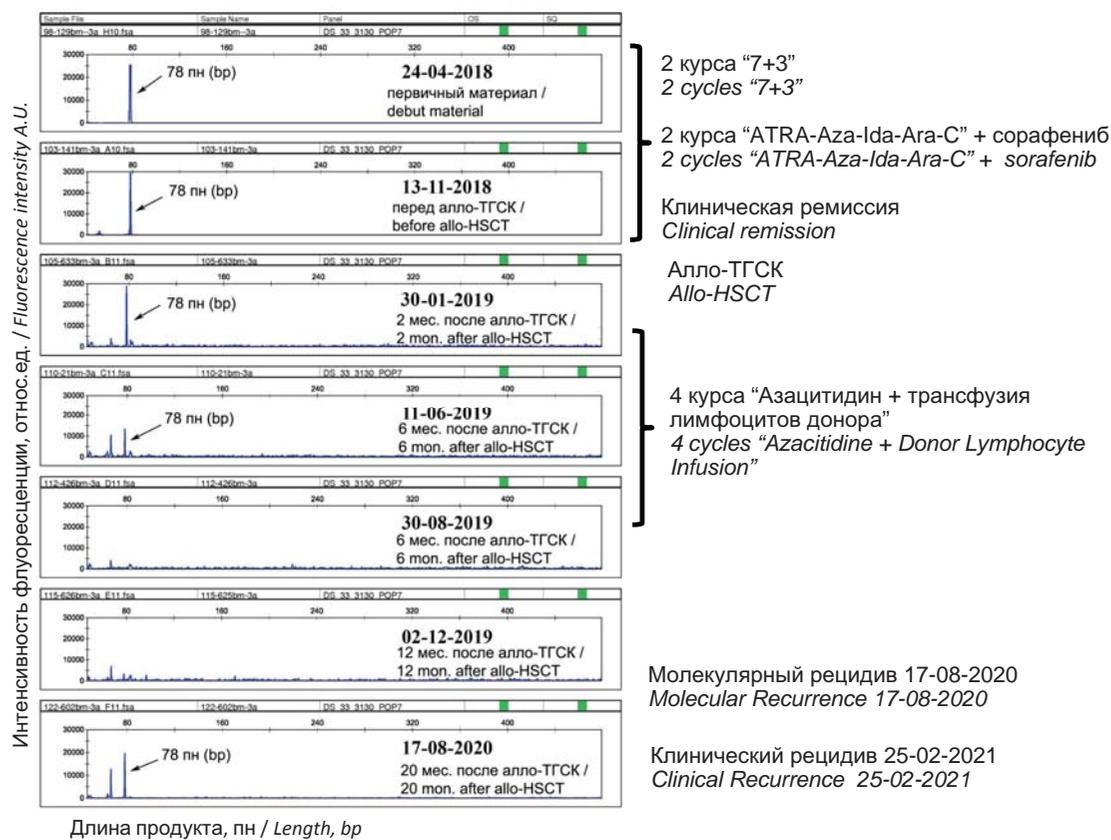


Рисунок 4. Пример определения МОБ методом ТД-ПЦР у больной О., 22 года, с диагнозом ОМЛ. На электрофореграммах стрелкой указан пик мутантного аллеля длиной 78 п. н. Справа представлены этапы лечения и основные события

Figure 4. Example of MRD determination using TD-PCR in patient O., 22 years old, diagnosed with AML. In the electropherograms, the arrow indicates the peak of the mutant allele, 78 bp long. The stages of treatment and main events are shown on the right

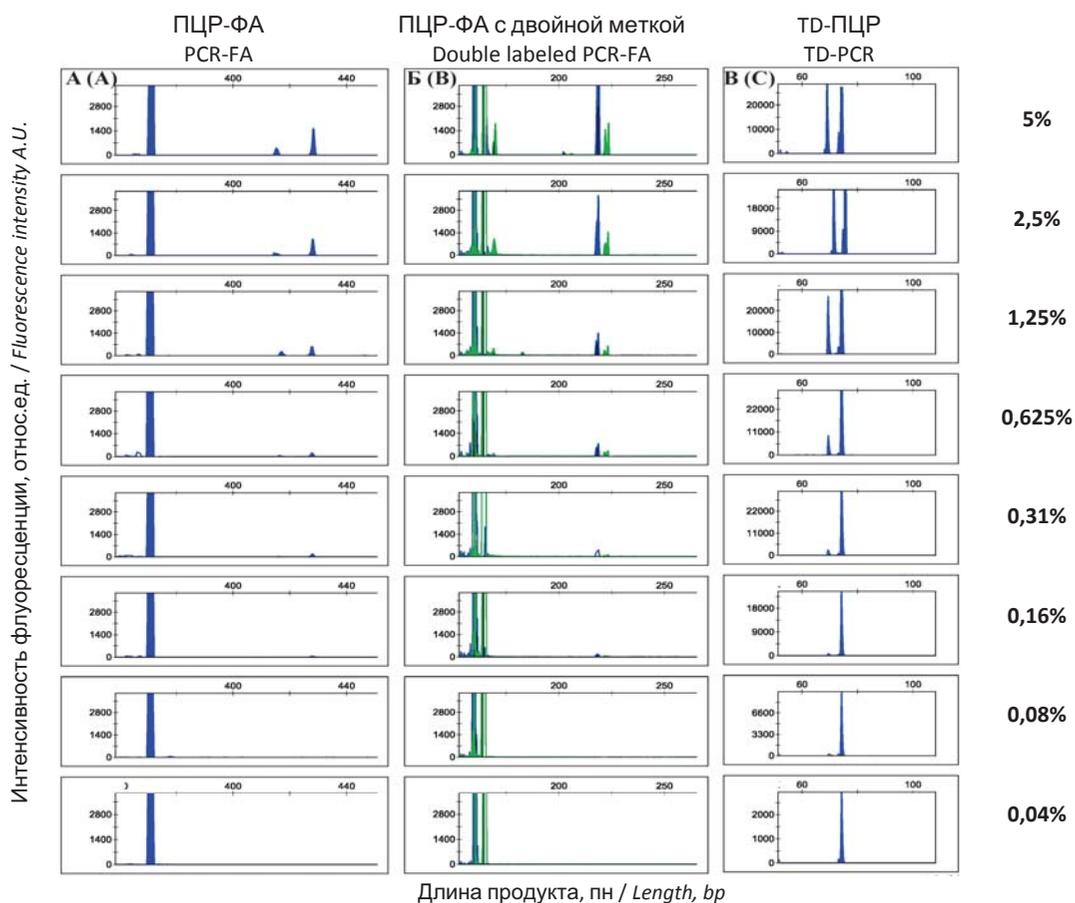


Рисунок 5. Результаты измерения аналитической чувствительности методами ПЦР-ФА (А), ПЦР-ФА с двойной меткой (Б), ТД-ПЦР (В). Представлены серийные двукратные разведения ДНК больного с ITD длиной 57 п. н. в ДНК здорового донора

Figure 5. Results of analytical sensitivity measuring using PCR-FA (A), double labeled PCR-FA (B), and TD-PCR (C). Serial 2-fold dilutions of patient DNA with a 57 bp ITD in the DNA of a healthy donor are shown

Интерес представляют больные, у которых *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD мутации были выявлены одновременно, т. к. мутации в TKD домене могут стать причиной резистентности к ингибиторам тирозинкиназ. В обследованной когорте было 8 (9,3%) из 86 больных с одновременным выявлением мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD, при этом общая выявляемость мутаций *FLT3*-ITD составила 35 (40,7%) из 86. Таким образом, почти четверть больных с мутацией *FLT3*-ITD могут иметь точечные соматические мутации в доменах TKD1/TKD2.

Обсуждение

В соответствии с отечественными и зарубежными клиническими рекомендациями всем больным с *de novo* ОМЛ или при рецидиве ОМЛ необходимо провести исследование на *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD в кратчайшие сроки для определения прогноза и тактики терапии, решения вопроса о назначении ингибиторов тирозинкиназ [31–34]. Независимо от возраста, величины АО, типа мутации (*FLT3*-ITD или *FLT3*-TKD), первичного или рецидивного/резистентного статуса, наличия или отсутствия мутации *NPM1* назначение ингибиторов тирозинкиназ как в качестве монотерапии, так и в сочетании с химиотерапией, гипометилирующей

или таргетной терапией улучшает прогноз больного [11, 35–37].

Доказанные преимущества ингибиторов тирозинкиназ стали ключевым моментом пересмотра ELN рекомендаций в 2022 г. [37]. В рекомендациях ELN 2017 [20] важную роль играла оценка АО *FLT3*-ITD при определении прогноза и группы риска [20]. В ELN 2022 г. [37] все больные с *FLT3*-ITD, независимо от АО, с отсутствием благоприятных или неблагоприятных генетических аномалий попадают в группу промежуточного риска [37]. Это не отменяет необходимости определять АО при выявлении *FLT3*-ITD, т. к. величина АО позволяет принимать решения, например, относительно проведения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) в первой ремиссии [38–41].

Для увеличения чувствительности на любых этапах диагностики ОМЛ рекомендуется использовать пунктат костного мозга, а не периферическую кровь [31–34, 42]. В рекомендациях ELN 2017 г. [20] и в большинстве исследований рекомендуется использовать для тестирования мутаций *FLT3* ДНК, а не РНК, т. к. только материал ДНК позволяет правильно определить величину АО, которая будет иметь клиническое значение [20, 32, 38–43]. «Золотым стандартом» оп-

Таблица 3. Результаты тестирования мутаций *FLT3* и характеристика больных с выявленными точечными мутациями в домене TKD методом ВПС

Table 3. Results of *FLT3* mutations testing and characteristics of patients with point mutations in the TKD domain identified by NGS

№	<i>FLT3</i> -ITD ПЦР-ФА (ΔH%) PCR-FA (VAF%)	<i>FLT3</i> -TKD АС-ПЦР AS-PCR	<i>FLT3</i> -TKD ВПС (ΔH%) NGS (VAF%)	Группа прогноза по ELN 2017 [20] и данные молекулярно-генетического тестирования <i>Prognosis group (ELN 2017 [20]) and molecular genetic testing data</i>
1	-	-	p.D835V (1,2)	Благоприятная с мутированным NPM1 и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1 and normal karyotype</i>
2	3	+	p.D835H (4,9)	Благоприятная с мутированным NPM1, FLT3-ITD (AO < 0,5) и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1, FLT3-ITD (AR < 0.5) and normal karyotype</i>
			p.A680V (1,9)	
3	44	-	p.A680V (1)	Промежуточная (del 7q) <i>Intermediate (del 7q)</i>
4	-	-	p.N841K (2)	Неблагоприятная (t (3;5)) <i>Adverse (t (3;5))</i>
			p.N676K (10,4)	
5	-	+	p.K623I (31)	Промежуточная без мутированного NPM1 и без FLT3-ITD, нормальный кариотип <i>Intermediate without NPM1, without FLT3-ITD, normal karyotype</i>
			p.D839G (9,8)	
			p.D835Y (3)	
6	-	+	p.D835H (2,6)	Благоприятная с мутированным NPM1 и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1 and normal karyotype</i>
7	36	+	p.D835H (32)	Благоприятная с мутированным NPM1, FLT3-ITD (AO < 0,5) и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1, FLT3-ITD (AR < 0.5) and normal karyotype</i>
8	2	-	p.N676K (1,8)	Нет информации <i>No data</i>
			p.D835E (1,7)	
9	-	-	p.D835E (16,7)	Промежуточная без мутированного NPM1 и без FLT3-ITD, при кариотипировании нет митозов <i>Intermediate without NPM1 and without FLT3-ITD, karyotyping — no mitosis</i>
10	-	-	p.M664I (40,9)	Неблагоприятная (t (6;11), del 7q) <i>Adverse (t (6;11), del 7q)</i>
11	39	-	p.N676K (12,6)	Промежуточная с FLT3-ITD и трисомия 8,10 <i>Intermediate with FLT3-ITD and trisomy 8,10</i>
12	-	-	p.D839A (40)	Благоприятная с мутированным NPM1 и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1 and normal karyotype</i>
13	2	-	p.D835_M837delinsAAL (3,4)	Промежуточная с FLT3-ITD и нормальным кариотипом <i>Intermediate with FLT3-ITD and normal karyotype</i>
14	-	+	p.D835E (2,4)	Благоприятная с RUNX1-RUNXT1; t (8;21) <i>Favorable with RUNX1-RUNXT1; t (8;21)</i>
			p.D835Y (1,5)	
			p.N676K (1,7)	
			p.N676T (6,4)	
			p.M664I (10,3)	
15	1,8	-	p.N676K (26,8)	Благоприятная с мутированным NPM1, FLT3-ITD (AO < 0,5) и нормальным кариотипом <i>Favorable with mutated NPM1, FLT3-ITD (AR < 0.5) and normal karyotype</i>
16	8	-	p.D835E (28,4)	Неблагоприятная с FLT3-ITD, мутированным RUNX1 и трисомией 8 <i>Adverse with FLT3-ITD, mutated RUNX1 and trisomy 8</i>
			p.N676K (11,7)	

Примечания: “-” не выявлено мутаций, “+” выявлено.

Notes: “-” mutations not identified, “+” identified.

ределения мутаций *FLT3* считается ФА методом капиллярного электрофореза (КЭ), который позволяет не только анализировать *FLT3*-ITD и определять АО, но и при применении сайт-специфических эндонуклеаз (рестриктаз) определять мутации *FLT3*-TKD в кодонах 835–836 [32, 42–44]. С тех пор как К. М. Murphy и соавт. в 2003 г. предложили этот метод, он практически не претерпел изменений [44].

Также используется ФА-КЭ при исследовании *FLT3*-ITD. Из преимуществ метода можно отметить надежность, быстроту проведения исследования, относительно низкую стоимость, возможность определения размера вставки и аллельного отношения. Существуют сложности при интерпретации пиков с небольшой аллельной нагрузкой (менее 1–2%), которые могут быть сравнимы с капиллярным базовым шумом. Высокая специфичность и чувствительность исследования достигается выполнением в повторах. Альтернативой ФА-КЭ является ФА методом гель-электрофореза, однако этот метод обладает меньшей чувствительностью, не позволяет измерить АО и визуализировать вставки небольшого размера [42, 45].

М. Sakaguchi и соавт. [42] определили, что для мутаций *FLT3*-ITD порог обнаружения при проведении гель-электрофореза колеблется в диапазоне АО от 0,034 до 0,072 (что эквивалентно АН от 3,3 до 6,7%), а при проведении ФА-КЭ АО = 0,017 (эквивалентно АН = 1,7%). Вследствие перечисленных выше причин преимущество получил именно ФА-КЭ, хотя гель-электрофорез все еще используется. В настоящей работе установили бóльшую чувствительность ФА (АН = 0,31%), но чувствительность определения зависит от многих параметров: исходного количества и качества ДНК, длины мутантного аллеля (чем больше размер вставки *FLT3*-ITD, тем ниже чувствительность определения), степени разведения продукта при проведении КЭ, прибора для КЭ и приборного программного обеспечения.

В диагностике *FLT3*-ITD применяют и различные модификации ПЦР. Например, ПЦР методом тандемной дубликации, дельта ПЦР, ПЦР с двойной меткой [24, 25, 46]. Метод дельта ПЦР предполагает использование двух обратных меченых разными флуорофорами праймеров, нуклеотидная разница в расположении которых (дельта), обуславливает появление 2 пиков с разницей в дельта п. н. для 1-го мутантного клона на ФА [46]. В настоящей работе был применен принцип дельта, однако использовали не 2 обратных праймера, а флуорофоры FAM и R6G на прямом и обратном праймерах, разная масса и электрофоретическая подвижность которых, аналогично, обуславливает появление двух пиков у одного мутантного аллеля с дельтой 4 п. н. Такой подход обеспечил бóльшую специфичность и чувствительность (АН = 0,16%) при определении *FLT3*-ITD. В нашей работе метод ПЦР-ФА с двойной меткой позволил выявить большее количество вставок

у 22 (56%) из 39 больных с *FLT3*-ITD, а также обнаружить вставки, которые не были обнаружены методом ПЦР-ФА у 16% (6 из 37) больных в без первично выявленной мутации *FLT3*-ITD из благоприятной (с мутацией *NPM1* без *FLT3*-ITD) и промежуточной (без мутаций *NPM1* и *FLT3*-ITD) группы риска ELN.2017 [20].

По данным литературы [10, 47, 48], множественные вставки *FLT3*-ITD (более 2) выявляются у 22–35% больных ОМЛ, что не влияет на прогноз и эффективность терапии ингибиторами тирозинкиназ. В случае применения метода ПЦР с двойной меткой обнаружили существенно большее количество больных с множественными вставками. У 8% больных смогли объяснить появление дополнительных пиков близким расположением обратного праймера и попаданием места его посадки на вставки *FLT3*-ITD.

Гораздо интересней возможность выявления бóльшего числа больных с *FLT3*-ITD при первичном тестировании. В настоящем исследовании это 16% от больных с нормальным кариотипом, у которых *FLT3*-ITD не была выявлена стандартным методом ПЦР-ФА, но была выявлена методом ПЦР-ФА с двойной меткой. У этих больных есть шанс улучшить прогноз за счет добавления ингибиторов тирозинкиназ. По литературным данным [49, 50], у 20–40% больных ОМЛ при развитии рецидивов изменяется мутационный статус *FLT3*: изменяется состав (длина и количество) вставок ITD, теряются или приобретаются мутации ITD/TKD.

В настоящей работе у 3 больных, у которых новые мутации *FLT3*-ITD выявлены уже при развитии рецидива, при пересмотре материала, полученного в дебюте ОМЛ, были обнаружены данные клоны с применением дополнительных методов ТД-ПЦР и ПЦР-ФА с двойной меткой. Таким образом, используя только метод ПЦР-ФА, можно недооценить количество вставок *FLT3*-ITD у больных ОМЛ. Множественность вставок и различная АН соответствующих мутаций поддерживают тот факт, что у значительной части больных мутации *FLT3* представляют собой позднее онкогенное событие. Изменчивость *FLT3*-ITD и отсутствие стандартизируемых методик не позволяет использовать мутацию как единственный маркер МОБ [51].

Если учесть особую устойчивость клонов с мутациями *FLT3*-ITD, то, очевидно, что отслеживание этой мутации во время проведения терапии играет важную роль, и многие исследования поддерживают клиническую ценность определения МОБ при *FLT3*-позитивном ОМЛ [52–54]. Для определения МОБ в настоящей работе был применен метод ТД-ПЦР. Высокая чувствительность ТД-ПЦР достигается тем, что в реакцию ПЦР вступают только аллели со вставками ITD, но не «дикий» аллель. Этот метод как единственный не применим для первичной диагностики, однако может оказать помощь при верификации клонов с экс-

тремально низкой АН, менее 1%, или с длинными вставками ITD. Преимуществом ТД-ПЦР является применение стандартной, а не пациент-специфичной панели праймеров, что делает метод простым и легко используемым в клинической практике. Необходимо, однако, учитывать нюансы: возможность применения только у больных со вставками более 50 п.н., вариативность чувствительности 10^{-3} – 10^{-5} , невозможность количественного ответа и затруднения в интерпретации при множественных вставках или появлении новых вставок в ходе определения МОБ.

В большом количестве работ показано успешное использование ВПС для поиска *FLT3*-ITD и определения МОБ [53–66]. Ограничения ВПС: высокая стоимость исследования, продолжительность до 20–30 дней, неточность подсчета АО, возможность получения ложноотрицательных результатов. Последние два пункта связаны с особенностями биоинформатической обработки данных ВПС при поиске инсерций и делеций и пока труднопреодолимы, несмотря на применение различных алгоритмов анализа [55–59]. В настоящей работе выявили вставки *FLT3*-ITD методом ВПС только у 95% положительных больных. При этом только метод ВПС позволяет точно определить место, длину и последовательность вставки/вставок ITD.

Последние годы активно изучается вопрос о том, какую прогностическую роль играют размер и место вставки ITD. Большой размер вставки либо негативно влияет на прогноз [60, 61], либо не оказывает влияния [10, 48, 62]. Многие исследователи считают, что место вставки играет важную прогностическую роль. По результатам исследований [63–65], у больных со вставками в TKD1 домене хуже прогноз по сравнению с теми, у которых вставки в JMD домене. Данные исследования RATIFY, в котором проведен анализ 452 больных, получавших мидостаурин против плацебо, показали, что у больных со вставкой в TKD1 домене не только хуже прогноз, но также в этой группе не был получен положительный эффект от мидостаурина [65].

Размер *FLT3*-ITD значимо коррелировал с местом мутации: чем более С-концевым является ITD, тем длиннее вставка [65, 66]. ВПС — идеальный метод для обнаружения именно однонуклеотидных замен. В настоящем исследовании обнаружили точечные соматические замены в доменах TKD1 и TKD2 у 16 (19,5%) из 82 больных ОМЛ, тогда как стандартная методика АС-ПЦР, рассчитанная на выявление мутаций в D835Y/H, — только у 4 (4,9%) из 82 больных.

Точечные соматические мутации *FLT3*-TKD, так же как мутации *FLT3*-ITD, являются поздними онкогенными событиями, демонстрируя у многих больных множественность и небольшую АН, а также могут сочетаться с любыми генетическими изменениями и встречаться в любой прогностической группе ELN. Интерес к мутациям *FLT3*-TKD в последние годы вырос значи-

тельно, поскольку приобретение некоторых из них вызывает резистентность к ингибиторам тирозинкиназ [67]. В случаях рецидива после лечения квизартинибом больных с *FLT3*-ITD-положительным ОМЛ сообщалось о вторичных мутациях в позициях D835, Y842, F691 [68]. Нуклеотидные замены в кодоне F691, так называемом «привратниковом» кодоне, в большинстве исследований признаны причиной мультирезистентности к ингибиторам тирозинкиназ [69–73]. В когорте первичных больных не было обнаружено мутаций в кодоне F691, зато у 6 (7,3%) из 82 больных обнаружена мутация в кодоне N676. Аналогичные результаты получены в исследовании F. G. Rücker и соавт. [65] на большей выборке больных; у 10 (3,6%) из 275 больных имелась мутация N676K. G. W. Roloff и соавт. [74] показали, что у больных с *FLT3*-ITD и N676K мутациями не обнаружена резистентность к мидостаурину и гилтеритинибу. Таким образом, ведутся активные поисковые исследования в данной области, неосуществимые без применения ВПС.

При проведении настоящей работы стало очевидно, что чем больше методов применяется, тем более информативным оказывается исследование мутаций *FLT3*. Гетерогенность и минорные клоны *FLT3*-ITD у большинства больных, широкий спектр точечных соматических мутаций в TKD1 и TKD2 доменах ставят новые задачи диагностики, не решаемые без внедрения новых методов. Все это позволяет сформулировать рекомендации по молекулярно-генетической диагностике мутаций *FLT3*.

1) Для исследования мутаций *FLT3* надо использовать материал ДНК, выделенный из клеток костного мозга. Только при отсутствии возможности выполнить пункцию (в случае «сухого пунктата») можно использовать периферическую кровь с количеством бластных клеток не менее 20%.

2) Всем больным ОМЛ необходимо выполнить исследование на наличие мутаций *FLT3*-ITD и *FLT3*-TKD при первичной диагностике в кратчайшие сроки для решения вопроса о назначении мидостаурина или других ингибиторов тирозинкиназ. У больных с рецидивом или резистентным течением ОМЛ должны быть выполнены повторные тесты.

3) Для первичной диагностики *FLT3*-ITD рекомендуется применять метод ПЦР с фрагментным анализом (капиллярным электрофорезом) с праймерами, перекрывающими область возможной вставки ITD от начала 14 экзона до конца 15 экзона. При этом технические условия капиллярного электрофореза должны позволять выявлять вставки большой длины (200–300 п.н.). Капиллярный электрофорез обладает должной чувствительностью и специфичностью (при выполнении в повторях) и позволяет осуществить подсчет аллельного отношения. Прочие методы электрофореза (агарозный, полиакриламидный) не позволяют точно определить

длину мутантного аллеля и вычислить АО, поэтому применяют их только при отсутствии возможности выполнить капиллярный электрофорез.

4) Рекомендуется у всех больных с выявленной мутацией рассчитывать величину аллельного отношения *FLT3*-ITD, что необходимо для принятия взвешенных клинических решений.

5) Ингибиторы тирозинкиназ должны назначаться при любой аллельной нагрузке *FLT3*-ITD, поэтому для увеличения специфичности первичной диагностики рекомендуется выполнять исследования в повторях, а также при вставках с небольшой аллельной нагрузкой, менее 2%, желателен применять дополнительные верифицирующие методы: ВПС, метод с двойной меткой и другие.

6) Прочие методы первичной диагностики *FLT3*-ITD, такие как ПЦР-ФА с двойной меткой, дельта ПЦР-ФА, ТД-ПЦР и другие, могут дать дополнительные сведения о вставках с небольшой аллельной нагрузкой или длинных вставках.

7) Применение ВПС для определения *FLT3*-ITD оправдано только в узких исследовательских целях: определение места, размера вставки ITD и ее нуклеотидного состава.

Литература

1. Kazi J.U., Rönstrand L. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev.* 2019; 99(3): 1433–66. DOI: 10.1152/physrev.00029.2018.
2. Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment. *Oncol. Rev.* 2012; 6: e8. DOI: 10.4081/oncol.2012.e8.
3. Kiyoi H., Naoe T. FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43(8): 1541–7. DOI: 10.1080/1042819021000002866.
4. Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1999; 33(1–2): 83–91. DOI: 10.3109/10428199909093728.
5. Schneider F., Hoster E., Schneider S., et al. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML) *Ann. Hematol.* 2012; 91: 9–18. DOI: 10.1007/s00277-011-1280-6.
6. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L., et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374: 2209–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.
7. Ley T.J., Miller C., Ding L., et al. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 2059–74. DOI: 10.1056/nejmoa1301689.
8. Kayser S., Schlenk R.F., Londono M.C., et al. German-Austrian AML Study Group (AMLSG). Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood.* 2009; 114(12): 2386–92. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209999.
9. Fröhling S., Schlenk R.F., Breitnick J., et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML Study Group Ulm. *Blood.* 2002; 100: 4372–80. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1440.
10. Gale R.E., Green C., Allen C., et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large

8) Определение МОБ — важнейшее исследование, влияющее на принятие решений при терапии ОМЛ. Метод ТД-ПЦР позволяет определить МОБ при вставках длиной более 50 п.н., т.е. примерно у половины больных. Для ТД-ПЦР применяют стандартную (не пациент-специфичную) панель праймеров, что делает метод простым и легко применимым. Необходимо учитывать нюансы: вариативность чувствительности 10^{-3} – 10^{-5} , невозможность количественного ответа и затруднения в интерпретации при множественных вставках или появлении новых вставок в ходе определения МОБ.

9) Для первичной диагностики *FLT3*-TKD можно использовать методы аллель-специфичной ПЦР или ПЦР с последующим электрофоретическим анализом рестрикционных фрагментов, которые позволяют быстро осуществить анализ и выявить мутации в 835–836 кодонах *FLT3*.

10) При назначении ингибиторов тирозинкиназ для поиска мутаций, отвечающих за резистентность, рекомендуется дополнительно выполнить секвенирование ТКД регионов (16–17 и 20 экзоны), при этом метод ВПС предпочтителен, так как выявляет мутантные клоны с чувствительностью 1% и более.

References

1. Kazi J.U., Rönstrand L. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev.* 2019; 99(3): 1433–66. DOI: 10.1152/physrev.00029.2018.
2. Grafone T., Palmisano M., Nicci C., Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: Biology and treatment. *Oncol. Rev.* 2012; 6: e8. DOI: 10.4081/oncol.2012.e8.
3. Kiyoi H., Naoe T. FLT3 in human hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43(8): 1541–7. DOI: 10.1080/1042819021000002866.
4. Drexler HG, Meyer C, Quentmeier H. Effects of FLT3 ligand on proliferation and survival of myeloid leukemia cells. *Leuk Lymphoma.* 1999; 33(1–2): 83–91. DOI: 10.3109/10428199909093728.
5. Schneider F., Hoster E., Schneider S., et al. Age-dependent frequencies of NPM1 mutations and FLT3-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML) *Ann. Hematol.* 2012; 91: 9–18. DOI: 10.1007/s00277-011-1280-6.
6. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L., et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374: 2209–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.
7. Ley T.J., Miller C., Ding L., et al. The Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 2059–74. DOI: 10.1056/nejmoa1301689.
8. Kayser S., Schlenk R.F., Londono M.C., et al. German-Austrian AML Study Group (AMLSG). Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood.* 2009; 114(12): 2386–92. DOI: 10.1182/blood-2009-03-209999.
9. Fröhling S., Schlenk R.F., Breitnick J., et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: A study of the AML Study Group Ulm. *Blood.* 2002; 100: 4372–80. DOI: 10.1182/blood-2002-05-1440.
10. Gale R.E., Green C., Allen C., et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large

- cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111: 2776–84. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090.
11. Stone R.M., Mandrekar S.J., Sanford B.L., et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377: 454–64. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359.
 12. Perl A.E., Martinelli G., Cortes J.E., et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N. Engl. J. Med.* 2019; 381: 1728–40. DOI: 10.1056/NEJMoa1902688.
 13. Badar T., Kantarjian H.M., Nogueras-Gonzalez G.M., et al. Improvement in clinical outcome of FLT3 ITD mutated acute myeloid leukemia patients over the last one and a half decade. *Am J Hematol.* 2015; 90(11): 1065–70. DOI: 10.1002/ajh.24140.
 14. Oñate G., Pratcorona M., Garrido A. et al. Survival improvement of patients with FLT3 mutated acute myeloid leukemia: results from a prospective 9 years cohort. *Blood Cancer J.* 2023; 13: 69. DOI: 10.1038/s41408-023-00839-1.
 15. Daver N., Schlenk R.F., Russell N.H., Levis M.J. Targeting FLT3 mutations in AML: Review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* 2019; 33: 299–312. DOI: 10.1038/s41375-018-0357-9.
 16. Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001; 97: 2434–9. DOI: 10.1182/blood.V97.8.2434.
 17. 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: 2527–37. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091215.
 18. Li S., Li N., Chen Y., et al. FLT3-TKD in the prognosis of patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Front Oncol.* 2023; 13: 1086846. DOI: 10.3389/fonc.2023.1086846.
 19. Eguchi M., Minami Y., Kuzume A., Chi S. Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines.* 2020; 8(8): 245. DOI: 10.3390/biomedicines8080245.
 20. Döhner 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: 424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
 21. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни у больных В-клеточным хроническим лимфолейкозом методом пациент-специфичной ПЦР. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2011; 12: 22–35.
 22. Yokota S., Kiyoi H., Nakao M., et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia.* 1997; 11(10): 1605–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2400812.
 23. Brownstein M.J., Carpten J.D., Smith J.R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques.* 1996; 20(6): 1004–10. DOI: 10.2144/96206st01.
 24. Lin M.T., Tseng L.H., Beierl K., et al. Tandem duplication PCR: an ultrasensitive assay for the detection of internal tandem duplications of the FLT3 gene. *Diagn Mol Pathol.* 2013; 22(3): 149–55. DOI: 10.1097/PDM.0b013e31828308a1.
 25. Lin M.T., Tseng L.H., Dudley J.C., et al. A Novel Tandem Duplication Assay to Detect Minimal Residual Disease in FLT3/ITD AML. *Mol Diagn Ther.* 2015; 19(6): 409–17. DOI: 10.1007/s40291-015-0170-3.
 26. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
 27. Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010; 26: 589–95. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698.
 - cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008; 111: 2776–84. DOI: 10.1182/blood-2007-08-109090.
 11. Stone R.M., Mandrekar S.J., Sanford B.L., et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377: 454–64. DOI: 10.1056/NEJMoa1614359.
 12. Perl A.E., Martinelli G., Cortes J.E., et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. *N. Engl. J. Med.* 2019; 381: 1728–40. DOI: 10.1056/NEJMoa1902688.
 13. Badar T., Kantarjian H.M., Nogueras-Gonzalez G.M., et al. Improvement in clinical outcome of FLT3 ITD mutated acute myeloid leukemia patients over the last one and a half decade. *Am J Hematol.* 2015; 90(11): 1065–70. DOI: 10.1002/ajh.24140.
 14. Oñate G., Pratcorona M., Garrido A. et al. Survival improvement of patients with FLT3 mutated acute myeloid leukemia: results from a prospective 9 years cohort. *Blood Cancer J.* 2023; 13, 69. DOI: 10.1038/s41408-023-00839-1.
 15. Daver N., Schlenk R.F., Russell N.H., Levis M.J. Targeting FLT3 mutations in AML: Review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* 2019; 33: 299–312. DOI: 10.1038/s41375-018-0357-9.
 16. Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001; 97: 2434–9. DOI: 10.1182/blood.V97.8.2434.
 17. 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: 2527–37. DOI: 10.1182/blood-2007-05-091215.
 18. Li S., Li N., Chen Y., et al. FLT3-TKD in the prognosis of patients with acute myeloid leukemia: A meta-analysis. *Front Oncol.* 2023; 13: 1086846. DOI: 10.3389/fonc.2023.1086846.
 19. Eguchi M., Minami Y., Kuzume A., Chi S. Mechanisms Underlying Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia. *Biomedicines.* 2020; 8(8): 245. DOI: 10.3390/biomedicines8080245.
 20. Döhner 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: 424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
 21. Sidorova Yu.V., Sorokina T.V., Biderman B.V., et al. The detection of minimal residual disease in patients with chronic B-cell lymphatic leukemia using patient-specified polymerase chain reaction. *Klinicheskaya I Laboratornaya Diganostika.* 2011; 12: 22–35 (In Russian).
 22. Yokota S., Kiyoi H., Nakao M., et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia.* 1997; 11(10): 1605–9. DOI: 10.1038/sj.leu.2400812.
 23. Brownstein M.J., Carpten J.D., Smith J.R. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques.* 1996; 20(6): 1004–10. DOI: 10.2144/96206st01.
 24. Lin M.T., Tseng L.H., Beierl K., et al. Tandem duplication PCR: an ultrasensitive assay for the detection of internal tandem duplications of the FLT3 gene. *Diagn Mol Pathol.* 2013; 22(3): 149–55. DOI: 10.1097/PDM.0b013e31828308a1.
 25. Lin M.T., Tseng L.H., Dudley J.C., et al. A Novel Tandem Duplication Assay to Detect Minimal Residual Disease in FLT3/ITD AML. *Mol Diagn Ther.* 2015; 19(6): 409–17. DOI: 10.1007/s40291-015-0170-3.
 26. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 2014; 30: 2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
 27. Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010; 26: 589–95. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698.

28. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25: 2078–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
29. Lai Z., Markovets A., Ahdesmaki M., et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227.
30. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38: e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603.
31. Клинические рекомендации № 131 «Острые миелоидные лейкозы». URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/131_1.
32. Bergeron J., Capo-Chichi J.M., Tsui H., et al. The Clinical Utility of FLT3 Mutation Testing in Acute Leukemia: A Canadian Consensus. *Curr Oncol*. 2023; 30(12): 10410–36. DOI: 10.3390/currncol30120759.
33. Cortes J.E., Tallman M.S., Schiller G.J., et al. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood*. 2018; 132(6): 598–607. DOI: 10.1182/blood-2018-01-821629.
34. Larson R.A., Mandrekar S.J., Huebner L.J., et al. Midostaurin reduces relapse in FLT3-mutant acute myeloid leukemia: the Alliance CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia*. 2021; 35(9): 2539–51. DOI: 10.1038/s41375-021-01179-4.
35. Döhner H., Weber D., Krzykalla J., et al. Midostaurin plus intensive chemotherapy for younger and older patients with AML and FLT3 internal tandem duplications. *Blood Adv*. 2022; 6: 5345–55. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022007223.
36. Jahn N., Jahn E., Saadati M., et al. Genomic landscape of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia (AML) treated within the CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia*. 2022; 36(9): 2218–27. DOI: 10.1038/s41375-022-01650-w.
37. Döhner H., Wei A.H., Appelbaum F.R., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022; 140: 1345–77. DOI: 10.1182/blood.2022016867.
38. Ho A.D., Schetelig J., Bochtler T., et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2016; 22: 462–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.023.
39. Oran B., Cortes J., Beitinjaneh A., et al. Allogeneic Transplantation in First Remission Improves Outcomes Irrespective of FLT3-ITD Allelic Ratio in FLT3-ITD-Positive Acute Myelogenous Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016; 22(7): 1218–26. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.03.027
40. Sakaguchi M., Yamaguchi H., Najima Y., et al. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018; 2(20): 2744–54. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018020305.
41. Brunet S., Labopin M., Esteve J., et al. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2012; 30(7): 735–41. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.9868.
42. Sakaguchi M., Nakajima N., Yamaguchi H, et al. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. 2020; 13: 100198. DOI: 10.1016/j.lrr.2020.100198.
43. Pollyea D.A., Bixby D., Perl A., et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021; 19(1): 16–27. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0002.
44. Murphy K.M., Levis M., Hafez M.J., 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
45. Маслюкова И.Е., Курочкин Д.В., Мартынова Е.В. и др. Сравнение методов фрагментного анализа и ПЦР-электрофореза для обнаружения мутаций
28. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25: 2078–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.
29. Lai Z., Markovets A., Ahdesmaki M., et al. VarDict: a novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227.
30. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38: e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603.
31. Clinical recommendations No. 131 "Acute myeloid leukemias". URL: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/131_1 (in Russian).
32. Bergeron J., Capo-Chichi J.M., Tsui H., et al. The Clinical Utility of FLT3 Mutation Testing in Acute Leukemia: A Canadian Consensus. *Curr Oncol*. 2023; 30(12): 10410–36. DOI: 10.3390/currncol30120759.
33. Cortes J.E., Tallman M.S., Schiller G.J., et al. Phase 2b study of 2 dosing regimens of quizartinib monotherapy in FLT3-ITD-mutated, relapsed or refractory AML. *Blood*. 2018; 132(6): 598–607. DOI: 10.1182/blood-2018-01-821629.
34. Larson R.A., Mandrekar S.J., Huebner L.J., et al. Midostaurin reduces relapse in FLT3-mutant acute myeloid leukemia: the Alliance CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia*. 2021; 35(9): 2539–51. DOI: 10.1038/s41375-021-01179-4.
35. Döhner H., Weber D., Krzykalla J., et al. Midostaurin plus intensive chemotherapy for younger and older patients with AML and FLT3 internal tandem duplications. *Blood Adv*. 2022; 6: 5345–55. DOI: 10.1182/bloodadvances.2022007223.
36. Jahn N., Jahn E., Saadati M., et al. Genomic landscape of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia (AML) treated within the CALGB 10603/RATIFY trial. *Leukemia*. 2022; 36(9): 2218–27. DOI: 10.1038/s41375-022-01650-w.
37. Döhner H., Wei A.H., Appelbaum F.R., et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022; 140: 1345–77. DOI: 10.1182/blood.2022016867.
38. Ho A.D., Schetelig J., Bochtler T., et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation Improves Survival in Patients with Acute Myeloid Leukemia Characterized by a High Allelic Ratio of Mutant FLT3-ITD. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 2016; 22: 462–9. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.10.023.
39. Oran B., Cortes J., Beitinjaneh A., et al. Allogeneic Transplantation in First Remission Improves Outcomes Irrespective of FLT3-ITD Allelic Ratio in FLT3-ITD-Positive Acute Myelogenous Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016; 22(7): 1218–26. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.03.027
40. Sakaguchi M., Yamaguchi H., Najima Y., et al. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2018; 2(20): 2744–54. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018020305.
41. Brunet S., Labopin M., Esteve J., et al. Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *J Clin Oncol*. 2012; 30(7): 735–41. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.9868.
42. Sakaguchi M., Nakajima N., Yamaguchi H, et al. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. 2020; 13: 100198. DOI: 10.1016/j.lrr.2020.100198.
43. Pollyea D.A., Bixby D., Perl A., et al. NCCN Guidelines Insights: Acute Myeloid Leukemia, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw*. 2021; 19(1): 16–27. DOI: 10.6004/jnccn.2021.0002.
44. Murphy K.M., Levis M., Hafez M.J., 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.
45. Maslyukova I.E., Kurochkin D.V., Martynova E.V., et al. Comparison of fragment analysis and PCR electrophoresis methods for the detection of FLT3-ITD mu-

- FLT3-ITD у пациентов с острым миелоидным лейкозом. *Онкогематология*. 2022; 17(4): 118–25. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125.
46. Beierl K., Tseng L.H., Beierl R., et al. Detection of minor clones with internal tandem duplication mutations of FLT3 gene in acute myeloid leukemia using delta-PCR. *Diagn Mol Pathol*. 2013; 22(1): 1–9. DOI: 10.1097/PDM.0b013e31825d81f4.
47. Meshinchi S., Stirewalt D.L., Alonzo T.A., et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*. 2008; 111(10): 4930–3. DOI: 10.1182/blood-2008-01-117770.
48. Abou Dalle I., Ghorab A., Patel K., et al. Impact of numerical variation, allele burden, mutation length and co-occurring mutations on the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in newly diagnosed FLT3- mutant acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2020; 10(5): 48. DOI: 10.1038/s41408-020-0318-1 48.
49. Cloos J., Goemans B.F., Hess, C.J., et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*. 2006; 20: 1217–20. DOI: 10.1038/sj.leu.2404246.
50. McCormick S.R., McCormick M.J., Grutkoski P.S., et al. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: Cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2010; 134: 1143–51. DOI: 10.5858/2009-0292-OA.1.
51. Heuser M., Freeman S.D., Ossenkoppele G.J., et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021; 138: 2753–67. DOI: 10.1182/blood.2021013626.
52. Grob T., Sanders M.A., Vonk C.M., et al. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2023; 41: 756–65. DOI: 10.1200/JCO.22.00715.
53. Loo S., Dillon R., Ivey A., et al. Pretransplant FLT3-ITD MRD assessed by high-sensitivity PCR-NGS determines posttransplant clinical outcome. *Blood*. 2022; 140: 2407–11. DOI: 10.1182/blood.2022016567.
54. Othman J., Potter N., Mokretar K., et al. FLT3 inhibitors as MRD-guided salvage treatment for molecular failure in FLT3 mutated AML. *Leukemia*. 2023; 37: 2066–72. DOI: 10.1038/s41375-023-01994-x.
55. Blätte T.J., Schmalbrock L.K., Skambraks S., et al. getITD for FLT3-ITD-based MRD monitoring in AML. *Leukemia*. 2019; 33(10): 2535–9. DOI: 10.1038/s41375-019-0483-z.
56. Bibault J.E., Figeac M., Hélevaut 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.
57. Lee S., Sun CH., Jang H., et al. ITDetect: a method to detect internal tandem duplication of FMS-like tyrosine kinase (FLT3) from next-generation sequencing data with high sensitivity and clinical application. *BMC Bioinformatics*. 2023; 24: 62. DOI: 10.1186/s12859-023-05173-8.
58. Spencer D.H., Abel H.J., Lockwood C.M., 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.
59. Tung J.K., Suarez C.J., Chiang T., et al. Accurate Detection and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplications in Clinical Hybrid Capture Next-Generation Sequencing Data. *J Mol Diagn*. 2021; 23(10): 1404–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2021.07.012.
60. Stirewalt D.L., Kopecky K.J., Meshinchi S.P., et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006; 107: 3724–6. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3453.
61. Chen F., Sun J., Yin, C., et al. Impact of FLT3-ITD allele ratio and ITD length on therapeutic outcome in cytogenetically normal AML patients without NPM1 mutation. *Bone Marrow Transplant*. 2020; 55: 740–8. DOI: 10.1038/s41409-019-0721-z.
- tations in patients with acute myeloid leukemia. *Onkogematologiya*. 2022; 17(4): 118–25 (In Russian). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-118-125.
46. Beierl K., Tseng L.H., Beierl R., et al. Detection of minor clones with internal tandem duplication mutations of FLT3 gene in acute myeloid leukemia using delta-PCR. *Diagn Mol Pathol*. 2013; 22(1): 1–9. DOI: 10.1097/PDM.0b013e31825d81f4.
47. Meshinchi S., Stirewalt D.L., Alonzo T.A., et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*. 2008; 111(10): 4930–3. DOI: 10.1182/blood-2008-01-117770.
48. Abou Dalle I., Ghorab A., Patel K., et al. Impact of numerical variation, allele burden, mutation length and co-occurring mutations on the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in newly diagnosed FLT3- mutant acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2020; 10(5): 48. DOI: 10.1038/s41408-020-0318-1 48.
49. Cloos J., Goemans B.F., Hess, C.J., et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*. 2006; 20: 1217–20. DOI: 10.1038/sj.leu.2404246.
50. McCormick S.R., McCormick M.J., Grutkoski P.S., et al. FLT3 mutations at diagnosis and relapse in acute myeloid leukemia: Cytogenetic and pathologic correlations, including cuplike blast morphology. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2010; 134: 1143–51. DOI: 10.5858/2009-0292-OA.1.
51. Heuser M., Freeman S.D., Ossenkoppele G.J., et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: A consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021; 138: 2753–67. DOI: 10.1182/blood.2021013626.
52. Grob T., Sanders M.A., Vonk C.M., et al. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol*. 2023; 41: 756–65. DOI: 10.1200/JCO.22.00715.
53. Loo S., Dillon R., Ivey A., et al. Pretransplant FLT3-ITD MRD assessed by high-sensitivity PCR-NGS determines posttransplant clinical outcome. *Blood*. 2022; 140: 2407–11. DOI: 10.1182/blood.2022016567.
54. Othman J., Potter N., Mokretar K., et al. FLT3 inhibitors as MRD-guided salvage treatment for molecular failure in FLT3 mutated AML. *Leukemia*. 2023; 37: 2066–72. DOI: 10.1038/s41375-023-01994-x.
55. Blätte T.J., Schmalbrock L.K., Skambraks S., et al. getITD for FLT3-ITD-based MRD monitoring in AML. *Leukemia*. 2019; 33(10): 2535–9. DOI: 10.1038/s41375-019-0483-z.
56. Bibault J.E., Figeac M., Hélevaut 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.
57. Lee S., Sun CH., Jang H., et al. ITDetect: a method to detect internal tandem duplication of FMS-like tyrosine kinase (FLT3) from next-generation sequencing data with high sensitivity and clinical application. *BMC Bioinformatics*. 2023; 24: 62. DOI: 10.1186/s12859-023-05173-8.
58. Spencer D.H., Abel H.J., Lockwood C.M., 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.
59. Tung J.K., Suarez C.J., Chiang T., et al. Accurate Detection and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplications in Clinical Hybrid Capture Next-Generation Sequencing Data. *J Mol Diagn*. 2021; 23(10): 1404–13. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2021.07.012.
60. Stirewalt D.L., Kopecky K.J., Meshinchi S.P., et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006; 107: 3724–6. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3453.
61. Chen F., Sun J., Yin, C., et al. Impact of FLT3-ITD allele ratio and ITD length on therapeutic outcome in cytogenetically normal AML patients without NPM1 mutation. *Bone Marrow Transplant*. 2020; 55: 740–8. DOI: 10.1038/s41409-019-0721-z.

62. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, et al. The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20: 2074–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2404368.
63. Schlenk R.F, Kayser S, Bullinger L, et al. German-Austrian AML Study Group. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014; 124(23): 3441–9. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578070.
64. 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.
65. Rücker F.G, Du L, Luck T.J., et al. Molecular landscape and prognostic impact of FLT3-ITD insertion site in acute myeloid leukemia: RATIFY study results. *Leukemia*. 2022; 36: 90–9. DOI: 10.1038/s41375-021-01323-0.
66. Blau O, Berenstein R, Sindram, A, Blau, I.W. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2013; 54: 145–52. DOI: 10.3109/10428194.2012.704999.
67. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci*. 2020; 111(2): 312–22. DOI: 10.1111/cas.14274.
68. Smith C.C., Paguirigan A., Jeschke G.R., et al. Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood*. 2017; 130: 48–58. DOI: 10.1182/blood-2016-04-711820.
69. Scholl S, Fleischmann M, Schnetzke U, Heidel F.H. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments. *Cells*. 2020; 9(11): 2493. DOI: 10.3390/cells9112493.
70. Lee, L.Y., Hernandez D., Rajkhowa T., et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*. 2017; 129: 257–60. DOI: 10.1182/blood-2016-10-745133.
71. Galanis A., Ma H., Rajkhowa T., et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*. 2014; 123(1): 94–100. DOI: 10.1182/blood-2013-10-529313.
72. Williams A.B., Nguyen B.; Li L., et al. Mutations of FLT3/ITD confer resistance to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*. 2012; 27: 48–55. DOI: 10.1038/leu.2012.191.
73. Staudt D., Murray H.C., McLachlan T., et al. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10): 3198. DOI: 10.3390/ijms19103198.
74. Roloff G.W., Wen F., Ramsland A., et al. Clinical and molecular response of acute myeloid leukemia harboring non-canonical FLT3 N676K driver mutations to contemporary FLT3 inhibitors. *Haematologica*. 2023; 108(8): 2234–9. DOI: 10.3324/haematol.2022.282148.
62. Ponziani V, Gianfaldoni G, Mannelli F, et al. The size of duplication does not add to the prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2006; 20: 2074–6. DOI: 10.1038/sj.leu.2404368.
63. Schlenk R.F, Kayser S, Bullinger L, et al. German-Austrian AML Study Group. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014; 124(23): 3441–9. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578070.
64. 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.
65. Rücker F.G., Du L, Luck T.J., et al. Molecular landscape and prognostic impact of FLT3-ITD insertion site in acute myeloid leukemia: RATIFY study results. *Leukemia*. 2022; 36: 90–9. DOI: 10.1038/s41375-021-01323-0.
66. Blau O, Berenstein R, Sindram, A, Blau, I.W. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma*. 2013; 54: 145–52. DOI: 10.3109/10428194.2012.704999.
67. Kiyoi H, Kawashima N, Ishikawa Y. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: Therapeutic paradigm beyond inhibitor development. *Cancer Sci*. 2020; 111(2): 312–22. DOI: 10.1111/cas.14274.
68. Smith C.C., Paguirigan A., Jeschke G.R., et al. Heterogeneous resistance to quizartinib in acute myeloid leukemia revealed by single-cell analysis. *Blood*. 2017; 130: 48–58. DOI: 10.1182/blood-2016-04-711820.
69. Scholl S, Fleischmann M, Schnetzke U, Heidel F.H. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments. *Cells*. 2020; 9(11): 2493. DOI: 10.3390/cells9112493.
70. Lee, L.Y., Hernandez D., Rajkhowa T., et al. Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor. *Blood*. 2017; 129: 257–60. DOI: 10.1182/blood-2016-10-745133.
71. Galanis A., Ma H., Rajkhowa T., et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood*. 2014; 123(1): 94–100. DOI: 10.1182/blood-2013-10-529313.
72. Williams A.B., Nguyen B.; Li L., et al. Mutations of FLT3/ITD confer resistance to multiple tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*. 2012; 27: 48–55. DOI: 10.1038/leu.2012.191.
73. Staudt D., Murray H.C., McLachlan T., et al. Targeting Oncogenic Signaling in Mutant FLT3 Acute Myeloid Leukemia: The Path to Least Resistance. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(10): 3198. DOI: 10.3390/ijms19103198.
74. Roloff G.W., Wen F., Ramsland A., et al. Clinical and molecular response of acute myeloid leukemia harboring non-canonical FLT3 N676K driver mutations to contemporary FLT3 inhibitors. *Haematologica*. 2023; 108(8): 2234–9. DOI: 10.3324/haematol.2022.282148.

Информация об авторах

Сидорова Юлия Владимировна*, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: sidorova.y@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1936-0084>

Information about the authors

Yulia V. Sidorova*, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,
e-mail: sidorova.y@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1936-0084>

Северина Наталия Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: severina.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7036-9968>

Бидерман Белла Вениаминовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: biderman.b@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Рисинская Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: risinskaya.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2957-1619>

Февралева Ирина Серафимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: fevrалева.i@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8763-246X>

Костромина Мария Александровна, студентка факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», e-mail: mariya.kostromina.01@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2774-1938>

Стародуб София Михайловна, студентка института цифрового биоинформатики и моделирования живых систем ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: starodub.sofi@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2614-986X>

Кашлакова Анастасия Игоревна, гематолог отделения химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с блоком трансплантации костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: kashlakova.a@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3548-8929>

Лукьянова Ирина Анатольевна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением дневного стационара онкологии и химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: lukyanova.i@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8337-2242>

Nataliya A. Severina, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: severina.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7036-9968>

Bella V. Biderman, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: biderman.b@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Natalya V. Risinskaya, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: risinskaya.n@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2957-1619>

Irina S. Fevrалева, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: fevrалева.i@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8763-246X>

Maria A. Kostromina, student of Faculty of Fundamental Medicine, M.V. Lomonosov Moscow State University, e-mail: mariya.kostromina.01@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2774-1938>

Sofia M. Starodub, 6th year student of I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), e-mail: starodub.sofi@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-2614-986X>

Anastasia I. Kashlakova, Hematologist, Department of Chemotherapy of Hemoblastosis and Hematopoietic Depressions with Bone marrow and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: kashlakova.a@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3548-8929>

Irina A. Lukyanova, Cand. Sci. (Med.), Hematologist, Head of the Department of Chemotherapy of Hemoblastosis and Hematopoietic Depressions with a Day In-patient Facility, National Medical Research Center for Hematology, e-mail: lukyanova.i@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8337-2242>

Судариков Андрей Борисович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: sudarikov.a@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Паровичникова Елена Николаевна, доктор медицинских наук, генеральный директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: parovichnikova.e@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

*** Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 22.08.2024

Принята к печати: 14.10.2024

Andrey B. Sudarikov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,
e-mail: sudarikov.a@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Elena N. Parovichnikova, Dr. Sci. (Med.), CEO National Medical Research Center for Hematology,
e-mail: parovichnikova.e@blood.ru
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>

*** Corresponding author**

Received 22 Aug 2024

Accepted 14 Oct 2024