

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации



На правах рукописи

**Итов Альберт Баширович**

**Острый миелоидный лейкоз с *FLT3-ITD*: анализ структуры tandemных повторов, клиническое значение и возможности мониторинга**

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

3.1.28. Гематология и переливание крови

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН

Масчан Алексей Александрович

кандидат медицинских наук

Ольшанская Юлия Вячеславовна

Москва-2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ С <i>FLT3</i> -ITD. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Строение гена <i>FLT3</i> и кодируемого геном белка FLT3.....	16
1.2 Регуляция активности белка FLT3 и его роль в гемопоэзе.....	17
1.3 Механизмы возникновения <i>FLT3</i> -ITD.....	20
1.4 Локализация <i>FLT3</i> -ITD в последовательности гена <i>FLT3</i> и принципы нарушения аутоингибирования.....	20
1.5 Структура <i>FLT3</i> -ITD.....	22
1.6 Особенности ОМЛ с <i>FLT3</i> -ITD.....	23
1.6.1 Цитогенетический профиль ОМЛ с <i>FLT3</i> -ITD.....	24
1.6.2 Молекулярно-генетический профиль ОМЛ с <i>FLT3</i> -ITD.....	26
1.7 Прогностическое значение <i>FLT3</i> -ITD при ОМЛ у детей.....	28
1.7.1 Прогностическое значение <i>FLT3</i> -ITD в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ.....	30
1.7.2 Влияние длины, количества tandemных повторов и места вставки на результаты терапии ОМЛ с <i>FLT3</i> -ITD.....	32
1.8 Ингибиторы тирозинкиназ и их влияние на результаты терапии ОМЛ с <i>FLT3</i> -ITD.....	33
1.9 Современные методы детекции <i>FLT3</i> -ITD.....	36
1.10 Возможности диагностики и клиническое значение МОБ <i>FLT3</i> -ITD...39	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
2.1 Критерии включения пациентов в исследование.....	42
2.2 Пациенты с <i>FLT3</i> -ITD-критерии стратификации и терапевтический план.....	45
2.3 Методы диагностики.....	48
2.3.1 Морфологическое исследование.....	48
2.3.2 Иммунофенотипирование методом МПЦ.....	49
2.3.3 Цитогенетические методы.....	49

2.3.4 Молекулярно-генетические методы.....	50
2.3.4.1 Выделение ДНК из клеток костного мозга.....	50
2.3.4.2 Фрагментный анализ.....	51
2.3.4.3 Высокопроизводительное секвенирование (ВПС).....	52
2.4 Определение МОБ <i>FLT3-ITD</i> с использованием ВПС.....	55
2.5 Статистические исследования.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	56
3.1 Результаты клинико-гематологических и морфо-цитохимических исследований пациентов с ОМЛ с <i>FLT3-ITD</i> .....	56
3.2 Результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований пациентов с ОМЛ с <i>FLT3-ITD</i> .....	57
3.3 Результаты терапии ОМЛ с <i>FLT3-ITD</i> .....	58
3.4 Результаты терапии пациентов с <i>FLT3-ITD</i> и <i>FLT3-WT</i> без цитогенетических аберраций («Нормальный кариотип (НК)»).....	60
3.4.1 Результаты терапии пациентов с ОМЛ - НК и мутациями в гене <i>NPM1</i> в сочетании с <i>FLT3-ITD</i> с высоким и низким аллельным соотношением.....	62
3.5 Результаты терапии пациентов с <i>FLT3-ITD</i> и <i>FLT3-WT</i> в различных цитогенетических группах ОМЛ.....	65
3.5.1 Разделение пациентов с ОМЛ на цитогенетические группы.....	65
3.5.2 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу <i>FLT3-ITD<sup>BP</sup></i> .....	67
3.5.3 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу <i>FLT3-ITD<sup>HP</sup></i> .....	68
3.5.4 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу <i>FLT3-ITD<sup>HP</sup></i> .....	71
3.6 Детекция <i>FLT3-ITD</i> методом ВПС с использованием алгоритма Pindel...	73
3.7 Локализация <i>FLT3-ITD</i> и влияние локализации на результаты терапии и исход заболевания.....	75
3.8 Характеристика дуплицированных фрагментов <i>FLT3-ITD</i> .....	77

3.8.1 Влияние характера дуплицированных фрагментов <i>FLT3-ITD</i> на результаты терапии и исход заболевания.....	79
3.9 Результаты детекции МОБ <i>FLT3-ITD</i> перед алло-ТГСК, влияние МОБ <i>FLT3-ITD</i> на исход ОМЛ и оправданность назначения ИТК после алло-ТГСК.....	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	84
4.1 Характеристика клинико-гематологического, цитогенетического и молекулярно-генетического профиля ОМЛ с <i>FLT3-ITD</i> .....	84
4.2 Результаты терапии пациентов с <i>FLT3-ITD</i> и без <i>FLT3-ITD</i> в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ.....	85
4.3 Детекция <i>FLT3-ITD</i> методом ВПС.....	88
4.4 Мониторинг МОБ <i>FLT3-ITD</i> .....	90
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
5.1 Перспективы дальнейшего развития темы исследования.....	94
ВЫВОДЫ.....	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	120

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) - генетически гетерогенное заболевание с обширным спектром генетических изменений, которые лежат в основе угнетения дифференцировки, апоптоза и неконтролируемой пролиферации злокачественных аналогов клеток-предшественников миелоидного ростка кроветворения [1]. Около трети генетических aberrаций при ОМЛ классифицируются как мутации класса I и обнаруживается в генах, участвующих в клеточных сигнальных путях, отвечающих за пролиферацию. Большинство мутаций этого класса являются дополнительными и субклональными, и эволюционно представляют более поздние лейкемогенные события [2]. Внутренние tandemные дубликации в гене *FLT3* (*FLT3-ITD*) - наиболее распространенный вариант таких молекулярно-генетических событий при ОМЛ. В отличие от взрослых, у которых *FLT3-ITD* являются самой частой (30-35%) аномалией, частота выявления *FLT3-ITD* при ОМЛ у детей составляет по разным данным от 10 до 15%. *FLT3-ITD* приводят к конституциональной лиганд-независимой киназной активности рецептора *FLT3*, блоку дифференцировки и усиленной пролиферации опухолевой популяции [3,4].

У пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом (НК) *FLT3-ITD* встречаются в 30-35% случаев и при стандартной химиотерапии, основанной на применении цитарабина (AraC) и антрациклинов, являются фактором неблагоприятного прогноза [4,5,6]. Ранее в большинстве протоколов лечения взрослых пациентов при стратификации на группы риска учитывали показатель аллельного соотношения. Пациентов с НК с *FLT3-ITD* с AR>0,5 включали в группу высокого риска [7]. Однако, с началом широкого применения ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) у взрослых пациентов, прогностическое значение *FLT3-ITD* при ОМЛ и подходы к стратификации на

группы риска были пересмотрены. Сегодня, при условии сочетания интенсивной химиотерапии с ИТК, ОМЛ с *FLT3-ITD* относятся к лейкозам промежуточного риска [8]. При детском ОМЛ с *FLT3-ITD* об эффективности назначения ИТК известно мало. В настоящее время проспективные рандомизированные исследования NCT03591510 и NCT04293562 для оценки клинической эффективности мидостаурина и гилтеритиниба соответственно в сочетании с интенсивной химиотерапией у детей с ОМЛ с *FLT3-ITD* находятся в фазе набора пациентов и их завершение планируется не ранее 2027 года.

В отечественном мультицентровом исследовании ОМЛ-MRD-2018 при стратификации на группы риска пациентов с НК учитывается наличие *FLT3-ITD*, аллельное соотношение *FLT3-ITD/FLT3-WT* и присутствие мутаций в гене *NPM1* [9].

Помимо НК, *FLT3-ITD* часто сочетаются с хромосомными/молекулярными aberrациями [7,9,10]. В случае сочетания основной стратифицирующей цитогенетической перестройки с *FLT3-ITD* группа риска определяется в соответствии с основным цитогенетическим маркером. В недавних исследованиях Tarlock и соавт в когорте детей и молодых взрослых продемонстрировали, что *FLT3-ITD* оказывают неблагоприятное влияние на показатели выживаемости только при сочетании с хромосомными/молекулярными aberrациями неблагоприятного прогноза [11]. В то же время другие исследования в когорте взрослых пациентов показали ухудшение показателей выживаемости при сочетании *FLT3-ITD* даже с «благоприятными» генетическими событиями [12,13]. Эти исследования показывают, что для выработки критериев назначения ИТК необходимо детально изучить влияние *FLT3-ITD* на показатели выживаемости в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ.

Структура *FLT3-ITD* и их влияние на результаты терапии хорошо изучена в когорте взрослых пациентов [14]. Показано, что примерно 70% дупликаций возникает в пределах юкстамембранного домена (JMD), 30%

выходит за пределы JMD и сосредоточены преимущественно в области beta-фрагмента первого тирозинкиназного домена (TKD1). У пациентов с дупликациями вне JMD домена наблюдается резистентность к стандартной химиотерапии и определенным ИТК, и, как следствие, снижение показателей ОБ и БСВ [15]. Исследований, хорошо описывающих локализацию и структуру *FLT3-ITD* при детских ОМЛ, крайне мало. В немногочисленных исследованиях оценивалось лишь влияние длины *FLT3-ITD* на выживаемость и полученные данные оказались противоречивыми [16,17].

Несмотря на применение ИТК, у пациентов с ОМЛ с *FLT3-ITD* риск развития рецидива остается высоким (около 30%) [18]. Систематический мониторинг динамики редукции или повторного нарастания размера клона с *FLT3-ITD* вероятно дал бы возможность предсказать развитие рецидива, но большинство рекомендаций/исследований по мониторингу МОБ не считают их надежным маркером для мониторинга [19]. Однако в более поздних исследованиях Grob и соавт, показали, как сохранение (хотя и, подчас, в минимальном «титре») инициальных дупликаций у подавляющего большинства пациентов, так их прогностическое значение в отношении рецидива ОМЛ [20].

Таким образом, актуальность данного исследования опосредована недостаточным количеством данных о локализации и структуре *FLT3-ITD* и их влиянии на показатели выживаемости при детских ОМЛ в отечественной и мировой литературе; небольшим числом публикаций о влиянии *FLT3-ITD* на выживаемость в различных цитогенетических и молекулярно-генетических подтипах ОМЛ у детей и целесообразности добавления ИТК к стандартной химиотерапии на более ранних этапах терапии детского ОМЛ; отсутствием данных о роли *FLT3-ITD* как маркера МОБ при ОМЛ у детей для оценки эффективности применения ИТК в посттрансплантационном периоде.

## **Степень разработанности темы исследования**

*FLT3-ITD* являются достаточно частым генетическим событием при ОМЛ у детей, выявляясь в 10-15% случаев. Согласно диагностическому алгоритму в рамках протокола проспективного мультицентрового протокола, в который включается около 100 пациентов в год (не менее половины всех вновь заболевших пациентов с ОМЛ в России) ОМЛ-MRD-2018, всем пациентам на этапе диагностики ОМЛ рутинно проводится определение *FLT3-ITD* и *AR FLT3-ITD/FLT3-WT* методом фрагментного анализа (ФА). Однако анализ длины фрагментов инсерции не позволяет провести детальный анализ локализации и последовательности *FLT3-ITD*.

При стратификации пациентов на группы риска наличие *FLT3-ITD* учитывается только у пациентов с НК и у пациентов с хромосомными перестройками неопределенного прогноза. В случае же сочетания основной стратифицирующей цитогенетической перестройки с *FLT3-ITD* группа риска определяется в соответствии с основным цитогенетическим маркером. Кроме того, применение ИТК для пациентов с ОМЛ с *FLT3-ITD* протоколом ОМЛ-MRD-2018 не предусмотрено. ИТК назначаются только по решению протокольной группы и после получения дополнительного информированного согласия на изменение протокола по медицинским показаниям.

## **Цель исследования**

Разработать новые подходы к диагностике ОМЛ с *FLT3-ITD* и оптимизировать терапевтическое ведение пациентов с *FLT3-ITD*, получающих лечение в рамках исследования ОМЛ-MRD-2018, на основании анализа молекулярно-генетических характеристик и их влияния на результаты терапии.

## **Задачи исследования**

1. оценить клинико-гематологический, морфо-цитохимический, цитогенетический и молекулярно-генетический профиль детей с ОМЛ с *FLT3-ITD*;

2. исследовать результаты терапии пациентов детей с ОМЛ с *FLT3-ITD*, получавших терапию по протоколу ОМЛ-MRD-2018 в общей когорте, в группе с нормальным кариотипом, в различных цитогенетических и молекулярно-генетических подгруппах ОМЛ и оценить целесообразность добавления ИТК на более ранних этапах терапии;

3. используя специальные биоинформатические алгоритмы для анализа данных ВПС, исследовать локализацию и структурные особенности *FLT3-ITD* у детей с ОМЛ и их значение для показателей выживаемости;

4. разработать методику детекции МОБ *FLT3-ITD* на основе ВПС с глубоким прочтением и оценить потенциальное прогностическое значение МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК в развитии посттрансплантационного рецидива и эффективность назначения ИТК в посттрансплантационный период.

### **Научная новизна исследования**

Впервые в России подробно описаны цитогенетический и молекулярный профиль детей с ОМЛ с *FLT3-ITD*, получавших лечение в рамках проспективного мультицентрового исследования ОМЛ-MRD-2018, и показано влияние *FLT3-ITD* на исход заболевания в различных подгруппах ОМЛ у детей.

Впервые в России на основе данных ВПС с применением биоинформатического алгоритма Pindel подробно описаны локализация и структура *FLT3-ITD* и их потенциальное прогностическое значение у детей с ОМЛ.

Впервые в мировой практике разработана и применена методика детекции МОБ *FLT3-ITD* у детей с ОМЛ на основе ВПС с глубоким прочтением с использованием универсальных праймеров.

### **Практическая значимость**

Результаты терапии детей с ОМЛ с *FLT3-ITD* показали, что *FLT3-ITD* оказывает неблагоприятное прогностическое влияние независимо от

аллельного соотношения и цитогенетической подгруппы ОМЛ, что диктует необходимость исследования эффективности интеграции ИТК в первую линию терапии.

Показано, что ВПС при условии применения специальных биоинформатических алгоритмов является надежным инструментом для определения и детального анализа *FLT3-ITD*, а особенности структуры *FLT3-ITD*, как показывают полученные нами данные, могут иметь потенциальное прогностическое значение и требуют более детального изучения.

По результатам оценки МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК было выявлено, что у пациентов, которые достигли ПР1 по данным МПЦ, может сохраниться персистенция инициального лейкомиического клона с *FLT3-ITD*, который приводит к пострасплантационному рецидиву, что указывает на необходимость внедрения в практику метода детекции МОБ *FLT3-ITD* для более точной оценки ответа на терапию и своевременной корректировки тактики ведения таких пациентов.

У пациентов с персистенцией МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК применение ИТК в посттрансплантационном периоде улучшает показатели выживаемости.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационное исследование проведено в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России. Исследование являлось ретроспективным и включало 64 пациента с *FLT3-ITD*, которые получали терапию по отечественному мультицентровому протоколу ОМЛ-MRD-2018 в период с 2018 по 2024 гг.

Методы исследования:

1. Анализ инициальных данных:

- инициальных демографических и клинических данных;
- инициальных лабораторных данных: лейкоцитоз, содержание бластных клеток в КМ и ПК, морфологический вариант ОМЛ;

— цитогенетических данных: результаты кариотипирования и FISH.

2. Фрагментный анализ ДНК для детекции *FLT3-ITD* всем пациентам с впервые диагностированным ОМЛ.

3. Таргетное ВПС для более полной оценки молекулярно-генетического профиля. Для проведения таргетного секвенирования использовалась кастомизированная панель генов QIASeg HMNP с последующей стандартной биоинформатической обработкой для определения однонуклеотидных замен и небольших делеций/инсерций. Для определения структуры и локализации *FLT3-ITD* первичные данные ВПС были обработаны с использованием алгоритма Pindel.

4. ВПС с глубоким покрытием для определения МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК. На основе полученных данных о локализации *FLT3-ITD* в последовательности гена *FLT3* были подобраны универсальные праймеры. С их помощью были получены ампликоны из ДНК костного мозга перед алло-ТГСК и подготовлена библиотека для последующего проведения ВПС с глубоким прочтением.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Пациенты с *FLT3-ITD* имеют характерный клинико-гематологический профиль, цитогенетически и молекулярно-генетически гетерогенны, но чаще сочетаются с НК,  $t(5;11)(q35;p15.5)/NUP98::NSD1$ ,  $t(6;9)(p23; q34)/DEK::NUP214$ , трисомией 8 и мутациями в генах *NPM1* и *WT1*;

2. *FLT3-ITD* оказывают неблагоприятное влияние в общей группе пациентов, в группе с НК независимо от сочетания с мутациями в гене *NPM1* и аллельного соотношения *FLT3-ITD/FLT3-WT*, и во всех цитогенетических подгруппах ОМЛ у детей, что показывает необходимость исследования эффективности интеграции ИТК в первую линию терапии для всех пациентов с *FLT3-ITD*;

3. ВПС с использованием биоинформатического алгоритма Pindel позволяет детектировать *FLT3-ITD* и оценивать их локализацию и структуру.

У детей большинство *FLT3-ITD* локализируются в JMD, реже в TKD1. Локализация *FLT3-ITD* не влияет на исход заболевания. Аминокислотный состав дупликаций представлен в основном фрагментами JMD, но часто в дупликации вовлечены фрагменты TKD1. У пациентов, имеющих дупликации, включающие аминокислотные остатки TKD1, более низкие показатели ОБ;

4. ВПС с глубоким прочтением является надежным инструментом для оценки МОБ *FLT3-ITD* и ее внедрение в лабораторную практику имеет важное клиническое значение. Персистенции МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК ассоциированы с высоким риском рецидива ОМЛ при отсутствии поддерживающей терапии ИТК.

#### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Тщательный анализ научной литературы и применение современных и корректных статистических методов обработки данных обеспечивают достоверность основных выводов, сформулированных по результатам диссертационного исследования.

Апробация диссертации проведена на совместном заседании экспертных комиссий по лабораторной диагностике, клеточным технологиям и фундаментальным исследованиям и гематологии, иммунологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, протокол №7 от 25 июня 2025 года.

Основные положения результатов диссертационного исследования были изложены на Всероссийской конференции «Кооперированные исследования в области детской гематологии/онкологии, Москва, 2024; Третьей Ежегодной конференции Московского общества медицинских генетиков, Москва, 2024; Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», Санкт-Петербург, 2024; Всероссийской конференции с международным участием «Биохимия человека», 2024; 14th I-BFM Biennial

Childhood Leukemia and Lymphoma Symposium (CLLS), Будапешт, Венгрия, 2025; Конгрессе «ЕНА2025», Милан, Италия, 2025, Четвертой Ежегодной конференции Московского общества медицинских генетиков, Москва, 2025.

### **Публикация результатов исследования**

По результатам диссертационного исследования опубликованы 3 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

### **Внедрение результатов в практику**

В практику лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России внедрен метод ВПС для инициального определения локализации и структуры *FLT3-ITD* и детекции МОБ *FLT3-ITD* с использованием алгоритма Pindel.

На основании результатов исследования о прогностическом влиянии *FLT3-ITD* при детском ОМЛ были внесены изменения в клинические рекомендации «Острые миелоидные лейкозы» у детей и новую версию протокола ОМЛ-MRD-2025, согласно которым, пациентам с *FLT3-ITD* к стандартной химиотерапии будут добавлять ИТК.

### **Личный вклад автора**

Автор провёл подробный анализ литературных данных, посвященных патогенезу, клиническим и молекулярно-генетическим особенностям ОМЛ с *FLT3-ITD*. Совместно с научными руководителями были определены цель и основные задачи исследования, составлен план проведения исследования. Автором лично выполнена молекулярно-диагностическая часть диссертационного исследования: ФА и ВПС для определения *FLT3-ITD* всем пациентам с впервые диагностированным ОМЛ. Совместно с группой биоинформатической обработки данных с применением алгоритма Pindel были получены и обработаны данные о локализации и структуре *FLT3-ITD*.

На основе обработанных данных ВПС автором были разработаны последовательности праймеров, которые использовались для проведения ВПС с глубоким прочтением ремиссионных образцов костного мозга перед алло-ТГСК для оценки МОБ *FLT3-ITD*.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация включает в себя введение, основную часть и заключение. Введение включает актуальность, цель и задачи исследования, научную новизну и практическую значимость работы, положения, выносимые на защиту, степень достоверности данных, апробацию полученных результатов и внедрение результатов в практику. Основная часть диссертации включает обзор литературы по теме диссертации, материалы и методы диссертационного исследования, результаты исследования и их обсуждение. Заключение состоит из выводов, перспектив дальнейшего развития темы исследования и практических рекомендаций.

Диссертация изложена на 123 страницах, включает 18 рисунков и 24 таблиц. Список литературы включает 165 литературных источников: 6 отечественных и 159 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОСТРЫЙ МИЕЛОИДНЫЙ ЛЕЙКОЗ С *FLT3-ITD*.

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ОМЛ-генетически гетерогенное заболевание с обширным спектром рецидивирующих и пассажирских мутаций, лежащих в основе неконтролируемой пролиферации и угнетении дифференцировки и апоптоза клеток миелоидного ростка кроветворения [1,21,22]. В основе патогенеза ОМЛ лежит синергизм трех основных классов мутаций: мутации второго класса, ответственных за нарушение клеточного деления и угнетение апоптоза (*t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1*, *t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214*, мутации в гене *NPM1* (экзон 11), *t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1*; *t(16;16)(p13q22)/CBFB::MYH11*; мутации в гене *CEBPA*, перестройки гена *KMT2A* с соавт.) [23,24]; мутации третьего класса, возникающие в генах, ответственных за эпигенетическую модификацию (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*) [24,25]; мутации первого класса (*FLT3*, *KIT*, *RAS*, *PTPN11*, *JAK2*, *CBL*), возникающие в генах-участниках клеточных сигнальных путей и обеспечивающих усиленную пролиферацию опухолевых клеток.

Мутации в генах, участвующих в клеточных сигнальных путях (мутации первого класса) являются наиболее частыми при ОМЛ [2,26]. Как правило, они являются дополнительными по отношению к иницирующим лейкемогенез событиям (например, хромосомным транслокациям с образованием химерных транскриптов или мутациям в генах *NPM1* и *CEBPA*) и ответственны за опухолевую прогрессию. В отличие от остальных мутаций этого класса, *FLT3-ITD* при ОМЛ с НК рассматриваются как основное драйверное молекулярно-генетическое событие, встречаются в 20-25% случаев ОМЛ с НК и определяют ответ на терапию в этой группе. Субклональные *FLT3-ITD* часто могут сочетаться и с рекуррентными транслокациями (например, с *t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1*, *t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214*), давая опухолевым клеткам преимущество в пролиферации и выживании и ухудшая прогноз заболевания [5,9,10,27].

## 1.1 Структура гена *FLT3* и кодируемого им белка FLT3

Первые данные о наличии гена рецепторной тирозинкиназы *FLT3* (*fms-like tyrosine kinase 3*) датируются 1991 годом, когда Rosnet с соавт. секвенировали ген, который имеет схожее строение с генами, кодирующими рецепторы факторов роста [28]. В 1994 году Small с соавт клонировали кДНК STK-1 (тирозинкиназа 1 стволовых клеток) из CD34+ гемопоэтических стволовых клеток. [29]. Более поздние исследования показали, что человеческий ген *FLT3* локализован в 13 хромосоме, в области 13q12.2., имеет длину 97кБ и состоит из 24 экзонов. Белок FLT3 имеет доменное строение и включает в себя внеклеточную и внутриклеточную части (рисунок 1). Внеклеточная часть белка начинается с NH<sub>2</sub>-концевого сигнального пептида (SP, первый экзон 1, 26 пар оснований), за которым следуют 5 иммуноглобулиноподобных доменов (Ig-like domains, экзоны 2-12). Между внеклеточными и внутриклеточными областями белка локализуется кодируемый 13-м экзоном трансмембранный домен (ТМ). Внутриклеточная часть белка представлена прилегающим к мембране юкстамембранным доменом, кодируемым 14 экзоном и большим функционально значимым тирозинкиназным доменом. Тирозинкиназный домен разделен на 2 отдельные области: тирозинкиназный домен 1 (TKD1), который начинается с аминокислоты 610 и занимает 15-17 и первую половину 18 экзона, далее следует небольшая киназная вставка (середины 18-го экзона), разделяющая два домена, далее, начиная с концевой части 18-го экзона и до 23-го экзона включительно располагается тирозинкиназный домен 2 (TKD2). Внутриклеточная часть белка заканчивается небольшим COOH-терминальным участком, занимающим 56 п.о. (24-й экзон) [30,31]. В результате сопряженной работы всех структурных компонентов гена синтезируется мембраносвязанная рецепторная тирозинкиназа III, которая включает в себя последовательность из 993 аминокислот. В процессе синтеза белок через специфические сайты связывания подвергается N-гликолизированию и уже зрелая гликолизированная форма встраивается в мембрану клетки [32,33].

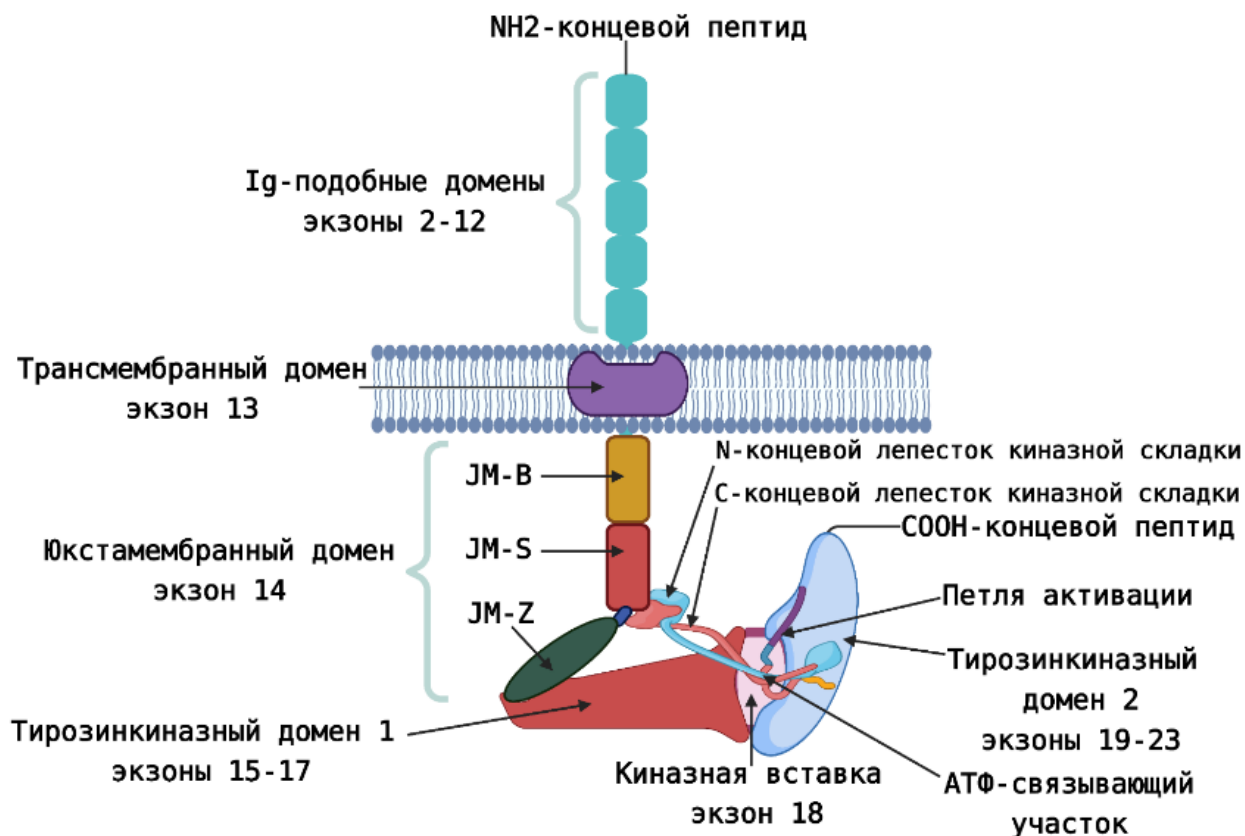


Рисунок 1- Структура белка *FLT3* [10]

## 1.2 Регуляция активности белка *FLT3* и его роль в гемопоэзе

Изучение кристаллической структуры белка *FLT3* показало, что его активность регулируется тремя основными структурными компонентами (рисунок 1): киназным участком (области TKD1 и TKD2), петлей активации (область TKD2) и JMD. Киназный участок состоит из N-концевого и C-концевого лепестка. N-конец складки состоит из пяти  $\beta$ -складчатых лепестков ( $\beta$ 1- $\beta$ 5) и примыкающей к ним одной  $\alpha$ -спирали ( $\alpha$ C). C-концевая часть киназного участка состоит из четырех  $\alpha$ -спиралей ( $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ EF,  $\alpha$ F- $\alpha$ I) и трех  $\beta$ -фрагментов ( $\beta$ 6,  $\beta$ 7  $\beta$ 8). N-и C-концы связаны гибким полипептидным участком, который позволяет им активно вращаться относительно друг друга, однако, в отсутствие лиганда, N-концевая часть складки повернута от C-концевой части. C-концевая часть участка прочно соединена с расположенной между Asp829-Phe830-Gly831 и Trp854-Met855-Ala856 ( $\beta$ 8-  $\beta$ 11,  $\alpha$ EF) петлей

активации. В этой области располагается активный центр в виде нефосфорилированного остатка тирозина Y842, который, при отсутствии лиганда, плотно зажат между N-и C-долями киназного фрагмента, что препятствует взаимодействию этого каталитического участка с молекулами АТФ. Предполагается, что за стабильность этой структуры отвечает аминокислота Asp835, которая имеет боковое положение и связана водородными связями с основной цепью [10,34,35,36].

JMD разделен на 3 структурных компонента (рисунок 1): мотив связывания (JM-B), мотив переключения (JM-S) и линкерный пептид (JM-Z). JMD выступает в качестве аутоингибирующего домена гена *FLT3*. JM-B включает в себя семь аминокислотных остатков (Tyr572-Met578) и при отсутствии лиганда спрятан в структуре белка, однако имеет прочную связь со всеми регулируемыми активностью FLT3 участками. Благодаря близкому расположению JM-B к N-концевой складке и прочному взаимодействию с ней через водородную связь с Glu661 блокируется вращение N-концевой складки в сторону C-конца, что способствует стабилизации неактивной формы белка при отсутствии лиганда. JM-S включает в себя 14 аминокислотных остатков (Val579-Val592) и расположен между JM-B и JM-Z областями юкстамембранного домена. Он имеет жесткое положение в структуре белка, ориентирован в сторону C-концевой киназной складки и контактирует с ней через два остатка тирозина (Y589 и Y591), которые в неактивном белке дефосфорилированы. Концевая часть юкстамембранного домена представлена JM-Z, состоящим из 11 аминокислот (Asp593-Trp603). Эта область близко располагается к N-концевой киназной складке, регулирует правильное ориентирование мотива переключения относительно области C-концевой киназной складки. Это способствует разобщению двух концевых участков киназной складки, сохраняя инактивное состояние белка при отсутствии лиганда [10,34,35,37,38,39,40,41].

Лиганд для FLT3 (FL) представляет собой небольшой трансмембранный белок, включающий последовательность из 235

аминокислот. Имеет доменное строение, во внеклеточной области расположен сигнальный пептид и четыре спиральных домена, а в цитоплазме-короткий цитоплазматический домен [34]. Высокая экспрессия FLT3 и его лиганда наблюдается на ранних предшественниках гемопоэтических стволовых клеток [42]. N-концевая часть лиганда связывается с третьим внеклеточным иммуноглобулиноподобным доменом мембранного рецептора FLT3, запуская каскад химических реакций, способствующих димеризации рецептора. Это приводит к консолидации цитоплазматических доменов рецептора FLT3 и аутофосфорилированию ключевых аминокислотных остатков JMD (Y589 и Y591). Область переключения изменяет свое положение относительно C-концевой киназной складки, меняется положение области мотива, вследствие чего она не в состоянии войти в собственный сайт аутоингибирования. Это способствует вращению N-концевой части киназной складки в сторону C-концевой, что способствует обнажению зажатой между N-и C-долями киназной складки активного центра петли активации (Y842), обеспечивая фосфорилирование тирозина. Тирозинкиназная активность рецептора способствует активации нижележащих сигнальных путей (фосфолипаза C, PI3K/AKT и MAPK/ERK) и вместе с другими факторами роста индуцирует пролиферацию и дифференцировку ранних предшественников миелоидных и лимфоидных клеток.

Более подробное изучение процессов пролиферации гемопоэтических стволовых клеток под действием различных белков (FLT3, KIT и др.) показало, что активируемый лигандом FL белок FLT3 оказывает существенное влияние на пролиферацию грануломоноцитарных колониестимулирующих единиц (CFU-GM) и лишь незначительно стимулирует рост эритроидных (BFU-E) и гранулоцитарно-эритроидно-мегакариоцитарно-макрофагальных колониобразующих единиц (CFU-GEMM) [43]. В зрелых клетках костного мозга экспрессия FLT3 исчезает, небольшая активность сохраняется лишь на поверхности моноцитов и дендритных клеток [10,34,35,36,37,41,42].

### 1.3 Механизмы возникновения *FLT3-ITD*

*FLT3-ITD* - соматическое генетическое событие у пациентов с ОМЛ. Впервые мутация была описана в 1996 году, когда Накао с соавт., изучая экспрессию мРНК гена *FLT3* у пациентов с ОМЛ, неожиданно обнаружили у нескольких пациентов аномально длинные ампликоны. Изучение нуклеотидной последовательности этих амплифицированных фрагментов показало, что изменение длины связано с наличием tandemных повторов в области JMD и TKD1 (14-15 экзоны). В этом же исследовании показали их соматическую природу, не обнаружив эти инициальные мутации в образцах костного мозга, полученных в ремиссии ОМЛ [44].

Механизмы появления *FLT3-ITD* изучены не в полном объеме, но на сегодняшний момент существуют две основные теории их возникновения. Первую теорию еще до открытия гена *FLT3* предложили в середине 1980 годов Chia с соавт, которые изучали аномально длинные фрагменты гена алкогольдегидрогеназы у дрозофил. Было выявлено, что в основе образования дубликаций лежит двухцепочечный разрыв во время репликации ДНК и микрогомология расщепленной последовательности, из-за которой может происходить смещение цепей ДНК при лигировании и как результат смещение репарации [45]. В 1998 году, Kiyoi с соавт в процессе изучения структуры *FLT3-ITD* в когорте из 50 пациентов с ОМЛ предложили новую теорию. Согласно их наблюдениям, *FLT3-ITD* возникает вследствие образования шпилькоподобной структуры из-за палиндромной последовательности в отстающей цепи во время репликации ДНК, что вызывает проскальзывание репликации и дублирование последовательности [10,46].

### 1.4 Локализация *FLT3-ITD* в последовательности гена *FLT3* и принципы нарушения аутоингибирования

*FLT3-ITD* по длине очень вариабельны, могут достигать до 400 пар оснований и более, имеют прямую ориентацию (5' - 3'), локализируются в 14-15 экзонах и всегда кратны трем, что сохраняет рамку считывания. При этом у

большинства пациентов рамка считывания сохраняется за счет точной дубликации нативной последовательности, тогда как у некоторых в последовательность добавляются внематричные нуклеотиды со стороны N-конца гена [47,48].

Большинство *FLT3-ITD* (рисунок 2) имеют локализацию в JMD (около 70% у взрослых с ОМЛ), в частности в области JM-Z рядом с шарнирным участком (HR). Это способствует внеклеточным конформационным изменениям JMD, аутофосфорилированию остатков тирозина в JM-S, сдвигу области JM-S к С-концевой части киназной складки. Это ведет к смещению JM-B и нивелированию аутоингибирующей функции JM-B. Эти изменения приводят к активации рецептора FLT3 без участия лиганда. Лиганд-независимая активация рецептора в дальнейшем усиливает активацию нижележащих сигнальных путей и снижает активность регуляторов транскрипции [10,35,49,50]. В частности, при *FLT3-ITD* опосредованной активации рецептора фосфорилируется и снижается экспрессия ключевых транскрипционных факторов миелопоэза (генов *PU.1*, *CEBPA*), а также подавляется экспрессия гена *RGS2*, что нарушает процесс дифференцировки миелоидных клеток [51,52,53]. Кроме того, мутантный белок FLT3 связывается с сайтами двух нижележащих сигнальных путей: MAP-киназный (белки ERK1, ERK2), предотвращая апоптоз клеток и STAT5, усиливая клеточную пролиферацию [54, 55]. При этом экспериментально, изучая роль белка FLT3 «дикого» типа и мутантного *FLT3-ITD* опосредованного белка в активации сигнальных молекул, было показано, что STAT5 путь фосфорилируется только *mut Flt3-32D* клетками, в то время *wt-Flt3-32D* клетки активируют исключительно MAP-киназный путь и обладают низкой пролиферативной активностью даже при стимуляции лигандом [56].

Дополнительно, угнетение апоптоза мутантным белком FLT3 будет происходить путем регуляции процессов транскрипции циклинов D1 и Bcl-XL [57,58].

Около 30% *FLT3*-ITD у взрослых с ОМЛ локализируются в ТКD1. На данный момент мало что известно о внутримолекулярных изменениях, которые происходят в результате появления этих дупликаций. Однако Breitenbücher и соавт экспериментально, используя метод Вестерн-блот, продемонстрировали, что *FLT3*-ITD в ТКD1 также вызывают конститутивную активацию рецептора и предположили, что это связано со вторичными изменениями в аутоингибирующем домене [59].

## 1.5 Структура *FLT3*-ITD

Структура *FLT3*-ITD, как и их локализация в последовательности гена *FLT3*, хорошо изучены в когорте взрослых пациентов (рисунок 2). Показано, что самым часто дублируемым участком является участок аминокислотной последовательности Y591-Y599 (YVDFREY<sub>591</sub>EY<sub>599</sub>). Минимум одна аминокислота этого региона дублируется у более чем 95% исследуемых пациентов. Vempati и соавт предполагают, что частая дупликация этого специфического участка юкстамембранного домена предполагает их существенной ролью в передаче сигнала [60]. Также часто дублируются аминокислотные остатки Y589, Y591 (около 40% дупликаций), непосредственно выступающие в качестве мотива связывания со STAT5. Анализ частоты встречаемости в дупликациях определенных аминокислот показал некоторую гетерогенность в разных исследованиях. Vempati с соавт. показали, что в их когорте чаще всего наблюдались дупликация R595-77% случаев, за ним следовали дупликации Y597-74%, F594, E596-по 73%, соответственно [60]. В исследованиях Kayser с соавт. самой дублируемой кислотой оказался Y597 (78,4%), далее следовал R595 (75,5%) [61]. Путем мутагенеза *in vitro* Vempati с соавт. [60] создали *FLT3*-ITD с часто дублирующимися аминокислотными остатками (R595/E596/Y597) и показали их важную роль в лиганднезависимой активации рецептора. Одновременно авторы исследовали активность рецептора с дупликациями, в составе которых

отсутствуют аминокислотные остатки Y591-Y599. Их активирующий потенциал оказался существенно ниже.

В научной литературе найдено крайне мало исследований, описывающих локализацию и структуру *FLT3-ITD* у детей с ОМЛ. Meshinchi с соавт. показали, что у детей большинство дупликаций расположены в экзоне 14 и лишь у 5 пациентов повторы начинались в интроне 14 и доходили до 15 экзона. Чаще всего дублировался мотив Y591–Y597, дупликация аминокислотных остатков Y589, Y591 наблюдалась у 31% пациентов. Самой дублируемой аминокислотой оказался Y597 (86%). Однако исследователи посчитали, что ее дупликация не имеет решающего значения для нарушения аутоингибирования, поскольку он располагается на поверхности белка *FLT3* согласно кристаллической структуре [16].

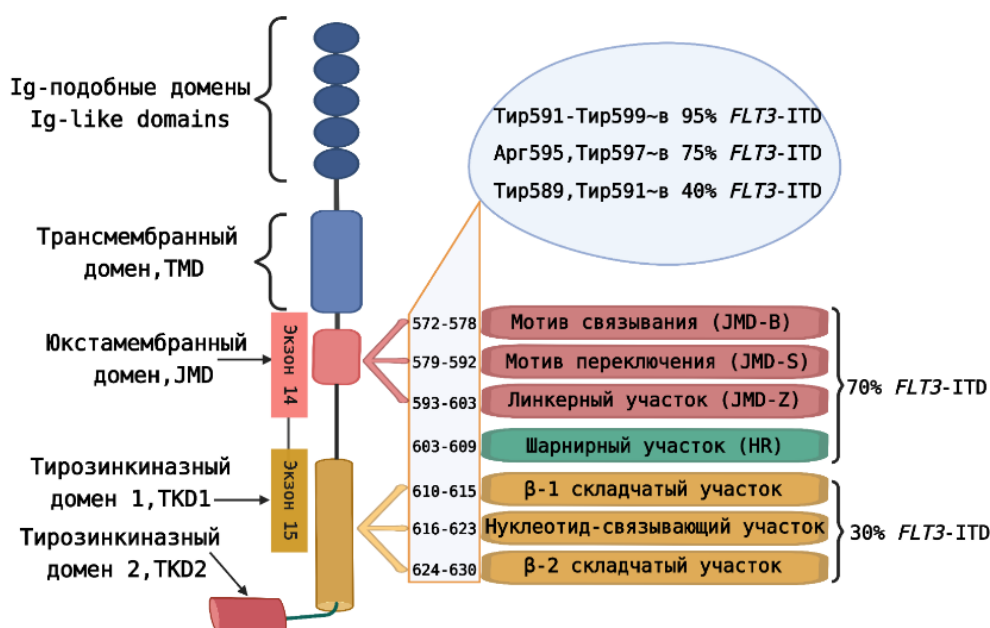


Рисунок 2 - Структура и локализация *FLT3-ITD* [10]

## 1.6 Особенности ОМЛ с *FLT3-ITD*

*FLT3-ITD* являются самым распространенным соматическим мутационным событием у детей с ОМЛ, частота встречаемости составляет от 15 до 20% от всех ОМЛ [3,5,27]. Эти показатели ниже, чем у взрослых

пациентов, где доля *FLT3-ITD*-положительных пациентов составляет 20–35% [62,63,64,65,66,67]. Исследования показали, что *FLT3-ITD* у детей коррелируют с более старшим возрастом [4, 68]. Это наблюдение объясняется исследованиями, где описывалась эволюция развития ОМЛ путем анализа единичных клеток (*single-cell*). В каждом анализируемом случае *FLT3-ITD* не являлась иницирующей, а приобреталась вследствие генетической изменчивости исходного клона на более поздних этапах лейкогенеза [17,69,70].

Наличие *FLT3-ITD* у взрослых и детей с ОМЛ коррелирует с повышенным числом лейкоцитов в крови, высоким процентом бластных клеток в периферической крови и костном мозге [4,62,68]. В соответствии с FAB-классификацией ОМЛ с *FLT3-ITD* представлен в основном острым миеломоноцитарным лейкозом (M4), острым миеломонобластным лейкозом без дифференцировки (M5a) и острым миеломонобластным лейкозом с дифференцировкой (M5b), а при остром эритроидном лейкозе (M6) и мегакариоцитарном лейкозе наблюдается очень редко [48, 62]. Это объясняется существенной ролью белка FLT3 в дифференцировке клеток моноцитарного ряда.

### **1.6.1 Цитогенетический профиль ОМЛ с *FLT3-ITD***

В рамках стандартной терапевтической стратегии (индукция ремиссии цитарабином (AraC), антрациклином +/- этопозид, постремиссионная терапия высокими дозами AraC с антрациклинами или этопозидом) стратификация на группы риска пациентов с ОМЛ проводится на основе генетических особенностей заболевания, которые определяются в ходе стандартного цитогенетического и молекулярно-генетического анализа. Около 20-25% случаев ОМЛ у детей не имеют структурных aberrаций [43,71,72,73,74] и классифицируется как ОМЛ с нормальным кариотипом (НК-ОМЛ). Дальнейший молекулярно-генетический анализ показывает, что в этой группе пациентов *FLT3-ITD* являются самым частым генетическим событием,

детектируемым примерно у 20-25% детей и 30-35% у взрослых [74,75]. При этом, *FLT3-ITD* так же могут сочетаться и с целым рядом цитогенетических аномалий [10,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86].

Примерно у 4-5% у детей с ОМЛ выявляются транслокации с участием гена *NUP98*. Ген *NUP98*, расположенный на хромосоме 11, в локусе 11p15 кодирует белок нуклеопорин и является частью комплекса ядерных пор, через которые в ядро из цитоплазмы проникают белки, регулирующие клеточный цикл. Хотя перечень генов-партнёров, вовлеченных в транслокации с участием *NUP98*, обнаруживаемых при остром миелоидном лейкозе, довольно широк, около 60% приходится на  $t(5;11)(q35;p15.4)$  с образованием химерного транскрипта *NUP98::NSD1*. Этот транскрипт, в свою очередь, очень часто (примерно в 80% случаев) сочетается с *FLT3-ITD* [76,77,78]. При-чем, результаты секвенирования РНК (RNA-Seq) показали, что химерный ген *NUP98::NSD1* проявляет высокую степень пенетрантности только в сочетании с мутацией *FLT3-ITD*. Это позволяет предположить, что эти генетические события действуют синергично, усиливая эффекты друг друга в процессе развития ОМЛ [79].

ОМЛ с транслокацией  $t(6;9)(p23;q34)$ , приводящая к слиянию 5'-части гена *DEK* в локусе 6p22.3 и 3'-части гена *NUP214*, в локусе 9q34, занимают всего 1% в структуре ОМЛ у детей [80,81]. Ген *DEK* кодирует белок, регулирующий доступность хроматина и ацетилирование гистонов [82], а ген *NUP214* регулирует клеточный цикл и нуклеоцитоплазматический транспорт [83]. Образование химерного гена *DEK::NUP214* негативно влияет на нормальную работу генов *HOX*, что приводит к нарушению процессов дифференцировки кроветворных клеток. Транслокация  $t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214$  в 40-50% случаев сочетается с *FLT3-ITD*. Было показано, что синергизм этих двух молекулярных событий усиливают сигнальные пути HIF1A и STAT, способствуя повышенной пролиферации лейкемических клеток [80].

ОМЛ с трисомией 8 в качестве единственной цитогенетической аномалии встречается редко, в 3-5% случаев. Исследования показали, что развитие ОМЛ при трисомии 8 связано с повышенной экспрессией генов, расположенных на 8-й хромосоме [84,85]. Кроме того, при трисомии 8 бластные клетки дополнительно несут широкий спектр генетических событий. В частности, обнаружены патогенные варианты в генах, отвечающих за эпигенетическую модификацию (55%), генах-регуляторах факторов транскрипции (51%) и сигнальных путей (40%). Встречаемость *FLT3-ITD* при трисомии 8 составляет около 30% [85,86].

К цитогенетическим абберациям, с которыми *FLT3-ITD* сочетается довольно редко, можно отнести CBF-лейкозы: (8;21)(q22;q22)/*RUNX1::RUNX1T1*; t(16;16)(p13q22)/*CBFB::MYH11*, где частота встречаемости *FLT3-ITD* - около 10%; лейкозы с перестройками гена *KMT2A*, делецией/моносомией 5-й и 7-й хромосом (частота встречаемости~2%) [10,75].

### 1.6.2 Молекулярно-генетический профиль ОМЛ с *FLT3-ITD*

Широкое внедрение в клиническую практику ВПС позволило более детально описать ранние (инициирующие) генетические события при ОМЛ с *FLT3-ITD*. Исследования показали, что *FLT3-ITD* молекулярно-генетически чаще сочетаются с мутациями в генах *NPM1*, *WT1*, реже с мутациями в *RUNX1*, вариантами в генах, ответственных за сигнальные пути и за эпигенетическую модификацию.

Ген нуклеофосмина *NPM1* локализуется в хромосоме 5, локусе 5q35, кодирует белок-шаперон NPM1. Строение белка включает в себя N-конец, центральное ядро и С-конец. В N-конце имеется участок NES (сигнал ядерного экспорта), ответственный за миграцию белка из ядра в цитоплазму. Центральное ядро состоит из участка связывания с гистонами и NLS участка (сигнал ядерной локализации), ответственного за локализацию белка в ядре. С-конец имеет область связывания с нуклеиновыми кислотами и участок

NoLS, ответственный за внутриядерную локализацию и связь с рибосомной ДНК. В норме, в *NPM1* дикого типа локализуется в ядре и участвует в регуляции клеточного цикла, репликации ДНК, остановке роста и апоптозе генетически нестабильных клеток [87,88,89,90,91].

Мутации в гене *NPM1* в виде инсерции 4 пар оснований при ОМЛ с НК встречаются в примерно 40-45% случаев. Локализируются мутации в С-концевой части гена (экзон 11) и нарушают структуру NoLS-области, ответственного за внутриядерную локализацию белка. Это способствует переносу белка *NPM1* в цитоплазму с помощью XPO1 (экспортином 1), что влечет нарушение дифференцировки и апоптоза ранних миелоидных предшественников, усиление их пролиферации под действием повышенной экспрессии белков семейства NOX [92,93,94].

Примерно в 40-45% случаях мутации в гене *NPM1* сочетаются с *FLT3-ITD* [92,93]. Экспериментальные исследования на мышах показали, что по отдельности эти мутации оказывают негативное влияние на систему кроветворения только после длительного латентного периода, тогда как их синергизм приводит к усилению пролиферативных свойств опухолевых клеток и развитию лейкоза за довольно короткий промежуток времени [95].

Ген *WT1* локализован в хромосоме 11, локусе 11p13, включает в себя 10 экзонов и выступает в качестве транскрипционного фактора, посттранскрипционного регулятора и супрессора опухоли. Регулирует развитие и метаболические процессы многих органов и тканей, включая кроветворную систему [96,97,98,99]. Так же показана роль *WT1* в качестве онкогена [100,101]. Мутации в гене *WT1* наблюдаются в 10% случаев ОМЛ. Локализируются патогенные варианты в ДНК-связывающем домене, в основном, в 7 и/или 9 экзонах и представлены в виде инделов, приводящих к сдвигу рамки считывания и синтезу усеченного белка. Это в свою очередь нарушает работу белка дикого типа [102].

Обнаружено, что мутации в *WT1* больше чем в половине случаев (57%) сочетаются с *FLT3-ITD* [103], причем в основном, при ОМЛ-НК и

t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1. Исследования показали, что гаплотипическая недостаточность (haploinsufficiency) *WT1* в сочетании *FLT3-ITD* приводят к нарушению экспрессии целого ряда генов: *ERG1*, *LRF2* и *S100A8*, ответственных за дифференцировку миелоидных клеток; *CIITA*, *CD74*, *CD86*, которые участвуют в работе главного комплекса гистосовместимости; *CHI313*, *LRF7*, *LRF4*, которые регулируют воспалительный ответ [104].

Мутации в гене *RUNX1* у детей с ОМЛ выявляются всего у 3% пациентов, в половине случаев у них наблюдаются дополнительные генетические события, самым частым из которых являются *FLT3-ITD* [105].

По сравнению со взрослыми [106] у детей с *FLT3-ITD* молекулярный профиль не так разнообразен и патогенные варианты в сигнальных путях (*NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *KIT*), генах, ответственных за метилирование ДНК (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), организацию хроматина, (*ASXL1*, *KMT2D*) и генах, связанных с когезинным комплексом (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG2*) наблюдаются довольно редко.

### **1.7 Прогностическое значение *FLT3-ITD* при ОМЛ у детей**

*FLT3-ITD* являются независимым фактором неблагоприятного прогноза. Впервые частота встречаемости *FLT3-ITD* и их влияние на показатели выживаемости у детей с ОМЛ было продемонстрировано на небольшой группе пациентов Iwai с соавт. в 1999 году [107]. Среди 94 пациентов *FLT3-ITD* были обнаружены всего у 5 (5,3%). Результаты терапии показали, что двое пациентов с *FLT3-ITD* умерли от прогрессии заболевания, а у двух пациентов развился ранний рецидив. Это исследование первым показало, что частота встречаемости *FLT3-ITD* у детей с ОМЛ была ниже по сравнению со взрослыми пациентами, а неблагоприятное прогностическое значение соответствовало ранее описанному у взрослых.

В 2001 году предположение о неблагоприятном влиянии *FLT3-ITD* на прогноз было подтверждено в исследовании Meshinchi с соавт., которые

описали результаты терапии детей (n=91), получавших лечение по протоколу Children's Cancer Group (CCG)-2891. Процент достижения ремиссии после индукции при ОМЛ с *FLT3*-ITD по сравнению с ОМЛ без *FLT3*-ITD был крайне низким (40% против 74% у *FLT3*-WT, p=0,0005), БСВ составила 7% против 44% соответственно, p=0,002, ОВ-13% против 50%, соответственно, p=0,02 [68].

Первое большое исследование, описывающее показатели выживаемости детей с ОМЛ, было опубликовано Zwaan с соавт. в 2003 году. Была проанализирована когорта пациентов в возрасте от 0 до 18 лет, получавших терапию по протоколам BFM-AML 1987, 1993, 1998 (немецкая исследовательская группа) и DCLSG ANLL 1987 и 1994 (голландская исследовательская группа по детской лейкемии). В этом исследовании доля *FLT3*-ITD-положительных ОМЛ составила 11,5%. Ремиссия после индукционной терапии у пациентов с *FLT3*-ITD была достигнута только в 70% случаев против 88% при ОМЛ с *FLT3*-WT, p=0,01. Показатели 5-летней БРВ составили соответственно 29% против 46%, p= 0,0046), ОВ-32% против 58%, p= 0,037) [7].

Неблагоприятное влияние высокого аллельного соотношения *FLT3*-ITD у детей впервые было показано в исследованиях Liang и соавт. Согласно их результатам, все пациенты с AR *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT больше 2,0 умерли в течение 8 месяцев после постановки диагноза [4]. В этом же исследовании впервые было показано, что ОМЛ с *FLT3*-ITD у детей как и у взрослых [48,108] ассоциированы с НК. Позже Meshinchi с соавт. подтвердили эти исследования, показав худшие показатели выживаемости у детей с AR *FLT3*-ITD/*FLT3*-WT больше 0,69 по сравнению с пациентами без *FLT3*-ITD (20% против 61% соответственно; p=0,037) [68].

Позже Meshinchi с соавт. изучили результаты терапии крупной педиатрической когорты, включавшей 630 детей с ОМЛ, получавших лечение по протоколам CCG-2941 и CCG -2961. Было показано, что четырехлетняя БСВ у детей с *FLT3*-ITD была ниже, чем у пациентов с *FLT3*-WT (31% против

55% соответственно,  $p < 0,001$ ), а ОВ имела тенденцию к снижению по мере увеличения аллельного соотношения *FLT3-ITD/FLT3-WT* и у пациентов с *AR-FLT3-ITD* больше 0,4 исходы терапии были значимо хуже, чем в группе *FLT3-WT* (19% по сравнению с 54% у пациентов с *FLT3-WT*,  $p = 0,001$ ). При этом риск развития рецидива в течение 4-х лет после достижения ремиссии составил 83% тогда как у группы *FLT3-WT* 43% ( $p < 0,001$ ) [10,75].

Herlin с соавт. показали, что пациенты, у которых наблюдаются мутации в гене *NPM1* и *FLT3-ITD* с  $AR < 0,5$ , лучше показатели БСВ по сравнению с группой с мутациями в гене *NPM1* и *FLT3-ITD* с  $AR > 0,5$  (85% и 69% соответственно,  $p = 0,025$ ) [74].

На основании всех этих исследований во многих протоколах лечения детского ОМЛ при стратификации на группы риска пациентов с НК стали учитывать  $AR$  *FLT3-ITD* и мутационный статус гена *NPM1*. Пациентов с *FLT3-ITD* без мутаций в *NPM1* независимо от  $AR$  и пациентов с мутациями в *NPM1* и *FLT3-ITD* с  $AR > 0,5$  стали включать в группу высокого риска, тогда как пациенты с мутациями в *NPM1* и *FLT3-ITD* с  $AR < 0,5$  стратифицировались в группу промежуточного риска.

В более поздних исследованиях Sakaguchi и соавт. показали, что НК с мутациями в *NPM1* и *FLT3-ITD* с низким  $AR$  не был связан с благоприятным исходом (ОВ составила всего 41,3%), а проведение алло-ТГСК в первой клинико-гематологической ремиссии всем *FLT3-ITD*-положительным пациентам значительно улучшает исход заболевания [13]. Схожие результаты клинической эффективности алло-ТГСК независимо от соотношения аллелей *FLT3-ITD* и статуса *NPM1* показали Organ с соавт. с использованием многофакторных регрессионных моделей [109].

### **1.7.1 Прогностическое значение *FLT3-ITD* в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ**

Помимо нормального кариотипа *FLT3-ITD* достаточно часто сочетаются с рекуррентными абберациями. В случае их сочетания с основной

стратифицирующей перестройкой группа риска определяется в соответствии с основным маркером. При сочетании же *FLT3-ITD* с маркером неопределенного риска пациента всегда классифицируют в группу высокого риска. Считалось, что *FLT3-ITD* являются неблагоприятным прогностическим маркером только у пациентов с нормальным кариотипом. В своих недавних исследованиях, Tarlock с соавт. провели сравнение показателей выживаемости пациентов в возрасте до 30 лет с цитогенетическими и молекулярно-генетическими абберациями благоприятного (*NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *CBFB::MYH11*), промежуточного (все пациенты, не классифицированные в группы благоприятного и неблагоприятного риска) и неблагоприятного (*NUP98::NSD1*, *DEK::NUP214/t(6;9)*, *WT1*, *UBTF*) риска с и без *FLT3-ITD*, где показали, что БСВ не отличалась между пациентами благоприятной (65,1% у пациентов с *FLT3-ITD* и 64% у пациентов с *FLT3-WT*,  $p=0,375$ ) и промежуточной группы (41,9% у пациентов с *FLT3-ITD* и 38,4% у пациентов с *FLT3-WT*,  $p=0,230$ ), тогда как у пациентов с маркерами неблагоприятного риска имелась тенденция к более низким значениям (22,2% и 29,7%,  $p=0,065$ ) [11]. Однако ранее Kayser с соавт., изучая влияние *FLT3-ITD* в группе СBF-лейкозов ( $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1::RUNX1T1$ ;  $t(16;16)(p13q22)/CBFB::MYH11$ ), показали, что *FLT3-ITD* может оказывать неблагоприятное влияние даже в группе пациентов с генетическими маркерами благоприятного риска. Согласно их наблюдениям, четырехлетняя безрецидивная выживаемость (БРВ) детей с СBF-лейкозами с *FLT3-ITD* в отсутствии трисомии 22 хромосомы составила всего 38%, в связи с чем было предложено проводить таким пациентам более интенсивную терапию с включением ингибиторов *FLT3* [12]. Liu с соавт., провели многофакторный анализ результатов терапии пациентов с трисомией 8, который выявил, что наличие мутации *FLT3-ITD* являются единственным фактором, который существенно ухудшал прогноз заболевания (относительный риск, ОР 3,39,  $p=0,014$ ), а алло-ТГСК в период ПР1-ключевой фактор, благоприятно влияющий на исход заболевания (ОР 9,24,  $p=0,001$ ) [86]. Tarlock с соавт.,

изучая результаты терапии большой когорты детей и молодых взрослых с ОМЛ с *FLT3-ITD*, также выявили, что у пациентов, у которых *FLT3-ITD* сочетались с трисомией 8, были очень низкие показатели БСВ (30%) и ОВ (40%) [110].

Сочетание патогенных вариантов в гене *WT1* и *FLT3-ITD* также является крайне неблагоприятным событием при ОМЛ. Об этом свидетельствуют недавние исследования Bhatnagar с соавт., согласно которым, у пациентов с мутациями в *WT1* в сочетании с *FLT3-ITD* по сравнению с группой с вариантами *WT1* и *FLT3-WT* более низкие показатели ОВ (медиана 0,7 и 1,5 года соответственно,  $p < 0,001$ ) и БСВ (медиана 0,2 и 0,8 года,  $p < 0,001$ ). Все эти наблюдения позволяют по-новому взглянуть на существующие подходы к стратификации и терапии ОМЛ с *FLT3-ITD* [111].

### **1.7.2 Влияние длины, количества tandemных повторов и места вставки на результаты терапии ОМЛ с *FLT3-ITD***

В исследованиях Meshinchi с соавт. было показано, что у пациентов с короткими дупликациями (менее 48 п.о.), по сравнению с пациентами с длинными (более 48 п.о.) были выше показатели ОВ (67% и 21%, соответственно  $p = 0,006$ ) и БРВ (51% и 19%, соответственно,  $p = 0,035$ ) [16]. В этом же исследовании оценивалось влияние количества tandemных повторов на результаты терапии. Было показано, что пятилетняя ОВ (30% у пациентов с одной ITD и 31% у пациентов с более чем одной ITD,  $p = 0,52$ ) и частота рецидивов (70% и 69%, соответственно,  $p = 0,35$ ) статистически не отличалась. В работе Gale с соавт. сравнивались клинические данные пациентов с *FLT3-ITD* в 4 группах в зависимости от длины (1 группа: 15-27п.о.; 2 группа: 30-45п.о.; 3 группа: 48-63п.о.; 4 группа: 66-213п.о.) и было показано снижение процента достижения ПР1 после индукционной терапии по мере увеличения длины вставки (90%, 92%, 88% и 76% соответственно,  $p = 0,02$ ) при отсутствии достоверных различий в показателях ОВ и БРВ [112]. Отсутствие прогностического значения длины tandemных повторов было показано и в

более поздних исследованиях [113]. Такие противоречивые данные, по мнению авторов, говорят о том, что прогностическое значение, возможно, имеет не столько протяженность *FLT3-ITD*, сколько характер дублицированных фрагментов и их локализация.

Действительно, ряд исследований ОМЛ у взрослых показали, что 30% дубликаций выходят за пределы JMD, локализуясь в TKD1. Kayser и соавт. идентифицировали наличие тандемных повторов, расположенных вне юкстамембранного домена, как неблагоприятный прогностический фактор достижения полной ремиссии (ОР 0,22;  $p=0,01$ ), БРВ (ОР 1,86;  $p<0,001$ ) и ОВ (ОР 1,59;  $p=0,008$ ) [61]. Эти наблюдения подтвердили Fischer с соавт., показав, что у пациентов с дубликацией в JMD полная ремиссия достигается чаще по сравнению с пациентами с *FLT3-ITD*, локализованным в TKD1 (86,4% против 57,1%,  $p=0,045$ ) [116].

Это свидетельствует о важности более детального исследования локализации и структуры *FLT3-ITD* у детей на этапе первичной диагностики. По мере накопления эти данные могут использоваться для коррекции или выбора индивидуализированной терапии.

## **1.8 Ингибиторы тирозинкиназ и их влияние на результаты терапии ОМЛ с *FLT3-ITD***

Крайне неблагоприятное прогностическое влияние *FLT3-ITD* на исход ОМЛ послужило стимулом для создания лекарственных препаратов, которые могут оказывать влияние на активность мутированного белка FLT3. Принцип действия всех имеющихся на сегодняшний день ИТК основан на взаимодействии препарата с АТФ-связывающим участком петли активации белка FLT3 и последующей его инактивации. По механизму этого взаимодействия ИТК подразделяются на 2 типа (рисунок 3): ингибиторы 1 типа (сунитиниб, мидостаурин, лестауртиниб, креноланиб и гилтеритиниб), которые связываются с ключевым участком рецептора только в том случае, если он находится в активной конформации и ингибиторы 2 типа (сорафениб,

понатиниб, квизартиниб), которые связываются только с конформационно неактивным рецептором [115].

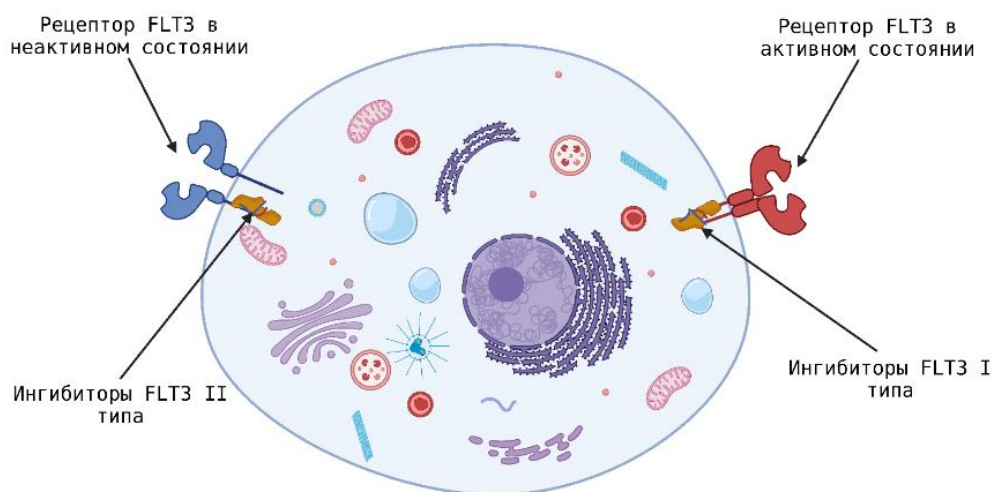


Рисунок 3 - Механизм действия на белок FLT3 ИТК I и II типов [10]

ИТК первого поколения (сунитиниб, сорафениб, мидостаурин) обладают ингибирующей активностью не только в отношении FLT3, но и многих других тирозинкиназ (KIT, PDGFR, VEGFR, RAS/RAF, JAK2). Первым ингибитором, который показал высокую ингибирующую активность в отношении FLT3, стал лестауртиниб [116]. Исследования I и II фазы на 17 взрослых пациентах с рецидивом/рефрактерным ОМЛ с *FLT3-ITD* показали, что лестауртиниб переносился без выраженных осложнений и устойчиво подавлял фосфорилирование FLT3, снижая процент бластных клеток [117,118]. Эти данные способствовали включению лестауртиниба в индукционную и консолидирующую химиотерапию пациентам с мутациями в гене *FLT3* в рамках исследования MRC AML15. Позже результаты этого исследования показали эффективное ингибирование FLT3 у 82% пациентов, которые получали таргетную терапию [119].

Позднее Stone с соавт. показали эффективность мидостаурина, продемонстрировав, что пациенты, к стандартной терапии которых был добавлен мидостаурин, имели более высокие показатели БСВ по сравнению с

группой, получавших только стандартную терапию (ОР 0,78;  $p=0,002$ ) [120]. Sasaki с соавт. изучили результаты терапии большой когорты пациентов с ОМЛ с *FLT3-ITD*, 43% из которых получали вместе со стандартной химиотерапией сорафениб, тогда как 57% получали только химиотерапию. Было выявлено, что в группе пациентов, которые получали сорафениб по сравнению с группой, получавших только химиотерапию, значительно длиннее медиана БРВ (35 и 8 месяцев, соответственно,  $p=0,019$ ) и ОВ (42 и 13 месяцев, соответственно,  $p=0,026$ ). Значительное влияние сорафениба на показатели выживаемости показали и результаты многофакторного анализа (КР=0,558,  $p=0,009$ ) [121]. Рандомизированное двойное слепое исследование Röllig с соавт также показало, что 3-летняя БРВ в группе плацебо составила 22% (95%ДИ 13-32) что ниже по сравнению с 40% (95%ДИ 29-51) в группе пациентов, которым к стандартной химиотерапии добавляли сорафениб (отношение рисков (ОР)-0,64, 95%ДИ 0,45-0,91,  $p=0,013$ ). Однако в группе, которая получала сорафениб, статистически выше был процент развития осложнений 3 степени: повышения температуры тела (ОР 1,54), диареи (ОР 7,89), кровотечений (ОР 3,75), сердечные приступы (ОР 3,46), кожные реакции в области кистей и стоп (наблюдались только в группе, которая получала сорафениб) и кожные высыпания (ОР 4,06) [122]. Эти осложнения были связаны с воздействием мультикиназных ингибиторов на другие рецепторные тирозинкиназы.

В последующем, с целью снижения риска осложнений, были разработаны более избирательные ИТК нового (второго) поколения-квизартиниб, креноланиб и гилтеритиниб. Эффективность и безопасность ИТК нового поколения показали Etrb с соавт. по результатам рандомизированного двойного слепого исследования, где сравнивались результаты терапии пациентов с впервые диагностированным ОМЛ, получавших вместе со стандартной химиотерапией квизартиниб и пациентов, которые лечились только стандартной химиотерапией (группа плацебо). Согласно результатам у пациентов, получивших квизартиниб, медиана ОВ

оказалась существенно выше по сравнению с группой плацебо (32 и 15 месяцев, соответственно,  $p=0,032$ ) [123].

Per1 с соавт., которые в ходе слепого рандомизированного исследования изучали эффективность гилтеритиниба у пациентов с рефрактерным и/или рецидивирующим ОМЛ с *FLT3-ITD*, показали, что у пациентов, получавших гилтеритиниб по сравнению с группой плацебо, существенно выше медиана ОВ (9,3 и 5,6 месяца, соответственно,  $p<0,001$ ) и ниже процент развития осложнений 3-й степени [124].

Широкое применение ИТК в дополнение к стандартной терапии взрослым пациентам с впервые установленным и/или рефрактерным/рецидивирующим ОМЛ стало настоящим прорывом и значительно улучшило исход ОМЛ с *FLT3-ITD* [110, 125, 126]. Это позволило включить *FLT3-ITD* в промежуточную группу риска в обновленной стратификации групп риска ОМЛ ELN2022.

Ингибирование FLT3 как стратегия лечения детского ОМЛ долгое время было затруднено значительной токсичностью ИТК, в основном из-за off-target эффектов. Однако результаты терапии ОМЛ у взрослых, которые были достигнуты при добавлении к стандартной химиотерапии более селективного перорального ИТК гилтеритиниба, привели к включению этого препарата в проспективное исследование AAML1831 Группы детской онкологии (NCT04293562). Исследование в настоящее время продолжается, завершить исследование планируется в 2027 году.

## **1.9 Современные методы детекции *FLT3-ITD***

Детекция *FLT3-ITD* является обычной рутинной диагностической практикой для пациентов с ОМЛ ввиду важного прогностического значения и возможности таргетной терапии [127]. В настоящее время «золотым стандартом» детекции *FLT3-ITD* выступает анализ длины ПЦР-фрагментов с помощью капиллярного электрофореза (рисунок 4). Преимуществами этого метода являются быстрота получения результатов, высокая чувствительность

(более 1%), специфичность и возможность оценить AR, которое представляет собой отношение площади «мутантного» аллеля к аллелю «дикого типа» (*FLT3-ITD/FLT3-WT*) [127,128,129,130,131]. Для проведения ПЦР подбираются праймеры, комплементарные 14-15 экзонам гена *FLT3*, 5'конец которого мечен флуоресцентным красителем. После проведения ПЦР, полученный ПЦР-продукт в ходе капиллярного гель-электрофореза разделяется по соотношению заряд/масса. Разделенные фрагменты двигаясь по капиллярам прибора, пересекают оптический лазер, который возбуждает флуоресценцию меченых концов ДНК фрагментов. Это свечение улавливает, регистрирует и разделяет по спектру ПЗС-камера прибора. Камера далее конвертирует эти данные в цифровые значения и сохраняет полученные файлы в формате, совместимом с программным обеспечением, используемым для анализа. Программа для анализа данных позволяет оценить количество, длину и аллельную нагрузку *FLT3-ITD*. Все ампликоны, которые по длине больше чем «дикий тип» считаются положительными по *FLT3-ITD*.

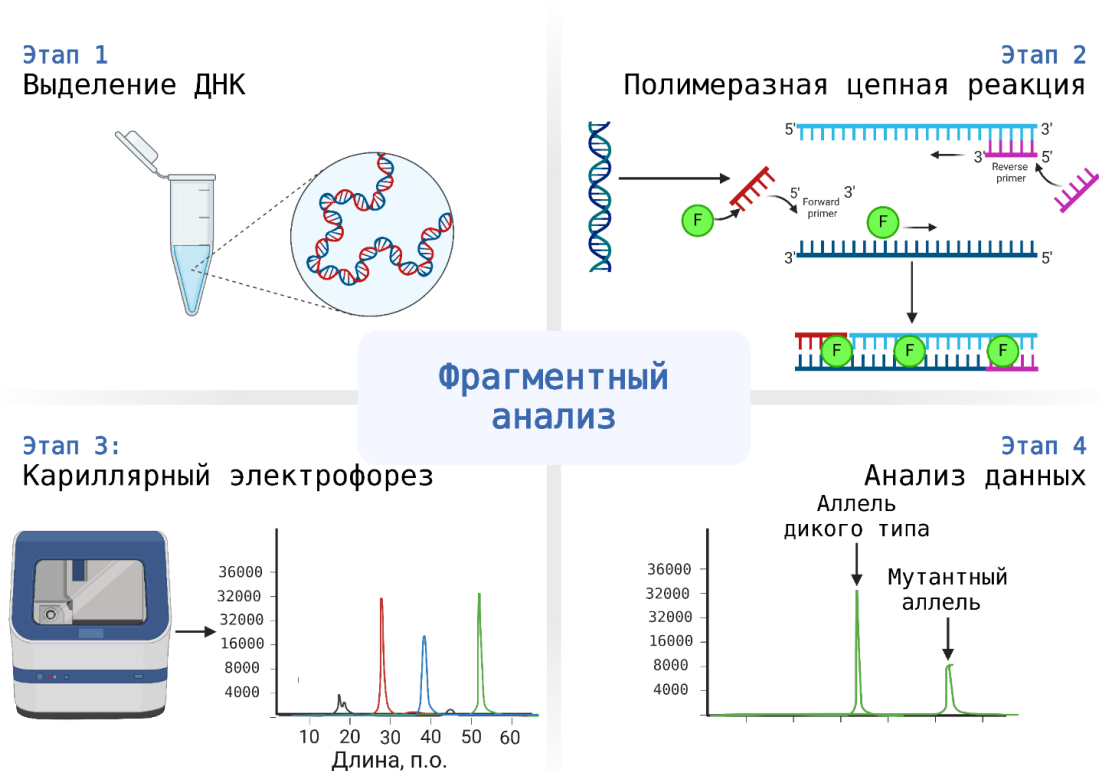


Рисунок 4 - Этапы фрагментного анализа [10]

Ограничениями метода являются невозможность исследовать структуру и локализацию вставки *FLT3-ITD*.

Создание новых биоинформатических инструментов и алгоритмов позволяют эффективно обнаруживать *FLT3-ITD* с использованием данных ВПС (рисунок 5). Эти алгоритмы можно разделить на две большие группы по стратегии выявления крупных инсерций/делеций/дупликаций. В первую группу входят алгоритмы Pindel, ITDseek, getITD, ScanITD и FLT3\_ITD\_ext [132,133,134,135,136], которые вначале выравнивают первичные ВПС-данные на эталонный геном человека, формируя BAM-файл. Из BAM-файла далее извлекаются несоответствующие исходной последовательности прочтения с указанием координат начала и конца вставки в последовательности генома. Во вторую группу входят алгоритмы BreaKmer, ITDetector и ITD assembler [137,138,139], которые вначале выявляют повторяющиеся прочтения в исходных данных ВПС и собранные фрагменты выравнивают по эталонному геному человека и находят точные координаты вставки.

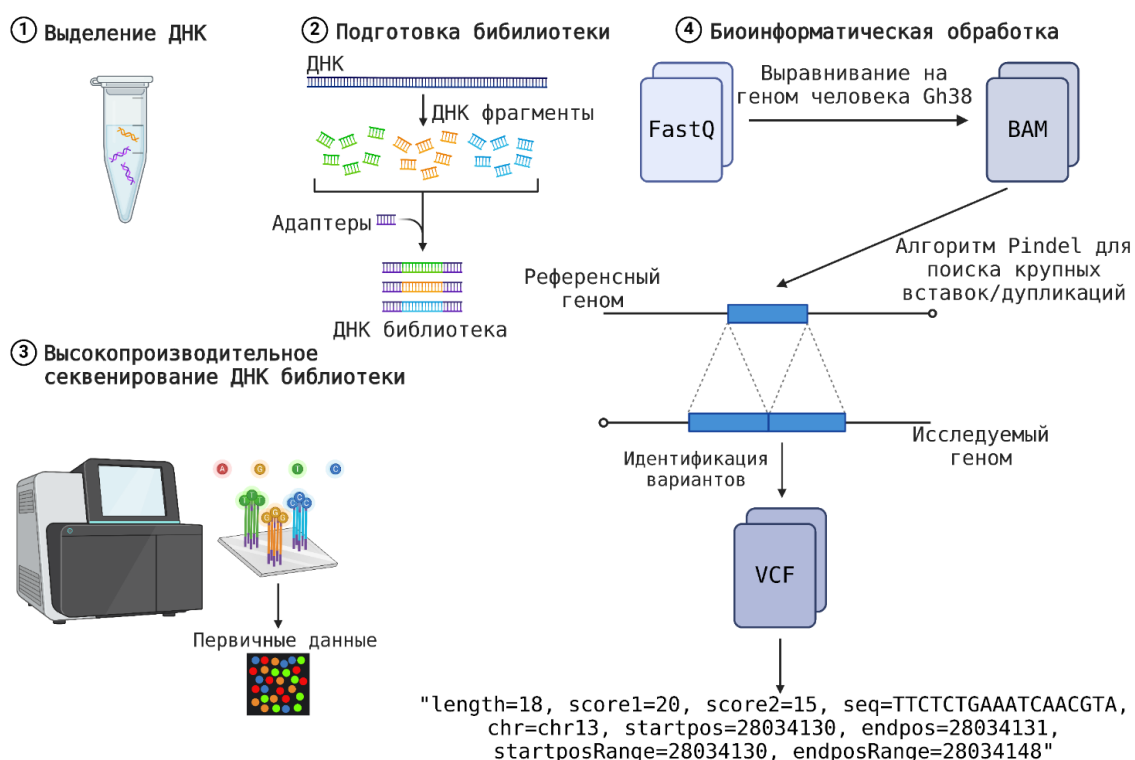


Рисунок 5 - Этапы детекции *FLT3-ITD* методом высокопроизводительного секвенирования [10]

Наиболее широкое практическое применение в лабораторной практике получил алгоритм Pindel. С его помощью можно анализировать только парно-концевые прочтения. Вначале все прочтения выравниваются на референсный геном человека (hg38 или hg19) и выдаются BAM-файлы. При анализе BAM-файла алгоритм определяет считывания с парными концами, у которых успешно выравнен только один конец. Не выравненный конец Pindel делит на две части и каждую часть продолжает выравнивать на эталонный геном. На заключительном этапе проверяются результаты выравнивания двух частей, чтобы определить координаты и последовательность внутренних tandemных дупликаций в последовательности генома. Результаты выдаются в виде VCF-файла [132].

Качественный анализ показал, что Pindel обладает высокой чувствительностью (100% на смоделированных и 96% на реальных образцах) и специфичностью (отсутствие ложноположительных результатов на смоделированных и реальных образцах) по сравнению с другими алгоритмами в отношении определения положения вставки ITD и ее длины, но уступает по точности определения AR алгоритму FLT3\_ITD\_ext и даже результатам ФА [140,141,142]. Кроме того, этот алгоритм не позволяет обнаруживать дупликации с крупными вставками и/или рассредоточенные дупликации.

Ограничениями для рутинного использования алгоритма Pindel, как и других инструментов для выявления *FLT3*-ITD, является сложность установки сторонних программ, необходимых для нормальной работы используемых платформ [134, 140].

## **1.10 Возможности диагностики и клиническое значение**

### **МОБ *FLT3*-ITD**

*FLT3*-ITD являются субклональными, молекулярно нестабильными и вариабельными по локализации, в связи с чем долгое время ограничивалась возможность оценки МОБ *FLT3*-ITD [143]. Чувствительность стандартного

фрагментного анализа составляла <1% и не подходила в качестве метода для оценки МОБ.

Grunwald и соавт предложили метод TD-ПЦР, которая была основана на использовании стандартизированных пар праймеров для амплификации (7 пар праймеров, охватывающих всю длину 14 экзона). Принцип позволял проводить амплификацию только в том случае, если целевой участок дублировался. Главным преимуществом метода являлась высокая чувствительность ( $10^{-4}$ ). С применением TD-ПЦР авторы провели оценку МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК 28 пациентам и полученные данные показали, что у семи пациентов (25%) перед алло-ТГСК сохранялась персистенция МОБ *FLT3-ITD*. Оценка результатов терапии продемонстрировала, что наличие МОБ+ *FLT3-ITD* было прогностическим фактором ( $p = 0,0003$ ) развития рецидива после алло-ТГСК [144].

Несмотря на высокую чувствительность метод ограничивался невозможностью обнаружения дубликаций менее 30–40 оснований, так как такие дубликации являлись слишком короткими для отжига праймеров. В связи с этим с использованием метода TD-ПЦР проводилась оценка МОБ *FLT3-ITD* только пациентам, которые изначально имели длинные дубликации (>40 пар оснований).

В последние годы стали широко использовать метод ВПС в качестве инструмента для оценки МОБ *FLT3-ITD*. В частности, Grob с соавт. проводили исследования ремиссионных образцов пациентов с изначально диагностированным *FLT3-ITD* с использованием ВПС и показали, что у 23% в ПР1 по данным МПЦ сохраняется персистенция МОБ *FLT3-ITD*, при чем все дубликации по длине соответствовали инициальным, что свидетельствовало о стабильности генетического маркера. Авторы, оценивая прогностическую значимость МОБ *FLT3-ITD*, показали, что персистенция *FLT3-ITD* в ремиссии заболевания связана с повышенным риском рецидива (75% против 33% у пациентов без МОБ *FLT3-ITD*,  $p < 0,001$ ) и снижением ОВ (31% против 57%,  $p < 0,001$ ) [20].

Позднее Rücker с соавт. на пациентах с ОМЛ, включенных в немецко-австрийскую исследовательскую группу, показали, что отсутствие по результатам ВПС МОБ *FLT3-ITD* после двух циклов химиотерапии было ассоциировано с низким процентом развития рецидива (26% против 46% у МОБ *FLT3-ITD* позитивных,  $p=0,001$ ) и лучшими показателями ОВ (4-х летняя 70% и 44%, соответственно,  $p=0,012$ ). Результаты многофакторного анализа показали, что после двух циклов химиотерапии единственным благоприятным фактором для ОВ (ОР 0,39,  $p=0,018$ ) и риска развития рецидива (ОР=0,29,  $p=0,006$ ) является МОБ *FLT3-ITD* отрицательный статус [145].

Кроме того, по наблюдениям Grob T. с соавт. молекулярная ремиссия имела важное прогностическое значение и перед алло-ТГСК, поскольку ими было выявлено, что отсутствие молекулярной ремиссии перед алло-ТГСК значительно повышает риск развития рецидива (71% против 39% у пациентов без МОБ *FLT3-ITD*,  $p<0,001$ ) [20]. Эти наблюдения подтверждают Rücker F.G. с соавт. Согласно их исследованию, у МОБ *FLT3-ITD* отрицательных пациентов, получивших алло-ТГСК в ПР1 наблюдались лучшие показатели ОВ (4-х летняя 77% и 44% у МОБ *FLT3-ITD* позитивных,  $p=0,029$ ) [145].

В последующем Levis с соавт. показали, что применение гилтеритиниба после алло-ТГСК имеет важное клиническое значение для пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD* перед ТГСК (ОР 0,515 (0,316-0,838),  $p=0,0065$ ), тогда как для пациентов с МОБ *FLT3-ITD* отрицательным статусом перед алло-ТГСК прием гилтеритиниба не влиял на исход заболевания (ОР 1,213 (0,616-2,387),  $p=0,5750$ ) [146].

Эти наблюдения подчеркивают необходимость оценки статуса МОБ *FLT3-ITD* современными молекулярными методами для своевременной модификации терапии и улучшения исхода ОМЛ с *FLT3-ITD*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Критерии включения пациентов в исследование

Проведённое исследование носило ретроспективный характер, одобрено Независимым этическим комитетом 11.02.2025 года и утверждено решением Ученого Совета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России 11.03.2025 года. В исследование включены 64 пациента с *FLT3-ITD* и 461 пациент без *FLT3-ITD* с впервые установленным диагнозом ОМЛ на основании результатов клинических, морфологических, цитохимических, иммунофенотипических исследований. Все пациенты проходили лечение в рамках кооперативного мультицентрового исследования ОМЛ-MRD2018 (NCPHOI-2018-05) «Лечение острых миелоидных лейкозов у детей с помощью интенсивной полихимиотерапии и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от геноидентичного или гаплоидентичного донора в зависимости от группы молекулярно-генетического риска и MRD ответа на индукционную химиотерапию» (выписки из протокола заседаний НЭК №11э/3-18 от 20.11.2018 – версия 1 и № 2э/1-19 от 02.04.2019 – версия 2) в период с 04.2018 по 01.2024 гг.

Критериями включения в исследование являлись:

- Возраст 0–18 лет;
- Впервые установленный диагноз острый миелоидный лейкоз;
- Подписанное информированное добровольное согласие на участие в клиническом исследовании.

Критериями исключения из исследования являлись:

- Острый промиелоцитарный лейкоз (M3-вариант) с  $t(15;17)(q22;q11-q21)/PML::RARA$ ;
- Миелодиспластический синдром (рефрактерная анемия с избытком бластов);

- ОМЛ в результате эволюции приобретенной апластической анемии или врожденных форм костномозговой недостаточности (тяжелая врожденная нейтропения, анемия Фанкони, и др), в исходе других миелопролиферативных заболеваний (например, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз);
- Несогласие на участие в исследовании и/или неподписание информированного согласия перед началом терапии или отказ от продолжения участия в любое время.

Все пациенты проходили цитогенетическую и молекулярно-генетическую диагностику в лаборатории цитогенетики и молекулярной генетики ФГБУ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России или в лаборатории молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург. На основании цитогенетических и молекулярно-генетических маркеров пациенты, согласно мультицентровому исследованию ОМЛ-MRD2018, включались в группы риска (таблица 1).

Таблица 1 - Стратификация на группы риска пациентов протокола ОМЛ-MRD2018

Группы риска	Цитогенетический/молекулярный маркер
Стандартный риск	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>inv(16)(p13.1q22)/CBFb::MYH11</i> или <i>t(16;16)(p13.1;q22)/CBFb::MYH11</i></li> </ul>
Промежуточный риск	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1:RUNX1T1</i> без трисомии 4-й хромосомы</li> <li>• <i>t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A</i> с морфологией M5</li> <li>• <i>t(1;11)(q21;q23)/ KMT2A ::MLLT11</i></li> <li>• Нормальный кариотип без <i>FLT3-ITD</i></li> <li>• Мутации в гене <i>NPM1</i> без дополнительных молекулярных аномалий или с <i>FLT3-ITD</i> с аллельным соотношением &lt;0,5</li> </ul>

Продолжение таблицы 1

Группы риска	Цитогенетический/молекулярный маркер
Промежуточный риск	<ul style="list-style-type: none"> <li>• М7 с t(1;22)(p13;q13)/<i>RBM15::MKL1</i></li> <li>• Две мутации в гене <i>CEBPA</i></li> <li>• Отсутствие других кариотипических и молекулярно-биологических критериев высокого риска</li> </ul>
Высокий риск	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 11q23 аномалии кроме t(1;11)(q21;q23)/<i>KMT2A::MLLT11</i> и t(9;11)(p21.3;q23.3)/<i>MLLT3::KMT2A</i> с морфологией М5</li> <li>• Inv(3)(q21.3q26.2), t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2</i>, <i>MESOM</i></li> <li>• Сложные аномалии кариотипа (&gt;3 аномалий)</li> <li>• t(8;21)(q22;q22.1)/<i>RUNX1::RUNX1T1</i> с трисомией 4-й хромосомы</li> <li>• t(16;21)(p11;q22)/<i>FUS::ERG</i></li> <li>• Моносомия по 7-й хромосоме</li> <li>• Моносомия по 5-й хромосоме, делеция длинного плеча 5-й хромосомы</li> <li>• Нормальный кариотип с активирующими мутациями в гене <i>FLT3 (FLT3-ITD)*</i></li> <li>• ОМЛ с М7-вариантом без t(1;22)(p13;q13)/<i>RBM15::MKL1</i></li> <li>• ОМЛ с М6-вариантом</li> <li>• t(7;12)(q36;p13)/<i>MNX1::ETV6</i></li> <li>• ОМЛ с мультилинейной дисплазией</li> <li>• Транслокации с участием <i>NUP98</i></li> <li>• Мутации в гене <i>TP53</i></li> <li>• Мутации в гене <i>RUNX1</i></li> </ul>

\*К этой категории пациентов относятся:

- Нормальный кариотип с активирующими мутациями в гене *FLT3 (FLT3-ITD)* при отсутствии мутаций в гене *CEBPA*;

- Пациенты с активирующими мутациями в гене *FLT3* (*FLT3-ITD*), у которых нет митозов по результатам кариотипирования, но по данным FISH отсутствуют стратифицирующие транслокации.
- Пациенты с мутациями в гене *NPM1* с *FLT3-ITD* с аллельным соотношением  $>0,5$  без дополнительных молекулярных аномалий.

## 2.2 Пациенты с *FLT3-ITD*-критерии стратификации и терапевтический план лечения

*FLT3-ITD* были обнаружены у 64 пациентов. У двух пациентов *FLT3-ITD* сочетался с *inv(16)(p13.1q22)/CBFb::*MYH11**. Эти пациенты были стратифицированы в группу стандартного риска. Терапевтический план этих пациентов включал пять блоков химиотерапии и представлен на рисунке 6. Один пациент умер до оценки статуса ремиссии от синдрома лейкостаза, другой пациент получил терапию в полном объеме.

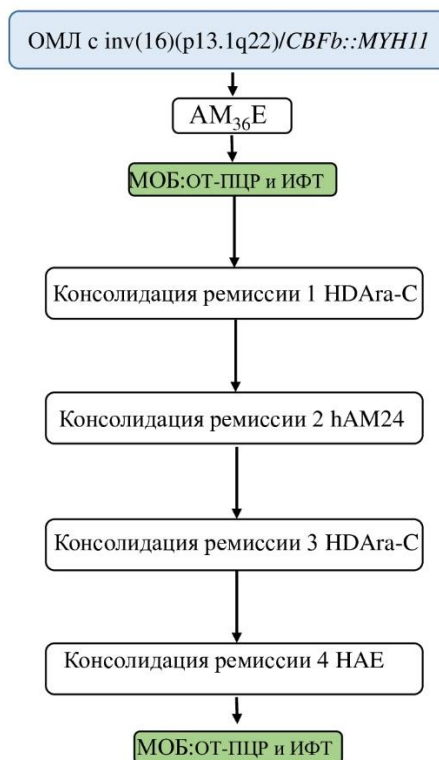


Рисунок 6 - Терапевтический план лечения пациентов, включенных в группу стандартного риска протокола ОМЛ-MRD-2018

Одиннадцать пациентов с *FLT3*-ITD были стратифицированы в группу промежуточного риска. Терапевтический план этих пациентов представлен на рисунке 7. По результатам оценки МОБ методом многоцветной проточной цитометрии (МПЦ) после первого курса индукционной терапии АМЕ<sub>42</sub>Е у десяти пациентов была детектирована ПР1 (МОБ <5%). Один пациент после АМЕ<sub>42</sub>Е получил аллогенную ТГСК, один пациент умер от инфекционных осложнений после 1-го блока постремиссионной терапии высокими дозами цитарабина и митоксантрона (НАМ), оставшиеся восемь пациентов получили последующую протокольную терапию в полном объеме.

У одного пациента с мутацией в гене с *NPM1* и *FLT3*-ITD с AR<0,5 была детектирована первичная рефрактерность после АМЕ<sub>42</sub>Е. Этому пациенту был проведен курс терапии «спасения» FLAIda→FLA с добавлением сорафениба (дополнительно было получено согласие на изменение протокола лечения по медицинским показаниям) с последующей алло-ТГСК с поддерживающей таргетной терапией.

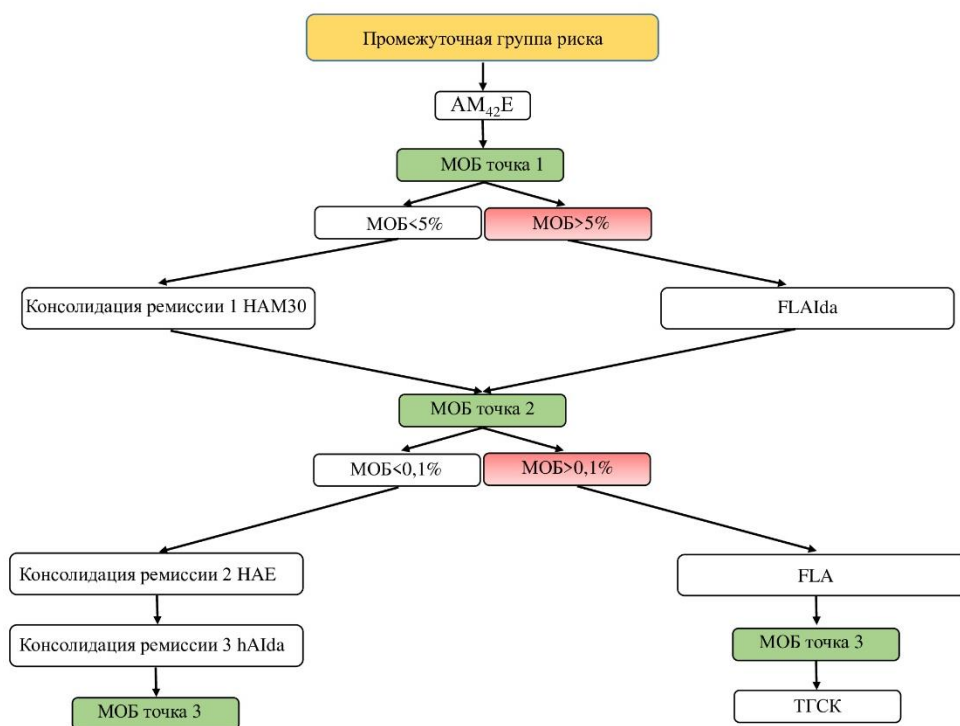


Рисунок 7 - Терапевтический план лечения пациентов, включенных в группу промежуточного риска протокола OML-MRD-2018

Пятьдесят один пациент с *FLT3-ITD* без стратифицирующих транслокаций или в сочетании с определяющими высокий риск стратифицирующими транслокациями были включены в группу высокого риска. Терапевтический план этих пациентов представлен на рисунке 8. Девять пациентов умерли до оценки статуса ремиссии.

У 16 пациентов после курса индукционной терапии АМЕ<sub>42</sub>Е документирована ПР1 (морфологически+МОБ <5%). Дальнейшую терапию по протоколу (консолидация ремиссии 1 НАМ и терапия FLA) получили 14 пациентов. Изменили протокол по медицинским показаниям двум пациентам: один получал малые дозы AraC+сорафениб, другой-децитабин+венетаклакс в связи с инфекционными осложнениями (дополнительно были получены согласия на изменение протокола лечения по медицинским показаниям). После курса FLA один пациент умер до проведения алло-ТГСК, 13 пациентов в ПР1 получили алло-ТГСК.

У 26 пациентов по результатам оценки МОБ методом МПЦ после первого курса индукционной терапии АМЕ<sub>42</sub>Е была детектирована первичная рефрактерность (МОБ >5%). Всем пациентам с первичной рефрактерностью была назначена терапия «спасения» FLAIda→FLA. Из них один пациент умер до начала терапии «спасения», двое до «точки» оценки МОБ после начала терапии «спасения», остальные 24 получили полный курс FLAIda→FLA. ИТК (сорафениб, мидостаурин, нексавар, гилтеритиниб) были добавлены к терапии «спасения» 17 пациентам из 24 с первичной рефрактерностью по решению протокольной группы. От всех пациентов были дополнительно получены информированные согласия на изменение протокола по медицинским показаниям. После терапии «спасения» 23 пациентам была проведена алло-ТГСК: 11 пациентам в статусе АЗ, 12 в статусе ПР1. После алло-ТГСК лечение ИТК в составе посттрансплантационной терапии продолжили 16 пациентов из 17, которым ингибиторы были добавлены на этапе терапии «спасения».

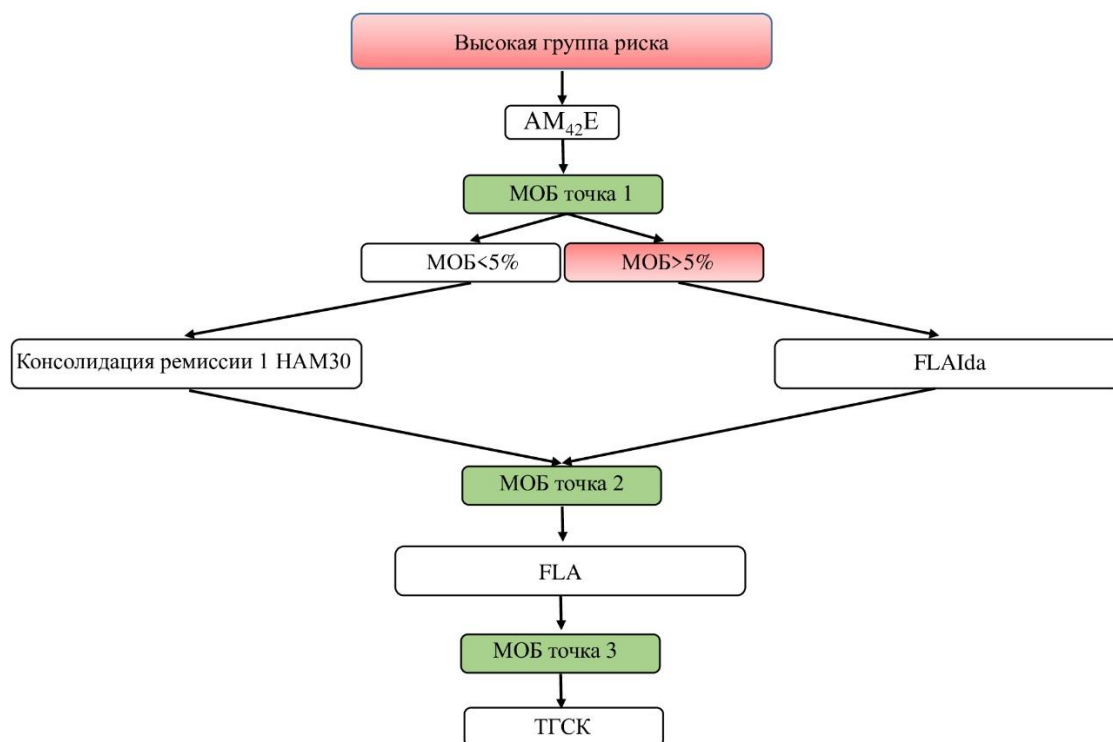


Рисунок 8 - Терапевтический план лечения пациентов, включенных в группу высокого риска протокола ОМЛ-MRD2018

## 2.3 Методы диагностики

Диагноз ОМЛ устанавливался на основании морфологических исследований и данных иммунофенотипирования. Для стратификации пациентов на группы риска проводили цитогенетические и молекулярно-генетические исследования.

### 2.3.1 Морфологическое исследование

Для проведения морфологического анализа высушенные на воздухе мазки костного мозга окрашивались по методу Романовского-Гимзы. При инициальной диагностике ОМЛ проводился подсчет не менее 200 ядросодержащих клеток. Результаты морфологического анализа выражались в процентах и оценивались на основании морфологических критериев Франко-Американо-Британской (FAB) классификации [147]. При оценке ремиссии

проводился подсчет не менее 500 ядродержащих клеток и критерием достижения ремиссии было наличие менее 5% бластных клеток.

### **2.3.2 Иммунофенотипирование методом МПЦ**

Диагностическое иммунофенотипирование клеток костного мозга осуществлялось согласно принятым рекомендациям российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей [148]. Иммунофенотипирование клеток костного мозга производилось на проточных цитометрах Navios и FACS Canto II. Меченые флуорохромами антитела, которые были использованы для определения иммунофенотипа опухолевых клеток указаны в приложении А.1 [149]. Анализ полученных данных проводился с использованием программного обеспечения Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, США).

Для определения МОБ методом МПЦ использовались 2 диагностические панели (приложение А.2), каждая из которых содержали определенные меченые флуорохромами антитела [150]. Первая панель была предназначена для определения иммунофенотипа ранних предшественников миелоидных клеток, а вторая панель включала в себя антитела для определения клеток, схожих с иммунофенотипом инициального ОМЛ. Каналы PE и APC во второй панели предназначались для добавления пациент-специфических маркеров.

Количество опухолевых клеток выражалось в процентном соотношении их числа к числу всех проанализированных ядродержащих клеток. В качестве критерия достижения ремиссии после курса индукционной терапии АМЕ<sub>42</sub>Е был установлен порог <5% опухолевых клеток, а после НАМ или FLAIda-<0,1% опухолевых клеток.

### **2.3.3 Цитогенетические методы**

Для проведения стандартного кариотипирования применялась техника краткосрочного культивирования клеток (17-24 часа). Для остановки

клеточного цикла на стадии метафазы в исследуемую культуру добавлялся колхицин. После предварительной обработки трипсином хромосомы полученной клеточной суспензии окрашивали на дифференциальные G-полосы красителем Гимза [151]. Поиск метафазных пластинок проводили с использованием программы Metafer (MetaSystems, USA). Анализ полученных данных проводилось с использованием программы Ikaros Karyotyping Software (MetaSystems, USA). Анализировали не менее 20 метафазных пластинок.

Для определения стратифицирующих для ОМЛ цитогенетических aberrаций проводилось исследование методом флуоресцентной гибридизации in situ (FISH). Для анализа использовались ДНК-зонды (приложение А.3), комплементарные интересующему участку ДНК. Гибридизация проводилась в соответствии с инструкцией фирм-производителей. После гибридизации проводилось контрокрашивание всего материала ДНК с использованием красителя DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA). Визуализация результатов гибридизации производилась при помощи флуоресцентной микроскопии CoolCube (MetaSystems, USA) с использованием соответствующих красителям фильтров.

Результаты цитогенетических исследований описывались в соответствии с Международной системой цитогенетической номенклатуры человека (2020) [152].

### **2.3.4 Молекулярно-генетические методы**

Молекулярно-генетическими методами для детекции стратифицирующих мутаций являлись фрагментный анализ и высокопроизводительное секвенирование (ВПС). Материалом для исследований являлась выделенная из клеток костного мозга ДНК.

#### **2.3.4.1 Выделение ДНК из клеток костного мозга**

Выделение ДНК из костного мозга осуществляли с использованием коммерческого набора innuPREP DNA/RNA Mini Kit (Analytik Jena AG,

Германия) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Набор включал колонки, содержащие мембраны на основе двуокси кремния (SiO<sub>2</sub>) для абсорбции ДНК, Lysis Solution RL для лизирования клеток, Washing Solution HS и Washing Solution LS для отмывки ДНК. Для элюции ДНК использовали Elution buffer. Концентрация и качество выделенной ДНК определили с помощью набора dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 2.3.4.2 Фрагментный анализ

Фрагментный анализ включал в себя два этапа: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и разделение амплифицированных фрагментов ДНК с помощью капиллярного электрофореза.

Для проведения ПЦР использовали набор OneTaq® Start 2X Master Mix (New England Biolabs, USA) и комплементарные к 14-15 экзонам гена *FLT3* праймеры (таблица 2). ПЦР проводили в приборе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA).

Таблица 2 - Последовательность праймеров для определения внутренних tandemных дупликаций в гене *FLT3* (*FLT3-ITD*)

Праймер	Последовательность	Ссылка
<b><i>FLT3/14-15ex/F</i></b>	TGGTGTTTGTCTCCTCTTCATTGT	[153]
<b><i>FLT3/14-15ex/R</i></b>	<b>HEX-GTTGCGTTCATCACTTTTCCAA</b>	

Полученные фрагменты ДНК, меченые флуорофором, смешивали с высокодеионизированным формамидом (Hi-Di, Thermo Fisher Scientific, USA) и GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard (LIZ 500, Thermo Fisher Scientific, USA). Полученную смесь денатурировали при 95°C в приборе T100 Thermal Cycler. После денатурации, ДНК фрагменты образцов разделяли по молекулярной массе с использованием генетического анализатора ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA). Анализ полученных данных проводили с помощью программы GeneMapper (Thermo Fisher Scientific, USA).

Методом фрагментного анализа оценивались мутационный статус генов *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*. У пациентов без мутаций на полученной хроматограмме выявлялся только один пик, который соответствовал аллелю «дикого» типа. При наличии мутаций, на хроматограмме выявлялись два и более пика, один из которых соответствовал аллелю «дикого» типа, остальные аллелю мутантного типа.

При оценке статуса гена *FLT3* пациенты, у которых обнаруживались фрагменты, превышающие по длине размер «дикого» типа, считались положительными по *FLT3*-ITD. Аллельное соотношение (Allelic Ratio, AR) *FLT3*-ITD рассчитывали по формуле:

$$\text{Allelic Ratio} = \frac{\text{площадь пика мутантного аллеля (FLT3-ITD)}}{\text{площадь пика аллеля дикого типа (FLT3-WT)}}$$

У пациентов с несколькими *FLT3*-ITD клонами аллельное соотношение рассчитывалось для каждого клона отдельно и при стратификации пациентов на группы риска суммировалось.

### 2.3.4.3 Высокопроизводительное секвенирование

ВПС проводили с использованием кастомизированной панели генов QIASeg HMNP (Qiagen, Germany). Панель включала кодирующие участки и прилежащие интронные области сплайсинга 141 гена (приложение А.4). Пробоподготовку проводили набором QIASeg Targeted DNA Custom Panel (Qiagen, Germany) по протоколу QIASeg Targeted DNA Panel for Illumina Instruments. Концентрацию ДНК готовых библиотек измеряли с помощью набора 1X dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) на приборе Qubit 3.0. (Thermo Fisher Scientific, USA). Секвенирование методом парно-концевого чтения (2x151) осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, USA). Анализ полученных данных проводили с помощью Data Analysis Center (Qiagen, Germany). Средняя глубина прочтения составила 1000х.

Обработку полученных данных секвенирования проводили с использованием автоматизированного алгоритма, включающего на начальном

этапе выравнивание прочтений на референсную последовательность генома человека (hg19). Последующий вторичный биоинформатический анализ проводили с помощью Data Analysis Center (Qiagen, Germany), который выявлял несоответствующие референсной последовательности варианты и фильтровал варианты по качеству. Выявленные варианты аннотировались по известным транскриптам каждого гена из базы RefSeq с применением ряда методов предсказания патогенности выявленных замен (SIFT, PolyPhen-2). Для оценки популяционных частот были использованы выборки из базы данных gnomAD.

Для оценки клинической значимости выявленных после всех этапов биоинформатической обработки вариантов были использованы базы данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC), The Human Genomics Community (VarSome), My Cancer Genome, Precision Oncology Knowledge Base (OncoKB), cBioPortal, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Intogen, ClinicalTrials.gov, Pecan Data Portal, International Cancer Genome Consortium, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), Human Gene Mutation Database (HGMD), Leiden Open Variation Database (LOVD), а также данные литературы (PubMed). Заключение о клинической значимости выявленных вариантов было дано с учетом рекомендаций AMP, ASCO, CAP [154].

Использованный стандартный биоинформатический алгоритм был предназначен только для выявления однонуклеотидных замен (SNP) и небольших инделов (делеции/инсерции не более 10 п.о.). Для выявления *FLT3-ITD* первичные данные дополнительно обрабатывали с использованием алгоритма Pindel [132]. Координаты и последовательность *FLT3-ITD* алгоритм выдал в виде VCF-файла.

#### **2.4 Определение МОБ *FLT3-ITD* с использованием ВПС**

Исходя из доступности образцов ДНК костного мозга перед алло-ТГСК пациентов, которые имели в инициальном материале *FLT3-ITD*, была

амплифицирована методом ПЦР с использованием собственного набора праймеров (таблица 3).

Таблица 3 - Последовательность праймеров для детекции *FLT3*-ITD в образцах перед алло-ТГСК

Праймер	Последовательность
<i>FLT3/14-15ex/F</i>	CTGAAGCAATTTAGGTATGAAAGCCAG
<i>FLT3/14-15ex/R</i>	CCTGATCCTAGTACCTTCCCTGC

Длина получившихся ампликонов составила 230 п.о. Далее проводили пробоподготовку набором для приготовления библиотек из ампликонов «SG GM Ampli» (Raissol Bio, Россия). Индексирование ампликонов проводили посредством ПЦР, система была совместима с индексированными праймерами по технологии Illumina TrueSeq (Illumina, USA). Секвенирование методом парно-концевого чтения (2x151) осуществили на приборе MiniSeq (Illumina, USA). Полученные данные анализировали с использованием алгоритма Pindel. Средняя глубина покрытия составила 100.000x. Результаты были получены в виде VCF-файла, в котором указывались координаты и последовательность обнаруженных *FLT3*-ITD. *FLT3*-ITD, выявленные при оценке МОБ сравнивались с результатами, полученными при инициальной диагностике.

## 2.5 Статистические исследования

Сравнение исследуемых групп проводилось с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни (для количественных данных) и точного критерия Фишера (для категориальных данных). Для определения значимости различий в медианах групп использовался тест Краскела-Уоллиса. Для оценки качественных величин считали частоту (%). Анализ выживаемости проводился с использованием метода Каплана-Майера [155]. Для статистического сравнения кривых выживаемости применяли

непараметрический лог-ранговый критерий [156]. ОВ рассчитывалась от даты постановки диагноза до смерти или даты последнего контакта. БСВ рассчитывалась от даты постановки диагноза до даты наступления первого события. За событие принимались: рефрактерность к проводимой терапии, смерть в период индукционной терапии, смерть в ремиссии, рецидив. Первичной рефрактерностью считалось наличие более 5% бластов после проведения АМЕ, а датой события-дата постановки диагноза. Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения SPSS (v.23.0, IBM Inc.), GraphPad Prism 10 и R-statistics.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Результаты клинико-гематологических и морфо-цитохимических исследований пациентов с ОМЛ с *FLT3-ITD*

*FLT3-ITD* были выявлены у 64 из 525 пациентов с диагнозом первичный ОМЛ (12,2%). Для пациентов с *FLT3-ITD* были характерны более старший возраст (две трети пациентов были старше 10 лет), преобладание мальчиков (1,9:1), наличие инициального гиперлейкоцитоза, высокий процент бластных клеток в ПК и КМ и М4 морфологический субвариант по FAB классификации. *FLT3-ITD* крайне редко встречались при М5b, М6 и М7 вариантах ОМЛ.

Подробно клинико-гематологические данные представлены в таблице 4 и рисунке 6.

Таблица 4 - Клинико-гематологические данные пациентов протокола ОМЛ-MRD-2018 с *FLT3-ITD* и без *FLT3-ITD* (*FLT3-WT*)

Характеристики	<i>FLT3-WT</i>	<i>FLT3-ITD</i>	p
<b>Всего:</b>	461	64	
<b>Пол: м/д</b>	243/218; 1:1	43/22; 1,9:1	<b>0,0607</b>
<b>Возраст, Медиана (диапазон):</b>	12,4 (0,26-18)	8,21 (0,02-18)	<b>&lt;0,0001</b>
0-10 лет, число (%)	283 (61,4%)	25 (39%)	<b>0,0010</b>
11-18 лет, число (%)	178 (38,6%)	39 (61%)	
<b>Лейкоциты, 10<sup>9</sup>/л, Медиана (диапазон)</b>	21,6 (0,6-889)	91,14 (1-561)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Бласты в ПК, %, Медиана (диапазон)</b>	39 (0-89)	74,5 (0-96)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Бласты в КМ, %, Медиана (диапазон)</b>	59,1 (0-98)	80 (9-99)	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Миеломоноцитарный лейкоз (М4), %</b>	70 (17%)	19 (30%)	<b>0,0397</b>

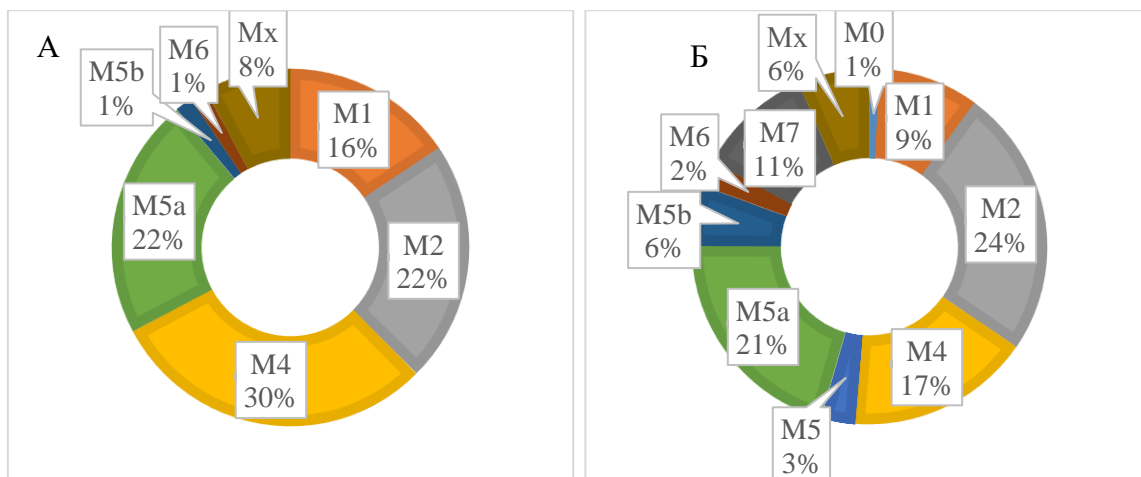


Рисунок 6 - Результаты морфологического анализа пациентов с ОМЛ с *FLT3*-ITD (А) и *FLT3*-WT (Б) в соответствии с FAB-классификацией

### 3.2 Результаты цитогенетических и молекулярно-генетических исследований пациентов с ОМЛ с *FLT3*-ITD

*FLT3*-ITD были высоко ассоциированы с ОМЛ с  $t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1$  (14 из 20, 70%), с  $t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214$  (4 из 6, 67%), с трисомией 8 (7 из 12, 60%), НК (19 из 86, 22,1%), с классическими мутациями в 11 экзоне гена *NPM1* (13 из 33, 39,4%). При *CBF*-ОМЛ и *KMT2A* позитивных ОМЛ *FLT3*-ITD встречались крайне редко (таблица 5).

Таблица 5 - Цитогенетический и молекулярно-генетический профиль пациентов с ОМЛ с *FLT3*-ITD (n=64) и *FLT3*-WT (n=461)

Молекулярный маркер	<i>FLT3</i> -ITD	<i>FLT3</i> -WT	p
$t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1$	21,8% (n=14)	1,3% (n=6)	<0,0001
$t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214$	6,25% (n=4)	0,4% (n=2)	0,0025
Трисомия 8	11%, (n=7)	1,1% (n=5)	<0,0001
НК	29,6% (n=19)	14,5% (n=67)	0,0038
Мутации в гене <i>NPM1</i>	20,3% (n=13)	4,3% (n=20)	<0,0001
<i>CBF</i> -ОМЛ	6,25% (n=4)	29% (n=134)	<0,0001
Перестройки гена <i>KMT2A</i>	6,25% (n=4)	27% (n=125)	<0,0001
Мутации в гене <i>WT1</i>	26,5% (n=17)	7,4% (n=34)	<0,0001

*FLT3-ITD* также были ассоциированы с патогенными вариантами в гене *WT1* (26,5% против 7,4% у *FLT3-WT*,  $p < 0,0001$ ). Гетерозиготные мутации в этом гене локализовались в ДНК-связывающем домене (7 и/или 9 экзоны) и были представлены преимущественно инсерциями.

Кроме того, у пациентов с *FLT3-ITD* обнаруживались патогенные варианты в генах сигнальных путей (*PTPN11*, 7,9%; *NRAS*, 4,6%), в генах, ответственных за метилирование ДНК (*DNMT3A*, 4,6%) и транскрипцию (*RUNX1*, 4,6%).

### 3.3 Результаты терапии ОМЛ с *FLT3-ITD*

Большинство пациентов с *FLT3-ITD* были стратифицированы в группу высокого риска (таблица 6).

Таблица 6 - Стратификация на группы риска пациентов *FLT3-ITD* и *FLT3-WT*

Группа риска	<i>FLT3-ITD</i> (n=64)	<i>FLT3-WT</i> (n=461)	p
Стандартная, % (n)	3,2% (n=2)	11,9% (n=55)	<b>0,0314</b>
Промежуточная, % (n)	17,2% (n=11)	48,2% (n=222)	<b>&lt;0,00001</b>
Высокая, % (n)	79,7% (n=51)	39,9% (n=184)	<b>&lt;0,00001</b>

Для пациентов с *FLT3-ITD* по сравнению с пациентами с *FLT3-WT* была характерна высокая частота рефрактерности к индукционной химиотерапии (42,2% против 11,8%,  $p < 0,001$ ), тенденция к более высокой летальности в период индукционной терапии (14% и 7,6%,  $p = 0,0912$ ), связанной с осложнениями гиперлейкоцитоза. Вероятность достижения ПР1 у пациентов с *FLT3-ITD* составила всего 43,8% против 80,1% у пациентов без *FLT3-ITD*,  $p < 0,00001$  (таблица 7). Восемнадцать пациентов с первичной рефрактерностью получали в составе терапии «спасения» ИТК (сорафениб, мидостаурин, нексавар, гилтеритиниб).

Таблица 7 - Результаты терапии пациентов *FLT3-ITD* и *FLT3-WT*

Данные	<i>FLT3-ITD</i> n=64	<i>FLT3-WT</i> n=461	p
ПР1 после индукции, % (n)	43,8% (n=28)	80,1% (n=373)	<0,00001
Первичная рефрактерность, % (n)	42,2% (n=27)	11,5% (n=53)	<0,00001
ПР1 после терапии «спасения», % (n)	20,3% (n=13)	5,4% (n=25)	0,8117
Рецидив до алло-ТГСК, % (n)	9,4% (n=6)	17,8% (n=82)	0,1926

В группе *FLT3-ITD*+ доля пациентов, получивших алло-ТГСК в первой линии терапии была выше ввиду включения большинства пациентов в группу высокого риска, однако треть алло-ТГСК проводилась вне ремиссии («активное заболевание», АЗ) (таблица 8). После алло-ТГСК ИТК в составе посттрансплантационной терапии продолжили получать 17 пациентов из 18, которым ингибиторы были назначены в связи с первичной рефрактерностью.

Таблица 8 - Результаты проведения алло-ТГСК пациентам с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT*

Данные	<i>FLT3-ITD</i> (n=64)	<i>FLT3-WT</i> (n=461)	p
алло-ТГСК по протоколу, % (n)	57,8% (n=37)	37,5% (n=173)	<b>0,0026</b>
алло-ТГСК по протоколу в ПР1% (n)	40,6% (n=26)	32% (n=148)	<b>0,0243</b>
алло-ТГСК по протоколу в АЗ*, % (n)	17,2% (n=11)	5,4% (n=23)	
Рецидив после алло-ТГСК, проведенной по протоколу, % (n)	14% (n=9)	6,5% (n=30)	0,3527
Смерть от рецидива после алло-ТГСК, проведенной по протоколу, % (n)	6,2% (n=4)	2,8% (n=13)	1,0000
алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	10,1% (n=6)	17,1% (n=79)	<b>0,0369</b>

\*Активное заболевание (вне ремиссии)

Медиана наблюдения в исследуемых группах составила два года. Показатели БСВ у пациентов с *FLT3-ITD* по сравнению с пациентами с *FLT3-WT* оказались значимо ниже (22% и 48%, соответственно, p<0,001) за счет

большого числа первично-рефрактерных пациентов в группе с *FLT3-ITD*. Высокий процент индукционной летальности повлиял на показатели ОВ пациентов с *FLT3-ITD* (48%), которые оказались ниже по сравнению с пациентами без *FLT3-ITD* (75%,  $p < 0,010$ ) (рисунок 7).

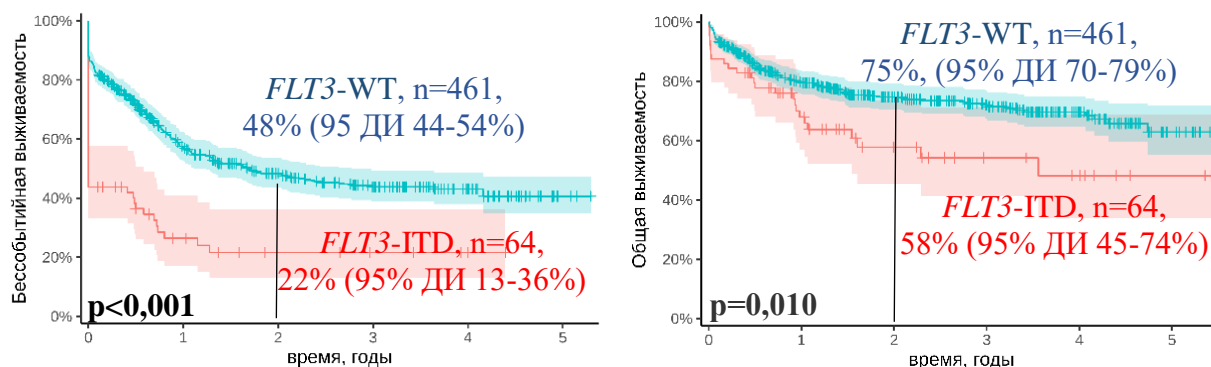


Рисунок 7 - Сравнение показателей выживаемости пациентов с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT*. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость. Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения.

Медиана наблюдения 2 года

### 3.4 Результаты терапии пациентов с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* без цитогенетических aberrаций («Нормальный кариотип (НК)»)

Ранее прогностическое значение *FLT3-ITD* оценивалось прежде всего у пациентов с ОМЛ с НК. В настоящем исследовании по результатам цитогенетического анализа aberrаций не было обнаружено у 109 пациентов с первичным ОМЛ и у 26 из них были обнаружены *FLT3-ITD*. Группа пациентов без цитогенетических aberrаций с *FLT3-ITD* отличалась высокой смертностью в индукции, что повлекло к более низким показателям достижения ПР1 после индукционной терапии. Процент первично-рефрактерных в исследуемых группах не отличался, но у пациентов с *FLT3-ITD* процент достижения ПР1 после терапии «спасения» был ниже. (таблица 9). ИТК к терапии «спасения» были добавлены 5 пациентам из 7 с первичной рефрактерностью.

Таблица 9 - Результаты терапии пациентов с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* без цитогенетических aberrаций (НК)

Данные	НК с <i>FLT3-ITD</i> (n=26)	НК с <i>FLT3-WT</i> (n=83)	p
ПР1 после индукции, % (n)	57,7% (n=15)	77,1% (n=64)	0,0769
Смерть в индукции, % (n)	15,4% (n=4)	3,6% (n=3)	<b>0,0543</b>
Первичная рефрактерность, % (n)	26,7% (n=7)	19,2% (n=16)	0,4175
ПР1 после терапии «спасения», % (n)	3,8% (n=1)	12% (n=10)	<b>0,0498</b>
Рецидив до алло-ТГСК, % (n)	15,4% (n=4)	19,2% (n=16)	0,7774

Процент проведения алло-ТГСК в АЗ у пациентов без цитогенетических aberrаций с *FLT3-ITD* (15,4%) был выше по сравнению с пациентами с НК с *FLT3-WT* (4,8%). Все 5 пациентов, которым были назначены таргетные препараты на этапе терапии спасения, продолжили получать ИТК после алло-ТГСК (таблица 10). Рецидивы наблюдались только в группе пациентов, которые не получали ИТК в посттрансплантационном периоде.

Таблица 10 - Результаты проведения алло-ТГСК пациентам с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* без цитогенетических aberrаций и влияние приема ИТК после алло-ТГСК на исход пациентов с *FLT3-ITD* без цитогенетических aberrаций

Данные	НК с <i>FLT3-ITD</i> (n=26)	НК с <i>FLT3-WT</i> (n=83)	p
алло-ТГСК по протоколу, % (n)	38,5% (n=10)	32,5% (n=27)	0,6378
алло-ТГСК по протоколу в ПР1, % (n)	23,1% (n=6)	27,6% (n=23)	0,174
алло-ТГСК по протоколу в АЗ, % (n)	15,4% (n=4)	4,8% (n=4)	
Рецидив после алло-ТГСК по протоколу, % (n)	11,5% (n=3)	2,4% (n=2)	0,1102
алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	15,3% (n=4)	20,4% (n=17)	0,1014
Рецидив 2 после алло-ТГСК*, % (n)	7,7% (n=2)	7,2% (n=6)	0,6177

Продолжение таблицы 10.

<b>Влияние назначения ИТК после алло-ТГСК по протоколу на исход ОМЛ при НК с <i>FLT3-ITD</i></b>			
<b>Данные</b>	<b>Рецидив</b>	<b>Ремиссия</b>	<b>p</b>
алло-ТГСК по протоколу в ПР1/А3 с терапией ИТК, % (n)	0	100% (n=5)	0,1667
алло-ТГСК по протоколу в ПР1/А3 без терапии ИТК, % (n)	60% (n=3)	40% (n=2)	

\*Среди пациентов, у которых алло-ТГСК была выполнена в связи с рецидивом ОМЛ

Показатели БСВ и ОВ оказались ниже у пациентов без цитогенетических aberrаций с *FLT3-ITD* (32% и 55% соответственно) по сравнению с группой без цитогенетических aberrаций с *FLT3-WT* (48% и 86% соответственно) (рисунок 8).

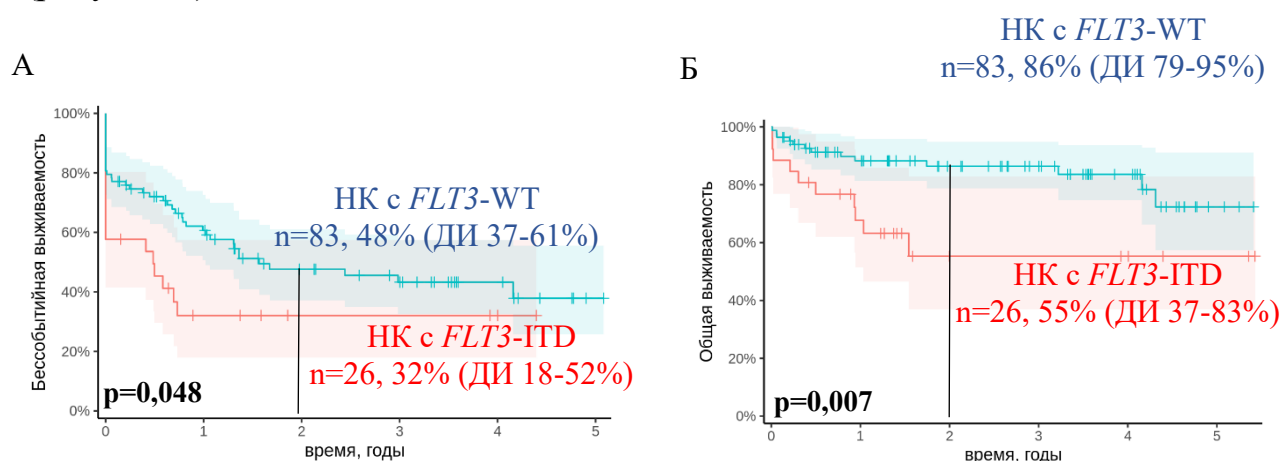


Рисунок 8 - Сравнение показателей выживаемости пациентов с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* без цитогенетических aberrаций. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость. Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения. Медиана наблюдения 2 года

### 3.4.1 Результаты терапии пациентов с ОМЛ - НК и мутациями в гене *NPM1* в сочетании с *FLT3-ITD* с высоким и низким аллельным соотношением

У 13 пациентов с НК с *FLT3-ITD* были обнаружены классические инсерции в гене *NPM1* (13 из 26, 50%). У 8 пациентов (61,5%) мутации в гене

*NPM1* сочетались с *FLT3-ITD* с низким AR ( $AR < 0,5$ ), у 5 пациентов (38,5%) - с высоким AR ( $AR > 0,5$ ). Результаты терапии пациентов с мутациями в *NPM1* и *FLT3-ITD* с  $AR < 0,5$  были схожи с результатами группы с мутациями в *NPM1* с *FLT3-ITD* с  $AR > 0,5$  и с группой с мутациями в *NPM1* без *FLT3-ITD* (таблица 11).

Таблица 11 - Результаты терапии пациентов с мутациями в *NPM1* с *FLT3-ITD* с  $AR < 0,5$ , с мутациями в *NPM1* с *FLT3-ITD* с  $AR < 0,5$  и с мутациями в *NPM1* без *FLT3-ITD*

Данные	<i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> с $AR < 0,5$ (n=8)	<i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> с $AR > 0,5$ (n=5)	<i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> (n=17)	p
ПР1 после индукции, % (n)	62,5% (n=5)	80% (n=4)	76,5% (n=13)	0,851985
Смерть до ремиссии, % (n)	25% (n=2)	20% (n=1)	11,7% (n=2)	0,809130
Первичная рефрактерность, % (n)	12,5% (n=1)	0	11,7% (n=2)	1,0000
Рецидив до алло-ТГСК, % (n)	25% (n=2)	20% (n=1)	17,6% (n=3)	1,0000
Смерть от рецидива до алло-ТГСК, % (n)	12,5% (n=1)	0	0	-

Один пациент с мутациями в гене *NPM1* в сочетании с *FLT3-ITD* с низким AR получил алло-ТГСК в первой линии терапии в связи с развитием первичной рефрактерности, еще один получил в связи с рецидивом. Среди пациентов с мутациями в гене *NPM1* в сочетании с *FLT3-ITD* с высоким AR алло-ТГСК по протоколу получили два пациента, еще один получил в связи с рецидивом (таблица 12).

Таблица 12 - Результаты проведения алло-ТГСК пациентам с мутациями в *NPM1* с *FLT3-ITD* с AR <0,5, с мутациями в *NPM1* с *FLT3-ITD* с AR >0,5 и с мутациями в *NPM1* без *FLT3-ITD*

Данные	<i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> с AR<0,5 (n=8)	<i>NPM1</i> с <i>FLT3-ITD</i> с AR>0,5 (n=5)	<i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i> (n=17)	p
алло-ТГСК по протоколу, % (n)	12,5% (n=1)	40% (n=2)	18% (n=3)	0,567108
алло-ТГСК по протоколу в ПР1, % (n)	n=1	n=2	n=2	1,0000
алло-ТГСК по протоколу в АЗ, % (n)	-	-	n=1	
алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	12,5% (n=1)	20% (n=1)	18% (n=3)	0,50

Однако, исследуемая цитогенетическая подгруппа оказалась немногочисленной и сравнение результатов терапии и проведения алло-ТГСК необходимо оценивать на более крупной выборке пациентов.

Анализ показателей выживаемости (таблица 13) показал, что ОВ в группе с мутациями в *NPM1* в сочетании с *FLT3-ITD* с AR<0,5 была ниже (38%) по сравнению с показателями в группе с *NPM1* с *FLT3-ITD* с AR>0,5 (53%) и в группе с *NPM1* без *FLT3-ITD* (83%. p=0,032) за счет смертей до ремиссии (n=2) и от рецидива (n=2).

Таблица 13 - Показатели выживаемости пациентов с мутациями в гене *NPM1* и *FLT3-ITD* с высоким и низким аллельным соотношением и с мутациями в *NPM1* без *FLT3-ITD*

Группы	Число пациентов	Бессобытийная выживаемость		Общая выживаемость	
		%	95% ДИ	%	95% ДИ
Мутации в <i>NPM1</i> без <i>FLT3-ITD</i>	17	60	39-92	88	74-100
Нормальный кариотип с мутацией в <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с AR<0,5	8	23	4,8-100	38	13-100
Нормальный кариотип с мутацией в <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i> с AR>0,5	5	60	29-100	53	21-100
Нормальный кариотип без мутаций в <i>NPM1</i> и <i>FLT3-ITD</i>	66	45	33-60	86	77-96

### 3.5 Результаты терапии пациентов с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* в различных цитогенетических группах ОМЛ

#### 3.5.1 Разделение пациентов с ОМЛ на цитогенетические группы риска

Пациенты с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* были разделены на 3 генетические группы риска (таблица 14):

- пациенты с генетическими вариантами, традиционно определяющими относительно благоприятный прогноз (БП), были включены в группы *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> и *FLT3-WT*<sup>БП</sup>;
- пациенты с генетическими вариантами, определяющими неблагоприятный прогноз (НП), были включены в группы *FLT3-ITD*<sup>НП</sup> и *FLT3-WT*<sup>НП</sup>;

- пациенты с генетическими вариантами, не классифицированные в первые два, были включены в группы промежуточного прогноза (ПП), *FLT3-ITD<sup>III</sup>* и *FLT3-WT<sup>III</sup>*.

Таблица 14 - Подгруппы ОМЛ с *FLT3-ITD* и *FLT3-WT* в зависимости от цитогенетического или молекулярного маркера

Группа риска	Цитогенетический и/или молекулярный вариант, % (n)	<i>FLT3-WT</i> , % (n)	<i>FLT3-ITD</i> , % (n)
БП	t(8;21)(q22;q22)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , % (n=83)	97,3% (n=81)	2,4% (n=2)
	inv16/t(16;16)(p13;q22)/ <i>CBFB::MYH11</i> , % (n=57)	96,5% (n=55)	3,5% (n=2)
	Мутации в гене <i>NPM1</i> , % (n=32)	59,4% (n=19)	40,6% (n=13)
	Биаллельные мутации в гене <i>CEBPA</i> , % (n=27)	96,3% (n=26)	3,7% (n=1)
	<b>ВСЕГО</b>	<b>181</b>	<b>18</b>
ПП	Трисомия 8, % (n=12)	33,3% (n=4)	66,6% (n=8)
	Мутации в гене <i>WT1</i> , % (n=17)	47% (n=8)	53% (n=9)
	Другое, % (n=114)	98,2% (n=112)	1,8% (n=2)
	<b>ВСЕГО</b>	<b>124</b>	<b>19</b>
НП	t(6;9)(p23;q34) / <i>DEK::NUP214</i> , % (n=6)	33,3% (n=2)	66,6% (n=4)
	Перестройки гена <i>NUP98</i> , % (n=32)	53% (n=17)	47% (n=15)

Продолжение таблицы 14

НП	<b>Перестройки гена <i>KMT2A</i>, кроме <i>t(1;11)(q21;q23)</i> и <i>t(9;11)</i> с морфологией М5, % (n=81)</b>	<b>95% (n=77)</b>	<b>5% (n=4)</b>
	Моносомия 7, % (n=8)	75% (n=6)	25% (n=2)
	Другое, % (n=54)	46,3% (n=52)	53,7% (n=2)
	<b>ВСЕГО</b>	<b>154</b>	<b>27</b>

### 3.5.2 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу *FLT3-ITD*<sup>БП</sup>

Для пациентов подгруппы *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> были характерны более высокий процент бластных клеток в периферической крови (медиана 82,0% по сравнению с 54,5% у подгруппы *FLT3-WT*<sup>БП</sup>,  $p < 0,0001$ ) и более низкие показатели достижения ПР1 после индукционной терапии за счет высокой индукционной летальности (таблица 15).

Таблица 15 - Результаты терапии и проведения алло-ТГСК у пациентов в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> и *FLT3-WT*<sup>БП</sup>

Данные	<i>FLT3-ITD</i> <sup>БП</sup> (n=18)	<i>FLT3-WT</i> <sup>БП</sup> (n=181)	p
ПР1 после индукции, % (n)	72,2% (n=13)	90,6% (n=164)	<b>0,0337</b>
Смерть в индукции, % (n)	22,2% (n=4)	5,5% (n=10)	<b>0,0266</b>
Первичная рефрактерность, % (n)	5,5% (n=1)	3,8% (n=7)	0,4739
ПР1 после терапии «спасения», % (n)	5,5% (n=1)	1,6% (n=3)	1,0000
Рецидив, % (n)	22,2% (n=4)	19,8% (n=36)	0,4693
ТГСК, % (n)	33,3% (n=6)	30,9% (n=56)	0,4093
Рецидив после алло-ТГСК, % (n)	16,7% (n=3)	3,9% (n=7)	<b>0,0479</b>

У пациентов подгруппы *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> показатели БСВ и ОВ (45% и 43%, соответственно) были ниже по сравнению с подгруппой *FLT3-WT*<sup>БП</sup> (63% и 85%, соответственно) за счет повышенной смертности в индукции и высокой вероятности рецидива после алло-ТГСК (рисунок 9).

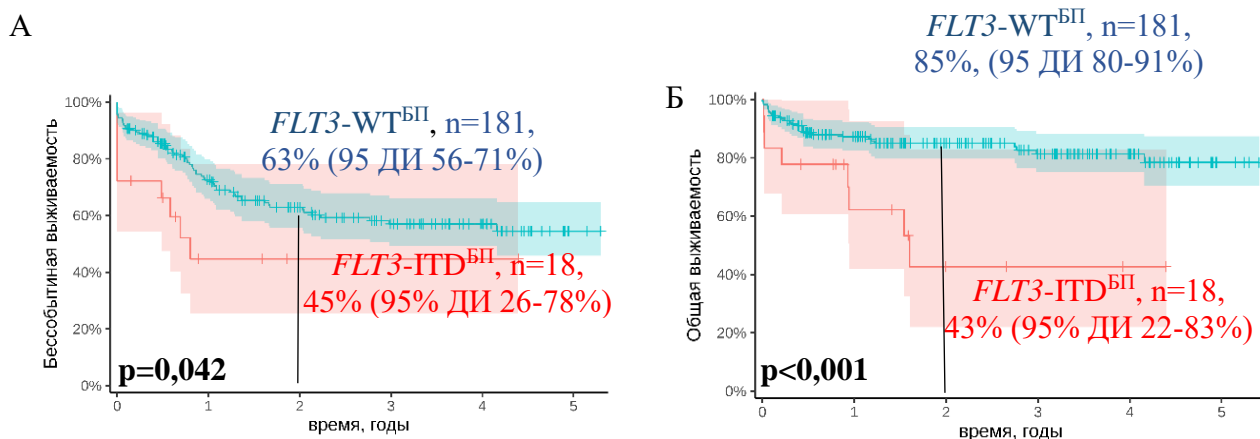


Рисунок 9 - Сравнение показателей выживаемости в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> и *FLT3-WT*<sup>БП</sup>. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость.

Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения.

Медиана наблюдения 2 года

Среди пациентов группы *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> один пациент получил ИТК (сорафениб) на этапе терапии «спасения» в связи с развитием первичной рефрактерности и продолжил таргетную терапию после алло-ТГСК в статусе ПР1. Четыре пациента получали ИТК в рецидиве заболевания, однако все погибли от прогрессии основного заболевания: один до алло-ТГСК, остальные от второго рецидива после алло-ТГСК.

### 3.5.3 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу *FLT3-ITD*<sup>ШП</sup>

Пациенты подгруппы *FLT3-ITD*<sup>ШП</sup> отличались от таковых без *FLT3-ITD* гиперлейкоцитозом (медиана  $16,25 \times 10^9/\text{л}$  и  $84,7 \times 10^9/\text{л}$  соответственно,  $p=0,0008$ ), более низкой вероятностью достижения ПР1 после индукционной терапии и высоким процентом первично-рефрактерных пациентов (таблица

16). ИТК в составе терапии «спасения» получили 8 пациентов из 11 с первичной рефрактерностью.

Таблица 16 - Результаты терапии пациентов в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>III</sup> и *FLT3-WT*<sup>III</sup>

Данные	<i>FLT3-ITD</i> <sup>III</sup> (n=19)	<i>FLT3-WT</i> <sup>III</sup> (n=124)	p
ПР1 после индукции, % (n)	36,8% (n=7)	74,2% (n=92)	<b>0,0023</b>
Смерть в индукции, % (n)	5,3% (n=1)	0,8% (n=10)	1,0000
Первичная рефрактерность, % (n)	57,9% (n=11)	17,7% (n=22)	<b>0,0005</b>
ПР1 после терапии «спасения», % (n)	21% (n=4)	7% (n=9)	1,0000
Рецидив до алло-ТГСК, % (n)	5,2% (n=1)	21,7% (n=27)	0,2714

В группе *FLT3-ITD*<sup>III</sup> наблюдался высокий процент проведения алло-ТГСК, причем 1/3 проводилась вне ремиссии. Все 8 пациентов, которым была назначена терапия ИТК в связи с первичной рефрактерностью, продолжили получать ИТК в посттрансплантационном периоде. Развитие рецидива после алло-ТГСК наблюдалось только среди пациентов, которым не были назначены ИТК в составе посттрансплантационной терапии (таблица 17).

Таблица 17 - Проведение алло-ТГСК в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>III</sup> и *FLT3-WT*<sup>III</sup> и влияние приема ИТК после алло-ТГСК на исход пациентов подгруппы *FLT3-ITD*<sup>III</sup>

Данные	<i>FLT3-ITD</i> <sup>III</sup>	<i>FLT3-WT</i> <sup>III</sup>	p
алло-ТГСК по протоколу, % (n)	68,4% (n=13)	31,5% (n=39)	<b>0,0013</b>
алло-ТГСК по протоколу в ПР1, % (n)	42,1% (n=8)	22,6% (n=28)	<b>0,0542</b>
алло-ТГСК по протоколу в АЗ, % (n)	26,3% (n=5)	8,9% (n=11)	
Рецидив после алло-ТГСК по протоколу, % (n)	15,7% (n=3)	3,2% (n=4)	0,3473
алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	10,5% (n=2)	20,8% (n=26)	0,3602

Продолжение таблицы 17

Рецидив после алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	5,2% (n=1)	8,3% (n=10)	1,0000
<b>Влияние на исход ОМЛ приема ИТК после алло-ТГСК по протоколу в группе <i>FLT3-ITD</i><sup>III</sup> (n=13)</b>			
<b>Группа</b>	<b>Ремиссия</b>	<b>Рецидив</b>	<b>p</b>
алло-ТГСК в ПР1/А3 с поддерживающей терапией ИТК, % (n)	8	0 (0%)	<b>0,0455</b>
алло-ТГСК в ПР1/А3 без поддерживающей терапии ИТК, % (n)	5	3 (60%)	

Показатели БСВ в группе *FLT3-ITD*<sup>III</sup> оказались существенно ниже по сравнению с подгруппой *FLT3-WT*<sup>III</sup> (12% и 37% соответственно,  $p < 0,001$ ) за счет большого числа первично-рефрактерных пациентов. Однако высокий процент проведения алло-ТГСК с активным добавлением ИТК в посттрансплантационную терапию значительно улучшили прогноз пациентов в подгруппе *FLT3-ITD*<sup>III</sup> и приблизили их показатели ОВ к показателям пациентов в группе *FLT3-WT*<sup>III</sup> (68% и 72% соответственно,  $p > 0,8$ ) (рисунок 10).

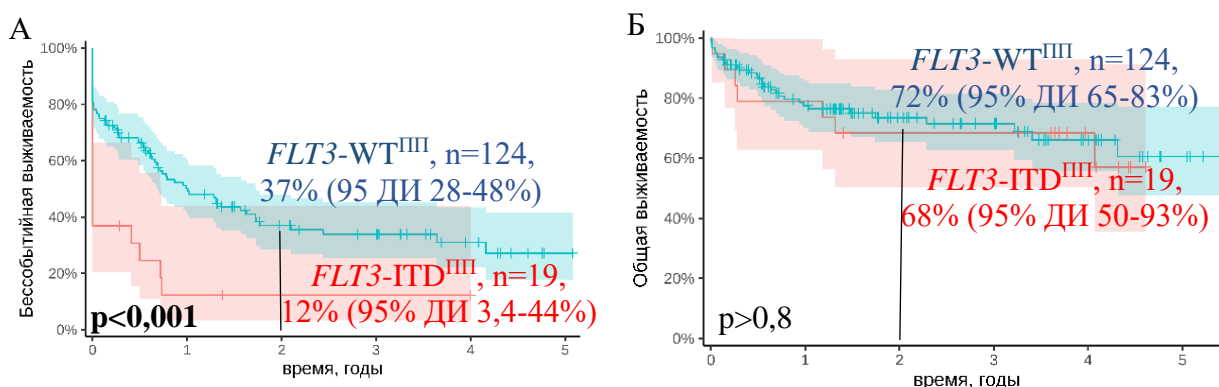


Рисунок 10 - Сравнение показателей выживаемости в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>III</sup> и *FLT3-WT*<sup>III</sup>. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость. Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения.

Медиана наблюдения 2 года

### 3.5.4 Результаты терапии пациентов, включенных в цитогенетическую подгруппу *FLT3-ITD*<sup>НП</sup>

Цитогенетическая подгруппа *FLT3-ITD*<sup>НП</sup> отличались от подгруппы *FLT3-WT*<sup>НП</sup> гиперлейкоцитозом (медиана  $17,6 \times 10^9/\text{л}$  и  $117,6 \times 10^9/\text{л}$  соответственно,  $p < 0,0001$ ), высоким числом первично-рефрактерных пациентов и низким процентом достижения ПР1 после индукционной терапии (таблица 18). ИТК в составе терапии «спасения» получили 9 пациентов с первичной рефрактерностью.

Таблица 18 - Результаты терапии пациентов в подгруппах *FLT3-ITD*<sup>НП</sup> и *FLT3-WT*<sup>НП</sup>

Данные	<i>FLT3-ITD</i> <sup>НП</sup> (n=27)	<i>FLT3-WT</i> <sup>НП</sup> (n=154)	p
ПР1 после индукции, % (n)	29,6% (n=8)	75,3% (n=116)	<b>&lt;0,00001</b>
Смерть в индукции, % (n)	14,8% (n=4)	9,7% (n=15)	0,4929
Первичная рефрактерность, % (n)	55,5% (n=15)	15,6% (n=24)	<b>&lt;0,00001</b>
ПР1 после терапии спасения, % (n)	29,6% (n=8)	8,45% (n=13)	0,7486
Рецидив до алло-ТГСК, % (n)	3,7% (n=1)	14,2% (n=22)	<b>0,0723</b>

Процент проведения алло-ТГСК в сравниваемых группах не отличалась, но пациенты подгруппы *FLT3-ITD*<sup>НП</sup> чаще трансплантировались в АЗ. Среди пациентов, которые получали ИТК в составе терапии «спасения», один умер до алло-ТГСК, остальные 8 пациентов продолжили получать ИТК в составе посттрансплантационной терапии. Развитие рецидива после алло-ТГСК наблюдалось только в группе пациентов, которые не получали ИТК в посттрансплантационном периоде (таблица 19).

Таблица 19 - Результаты проведения алло-ТГСК в подгруппах *FLT3-ITD<sup>НП</sup>* и *FLT3-WT<sup>НП</sup>* и влияние приема ИТК после алло-ТГСК на исход пациентов подгруппы *FLT3-ITD<sup>НП</sup>*

Данные	<i>FLT3-ITD<sup>НП</sup></i>	<i>FLT3-WT<sup>НП</sup></i>	р
алло-ТГСК по протоколу, % (n)	77,7% (n=21)	66,2% (n=102)	0,2714
алло-ТГСК по протоколу в ПР1, % (n)	55,5% (n=15)	60,3% (n=93)	<b>0,022</b>
алло-ТГСК по протоколу в АЗ, % (n)	22,2% (n=6)	5,8% (n=9)	
Рецидив после алло-ТГСК по протоколу, % (n)	22,2% (n=6)	16,8% (n=26)	0,7879
алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	14,8% (n=4)	10,9% (n=17)	0,4081
Рецидив после алло-ТГСК по причине рецидива, % (n)	7,4% (n=2)	3,2% (n=5)	0,5743
<b>Влияние на исход ОМЛ приема ИТК после алло-ТГСК по протоколу в группе <i>FLT3-ITD<sup>НП</sup></i> (n=27)</b>			
Данные	Рецидив	Ремиссия	р
алло-ТГСК по протоколу в ПР1/АЗ с поддерживающей терапией ИТК (n=8), % (n)	0	100% (n=8)	<b>0,0456</b>
алло-ТГСК по протоколу в ПР1/АЗ без поддерживающей терапии ИТК (n=13), % (n)	46,2% (n=6)	53,8% (n=7)	

Показатели БСВ в группе *FLT3-ITD<sup>НП</sup>* оказались существенно ниже по сравнению с подгруппой *FLT3-WT<sup>НП</sup>* (12% и 40% соответственно,  $p < 0,001$ ) за счет большого числа первично-рефрактерных пациентов. Однако проведение алло-ТГСК с активным добавлением ИТК в посттрансплантационную терапию значительно улучшили исход пациентов в подгруппе *FLT3-ITD<sup>НП</sup>*, приблизив их показатели ОВ к показателям пациентов в подгруппе *FLT3-WT<sup>НП</sup>* (67% и 62% соответственно,  $p > 0,8$ ) (рисунок 11).

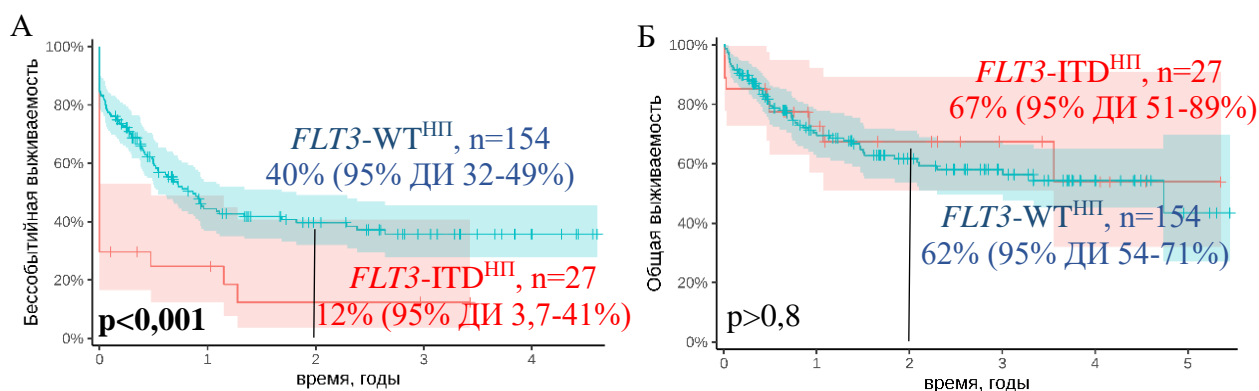


Рисунок 11 - Сравнение показателей выживаемости в подгруппах *FLT3-ITD<sup>HPI</sup>* и *FLT3-WT<sup>HPI</sup>*. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость. Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения.

Медиана наблюдения 2 года

### 3.6 Детекция *FLT3-ITD* методом ВПС с использованием алгоритма **Pindel**

По результатам ФА было выявлено 90 *FLT3-ITD*: у 71% пациентов (n=44) был выявлен только один (мажорный) клон, у 29% (n=20) помимо мажорного клона дополнительно выявлялись минорные клоны. Методом ВПС с использованием стандартных биоинформатических алгоритмов (рисунок 12) мажорные клоны удалось выявить лишь у 10 пациентов. После обработки первичных данных с использованием алгоритма Pindel (рисунок 13) удалось получить последовательность 71 *FLT3-ITD* у 62 пациентов. *FLT3-ITD*, которые имели маленькие AR по данным ФА, не удалось обнаружить методом ВПС в связи с недостаточным количеством прочтений (~1000х).

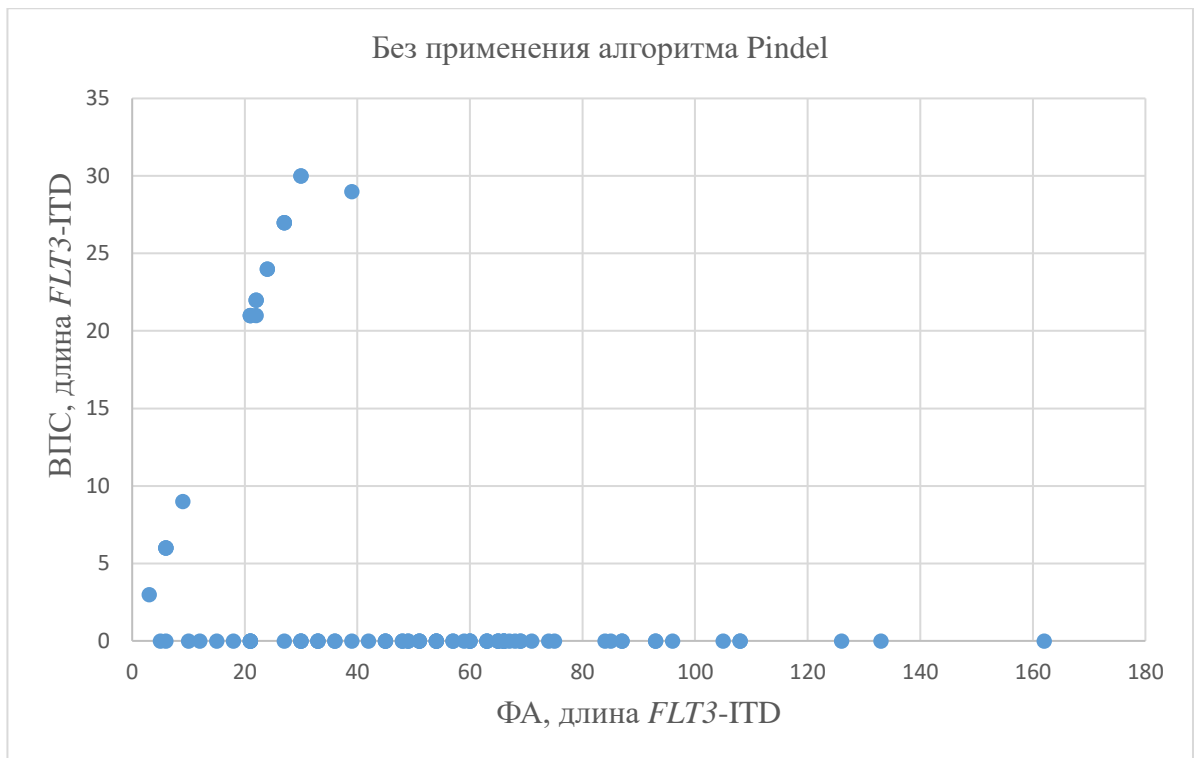


Рисунок 12 - Детекция *FLT3*-ITD с помощью ВПС с использованием стандартных биоинформатических алгоритмов и корреляция с данными ФА

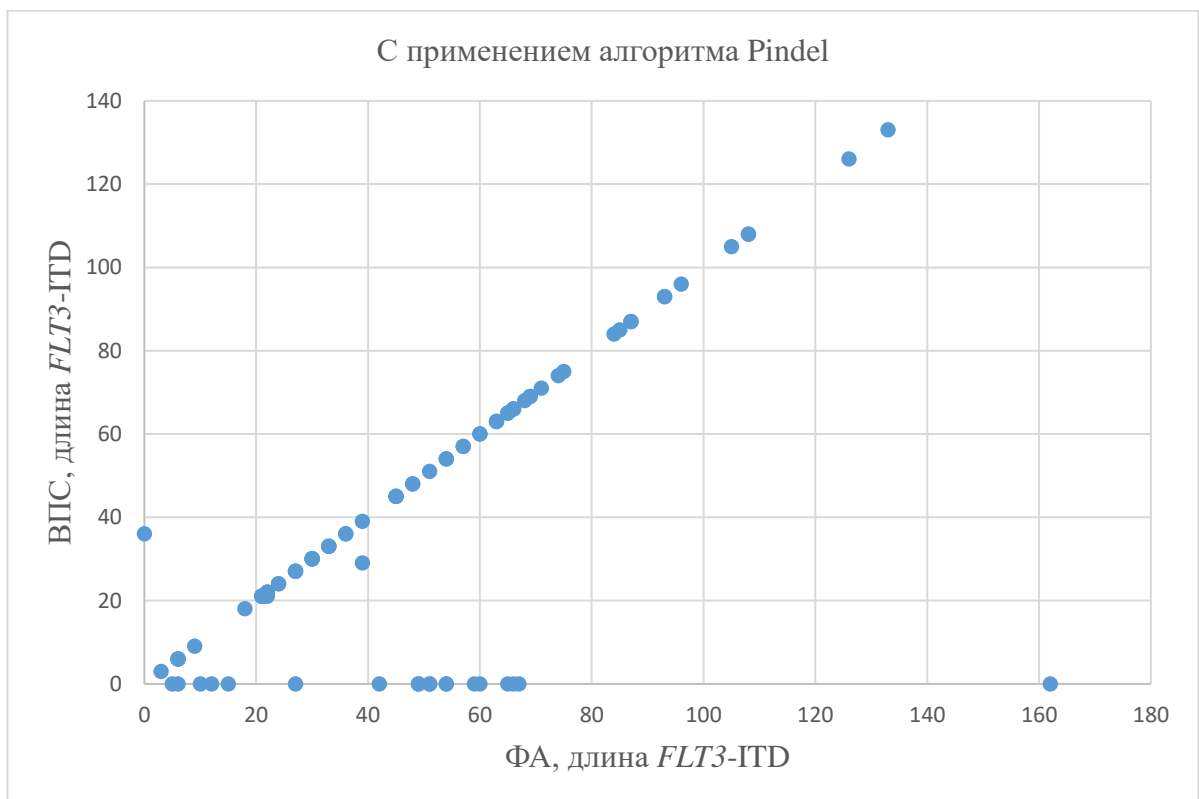


Рисунок 13 - Детекция *FLT3*-ITD с помощью ВПС с использованием алгоритма Pindel и корреляция с данными ФА

### 3.7 Локализация *FLT3*-ITD и влияние локализации на результаты терапии и исход заболевания

Все *FLT3*-ITD были рассредоточены по длине экзона 14. Три из выявленных дупликаций (4,2%) начинались в области JMD-B, одна из которых полностью локализовалась в данной области. Четырнадцать дупликаций (19,7%) начинались в области JMD-S и одна из них также полностью локализовалась в этой области. В области JMD-Z начинались 44 дупликации (62%), две из которых не выходили за пределы области. Шестнадцать дупликаций начались в области HR (8,5%) и всего пять (7%) — в области  $\beta$ 1-sheet TKD1 (рисунок 14).

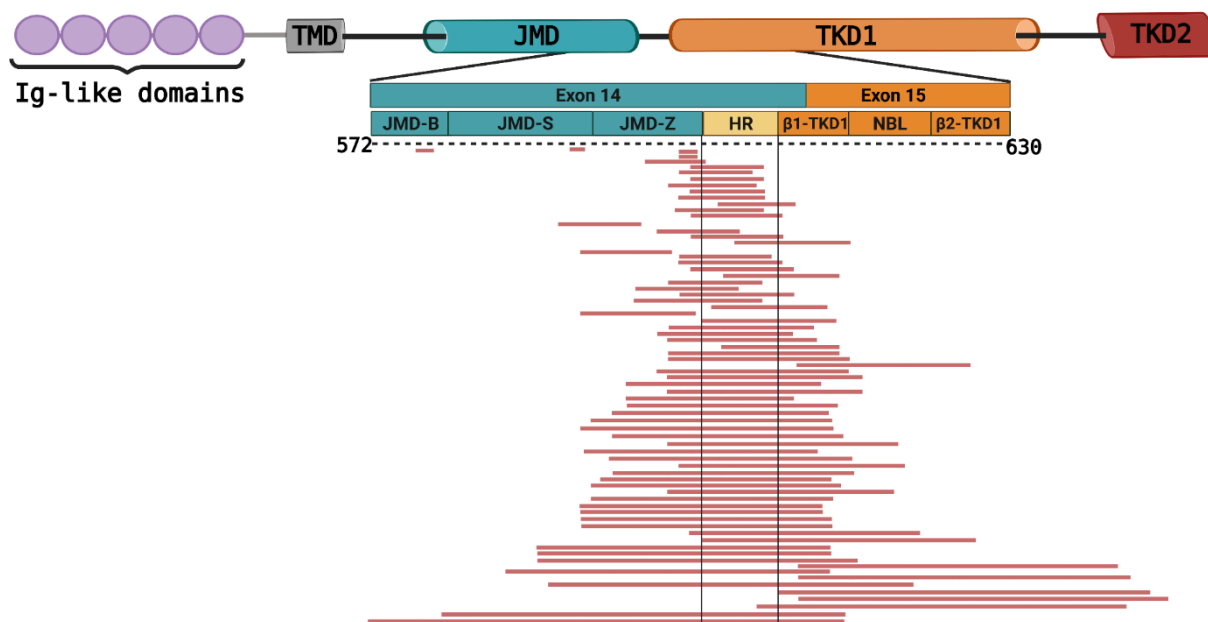


Рисунок 14 - Локализация *FLT3*-ITD в последовательности гена *FLT3*

Дупликации, имеющие локализацию в области TKD1, были достоверно более длинными по сравнению с дупликациями, имеющими локализацию в JMD, и для них не было характерно сочетание с мутациями в гене *NPM1* (таблица 20).

Таблица 20 - Молекулярные данные пациентов в зависимости от локализации *FLT3-ITD*

<b>Показатели</b>	<b>Локализация <i>FLT3-ITD</i> в TKD1 (n=5)</b>	<b>Локализация <i>FLT3-ITD</i> в JMD (n=57)</b>	<b>p</b>
Длина <i>FLT3-ITD</i> , п.о., медиана (диапазон)	95 (48-108)	51 (6-165)	<b>0,0049</b>
Дубликации активаторов STAT5-сигнального пути Y589, Y591, % (n)	80% (n=4)	59,6% (n=34)	0,6402
Мутации в <i>NPM1</i> , % (n)	0	20% (n=12)	0,5729

Клинико-гематологические показатели, результаты терапии и исход заболевания в двух исследуемых группах не отличались (таблица 21). Однако пациентов с дубликациями в области TKD1 оказалось крайне мало и достоверность результатов необходимо оценивать на более крупной выборке пациентов.

Таблица 21 - Клинико-гематологические данные и результаты терапии пациентов в зависимости от локализации *FLT3-ITD*

<b>Показатели</b>	<b>Локализация <i>FLT3-ITD</i> в TKD1 (n=5)</b>	<b>Локализация <i>FLT3-ITD</i> в JMD (n=57)</b>	<b>p</b>
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л, медиана (диапазон)	75,8 (58,8-178)	91 (1-561)	0,9784
Бластные клетки в костном мозге, %, медиана (диапазон)	87,5 (47-91,5)	79,5 (9-99)	0,2643
Первичная рефрактерность, % (n)	60% (n=3)	40,3% (n=23)	0,6414

Продолжение таблицы 21

Смерть в индукции, % (n)	<b>0</b>	<b>14% (n=8)</b>	<b>1,0000</b>
Рецидив, % (n)	40% (n=2)	28% (n=16)	0,6224
Смерть от рецидива, % (n)	40% (n=2)	14% (n=8)	0,4771
Нет событий, % (n)	20% (n=1)	22,8% (n=13)	1,0000
2-летняя ОВ	40% (95%ДИ 14-100%)	58% (95%ДИ 44-75%)	0,277
2-летняя БСВ	20% (95%ДИ 3,5-100%)	23% (95%ДИ 14-38%)	0,701

### 3.8 Характеристика дублицированных фрагментов *FLT3-ITD*

В 22 случаях (31%) были дублицированы фрагменты JM-S и JM-Z, в 16 случаях (22,5%) только фрагменты JM-Z, в 13 (18%) фрагменты JM-S, JM-Z, HR и TKD1, в пяти случаях (7%) были дублицированы аминокислотные остатки JM-B, JM-S и JM-Z, столько же случаев (n=5; 7%) было с дубликациями фрагментов JM-Z и HR, а в 4 случаях (6,3%) были дублицированы остатки JM-S, JM-Z и HR. Дубликация фрагментов всех ключевых областей 14 экзона (JM-B, JM-S, JM-Z и TKD1) наблюдалась лишь в одном случае (1,4%) (рисунок 15).

572 JMD-B	578 JMD-S	592 JMD-Z	603 HR	610 TKD1	
FR	ESQLQM	QVTGSSDNEY	FYDFREY	DLKWEFPREN	EFGKVLGS GA
	G				
SQ		EY			
		EY			
		HVDFRE			
		EY	DL		
		FREY	D		
		EY	DL		
		FREY	D		
		EY	DL		
		FREY	D		
		EY	DLKW		
		FREY	D		
		YVDFREY			
		YVDFREY			
		PSSRGEY			
		DFREY	D		
		VDFREY	D		
		YVDFREY			
		DPEY	DL		
		DFDFREY			
		VDFREY	DL		
		EY	DLKWEFP		
		RDYVDFREY			
		EY	DLKWEFP		
		FYVDFREY			
DNEY	FYVDFREY				
	PSGEY	DLKW			
	YVDFREY	D			
	DFREY	DLKWE			
NEY	FYVDFREY				
FEY	FYVDFREY				
DNEY	FYVDFREY				
	REY	DLKWE			
KDNEY	FYVDFREY				
	DFREY	DLKWEFP			
	EY	DLKWEFPREN		LEF	
DNEY	FYVDFREY	DLK			
	Y	DLKWEFPREN		LEFG	
DNEY	FYVDFREY	DLK			
GSSDNEY	FYVDFREY				
SDNEY	FYVDFREY				
WNGRSSDNEY	FYVDFREY				
YQVTGSSDNEY	FYVDFREY				
	Y	FYVDFREY	DLKWEFP		
		FYVDFREY	DLKWEFPREN		LE
SDNEY	FYVDFREY	DLKWE			
	FREY	DLKWEFPREN		LEFG	
EMV	QVTGSSDNEY	FYVDFREY			
ESQLQM	QVTGSSDNEY	FYV			
	GSSDNEY	FYVDFREY	DLKWE		
MV	QVTGSSDNEY	FYVDFREY			
		FYVDFREY	DLKWEFPREN		L
		FYVDFREY	DLKWEFPREN		LE
	DGSSDNEY	FYVDFREY	DLKW		
	QVTGSSDNEY	FYVDFREY	DL		
GSQMQM	QVTGSSDNEY	FYVDFR			
GVV	QVTGSSDNEY	FYVDFREY			
		FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEF
CRMTGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEF			
	SSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		L
NESQLQM	QVTGSSDNEY	FYVDFREY	D		
	RDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEF
AQVTGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFP			
	GGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LE
	TGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEF
	GSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEFGK
TLGQVTGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LE	
	ECSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEFGKNGM
QMV	QVSGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEFG
	LTGSSDNEY	FYVDFREY	DLKWEFPREN		LEFG

Рисунок 15 - Характеристика дублированных фрагментов *FLT3*-ITD у детей с ОМЛ. Красным цветом выделен участок Y591-599Y. Зеленым цветом выделены внематричные нуклеотидные вставки. Синим квадратом выделены дубликации с фрагментами TKD1

Наиболее часто дублируемым участком оказался Y591-Y599 (рисунок 16). Дубликация минимум одной аминокислоты этой области наблюдалась в

97,2% случаях (n=69), а весь участок (YVDFREY EY) был дублирован в 43,5% (n=31). Внематричные нуклеотидные вставки наблюдались в 32% случаев (рисунок 16). Самыми часто дублируемыми аминокислотами (рисунок 15) оказались Y597 (86%), E596 (83%), E598 (77,5%), F594 и R595 (по 76%). В 42 случаях (59%) были дублированы Y589 и/или Y591.

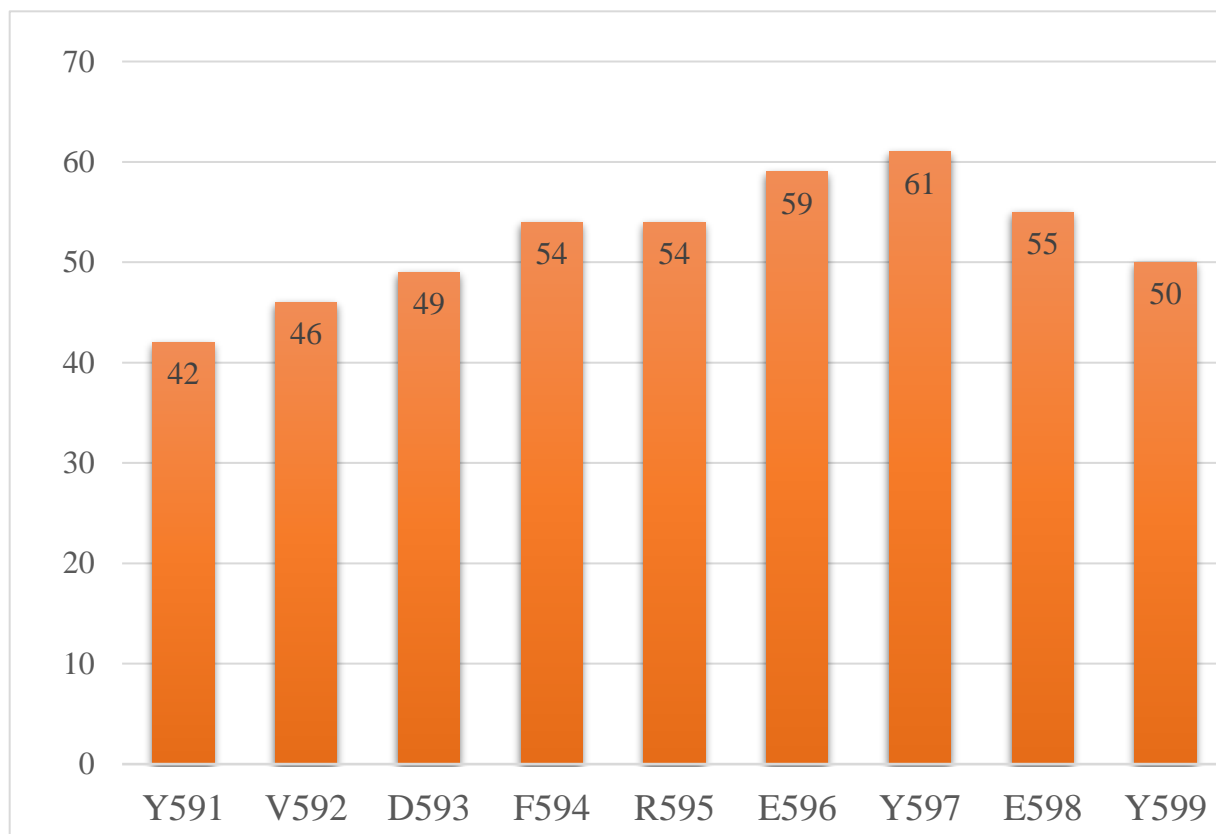


Рисунок 16 - Результаты анализа аминокислотного состава *FLT3*-ITD у детей с ОМЛ

### 3.8.1 Влияние характера дублированных фрагментов *FLT3*-ITD на результаты терапии и исход заболевания

Структурный анализ *FLT3*-ITD показал, что у 46 пациентов (74%) были дублированы только аминокислотные остатки JMD, тогда как *FLT3*-ITD 16 пациентов (26%) помимо фрагментов JMD включали еще и аминокислоты области TKD1. Дубликации, включающие фрагменты TKD1, имели более С-концевое положение в структуре гена *FLT3*, были более длинными по

сравнению с дупликациями, состоящими только из фрагментов JMD, и чаще в их составе были дупликации Y589 и/или Y591 (таблица 22).

Таблица 22 - Молекулярные данные пациентов в зависимости от характера дублицированных фрагментов *FLT3-ITD*

<b>Показатели</b>	<b>Дупликации фрагментов JMD и TKD1 (n=16)</b>	<b>Дупликации только фрагментов JMD (n=46)</b>	<b>p</b>
Длина <i>FLT3-ITD</i> п.о., медиана (диапазон)	86 (33-165)	38 (6-93)	<b>&lt;0,0001</b>
Дупликации активаторов STAT5-сигнального пути Y589, Y591, % (n)	81,3% (n=13)	54,3% (n=25)	0,0765

Клинико-гематологические показатели в двух группах не отличались, а результаты терапии показали, что у пациентов с дупликациями, затрагивающие аминокислотные фрагменты TKD1, наблюдалась тенденция к частым смертям от прогрессии заболевания после рецидива (таблица 23).

Таблица 23 - Клинико-гематологические данные и результаты терапии пациентов с *FLT3-ITD* в зависимости от характера дублицированных фрагментов

<b>Показатели</b>	<b>Дупликации фрагментов JMD и TKD1 (n=16)</b>	<b>Дупликации только фрагментов JMD (n=46)</b>	<b>p</b>
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л, медиана (диапазон)	104,7 (26-324)	81,4 (1-561)	0,3654
Бластные клетки в костном мозге, %, медиана (диапазон)	81,5 (21-97)	80 (9-99)	0,5396

Продолжение таблицы 23

Показатели	Дубликации фрагментов JMD и TKD1 (n=16)	Дубликации только фрагментов JMD (n=46)	p
Первичная рефрактерность, % (n)	50% (n=8)	39,1% (n=18)	0,5593
Смерть в индукции, % (n)	18,8% (n=3)	10,9% (n=5)	0,4143
Рецидив, % (n)	25% (n=4)	32,6% (n=15)	0,7553
Смерть от прогрессии рецидива, % (n)	25% (n=4)	13% (n=6)	0,0867
Нет событий, % (n)	12,5% (n=2)	26% (n=12)	0,3225

У пациентов с дубликациями, включающими фрагменты TKD1, по сравнению с пациентами, дубликации которых были представлены только фрагментами JMD (рисунок 17), наблюдалась низкая ОВ (2-летняя ОВ 28 и 75% соответственно,  $p=0,002$ ) и тенденция к более низкой БСВ (2-летняя БСВ 12 и 29% соответственно,  $p=0,115$ ).

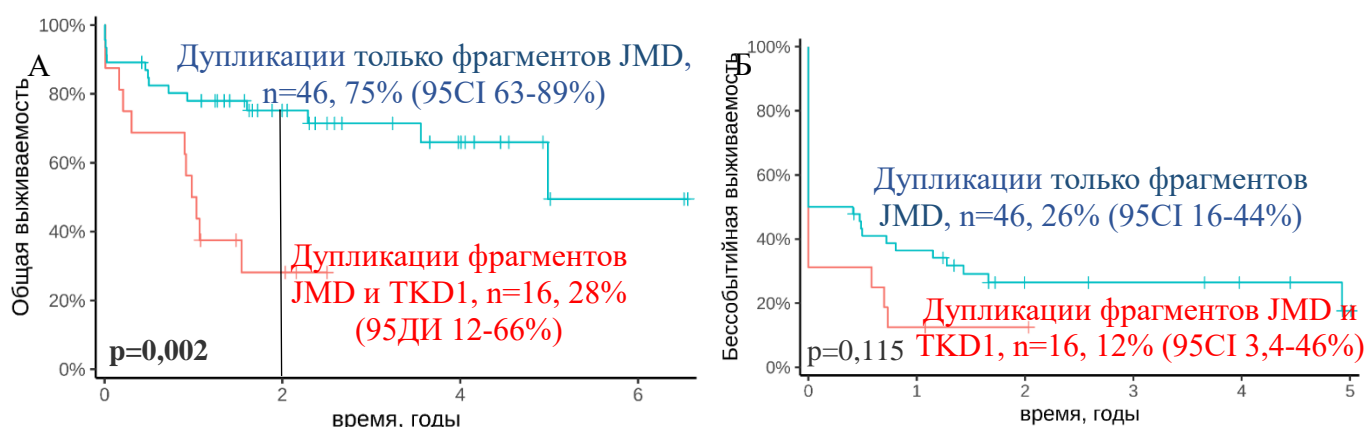


Рисунок 17 - Показатели выживаемости пациентов с *FLT3*-ITD в зависимости от характера дублицированных фрагментов. А-бессобытийная выживаемость, Б-общая выживаемость. Прямая вертикальная линия обозначает медиану наблюдения. Медиана наблюдения 2 года

### 3.9 Результаты детекции МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК, влияние МОБ *FLT3-ITD* на исход ОМЛ и обоснование назначения ИТК после алло-ТГСК

Алло-ТГСК в первой линии терапии получили 37 пациентов с *FLT3-ITD*. Ретроспективно удалось оценить МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК 26 пациентам (70%) из 37 (рисунок 18). Среди 20 пациентов, у которых по данным МПЦ была детектирована ПР1, 6 (30%) пациентов были МОБ+ *FLT3-ITD*. Среди 6 пациентов, у которых перед алло-ТГСК по данным МПЦ сохранялся статус А3, 4 (66,6%) были с МОБ+ *FLT3-ITD*, а у двух был МОБ *FLT3-ITD* отрицательный статус.

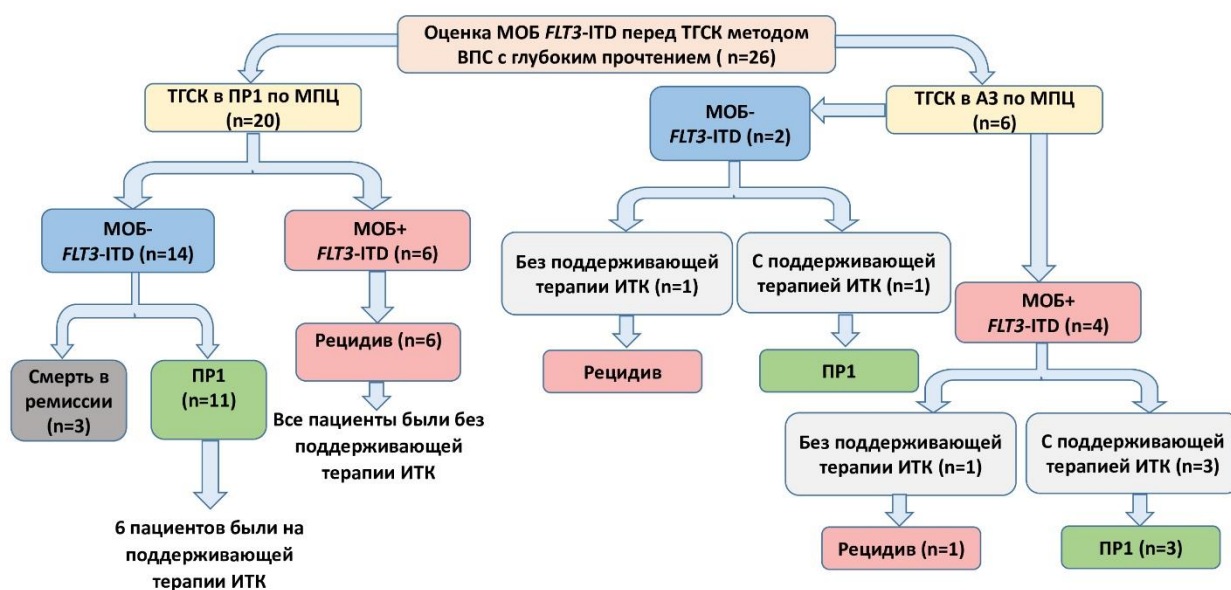


Рисунок 18 - Результаты оценки МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК у детей с ОМЛ с использованием ВПС с глубоким покрытием

Дубликации, выявленные при оценке МОБ, соответствовали инициальным (таблица 24). Рецидив после ТГСК развился у всех пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD* статусом, которые не получали поддерживающую терапию ИТК в посттрансплантационном периоде. Среди 16 пациентов с МОБ *FLT3-*

ITD отрицательным статусом трое умерли от инфекционных осложнений после алло-ТГСК, у одного развился рецидив, у оставшихся была достигнута ремиссия.

Таблица 24 - Молекулярно-генетическая характеристика пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD*

№ пациента	Цитогенетическая группа	Инициальная <i>FLT3-ITD</i>	<i>FLT3-ITD</i> перед алло-ТГСК	ИТК после алло-ТГСК	Исход
1	НК	57 AR=0,47 45 AR=0,14	57 VAF~0.0169	нет	рецидив
2	t(6;9)(p23;q34)/ <i>DEK</i> :: <i>CAN</i>	21 AR=0,06 39 AR=3,28	21 VAF~0.0706	нет	рецидив
3	Перестройки гена <i>KMT2A</i>	33 AR=0,4	33 VAF~0.0141	нет	рецидив
4	НК	93 AR=0,37	93 VAF~0.0171	нет	рецидив
5	Трисомия 8	60 AR=0,78	60 VAF~0.0941	нет	рецидив
6	t(5;11)(q35;p15.5)/ <i>NUP98</i> :: <i>NSD1</i>	30 AR=0,68	30 VAF~0.0163	нет	рецидив
7	(5;11)(q35;p15.5)/ <i>NUP98</i> :: <i>NSD1</i>	33 AR=0,52	33 VAF~2.3365	да	ПР1
8	Моносомия 7/делеция 7q	48 AR=0,09	48 VAF~0.0042	нет	Рецидив
9	НК	69 AR=12,5 49 AR=1,14	69 VAF~0.0681	да	ПР1
10	(5;11)(q35;p15.5)/ <i>NUP98</i> :: <i>NSD1</i>	42 AR=0,7	42 VAF~10.091	да	ПР1

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Характеристика клинико-гематологического, цитогенетического и молекулярно-генетического профиля ОМЛ с *FLT3-ITD*

В нашем исследовании общая частота встречаемости *FLT3-ITD* при ОМЛ у детей составила 12,2% [9], что соответствует ранее опубликованным данным, которые показывают, что *FLT3-ITD* являются одними из наиболее частых событий при ОМЛ [3,5,93]. При этом, как ранее было показано, *FLT3-ITD* не выступают в качестве иницирующей лейкоз мутации. Они появляются на более поздних этапах лейкемогенеза, давая преимущество опухолевым клеткам в выживании и усиливая их пролиферативную активность [17,69]. Этим объясняется наблюдаемая в нашем исследовании ассоциация *FLT3-ITD* с более старшим возрастом и повышенным числом лейкоцитов. Высокая корреляция *FLT3-ITD* с М4 морфологическим вариантом ОМЛ биологически обоснована высокой экспрессией гена *FLT3* при созревании гемопоэтических предшественников до моноцитов [48, 65].

*FLT3-ITD* встречаются в основном у пациентов с НК (около 40% у детей) [74] и почти в половине случаев сочетаются с инсерциями в гене *NPM1* [93]. Однако ряд исследований показывают, что *FLT3-ITD* является ведущим сопутствующим молекулярно-генетическим событием и при ряде рекуррентных цитогенетических аномалий, таких как  $t(5;11)(q35;p15)/NUP98::NSD1$  (примерно, 80%) [79],  $t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP21$  (70%) [80] и трисомия 8 (30%) [86]. С перестройками гена *KMT2A*, СВФ-лейкозами и другими структурными/молекулярными генетическими аномалиями *FLT3-ITD* сочетаются редко [14]. Цитогенетический и молекулярный профиль наших пациентов также оказался весьма гетерогенным [9]. Треть пациентов с *FLT3-ITD* имели НК и половина из них были с мутациями в *NPM1*. Частота встречаемости *FLT3-ITD* среди пациентов с транслокацией *NUP98::NSD1*

(70%) и *DEK::NUP214* (67%) соответствовала ранее опубликованным результатам. В нашей группе пациентов, которые в качестве единственного цитогенетического маркера имели трисомию хромосомы 8, процент *FLT3-ITD*-положительных оказался выше, чем других исследуемых группах, и составил 60%.

#### **4.2 Результаты терапии пациентов с *FLT3-ITD* и без *FLT3-ITD* в различных цитогенетических подгруппах ОМЛ**

*FLT3-ITD* является фактором неблагоприятного прогноза [5], но ранее это неблагоприятное влияние рассматривалось в основном в контексте ОМЛ с НК. Так, результаты многофакторного анализа Herlin с соавт. показали, что пациенты с НК с *FLT3-ITD* по сравнению с пациентами без *FLT3-ITD* имеют низкие показатели БСВ (40% и 53% соответственно,  $p=0,007$ ) и ОВ (56% и 73% соответственно,  $p=0,047$ ) [74]. Также ими было показано, что дополнительное прогностическое значение для этой группы имеет AR *FLT3-ITD/FLT3-WT* и наличие мутаций в гене *NPM1*. Пациенты с патогенными вариантами в гене *NPM1* в сочетании с *FLT3-ITD* с AR<0,5 имели лучшие показатели БСВ по сравнению с группой с *FLT3-ITD* с AR>0,5 (85% и 69% соответственно,  $p=0,025$ ). При отсутствии мутаций в гене *NPM1* *FLT3-ITD* имел плохой прогноз независимо от AR. Основываясь на этих данных и результатах более ранних исследований [75], во многих протоколах лечения ОМЛ, включая протокол ОМЛ-MRD-2018, при стратификации на группы риска пациентов с НК стали учитывать наличие *FLT3-ITD*, AR *FLT3-ITD/FLT3-WT* и присутствие мутаций в гене *NPM1*. Анализируя результаты терапии наших пациентов с НК [9,157], мы видим, что *FLT3-ITD* ухудшает БСВ и ОВ. Среди них, у небольшого числа пациентов наблюдалось сочетание *FLT3-ITD* и мутаций в *NPM1* и, несмотря на малую выборку, показатели ОВ этой группы ниже в сравнении с группой с *NPM1* без *FLT3-ITD* вне зависимости от AR *FLT3-ITD*. Интересно, что БСВ пациентов с мутацией в *NPM1* и *FLT3-ITD* с

AR>0,5 выше по сравнению с пациентами с AR<0,5. Это вероятнее всего связано со стратификацией последних в промежуточную группу риска, то есть с проведением более «щадящей» противоопухолевой терапии без добавления ИТК. Ранее похожие результаты были получены Sakaguchi с соавт., которые показали, что ОВ пациентов с *NPM1* и *FLT3-ITD* с AR<0,5 составляет всего 41,3%. Они выявили, что главным благоприятным фактором для пациентов с *FLT3-ITD* вне зависимости от статуса *NPM1* и аллельного соотношения являлось проведение алло-ТГСК в ПР1 [13]. Схожие результаты клинической эффективности алло-ТГСК независимо от соотношения аллелей *FLT3-ITD* и статуса *NPM1* показали Oran с соавт. с использованием многофакторного регрессионного анализа [109].

Ввиду широкой встречаемости *FLT3-ITD* не только при ОМЛ с НК, но и при ряде неслучайных цитогенетических aberrаций, в последние годы появился повышенный интерес к изучению влияния *FLT3-ITD* в различных группах ОМЛ. Tarlock с соавт сравнили показатели выживаемости пациентов с цитогенетическими и молекулярно-генетическими маркерами благоприятного, промежуточного и неблагоприятного прогноза с и без *FLT3-ITD* у детей и молодых взрослых до 30 лет и показали, что *FLT3-ITD* оказывает неблагоприятное влияние на ОВ (39,7% и 49,1% соответственно,  $p=0,093$ ) и БСВ (22,2% и 28,7% соответственно,  $p=0,065$ ) только в цитогенетически неблагоприятной группе [11]. Однако Kayser с соавт. показали, что четырехлетняя БРВ взрослых пациентов с *CBF*-лейкозами с *FLT3-ITD*, за исключением пациентов с трисомией 22, составила всего 38% [12]. В работе Liu с соавт., которые изучали результаты терапии взрослых пациентов с трисомией 8, выявили, что неблагоприятными факторами для этой группы были отсутствие алло-ТГСК в ПР1 (ОР 9,24,  $p=0,001$ ) и наличие субклональной *FLT3-ITD* (ОР 3,39,  $p=0,014$ ) [86]. Bhatnagar с соавт. показали, что у взрослых пациентов с ОМЛ с мутациями в *WT1* в сочетании с *FLT3-ITD* ниже показатели ОВ (медиана 0,7 и 1,5 года соответственно,  $p<0,001$ ) и БСВ (медиана 0,2 и 0,8 года,  $p<0,001$ ) по сравнению с группой с мутациями в *WT1*

и *FLT3-WT* [111]. Наши результаты показывают, что прогностическое неблагоприятное влияние *FLT3-ITD* оказывает во всех цитогенетических группах ОМЛ. У пациентов, у которых *FLT3-ITD* сочетается с благоприятными цитогенетическими маркерами по сравнению с другими подгруппами наблюдается высокая частота индукционных смертей, вызванных осложнениями гиперлейкоцитоза и с этим ассоциированы низкие показатели ОВ в этой группе. Это позволяет предположить, что пациентам, имеющим маркеры благоприятного прогноза, но несущие субклональные *FLT3-ITD*, требуется более интенсивная химиотерапия с добавлением ИТК в первой линии терапии. У пациентов с маркерами промежуточного и неблагоприятного прогноза выявлены очень низкие показатели БСВ, что связано с первичной рефрактерностью ОМЛ к индукционной химиотерапии [9,157]. Таким пациентам обычно назначают ИТК, которые снижают пролиферативную активность опухолевых клеток. Ранее Stone с соавт. на взрослых пациентах с ОМЛ показали высокую частоту достижения ПР1 и высокие показатели ОВ в группе, которым к стандартной химиотерапии добавляли ИТК по сравнению с группой, лечившихся только химиотерапией (разница 4-летней ОВ-7,2%) [120]. В нашем исследовании 18 пациентам с первичной рефрактерностью к терапии «спасения» были добавлены ИТК исходя из доступности препаратов (сорафениб, мидастаурин, нексавар, гилтеритиниб). Назначение ИТК значительно улучшило ответ на терапию, однако 17% пациентов на момент проведения алло-ТГСК все еще находились вне ремиссии по данным МПЦ. Эти пациенты продолжили терапию ИТК в посттрансплантационном периоде. Ранее эффективность такого терапевтического подхода была показана Maziarz с соавт. Согласно их наблюдениям, назначение таргетной терапии после алло-ТГСК существенно улучшила БСВ (ОР 2,51,  $p=0,01$ ,) и ОВ (ОР 2,64,  $p=0,02$ ) [158]. Среди наших пациентов с *FLT3-ITD* с маркерами промежуточного и неблагоприятного прогноза был высок процент проведения алло-ТГСК в первой линии в комбинации с ИТК в качестве поддерживающей терапии и это существенно

снизило число рецидивов и улучшило исход заболевания, показатели ОВ приблизились к показателям пациентов с *FLT3-WT*.

Среди пациентов с маркерами благоприятного прогноза, для которых не характерна первичная рефрактерность и не показана алло-ТГСК в первой линии, ИТК назначались при рецидиве и после алло-ТГСК во второй ремиссии. Однако у этих пациентов наблюдался крайне плохой ответ на терапию ИТК [9]. Вероятно, это можно объяснить тем, что в рецидиве опухолевые клетки претерпевают существенную клональную эволюцию с появлением патогенных вариантов, способствующих устойчивости к ингибиторам FLT3. Варианты RAS/MAPK-пути и *FLT3-TKD* считаются наиболее частыми событиями, которые могут приводить к такой резистентности [159].

#### 4.3 Детекция *FLT3-ITD* методом ВПС

На сегодняшний день в большинстве клинических лабораторий ведущим методом детекции *FLT3-ITD* является анализ фрагментов с помощью капиллярного электрофореза. Это обосновано высокой чувствительностью метода, быстрым получением результата и несложным процессом обработки полученных данных [128]. Фрагментный анализ позволяет оценить длину *FLT3-ITD* и аллельное соотношение *FLT3-ITD/FLT3-WT* [129,130,131]. Последнее, как показали большинство исследований [4,68,75], имело клиническое значение и учитывалось при стратификации пациентов на группы риска у пациентов с НК. Между тем, результаты терапии наших пациентов показывают, что показатели выживаемости пациентов с *FLT3-ITD* низкие независимо от AR. Наши данные сопоставимы с последними исследованиями в когорте детей и молодых взрослых, где в результате многофакторного анализа было выявлено, что AR не оказывает прогностического влияния на исход ОМЛ с *FLT3-ITD* [11].

Данные о влиянии длины *FLT3*-ITD на прогноз ОМЛ весьма скудны и неоднозначны. Согласно результатам некоторых исследований, у взрослых и детей с длинными *FLT3*-ITD статистически ниже показатели БСВ и ОВ [16]. Авторы других исследований показывают, что исход заболевания не зависит от длины ITD [17]. При этом во всех исследованиях приводятся разные медианы длины, по которым ранжируют и сравнивают пациентов. Это связано с высокой вариабельностью дупликаций по длине. В связи с этим авторы полагают, что потенциальное прогностическое значение имеет не длина, а структурные особенности самих дупликаций, подчеркивая важность внедрения в лабораторную практику современных методов, которые позволяют изучать локализацию и дублицированные фрагменты *FLT3*-ITD.

На сегодняшний день существует широкий спектр биоинформатических алгоритмов для выявления крупных инделов. В нашем исследовании мы детектировали *FLT3*-ITD с использованием алгоритма Pindel, и, как и было продемонстрировано ранее [160], он показал высокую чувствительность и специфичность.

Мы выявили, что у детей большинство *FLT3*-ITD локализируются в JMD (JMD-ITD, 93%) и лишь в небольшом проценте в TKD1 (TKD1-ITD, 7%). Эти данные сильно контрастируют с исследованиями анализа локализации *FLT3*-ITD у взрослых, в которых были показаны, что в области TKD1 сосредоточены около 30% *FLT3*-ITD [61, 161, 162]. При этом, как и у взрослых, TKD1-ITD у детей имеют более С-концевое положение в последовательности гена *FLT3*, а медиана длины у них выше, чем у JMD-ITD. Согласно нашим исследованиям на небольшой выборке результаты терапии и исход ОМЛ у детей не зависят от локализации *FLT3*-ITD, тогда как в когорте взрослых показан крайне неблагоприятный эффект TKD1-ITD. При чем до начала широкого применения ИТК Kayser с соавт. показали, что у пациентов с TKD1-ITD процент достижения ПР1 после интенсивной химиотерапии ниже по сравнению с пациентами с JMD-ITD [61], а в последующем было продемонстрировано, что TKD1-ITD ассоциированы с устойчивостью к ИТК первого поколения [163]. Эта устойчивость связана с повышенной

экспрессией антиапоптотического белка WEE1, которая защищает клетки, экспрессирующие TKD1-ITD от опосредованной мидостаурином остановки клеточного цикла [163,164]. Сопоставляя эти данные с результатами наших исследований, предполагается, что поскольку у детей большинство дупликаций локализуется в JMD, то добавление к стандартной химиотерапии ИТК будет иметь высокую терапевтическую эффективность.

Однако, анализируя результаты Arreba-Tutusaus с соавт. [165], которые показали, что опухолевые клетки с TKD1-ITD имеют сниженную чувствительность к лечению ИТК, но способность к активации нижестоящих сигнальных путей у TKD1-ITD и JMD-ITD одинаковая, возникает предположение, что устойчивость к ИТК может быть обусловлена иными свойствами *FLT3-ITD*. Проанализировав в исследованиях взрослых структуру *FLT3-ITD*, локализующихся в TKD1 и JMD [60,61], видно, что в составе TKD1-ITD часто присутствуют аминокислотные фрагменты TKD1, тогда как у *FLT3-ITD*, локализованных в JMD, дупликации фрагментов TKD1 наблюдаются редко. В нашем исследовании мы видим, что дупликации аминокислотных фрагментов TKD1 у детей происходит часто (у 26% пациентов) и у них, по сравнению с пациентами, у которых дуплицированы только фрагменты JMD, наблюдаются высокая летальность от прогрессии рецидива, низкие показатели ОВ и тенденция к более низким показателям БСВ.

Таким образом, ВПС с использованием биоинформатического алгоритма Pindel показал себя как хороший метод для определения *FLT3-ITD*, который позволяет описать локализацию и структуру *FLT3-ITD* и оценивать потенциальное прогностическое значение структурных особенностей *FLT3-ITD* на исход ОМЛ.

#### **4.4 Мониторинг МОБ *FLT3-ITD***

До широкого внедрения в лабораторную практику метода ВПС использование *FLT3-ITD* в качестве маркера оценки МОБ было невозможно, поскольку ряд исследований показали их нестабильность и сильную

вариабельность по локализации [143]. Поскольку проведение ВПС не предусматривает подбора пациент-специфических праймеров, этот современный лабораторный метод представляет собой надежный инструмент для оценки стабильности *FLT3-ITD* и клинического значения МОБ *FLT3-ITD*. По результатам нашего исследования мы видим, что у 38% пациентов перед алло-ТГСК наблюдалась персистенция *FLT3-ITD*, при чем у 23% была детектирована ПР1 по данным МПЦ. Подобное расхождение связано с более высокой чувствительностью метода ВПС с глубоким прочтением ( $10^{-5}$ ) по сравнению с МПЦ ( $10^{-4}$ ). При этом у всех пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD* сохранялся изначально выявленный мажорный клон, что свидетельствует о стабильности *FLT3-ITD*. Эти результаты сопоставимы с ранее опубликованными исследованиями в когорте взрослых пациентов, где было показано, что у примерно 29% пациентов в ПР1 сохраняется персистенция *FLT3-ITD* и все выявленные дупликации по длине и локализации идентичны изначально выявленным [20].

Высокое прогностическое значение МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК ранее показал Grob с соавт. [20]. Ими было выявлено, что у пациентов, у которых отсутствует молекулярная ремиссии перед алло-ТГСК, значительно повышен риск развития рецидива (71% против 39% у пациентов без МОБ *FLT3-ITD*,  $p < 0,001$ ). Позже это подтвердил Rucker с соавт., которые показали, что у пациентов, получивших алло-ТГСК в ПР1 без МОБ *FLT3-ITD* наблюдались лучшие показатели ОВ (4-х летняя 77% и 44% у МОБ+ *FLT3-ITD*,  $p = 0,029$ ) [21].

Рецидив после алло-ТГСК в нашей когорте произошёл только у пациентов, у которых была персистенция *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК при условии, что они не получали ИТК в посттрансплантационном периоде, тогда как у пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD*, которые были на поддерживающей терапии ИТК, сохранялась ПР1. Важно отметить, что пациентам проспективно не оценивался статус МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК и ИТК после алло-ТГСК получали только пациенты, которым ранее ингибиторы были добавлены

к терапии «спасения». В связи с этим часть пациентов продолжила терапию ингибиторами имея отрицательный молекулярный статус.

Эффективность применения ИТК после алло-ТГСК в когорте взрослых пациентов показали Levis с соавт. Согласно их наблюдениям, применение гилтеритиниба после алло-ТГСК имеет важное клиническое значение только для пациентов с МОБ+ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК (ОР 0,515 (0,316-0,838),  $p=0,0065$ ), тогда как для пациентов с МОБ *FLT3-ITD* отрицательным статусом перед алло-ТГСК прием гилтеритиниба не влиял на исход заболевания (ОР 1,213 (0,616-2,387),  $p=0,5750$ ) [146].

Эти наблюдения подчеркивают оправданность внедрения в лабораторную практику высокочувствительного метода для оценки статуса МОБ *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК, поскольку метод позволит персонализировано подходить к назначению ИТК, исходя из молекулярного статуса.

## ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе нашего исследования проведен всесторонний анализ ОМЛ с *FLT3-ITD* у детей. Было выявлено, что у детей с впервые диагностированным ОМЛ *FLT3-ITD* встречаются часто (12%). Эти пациенты имеют характерный клинико-гематологический и молекулярный профиль. Анализ результатов терапии показал, что *FLT3-ITD* является предиктором неблагоприятного прогноза вне зависимости от показателя аллельного соотношения *FLT3-ITD/FLT3-WT* и цитогенетической подгруппы ОМЛ. Низкие показатели БСВ у пациентов с *FLT3-ITD* были связаны с развитием первичной рефрактерности к проводимой противоопухолевой терапии, что предполагает необходимость добавления ИТК к стандартной химиотерапии на более ранних этапах терапии. Улучшение показателей ОВ связаны с высоким процентом проведения алло-ТГСК в сочетании с поддерживающей терапией ИТК в посттрансплантационном периоде.

Метод ВПС с использованием биоинформатического алгоритма Pindel показал себя как надежный метод детекции *FLT3-ITD*. Мы определили, что *FLT3-ITD* у детей в основном локализуется в JMD (93%), реже в TKD1 (7%), а структурно чаще дублируются аминокислотные только фрагменты JMD (74%), но часто (26%) затрагиваются фрагменты TKD1. При чем было выявлено, что характер дублированных фрагментов может влиять на показатели выживаемости, но это требует более детальных структурных и функциональных исследований.

С помощью ВПС с глубоким прочтением на небольшой выборке пациентов, которые получили алло-ТГСК в первой линии терапии, мы показали, что перед алло-ТГСК нередко наблюдается МОБ+ *FLT3-ITD*, которая может приводить к рецидивам без поддерживающей терапии ИТК в посттрансплантационном периоде. Это говорит о необходимости оценки молекулярной ремиссии перед проведением трансплантации.

## 5.1 Перспективы дальнейшего развития темы исследования

В дальнейшем планируется более детально изучить структурные и функциональные отличия *FLT3-ITD* в зависимости от характера дуплицированных фрагментов. С использованием программы AMBER 16 будет проведен структурный анализ мутированных белков FLT3, несущих только аминокислотные фрагменты JMD и мутированных белков FLT3, несущих аминокислотные фрагменты JMD и TKD1. В последующем будут оцениваться их функциональные отличия (трансформирующую способность, экспрессию целевых генов и восприимчивость к ИТК) путем мутагенеза *in vitro*.

## ВЫВОДЫ

1. У детей с ОМЛ с *FLT3-ITD* характерный клинико-гематологический профиль: большинство пациентов старше 10 лет (61%), повышенное число лейкоцитов ( $Me=91,14 \times 10^9/l$ ), высокий процент бластов в КМ ( $Me=80\%$ ) и ПК ( $Me=74,5\%$ ). Морфологически, *FLT3-ITD* ассоциированы с М4-морфовариантом ОМЛ (30%). У детей с ОМЛ с *FLT3-ITD* наблюдается цитогенетическая и молекулярно-генетическая гетерогенность, но чаще сочетаются с НК (29,6%), патогенными вариантами в *WT1* (26,5%),  $t(5;11)(q35;p15.4)/NUP98::NSD1$  (21,8%), классическими мутациями в 11 экзоне гена *NPM1* (20,3%), трисомией 8 (11%),  $t(6;9)(p23;q34)/DEK::NUP214$  (6,25%).

2. У детей с ОМЛ *FLT3-ITD* влияют на результаты терапии и показатели выживаемости в общей группе и во всех цитогенетических подгруппах ОМЛ. Показатели 2-летней БСВ и ОВ у пациентов с *FLT3-ITD* (22% и 58%, соответственно) были ниже, чем у пациентов *FLT3-ITD-WT* (48% и 75%, соответственно) за счет большого числа первично-рефрактерных пациентов. Показатели БСВ и ОВ у пациентов с НК с *FLT3-ITD* были ниже (32% и 55% соответственно) по сравнению с группой НК с *FLT3-WT* (48% и 86% соответственно). В группе с НК *FLT3-ITD* являлись предиктором неблагоприятного прогноза независимо от AR *FLT3-ITD/FLT3-WT* и статуса гена *NPM1*. У пациентов подгруппы *FLT3-ITD*<sup>БП</sup> показатели БСВ и ОВ (45% и 43%, соответственно) были ниже, чем в группе *FLT3-WT*<sup>БП</sup> (63% и 85%, соответственно) за счет частой смерти в индукции и частых рецидивов после алло-ТГСК. У пациентов подгруппы *FLT3-ITD*<sup>ПП</sup> и *FLT3-ITD*<sup>НП</sup> показатели БСВ оказались крайне низкими (12% и 12%, соответственно), однако высокий процент проведения алло-ТГСК в сочетании с поддерживающей терапией ИТК после алло-ТГСК существенно повысили показатели ОВ (68% и 67%, соответственно). Эти данные свидетельствуют о необходимости интеграции

ИТК на более ранних этапах терапии пациентам с *FLT3-ITD* независимо от цитогенетической подгруппы ОМЛ.

3. ВПС с применением биоинформатического алгоритма Pindel может выступать в качестве инструмента для детекции и изучения локализации и структуры *FLT3-ITD*. У детей в большинстве случаев *FLT3-ITD* локализуется в JMD (93%), реже в ТКD1 (7%). Локализация не влияет на результаты терапии и исход заболевания. Изучение аминокислотного состава *FLT3-ITD* показало, что в основном дупликации представлены аминокислотными фрагментами JMD (74%), но часто (26%) дупликации затрагивают аминокислотные фрагменты ТКD1. У пациентов с дупликациями, включающими аминокислотные фрагменты ТКD1, показатели БСВ И ОВ (12 и 28%, соответственно) ниже по сравнению с пациентами, у которых дублированы только фрагменты JMD (26% и 75%, соответственно).

4. Разработана и внедрена в практику методика детекции МОБ *FLT3-ITD* на основе ВПС с глубоким прочтением, которая выявила персистенцию *FLT3-ITD* перед алло-ТГСК у 38% (n=10) пациентов, большинство из которых (22,8%, n=6) были в ПР1 по данным МПЦ. Развитие посттрансплантационного рецидива было ассоциировано с наличием МОБ+ *FLT3-ITD* при отсутствии поддерживающей терапии ИТК после алло-ТГСК.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При выборе тактики лечения детей с ОМЛ с *FLT3-ITD* к стандартной химиотерапии следует добавлять ИТК независимо от показателя *AR FLT3-ITD/FLT3-WT* и наличия основного стратифицирующего маркера для исследования эффективности интеграции ИТК в первую линию терапии.

2. Наряду с ФА для детекции *FLT3-ITD* рекомендуется использовать ВПС с применением алгоритма Pindel.

3. Для пациентов с *FLT3-ITD*, которым по протоколу показано проведение ало-ТГСК, рекомендуется проведение ВПС с глубоким прочтением перед ало-ТГСК для количественной оценки МОБ *FLT3-ITD* с чувствительностью  $10^{-5}$  для своевременной модификации посттрансплантационной терапии.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЗ - статус активного заболевания
- Алло-ТГСК - аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток
- АТФ - аденозинтрифосфат
- БСВ - бессобытийная выживаемость
- БРВ - безрецидивная выживаемость
- ВПС - высокопроизводительное секвенирование
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИТК-ингибиторы тирозинкиназ
- КМ - костный мозг
- НК - нормальный кариотип
- МОБ - минимальная остаточная болезнь
- МПЦ - многоцветная проточная цитометрия
- ОВ - общая выживаемость
- ПК - периферическая кровь
- ОМЛ - острый миелоидный лейкоз
- ОР - относительный риск
- ПР1 - первая клинико-гематологическая ремиссия
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- ФА - фрагментный анализ
- AR - allelic ratio
- BAM - Binary Alignment Map
- CIITA - Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator
- CHI3L3 - Chitinase 3-like-3
- ELN - European Leukemia Network
- ERG1 - Immune-responsive gene 1
- NoLS - Nucleolar localization signal
- NES - Nuclear Export Signal
- FLT3-ITD* - *FLT3* internal tandem duplications

*FLT3*-WT - *FLT3* wild type

FISH - Fluorescence in situ hybridization

FAB - French-American-British (FAB) classification

JMD - Juxtamembrane domain

JMD-B - JM binding motif

JMD-S - JM switch motif

JMD-Z - zipper or linker peptide segment

TD-ПЦР - тандемнодупликационная полимеразная цепная реакция

TKD1 - tyrosine kinase domain 1

VCF - Variant Calling Format

VAF - Variant allele frequency

XPO1 - exportin 1

WEE1 - WEE1 G2 Checkpoint Kinase

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ley T. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia/ Ley TJ, Miller C, Ding L N et al. // The New England journal of medicine. – 2013 – Vol. 368. - №22. – P.2059-2074.
2. Papaemmanuil E. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia/ Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. // The New England journal of medicine. – 2016. – Vol. 374 № 23. – P. 2209–2221.
3. Rubio P. *NPM1*, *FLT3* and *CEBPA* mutations in pediatric patients with AML from Argentina: incidence and prognostic value / Rubio P, Campos B, Digiorge JA et al. // International journal of hematology. – 2016. – Vol. 104 № 5. – P. 582–590
4. Liang, D. Clinical relevance of internal tandem duplication of the *FLT3* gene in childhood acute myeloid leukemia / Liang DC, Shih LY, Hung IJ et. al. // Cancer. – 2004 – Vol. 94. – P. 3292-3298
5. Czogała M. Characteristics and Outcome of *FLT3*-ITD-Positive Pediatric Acute Myeloid Leukemia-Experience of Polish Pediatric Leukemia and Lymphoma Study Group from 2005 to 2022/ Czogała M, Czogała W, Pawińska-Wąsikowska K et. al. // Cancers (Basel). – 2023 – Sep 14. – Vol. 15 № 18. – P. 4557.
6. Qiu KY. Poor outcome of pediatric patients with acute myeloid leukemia harboring high *FLT3*/ITD allelic ratios/ Qiu KY, Liao XY, Liu Y et al. // Nature communications. - 2022. - June 27; Vol. 13 № 1. - P. 3679
7. Zwaan C. *FLT3* internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia: prognostic significance and relation to cellular drug resistance / Zwaan CM, Meshinchi S, Radich JP et al. // Blood. – 2003. – Oct 1. – Vol. 102(7). – P. 2387–2394
8. Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN/ Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR et al. // Blood. - 2022. - September 22; Vol. 140, № 12. - P. 1345-1377

9. Итов А.Б. Прогностическое значение внутренних тандемных дупликаций в гене *FLT3* в различных цитогенетических и молекулярно-генетических подгруппах острого миелоидного лейкоза у детей / Итов А.Б., Ольшанская Ю.В., Калинина И.И., и др. / Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2025. - Vol.24/ - №1. – P.66-77.
10. Итов А.Б. Внутренние тандемные дупликации в гене *FLT3* при остром миелоидном лейкозе: механизм образования и клиническое значение. / Итов А.Б., Ольшанская Ю.В. / Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2025. - Vol.24/ - №1. – P.188-198.
11. Tarlock K. Prognostic impact of cooccurring mutations in FLT3-ITD pediatric acute myeloid leukemia / Tarlock K, Gerbing RB, Ries RE et al. // Blood advances. – 2024. – Vol. 8 № 9. – P. 2094–2103.
12. Kayser S. Characteristics and outcome of patients with core-binding factor acute myeloid leukemia and FLT3-ITD: results from an international collaborative study / Kayser S, Kramer M, Martínez-Cuadrón D et al. // Haematologica. – 2022. – Apr 1. – Vol. 107 № 4. – P. 836–843.
13. Sakaguchi M. Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia / Sakaguchi M, Yamaguchi H, Najima Y et al. // Blood advances. – 2018. – Oct 23. – Vol. 2 № 20. – P. 2744–2754.
14. Fröhling S. AML Study Group Ulm. Acute myeloid leukemia. 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. / Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J et. al. // Blood. - 2002. - Dec 15. - Vol. 100 № 13. – P. 4372–4380.
15. Rucker FG. Molecular landscape and prognostic impact of FLT3-ITD insertion site in acute myeloid leukemia: RATIFY study results/ Rucker FG, Du L, Luck TJ et al. // Leukemia. - 2022. - January; Vol. 36, № 1. - P. 90-99
16. Meshinchi S. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML / Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA et. al. // Blood. – 2008 – May 15. – Vol. 111 № 10. – P. 4930–4933.

17. Stirewalt D. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia / Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S et. al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 107 № 9. – P. 3724–3726.
18. Brunet S. 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/ Brunet S, Labopin M, Esteve J, et al. // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. - 2012. - Vol. 30. - P. 735-741
19. Shih LY. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: A comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse/ Shih LY, Huang CF, Wu JH et al. // *Blood*. - 2002. - Vol. 100. - P. 2387-2392
20. Grob T. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. / Grob T, Sanders MA, Vonk CM et al. // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2023. – Feb 1. – Vol. 41 № 4. – P. 756–765.
21. Stirewalt D. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies/ Stirewalt, D., Radich, J.// *Nature reviews. Cancer*. – 2003 – Vol. 3. - №9. – P.650-665.
22. Hou H. Genomic landscape in acute myeloid leukemia and its implications in risk classification and targeted therapies/ Hou HA, Tien HF // *Journal of biomedical science*. – 2020 – Vol. 27 - №1. – P.81
23. Kelly L. Genetics of myeloid leukemias/ Kelly LM, Gilliland DG// *Annu Annual review of genomics and human genetics*. – 2002 – Vol. 3. – P.179–198.
24. Lagunas-Rangel F. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis/ Lagunas-Rangel F.A., Chávez-Valencia V., Gómez-Guijosa M.Á.// *International journal of hematology-oncology and stem cell research*. – 2017 – Vol.11. - №4. - P.328–339.
25. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. J / Takahashi, Shinichiro.// *Journal of hematology & oncology*. – 2011 – Sep 14. – Vol. 4. – P. 36.

26. DiNardo C. Mutations in AML: prognostic and therapeutic implications/ DiNardo CD, Cortes JE // Hematology. American Society of Hematology. Education Program. – 2016 – Dec 2. – Vol. 2016 -№ 1. – P. 348–355.
27. Meshinchi S. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. / Meshinchi S, Appelbaum FR // Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. – 2009 – Jul 1. – Vol. 15 № 13. – P. 4263–4269.
28. Rosnet O. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene/ Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D // Genomics. – 1991 – Feb. – Vol. 9 № 2. – P. 380–385.
29. Small D. STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34+ human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. / Small D, Levenstein M, Kim E et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1994 – Jan 18. – Vol. 91 № 2. – P. 459–463.
30. Kazi J. FMS-like Tyrosine Kinase 3/FLT3: From Basic Science to Clinical Implications/ Kazi JU, Rönstrand L // Physiological reviews. – 2019 – Jul 1. – Vol. 99 № 3. – P. 1433–1466.
31. Abu-Duhier F. Genomic structure of human FLT3: implications for mutational analysis/ Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al. // British Journal of Haematology. – 2001. – Vol. 113. – P. 1076–1077.
32. Maroc N. Biochemical characterization and analysis of the transforming potential of the FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase. / Maroc N, Rottapel R, Rosnet O et al. // Oncogene. – 1993 – Apr. – Vol. 8(4). – P. 909–918.
33. Lyman S. Characterization of the protein encoded by the flt3 (flk2) receptor-like tyrosine kinase gene/ Lyman SD, James L, Zappone J et al. // Oncogene. – 1993 – Apr. – Vol. 8 № 4. – P. 815–822.
34. Ke Y. Homology modeling of DFG-in FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3) and structure-based virtual screening for inhibitor identification/ Ke YY, Singh V, Coumar M et al. // Scientific reports. - 2015.

- 35.Griffith J. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain/ Griffith J, Black J, Faerman C et al. // *Molecular Cell*. – 2004. – Vol. 13 № 2. – P. 169–178
- 36.Lagunas-Rangel F. FLT3–ITD and its current role in acute myeloid leukaemia/ Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V // *Medical oncology* (Northwood, London, England). -2017.
- 37.Knighton D. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase/ Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF et al. // *Science*. – 1991. – Vol. 253 № 5018. – P. 407–414.
- 38.Hubbard S. "Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog/ Hubbard SR, Stevan R. // *The EMBO journal*. – 1997.
- 39.Huse M. (2002). The conformational plasticity of protein kinases / Huse M, Kuriyan J // *Cell*. – 2002. – Vol. 109 - №3. – P. 275–282.
- 40.Bossemeyer D. Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI (5-24) / Bossemeyer D, Engh RA, Kinzel V et al. // *The EMBO journal*. – 1993 – Vol. 12 - №3 – P. 849-859.
- 41.Chan P., Ilangumaran, S., La Rose, J., Chakrabartty, A., & Rottapel, R. (2003). Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region / Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J et al. // *Molecular and cellular biology*. – 2003. – Vol. 23 - №9. – P. 3067–3078.
- 42.Gary Gilliland D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia / Gilliland DG, Griffin JD // *Blood*. – 2002. – Vol. 100 - №5. – P. 1532–1542.
- 43.Harrison C. Cytogenetics of Childhood Acute Myeloid Leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment Trials AML 10 and 12 / Harrison CJ, Hills RK, Moorman AV et al. // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – P. 2674–2681

44. Nakao M. Internal tandem duplication of the *flt3* gene found in acute myeloid leukemia / Nakao M, Yokota S, Iwai T et al. // *Leukemia*. – 1996 – Vol. 10 № 12. – P. 1911–1918.
45. Chia W. Mutation of the *Adh* gene of *Drosophila melanogaster* containing an internal tandem duplication / Chia W, Savakis C, Karp R, Pelham H, Ashburner M // *Journal of molecular biology*. – 1985 – Dec 20. – Vol. 186 № 4. – P. 679–688.
46. Kiyoi H. Internal tandem duplication of the *FLT3* gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product/ Kiyoi H, Towatari M, Yokota S et al. // *Leukemia*. – 1998. – Vol. 12. – P. 1333–1337.
47. Levis M. *FLT3: ITD* does matter in leukemia. *Leukemia* / Levis M, Small D // *Leukemia* [Internet]. – 2003– Vol. 17. – P. 1738–52.
48. Thiede C. Analysis of *FLT3*-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis / Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. // *Blood*. – 2002 – Jun 15. – Vol. 99(12). – P. 4326–35.
49. Castaño-Bonilla T. Prognostic significance of *FLT3*-ITD length in AML patients treated with intensive regimens. / Castaño-Bonilla T, Alonso-Dominguez JM, Barragán E et al. // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11.
50. Kiyoi H. Mechanism of constitutive activation of *FLT3* with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain / Kiyoi H, Ohno R, Ueda R et al. // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21. – P. 2555–2563.
51. Mizuki M. Suppression of myeloid transcription factors and induction of *STAT* response genes by AML-specific *Flt3* mutations. / Mizuki M, Schwäble J, Steur C. et al. // *Blood*. – 2003. – Vol. 101. – P. 3164–3173.
52. Radomska, H. Block of *C/EBP alpha* function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with *FLT3* activating mutations/ Radomska HS, Bassères DS, Zheng R et al. // *The Journal of experimental medicine*. – 2006. – Vol. 203. – P. 371–381.

53. Scholl S. Molecular Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia: Ongoing Challenges and Future Treatments / Scholl S, Fleischmann M, Schnetzke U, Heidel FH // *Cells*. – 2020. – Vol. 9. – P. 2493.
54. Perkins G. The role of MAP kinase kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation / Perkins GR, Marshall CJ, Collins MK // *Blood*. – 1996 – May 1. – Vol. 87 № 9. – P. 3669–75.
55. Mui A. Suppression of interleukin-3-induced gene expression by a C-terminal truncated Stat5: role of Stat5 in proliferation / Mui AL, Wakao H, Kinoshita T et. al. // *The EMBO journal*. – 1996 – May 15. – Vol. 15 № 10. – P. 2425–33.
56. Hayakawa F. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines / Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H et al. // *Oncogene*. – 2000. – Vol. 19. – P. 624–631.
57. Dumon S. IL-3 dependent regulation of Bcl-xL gene expression by STAT5 in a bone marrow derived cell line / Dumon S, Santos SC, Debierre-Grockiego F et. al. // *Oncogene*. – 1999 – Jul 22. – Vol. 18 № 29. – P. 4191–4199.
58. Matsumura I. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells / Matsumura I, Kitamura T, Wakao H et. al. // *The EMBO journal*. – 1999 – Mar 1. – Vol. 18 № 5. – P. 1367–77.
59. Breitenbuecher F. Identification of a novel type of ITD mutations located in nonjuxtamembrane domains of the FLT3 tyrosine kinase receptor/ Breitenbuecher F, Schnittger S, Grundler R et. al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113 № 17. – P. 4074–4077.
60. Vempati S. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential / Vempati S, Reindl C, Kaza SK et. al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 110 № 2. – P. 686–694.
61. Kayser S. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome /

- Kayser S, Schlenk RF, Correa Londono M. et. al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 114 № 12. – P. 2386–2392.
62. Abu-Duhier F. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukemia / Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al. // *British journal of haematology*. – 2001. – Vol. 113. – P. 983–988.
63. Abu-Duhier F. FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group / Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al. // *British journal of haematology*. – 2000. – Vol. 111. – P. 190–195.
64. Stirewalt D. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia / Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S et al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 97. – P. 3589–3595.
65. Kiyoi H. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia / Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y et al. // *Blood*. – 1999. – Vol. 93. – P. 3074–3080.
66. Bispo J. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma / Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. – 2020 – Jun 1. – Vol. 10 № 6. – P. a034819
67. Yokota S. 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 / Yokota S, Kiyoi H, Nakao M et al. // *Leukemia*. – 1997. – Vol. 11. – P. 1605–1609.
68. Meshinchi S. Prevalence and prognostic significance of Flt3 internal tandem duplication in pediatric acute myeloid leukemia / Meshinchi S, Woods WG, Stirewalt DL et. al. // *Blood*. – 2001. – Vol. 97 № 1. – P. 89–94.
69. Jan M. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia / Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR et. al. // *Science translational medicine*. – 2012 – Aug 29. – Vol. 4 № 149. – P. 149ra118.

70. Cloos J. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples / Cloos J, Goemans BF, Hess CJ et al. // *Leukemia*. – 2006. – Vol. 20. – P. 1217–1220.
71. Neuhoff C. Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98 / von Neuhoff C, Reinhardt D, Sander A et al. // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2010. – Vol. 28. – P. 2682–2689.
72. Sandahl J. Ploidy and Clinical Characteristics of Childhood Acute Myeloid Leukemia: A NOPHO-AML Study / Sandahl JD, Kjeldsen E, Abrahamsson J et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2014. – Vol. 53. – P. 667–675.
73. Bolouri H. The Molecular Landscape of Pediatric Acute Myeloid Leukemia Reveals Recurrent Structural Alterations and Age-Specific Mutational Interactions. Bolouri H, Farrar JE, Triche TJ et al. // *Nature medicine*. – 2018. – Vol. 24. – P. 103–112.
74. Herlin M. What Is Abnormal in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia in Children? Analysis of the Mutational Landscape and Prognosis of the TARGET-AML Cohort / Herlin MK, Yones SA, Kjeldsen E et al. // *Genes (Basel)*. – 2021 – May 21. – Vol. 12 № 6. – P. 792.
75. Meshinchi S. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. / Meshinchi S, Alonzo TA, Stirewalt DL et al. // *Blood*. – 2006. – Dec 1. – Vol. 108 № 12. – P. 3654–3661.
76. Wang J. NUP98::NSD1 and FLT3/ITD co-expression is an independent predictor of poor prognosis in pediatric AML patients / Wang JW, Yu-Li, Yang XG и Xu LH. // *BMC pediatrics*. – 2024 – Aug 24. – Vol. 24 № 1. – P. 547.
77. Ostronoff F. NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report / Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB et al. // *Blood*. – 2014. – Vol. 124. – P. 2400–2407

78. Hollink I. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern / Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – P. 3645–3656.
79. Matsukawa T. NUP98::Nsd1 and FLT3-ITD collaborate to generate acute myeloid leukemia. / Matsukawa T, Yin M, Nigam N et al. // *Leukemia*. – 2023. – Jul. – Vol. 37 № 7. – P. 1545–1548.
80. Potluri S. Gene regulation in t(6;9) DEK::NUP214 Acute Myeloid Leukemia resembles that of FLT3-ITD/NPM1 Acute Myeloid Leukemia but with an altered HOX/MEIS axis / Potluri S, Kellaway SG, Coleman DJL и др. // *Leukemia*. – 2024. – Feb. – Vol. 38 № 2. – P. 403–407.
81. Sandahl J. t(6;9)(p22;q34)/DEK-NUP214-rearranged pediatric myeloid leukemia: an international study of 62 patients / Sandahl JD, Coenen EA, Forestier E et al. // *Haematologica*. – 2014. – May. – Vol. 99(5). – P. 865–872.
82. Wilcher K. The impact of the chromatin binding DEK protein in hematopoiesis and acute myeloid leukemia / Wilcher K.E., Page E.R.H., Privette Vinnedge L.M. // *Experimental hematology*. – 2023.
83. Mendes A. NUP214 in Leukemia: It's More than Transport / Mendes A, Fahrenkrog B // *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – P. 76.
84. Virtaneva K. Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics / Virtaneva K, Wright FA, Tanner SM et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Jan 30. – Vol. 98 № 3. – P. 1124–1129.
85. Becker H, Maharry K, Mrózek K, Volinia S, Eisfeld AK, Radmacher MD, Kohlschmidt J. Prognostic gene mutations and distinct gene- and microRNA-expression signatures in acute myeloid leukemia with a sole trisomy 8. / Becker H, Maharry K, Mrózek K et al. // *Leukemia*. – 2014. – Aug. – Vol. 28 № 8. – P. 1754–1758.

- 86.Liu, J. Molecular genetic and clinical characterization of acute myeloid leukemia with trisomy 8 as the sole chromosome abnormality / Liu J, Han W, Cai X et al. // Hematology. – 2022. – Vol. 27 № 1. – P. 565–574.
- 87.Grisendi S. Nucleophosmin and cancer / Grisendi S, Mecucci C, Falini B et al. // Nature reviews. Cancer. – 2006. – Vol. 6. – P. 493–505.
- 88.Rottin F. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment / Rottin F, Schueder F, Tiwary S et al. // Science. – 2019. – Vol. 365. – P. 342–347.
- 89.Borer R. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm / Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM et al. // Cell. – 1989. – Vol. 56. – P. 379–390.
- 90.Chiarella S. Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA / Chiarella S, De Cola A, Scaglione GL et al. // Nucleic acids research. – 2013. – Vol. 41. – P. 3228–3239.
- 91.Falini B. NPM1-mutated acute myeloid leukemia: From bench to bedside/ Falini B, Brunetti L, Sportoletti P et al. // Blood. – 2020. – Vol. 136. – P. 1707–1721.
- 92.Thiede C. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) / Thiede C, Koch S, Creutzig E et al. // Blood. – 2006. – May 15. – Vol. 107 № 10. – P. 4011–4020.
- 93.Sharma N. NPM1 Mutations in AML-The Landscape in 2023 / Sharma N, Liesveld JL // Cancers (Basel). – 2023. – Feb 12. – Vol. 15 № 4. – P. 1177.
- 94.Falini B. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype / Falini B, Mecucci C, Tiacci E et al. // The New England journal of medicine. – 2005. – Jan 20. – Vol. 352 № 3. – P. 254–266.
- 95.Mupo A. A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice / Mupo A, Celani L, Dovey O et al. // Leukemia. – 2013. – Vol. 27. – P. 1917–1920.
- 96.Toska E. Mechanisms of transcriptional regulation by WT1 (Wilms' tumour 1) / Toska E, Roberts SG // The Biochemical journal. – 2014. – Jul 1. – Vol. 461 № 1. – P. 15–32.

97. Niktoreh N. Mutated WT1, FLT3-ITD, and NUP98-NSD1 Fusion in Various Combinations Define a Poor Prognostic Group in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. / Niktoreh N, Walter C, Zimmermann M, et. al. // Journal of oncology – 2019
98. Hohenstein P. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1/ Hohenstein P, Hastie ND // human molecular genetics. – 2006. – Vol. 15. – P. 196–201.
99. Miller-Hodges E. WT1 in disease: shifting the epithelial mesenchymal balance / Miller-Hodges E, Hohenstein P // The Journal of pathology. – 2011. – Vol. 226. – P. 229–240.
100. Ariyaratana S. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis / Ariyaratana S, Loeb DM // Expert reviews in molecular medicine. – 2007. – Vol. 14. – P. 1-17.
101. Nishida S. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1/ Nishida S, Hosen N, Shirakata T et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107. – P. 3303–3312.
102. Owen C. The clinical relevance of Wilms Tumour 1 (WT1) gene mutations in acute leukaemia / Owen C, Fitzgibbon J, Paschka P. // Hematological Oncology. – 2009. – Vol. 28 № 1. – P. 13–19.
103. Paschka P. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. / Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS et al. // Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. – 2008. – Oct 1. – Vol. 26 № 28. – P. 4595–4602.
104. Pronier E. Genetic and epigenetic evolution as a contributor to WT1-mutant leukemogenesis / Pronier E, Bowman RL, Ahn J et al. // Blood. – 2018. – Sep 20. – Vol. 132 № 12. – P. 1265–1278.
105. Migas A. AML1/RUNX1 gene point mutations in childhood myeloid malignancies / Migas A, Savva N, Mishkova O et al. // Pediatric Blood & Cancer. – 2011. – Oct. – Vol. 57 № 4. – P. 583–587.

106. Jahn, N. Genomic landscape of patients with FLT3-mutated acute myeloid leukemia (AML) treated within the CALGB 10603/RATIFY trial / Jahn N, Jahn E, Saadati M et al. // *Leukemia*. – 2022. – Vol. 36. – P. 2218–2227.
107. Iwai T. Internal tandem duplication of the FLT3 gene and clinical evaluation in childhood acute myeloid leukemia. The Children's Cancer and Leukemia Study Group, Japan / Iwai T, Yokota S, Nakao M et al. // *Leukemia*. – 1999. – Jan. – Vol. 13(1). – P. 38–43.
108. Whitman S. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study/ Whitman SP, Archer KJ, Feng L et al. // *Cancer research*. – 2001. – Vol. 61. – P. 7233–7239.
109. Oran B. Allogeneic Transplantation in First Remission Improves Outcomes Irrespective of FLT3-ITD Allelic Ratio in FLT3-ITD-Positive Acute Myelogenous Leukemia. / Oran B, Cortes J, Beitinjaneh A et al.// *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. – 2016. – Jul. – Vol. 22 № 7. – P. 1218–1226.
110. Tarlock K. Biology and Clinical Implications of Complex Landscape of Cooperating Events in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia / Tarlock K, Robinson L, Alonzo TA et al. // *Blood*. – 2021. – Vol. 138. – P. 3454.
111. Bhatnagar B. Framework of clonal mutations concurrent with WT1 mutations in adults with acute myeloid leukemia: Alliance for Clinical Trials in Oncology study / Bhatnagar B, Kohlschmidt J, Orwick SJ et al. // *Blood advances*. – 2023. – Aug 22. – Vol. 7(16). – P. 4671–4675.
112. Gale RE. 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/ Gale RE, Green C, Allen C et al. // *Blood*. - 2008. - Vol. 111, № 5. - P. 2776–2784
113. Corley EM. Impact of FLT3-ITD Insertion Length on Outcomes in Acute Myeloid Leukemia: A Propensity Score-Adjusted Cohort Study/ Corley EM,

- Mustafa Ali MK, Alharthy H et al. // *Biology (Basel)*. - 2022. - June 15; Vol. 11 № 6. - P. 916
114. Fischer M. Impact of FLT3-ITD diversity on response to induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia/ Fischer M, Schnetzke U, Spies-Weissbart B et al. // *Haematologica*. - 2017. - April; Vol. 102 № 4. - P. e129-e131
115. Weisberg E. Antileukemic effects of novel first- and second-generation FLT3 inhibitors: structure-affinity comparison. / Weisberg E, Roesel J, Furet P et al. // *Genes Cancer*. – 2010. – Vol. 1. – P. 1021–1032.
116. Levis M. A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo/ Levis M, Allebach J, Tse KF, et al // *Blood*. - 2002. - Vol. 99. - P. 3885–3891
117. Smith B. Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia/ Smith B, Levis M, Beran M, et al. // *Blood*. - 2004. - Vol. 103. - P. 3669–3676
118. Levis M. Plasma inhibitory activity (PIA): a pharmacodynamic assay reveals insights into the basis for cytotoxic response to FLT3 inhibitors/ Levis M, Brown P, Smith B, et al. // *Blood*. - 2006. - Vol. 108. - P. 3477–3483
119. Knapper S. Lestaurtinib FLT3 Inhibitory Activity Is Modulated by Concomitant Azole Therapy and May Influence Relapse Risk/ Knapper S, Burnett A, Hills R, et al. // *Blood*. - 2009. - Vol. 114. - P. 326a.
120. Stone R. Midostaurin plus chemotherapy for acute myeloid leukemia with a FLT3 mutation / Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL et al.// *The New England journal of medicine*. – 2017. – Vol. 377. – P. 454–464.
121. Sasaki K. Sorafenib plus intensive chemotherapy improves survival in patients with newly diagnosed, FLT3-internal tandem duplication mutation-positive acute myeloid leukemia / Sasaki K, Kantarjian HM, Kadia T et al. // *Cancer*. – 2019. – Nov 1. – Vol.125 № 21. – P. 3755–3766.
122. Röllig C. Study Alliance Leukaemia. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute

- myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial/ Röllig C, Serve H, Hüttmann A et al. // *The Lancet. Oncology.* - 2015. - Vol. 16 № 16. - P. 1691-1699
123. Erba H. QuANTUM-First Study Group. Quizartinib plus chemotherapy in newly diagnosed patients with FLT3-internal-tandem-duplication-positive acute myeloid leukaemia (QuANTUM-First): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. / Erba HP, Montesinos P, Kim HJ et al. // *Lancet.* – 2023. – May 13. – Vol. 401 № 10388. – P. 1571–1583.
124. Perl A. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML. / Perl AE, Martinelli G, Cortes JE et al. // *The New England journal of medicine.* – 2019. – Oct 31. – Vol. 381(18). – P. 1728–1740.
125. Schlenk R. Midostaurin added to chemotherapy and continued single-agent maintenance therapy in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD. / Schlenk RF, Weber D, Fiedler W et al. // *Blood.* – 2019. – Vol. 133. – P. 840–851.
126. Altman J. Phase 1 study of quizartinib in combination with induction and consolidation chemotherapy in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia / Altman JK, Foran JM, Pratz KW et al. // *American journal of hematology.* – 2018. – Vol. 93. – P. 213–221.
127. Sakaguchi M. The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia / Sakaguchi M, Nakajima N, Yamaguchi H et al. // *Leukemia Research Reports.* – 2020. – Vol. 13.
128. Wang T. ScanITD: detecting internal tandem duplication with robust variant allele frequency estimation / Wang T-Y, Yang R // *Gigascience.* – 2020. – Vol. 9.
129. Döhner H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. // *Blood.* – 2017. – Vol. 129(4). – P. 424–447.
130. Kim Y. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. / Kim

- Y, Lee GD, Park J et al. // *Blood cancer journal*. – 2015. – Aug 14. – Vol. 5 № 8. – P. e336.
131. Murphy K. Detection of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations by a multiplex polymerase chain reaction and capillary electrophoresis assay / Murphy KM, Levis M, Hafez MJ et al. // *The Journal of molecular diagnostics*. – 2003. – Vol. 5 № 2. – P. 96–102.
132. Kai Ye. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads / Ye K, Schulz MH, Long Q et al. // *Bioinformatics*. – 2009. – Vol. 25 № 21. – P. 2865–2871.
133. Au C. Clinical evaluation of panel testing by next-generation sequencing (NGS) for gene mutations in myeloid neoplasms / Au CH, Wa A, Ho DN et al. // *Diagnostic pathology*. – 2016. – Vol. 11. – P. 11.
134. Blätte T. getITD for FLT3-ITD-based MRD monitoring in AML / Blätte TJ, Schmalbrock LK, Skambraks S et al. // *Leukemia*. – 2019. – Vol. 33. – P. 2535–2539.
135. Wang T. ScanITD: detecting internal tandem duplication with robust variant allele frequency estimation / Wang T-Y, Yang R // *Gigascience*. – 2020. – Vol. 9.
136. Tsai H. Targeted informatics for optimal detection, characterization, and quantification of FLT3 internal tandem duplications across multiple next-generation sequencing platforms. / Tsai HK, Brackett DG, Szeto D et al. // *The Journal of molecular diagnostics*. – 2020. – Vol. 22. – P. 1162–1178.
137. Abo R. BreaKmer: detection of structural variation in targeted massively parallel sequencing data using kmers. / Abo RP, Ducar M, Garcia EP et al. // *Nucleic acids research*. – 2014. – Vol. 43.
138. Chiba K. Genomon ITDetector: a tool for somatic internal tandem duplication detection from cancer genome sequencing data / Chiba K, Shiraishi Y, Nagata Y et al. // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 31. – P. 116–118.
139. Rustagi N. ITD assembler: an algorithm for internal tandem duplication discovery from short-read sequencing data. / Rustagi N, Hampton OA, Li J et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 17. – P. 188.

140. Yuan D. Comprehensive review and evaluation of computational methods for identifying FLT3-internal tandem duplication in acute myeloid leukaemia / Yuan D, He X, Han X et al. // *Briefings in Bioinformatics*. – 2021. – Vol. 22 № 5.
141. Kim B. FLT3 Internal Tandem Duplication in Patients With Acute Myeloid Leukemia Is Readily Detectable in a Single Next-Generation Sequencing Assay Using the Pindel Algorithm / Kim B, Kim S, Lee ST et al. // *Annals of laboratory medicine*. – 2019. – May. – Vol. 39 № 3. – P. 327–329.
142. Lee S. 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 / Lee S, Sun CH, Jang H et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2023. – Feb 23. – Vol. 24 № 1. – P. 62.
143. Kottaridis P. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: Implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. / Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE et al. // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – P. 2393–2398.
144. Grunwald M. Improved FLT3 internal tandem duplication PCR assay predicts outcome after allogeneic transplant for acute myeloid leukemia/ Grunwald M, Tseng L, Lin M, et al. // *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. - 2014. - Vol. 20 № 12. - P. 1989-1995.
145. Rücker F. Measurable residual disease monitoring in AML with FLT3-ITD treated with intensive chemotherapy plus midostaurin / Rücker FG, Bullinger L, Cocciardi S et. al. // *Blood advances*. – 2024. – Dec 10. – Vol. 8 № 23. – P. 6067–6080.
146. Levis M. BMT-CTN 1506/MORPHO Study Investigators. Gilteritinib as Post-Transplant Maintenance for AML With Internal Tandem Duplication Mutation of FLT3/ Levis M, Hamadani M, Logan B et al. // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. - 2024. - Vol. 42 № 15. - P. 1766-1775

147. Bennett J. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group / Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et. al. // *British journal of haematology*. – 1976. – Aug. – Vol. 33 № 4. – P. 451–458.
148. Попов А. Диагностическое иммунофенотипирование острых лейкозов. Рекомендации российско-белорусской кооперативной группы по диагностике острых лейкозов у детей. / Попов А.М., Вержбицкая Т.Ю., Мовчан Л.В. и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2023. – Vol. 22 № 1. – P. 165–177.
149. Михайлова Е. Иммунофенотипическая характеристика острого миелоидного лейкоза с inv(16)(p13.1q22)/t(16;16) (p13.1;q22)/CBFb-MYH11 у детей / Михайлова Е.В., Кашпор С.А., Зеркаленкова Е.А. и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2021. – Vol. 20 № 1. – P. 46–53.
150. Михайлова Е. Цитометрическое и цитоморфологическое определение достижения ремиссии у детей с острым миелоидным лейкозом. Михайлова Е.В., Дагестани А.Н., Кашпор С.А. и др. // *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. – 2024. – Vol. 23 № 1. – P. 73–85.
151. Nijs D. Hot bands: A simple G-banding method for leukemic metaphases / Den Nijs J.I., et al. // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. – 1985.
152. ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020).
153. Libura M. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress / Libura M, Asnafi V, Tu A et al. // *Blood*. – 2003. – Vol. 102, Issue 6. – P. 2198–2204.
154. Li M. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists / Li MM, Datto M, Duncavage E et. al.// *The Journal of molecular diagnostics*. – 2017. – Jan. – Vol. 19 № 1. – P. 4–23.

155. Kaplan E. Nonparametric estimation from incomplete observations/ Kaplan E.L., Meier P. // Journal of the American Statistical Association. - 1958. - Vol. 53. - P. 457-81.
156. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration/ Mantel N // Cancer chemotherapy reports. - 1966. - Vol. 50. - P. 163–70.
157. Васильева М.С. Предварительные результаты терапии пациентов группы промежуточного риска по протоколу ОМЛ-MRD-2018/ Васильева М.С., Калинина И.И. и др./ Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2025. - Vol.24/ - №1. – P.14-25.
158. Maziarz R. Radius: A phase 2 randomized trial investigating standard of care ± midostaurin after allogeneic stem cell transplant in FLT3-ITD-Mutated AML/ Maziarz R. Patnaik MM, Scott BL et al. // Blood. - 2018. - Vol. 132. - P. 662
159. Alotaibi AS. Patterns of Resistance Differ in Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Type I versus Type II FLT3 inhibitors/ Alotaibi AS, Yilmaz M, Kanagal-Shamanna R et al. // Blood cancer discovery. - 2021. - Mar; Vol. 2 № 2. - P. 125-134
160. Cumbo C. FLT3 mutational analysis in acute myeloid leukemia: Advantages and pitfalls with different approaches/ Cumbo C, Tarantini F, Anelli L, et al. // Blood reviews. - 2022. - Vol. 54.
161. Liu, S. Pattern and prognostic value of FLT3-ITD mutations in Chinese de novo adult acute myeloid leukemia. / Liu S-B, Qiu Q-C, Bao X-B et al. // Cancer science. – 2018. – Vol. 109. – P. 3981–3992.
162. Schlenk, R. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation/ Schlenk R, Kayser, S, Bullinger L, et al. // Blood. - 2014.
163. Pugliese G. Impact of FLT3-ITD location on cytarabine sensitivity in AML: A network-based approach/ Pugliese G, Venafrà V, Bica V, et al. // Leukemia. - 2023. - Vol. 37. - P. 1151–1155.

164. Massacci G. A key role of the WEE1-CDK1 axis in mediating TKI-therapy resistance in FLT3-ITD positive acute myeloid leukemia patients. Massacci G, Venafra V, Latini S, et al. // *Leukemia*. - 2023. - Vol. 37. - P. 288–297.
165. Arreba-Tutusaus P. Impact of FLT3-ITD location on sensitivity to TKI-therapy in vitro and in vivo/ Arreba-Tutusaus P, Mack T, Bullinger L, et al. // *Leukemia*. - 2016. - Vol. 30 № 5. - P. 1220-1225

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Приложение А.1 Перечень меченных флуорохромами моноклональных антител для диагностики ОМЛ методом МПЦ

Флуорохромы	Моноклональные антитела
FITC	CD56, CD66b, Lys, CD4, CD61, CD38, CD15, CD34, CD4
PE	CD117, NG2, MPO, CD11a, CD99, CD371, CD2, CD7, CD19, CD13, HLA-DR, CD123, CD65
PerCP/PerCP-Cy5.5	CD7, CD14, CD3, HLA-DR, CD123, CD22, CD14, CD117, CD45
PE-Cy7	CD19, CD11b, CD22, CD64, CD41a, CD33, CD3, CD11b, CD5
APC	CD34, CD2, CD303, CD99, CD371, CD13, CD79a, CD11c, CD5, CD7, CD19, CD56
APC-Cy7/APC-Alexa 750	CD45, CD45RA, CD11b, CD3
Pacific Blue/BV421	CD33, CD13, CD79a, CD5, HLA-DR, CD10, CD235a, CD2, CD7, CD13
Krome Orange/BV510	CD3, CD11c, CD15, CD203c, CD45, CD3, CD4, CD11b
ECD	CD34, CD56
APC-Alexa 700	CD123, CD14, CD4

### Приложение А.2 Перечень меченных флуорохромами моноклональных антител для диагностики МОБ ОМЛ методом МПЦ

Флуорохромы	Моноклональные антитела для оценки иммунофенотипа предшественников миелоидных клеток	Моноклональные антитела для оценки иммунофенотипа опухолевых клеток
FITC	CD38	CD15

Продолжение приложения А.2		
PE	CD371	пациент-специфичный маркер
ECD	CD34	CD34
PC5.5	CD117	CD117
PC7	CD33	CD33
APC	CD99	пациент-специфичный маркер
APC-A700	CD123	CD14
APC-A750	CD45RA	CD11b
PB	HLA-DR	HLA-DR
KrO	CD45	CD45

Приложение А.3 ДНК-зонды для исследования методом FISH

ДНК-зонд	Перестройка	Производитель
ON <i>CBFB</i> (16q22.1) Break probe	<i>inv(16)(p13.1q22)/CBFb::MYH11</i> <i>t(16;16)(p13.1;q22)/CBFb::MYH11</i>	Kreatech ON, Германия
ON <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Fusion	<i>t(8;21)(q22;q22.1)/</i> <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Kreatech ON, Германия
ДНК-зонд	Перестройка	Производитель
ON <i>KMT2A</i> (11q23) Break	Перестройки гена <i>KMT2A</i>	Kreatech ON, Германия
ON <i>KMT2A::MLLT3</i> Fusion	<i>t(9;11) (p21.3;q23.3)/</i> <i>KMT2A::MLLT3</i>	Kreatech ON, Германия
<i>KMT2A::MLLT10</i> Dual Fusion	<i>t(10;11)(p11;q23)/</i> <i>KMT2A::MLLT10</i>	Cytocell, Великобритания
ON <i>KM2TA::MLLT4</i> Fusion	<i>t(6;11)(q27;q23)/ KM2TA::MLLT4</i>	Kreatech ON, Германия

Продолжение приложения А.3		
<i>MLLT1::KMT2A</i> Gene Fusion Probe Detection	t(11;19)(q23;p13.3)/ <i>MLLT1::KMT2A</i>	Wuhan HealthCare Biotechnology, Китай
<i>RMB15::MKL1</i> Fusion	t(1;22)(p13;q13)/ <i>RMB15::MKL1</i>	Cytotest, США
<i>MECOM</i> t(3;3); inv(3) (3q26) Break	Inv(3)(q21.3q26.2), t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM	Kreatech ON, Германия
Chromosome 4, 10 (4q12/CEP10) centromere probe	Изменение числа копий хромосом 4, 10	Wuhan HealthCare Biotechnology, Китай
ON <i>FUS</i> (16p11) Break	t(16;21)(p11;q22)/ <i>FUS::ERG</i>	Kreatech ON, Германия
XL 5q31/5q33/5p15 Deletion Probe	Делеция 5q, моносомия 5	Metasystems, США
XL 7q22/7q31 Deletion Probe	Делеция 7q, моносомия 7	Metasystems, США
ДНК-зонд	Перестройка	Производитель
<i>RBM15::MKL1</i> Dual Fusion/Translocation	t(1;22)(p13;q13)/ <i>RBM15::MKL1</i>	CytoTest, США
<i>MNX1::ETV6</i> Dual Fusion	t(7;12)(q36;p13)/ <i>MNX1::ETV6</i>	Cytotest, США
ON <i>NUP98</i> (11p15) Break	Перестройки гена <i>NUP98</i>	Kreatech ON, Германия

Приложение А.4 Список генов, включенных в панель QIASeg HMNP

*ABL1, ADA, ANKRD26, ASXL1, ASXL2, ATM, ATRX, BCL6, BCOR, BCORL1, BCR, BIRC3, BLM, BRAF, BRCA1, BRCA2, C17orf97, CALR, CARD11, CBL, CBLB, CBLC, CDKN2A, CEBPA, CHEK2, CREBBP, CRLF2, CSF1R, CSF3R, CTCF, CUX1, DAXX, DDX41, DNMT2, DNMT1, DNMT3A, EED, EGFR, ELANE, EP300, ETNK1, ETV6, EZH2, FAM154B, FAM47A, FAM5C, FAS, FBXW7, FLRT2, FLT3, GATA1, GATA2, GJB3, GNAS, HNRNPK, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, IKZF3, IL7R, JAK1, JAK2, JAK3, KAT6A, KCNA4, KCNK13, KDM6A, KDR, KIT, KLHDC8B, KLHL6, KMT2A, KMT2C, KRAS, LRRC4, LUC7L2, MAP2K1, MLH1, MPL, MSH2, MSH6, MYC, MYD88, NBN, NF1, NOTCH1, NPAT, NPM1, NRAS, NSD1, NTRK3, OR13H1, OR8B12, P2RY2, PAX5, PCDHB1, PDGFRA, PHF6, PML, PMS2, PRAMEF2, PRF1, PRPF40B, PRPF8, PTEN, PTPN11, RAD21, RB1, RELN, RUNX1, SETBP1, SF1, SF3A1, SF3B1, SH2B3, SH2D1A, SMARCB1, SMC1A, SMC3, SRP72, SRSF2, STAG2, STAT3, STXBP2, SUZ12, TAL1, TERC, TERT, TET2, TNFRSF13B, TP53, TPMT, TUBA3C, U2AF1, U2AF2, WAS, WRN, WT1, XPO1, ZRSR2.*