

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-1-92-98>

CC BY 4.0

# Оценка чувствительности методов скрининга мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, основанных на гетеродуплексном и HRM-анализах

Т.Н. Субботина<sup>1,2</sup>, А.А. Шалёва<sup>1,2</sup>, А.И. Шевченко<sup>1,2</sup>, Е.А. Поздышева<sup>3</sup>, Я.А. Войцеховская<sup>3</sup>, К.О. Миронов<sup>3</sup><sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; Россия, 660041 Красноярск, Свободный пр-кт, 79;<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 660037 Красноярск, ул. Коломенская, 26;<sup>3</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиреевская, 3А**Контакты:** Татьяна Николаевна Субботина [stn.25@mail.ru](mailto:stn.25@mail.ru)

**Введение.** В рамках диагностики истинной полицитемии одним из критериев постановки диагноза является наличие соматических мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, однако на сегодняшний день для анализа данных мутаций нет единого метода. Ранее нами были предложены 2 метода скрининга таких мутаций на основе гетеродуплексного и HRM-анализов (High Resolution Melt, метод детекции мутаций на основании анализа кривых плавления), являющихся относительно дешевыми и быстрыми по сравнению с секвенированием.

**Цель исследования** – определение чувствительности гетеродуплексного и HRM-анализов, применяемых в качестве методов скрининга соматических мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*.

**Материалы и методы.** Для определения чувствительности использованы клонированные образцы ДНК от 6 пациентов с различными мутациями в экзоне 12 гена *JAK2* и образец ДНК без мутации. Было выполнено разведение клонированных образцов в различных соотношениях, содержащих 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 и 0,78 % мутантного образца. Далее был проведен гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в ПААГ (полиакриламидном геле) и HRM-анализ.

**Результаты.** Порог чувствительности гетеродуплексного анализа составил 3,13–6,25 % мутантного аллеля в пробе, в зависимости от конкретной мутации, порог чувствительности HRM-анализа – 6,25–12,5 % мутантного аллеля.

**Заключение.** Гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в ПААГ и HRM-анализ для выявления специфических для истинной полицитемии мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* позволяют повысить эффективность использования различных типов секвенирования и могут быть использованы как более простые и менее дорогостоящие методы предварительного скрининга указанных мутаций.

**Ключевые слова:** экзон 12 гена *JAK2*, HRM, гетеродуплексный анализ

**Для цитирования:** Субботина Т.Н., Шалёва А.А., Шевченко А.И. и др. Оценка чувствительности методов скрининга мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, основанных на гетеродуплексном и HRM-анализах. Онкогематология 2024;19(1):92–8. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-1-92-98>

## Sensitivity evaluation of methods for screening *JAK2* exon 12 mutations based on heteroduplex and HRM analysis

T.N. Subbotina<sup>1,2</sup>, A.A. Shalyova<sup>1,2</sup>, A.I. Shevchenko<sup>1,2</sup>, E.A. Pozdysheva<sup>3</sup>, Ya.A. Voytsekhovskaya<sup>3</sup>, K.O. Mironov<sup>3</sup><sup>1</sup>Siberian Federal University; 79 Svobodnyy Prospekt, Krasnoyarsk 660041, Russia;<sup>2</sup>Federal Siberian Research Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency; 26 Kolomenskaya St., Krasnoyarsk 660037, Russia;<sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 3A Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia**Contacts:** Tatiana Nikolaevna Subbotina [stn.25@mail.ru](mailto:stn.25@mail.ru)

**Background.** According to WHO guidelines, one of the criteria for diagnosis of polycythemia vera is the presence of somatic mutations in exon 12 of the *JAK2* gene, but to date there is no universally accepted simple method to analyze these mutations. We have previously proposed two methods for screening such mutations based on heteroduplex and HRM (High Resolution Melt) assays, which are relatively cheap and fast compared to sequencing.

**Aim.** To analyze the sensitivity of these screening methods.

**Materials and methods.** The study used cloned DNA samples from 6 patients with various mutations in exon 12 of the *JAK2* gene that we had previously identified, as well as a clone of the corresponding wild-type DNA segment. Dilution of the cloned mutant samples with wild-type clones was performed to obtain samples with different levels of allele burden: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78 %. Heteroduplex analysis followed by PAGE (polyacrylamide gel) and HRM analysis was then performed with the diluted samples.

**Results.** The sensitivity threshold of the heteroduplex analysis was found to be between 3.13–6.25 % allele burdens depending on the specific mutation, the sensitivity threshold of the HRM assay was 6.25–12.5 % similarly.

**Conclusion.** Our proposed methods of heteroduplex analysis followed by PAGE and HRM-analysis for the detection of polycythemia vera-specific mutations in exon 12 of the *JAK2* gene allow increasing the efficiency of using different types of sequencing and can be used as simpler and less expensive methods of preliminary screening of these mutations.

**Keywords:** *JAK2* 12 exon, HRM, heteroduplex analysis

**For citation:** Subbotina T.N., Shalyova A.A., Shevchenko A.I. et al. Sensitivity evaluation of methods for screening *JAK2* exon 12 mutations based on heteroduplex and HRM analysis. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2024;19(1): 92–8. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-1-92-98>

## Введение

Истинная полицитемия (ИП) относится к группе хронических гематологических заболеваний, называемых миелопролиферативными неоплазиями (МПН), которые возникают в результате клональной экспансии мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток. Среди всех МПН ИП отличается неконтролируемой пролиферацией клеток миелоидного ряда и эритроцитов в отсутствие эритропоэтина.

Зарегистрированная ежегодная заболеваемость ИП составляет около 44 случаев на 100 тыс. населения [1] и чаще встречается среди пожилого населения, чем среди молодого.

Соматические драйверные мутации в гене *JAK2* являются одним из важнейших диагностических критериев при постановке диагноза ИП. У подавляющего большинства пациентов с ИП выявляется мутация p.V617F в экзоне 14 (95–97 % случаев), и около 1–3 % пациентов с ИП имеют мутации в экзоне 12 гена *JAK2*. В недавнем исследовании, проанализировавшем 1272 пациента с Rh-негативными МПН, показано, что мутации в экзоне 12 гена *JAK2* были обнаружены в 8 из 307 p.V617F-негативных случаев Rh-негативных МПН и в 2–5 % p.V617F-негативных случаев ИП [2]. Начиная с 2007 г. были открыты и описаны более 40 различных мутаций в экзоне 12 *JAK2* [3]. При этом мутации в экзоне 12 *JAK2* встречаются исключительно при ИП, в отличие от замены p.V617F в экзоне 14, и не встречаются при первичном миелофиброзе, в отличие от *JAK2*-V617F [4].

*JAK2* относится к семейству янус-киназ, имеющих 7 доменов гомологии JAK (JH1-JH7). JH2 представляет собой псевдокиназный домен, который фактически подавляет активность киназы *JAK2*, при этом экзон 14 кодирует часть сайта аутоингибирования JH2. Мутация p.V617F в экзоне 14 киназы *JAK2* вызывает активацию тирозинкиназы, снимая аутоингибирование псевдокиназного домена [5]. Известно, что функционально сходные мутации экзона 12 *JAK2* участвуют в активации сигнальных путей эритропоэтина.

Наличие мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* было включено в классификацию Всемирной организации здравоохранения (2016) как один из основных критериев диагностики ИП. Согласно данным базы COSMIC, в экзоне 12 гена *JAK2* описано примерно 40 соматических мутаций, встречающихся с разной частотой и имеющих клиническое значение для подтверждения ИП. Ввиду большого разнообразия типов данных мутаций, а также различного возможного уровня аллельной нагрузки каждой мутации выбор метода исследования соматических мутаций *JAK2* – непростая задача, в связи с этим выявление мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* на сегодняшний день не является рутинной процедурой в практике клинко-диагностических лабораторий. В качестве возможных скрининговых тестов для выявления данных мутаций ранее мы предлагали использование относительно простых и менее дорогостоящих, чем секвенирование, методов гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ (полиакриламидном геле) и HRM-анализа (High Resolution Melt, метод детекции мутаций на основании анализа кривых плавления) [6, 7].

**Цель исследования** – определение чувствительности гетеродуплексного анализа с последующим электрофорезом в ПААГ и HRM-анализа, применяемых в качестве методов скрининга соматических мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*.

## Материалы и методы

Для анализа порога чувствительности обоих методов осуществляли клонирование ДНК, выделенной из клинических образцов от 6 пациентов с ИП с ранее выявленными мутациями в экзоне 12 гена *JAK2* [8], в вектор pGEM-T по стандартной методике (Promega, США) [9]. Все выявленные мутации относились к типу Ins/Del. Отбор клонов «дикого» типа и содержащих мутации (см. таблицу) проводили на основании результатов секвенирования на генетическом анализаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Контрольные образцы, имеющие и не имеющие мутацию, были смешаны в разных

Перечень клонированных мутаций  
List of cloned mutations

Изменение cDNA cDNA change	Изменение в белке Protein change	rsid	COSMIC
c.1624_1629delAATGAA	p.N542-E543del	—	COSV67575778
c.1619_1627TCAGAAATG>AAA	p.I540-E543delinsKK	—	COSV67625452
c.1623_1628delAAATGA	p.N542_E543del	—	COSV67575778
c.1622_1627delGAAATG	p.R541_E543delinsK	rs1818850764	COSV67586963
c.1611_1616delTCACAA	p.F537_K539delinsL	rs1278748630	COSV67579858
c.1612_1616CACAA>TT	p.H538_K539delinsL	—	COSV106113090

соотношениях с получением проб, содержащих 0,78; 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 % мутантного образца — для гетеродуплексного анализа, и проб, содержащих 1,56; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 и 100 % мутантного образца — для HRM-анализа.

Метод гетеродуплексного анализа включал амплификацию фрагмента ДНК экзона 12 гена *JAK2* с образованием гетеродуплексов и последующий электрофорез в вертикальном ПААГ. Амплификацию выполняли с использованием набора реагентов для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени в присутствии EVA Green (Синтол, Москва) и праймеров, заимствованных из работы [10] и фланкирующих участок длиной 126 п. о., включающих нуклеотиды как экзона 12, так и части последующего интрона гена *JAK2* (прямой 5'-AATGGTGTCTTCTGATGTACC-3' и обратный 5'-AGACAGTAATGAGTATCTAATGAC-3'). Количество вносимой ДНК в реакционную пробу составило около 1200 копий. ПЦР с дополнительным этапом для образования гетеродуплексов проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 3 мин — 95 °С; 40 циклов: 10 с — 95 °С, 10 с — 58 °С, 20 с — 72 °С; 1 цикл (образование гетеродуплексов): 1 мин — 96 °С, 1 мин — 45 °С. Далее с продуктами амплификации проводили электрофорез в 8 % вертикальном ПААГ (соотношение акриламид/бис-акриламид — 29/1) в 1х TBE-буфере. Детекцию результатов выполняли путем окрашивания ПААГ бромистым этидием в течение 7–10 мин с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования Gel Doc (Bio-Rad, США). Соответствие молекулярных весов продуктов амплификации оценивали с помощью маркера молекулярного веса pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, 23 (размер фрагментов 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110, 67, 34 и 26 п. о.) (Applied Biosystems, США). Заключение о наличии мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* в гетерозиготном состоянии составляли по образованию дополнительных полос в геле (гетеродуплексов), которые не выявляются в образцах ДНК «дикого» типа, а также в образцах, содержащих 100 % мутантного аллеля.

HRM-анализ включает точный мониторинг прогрессивного изменения флуоресценции, вызванного высвобождением интеркалирующего красителя из дуплекса ДНК при тепловой денатурации. Замены оснований, делеции и вставки приводят к различиям в кинетике плавления дуплексов ДНК, которое можно обнаружить с помощью флуоресцентного красителя. Праймеры и условия ПЦР были также заимствованы из работы [10]. ПЦР проводили с помощью набора Precision Melt Supermix (Bio-Rad, США). Количество реагентов, вносимых в одну пробу (общий объем 10 мкл), составляло: Precision Melt Supermix — 5 мкл; праймеры прямой, обратный — по 0,5 мкл (с начальной концентрацией 2 мкМ каждого); образец ДНК — 4 мкл (около 1200 копий клонов). ПЦР с дополнительным этапом плавления высокого разрешения проводили на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: 2 мин — 95 °С; 40 циклов: 10 с — 95 °С, 30 с — 57 °С, 30 с — 72 °С; затем плавление с высоким разрешением: 30 с — 95 °С, 1 мин — 60 °С, плавление при температуре от 65 до 95 °С с градиентом 0,2 °С в 10 с. Результаты HRM оценивали с помощью программы Precision Melt Analysis (Bio-Rad, США).

### Результаты

На рис. 1 приведены результаты анализа чувствительности гетеродуплексного анализа с электрофорезом в ПААГ для 6 различных мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*.

На дорожках от проб, содержащих аллель «дикого» типа, четко визуализируется основной фрагмент, соответствующий «дикому» типу — 126 п. о. Полосы, соответствующие мутантным аллелям, на уровне 120 п. о. визуализируются при аллельной нагрузке 50 и 25 % в случаях 5 из 6 мутаций, при которых суммарное количество делетированных нуклеотидов равно 6. В случае мутации c.1612\_1616CACAA>TT полосы, соответствующие мутантному аллелю, отсутствуют, что, вероятно, обусловлено тем, что в результате данной мутаций происходит делеция лишь 3 нуклеотидов, а не 6. Для всех 6 мутаций визуализируются дополнительные полосы выше фрагмента «дикого» типа, соответствующие гетеродуплексам, образованным сочетанием фрагментов цепей ДНК

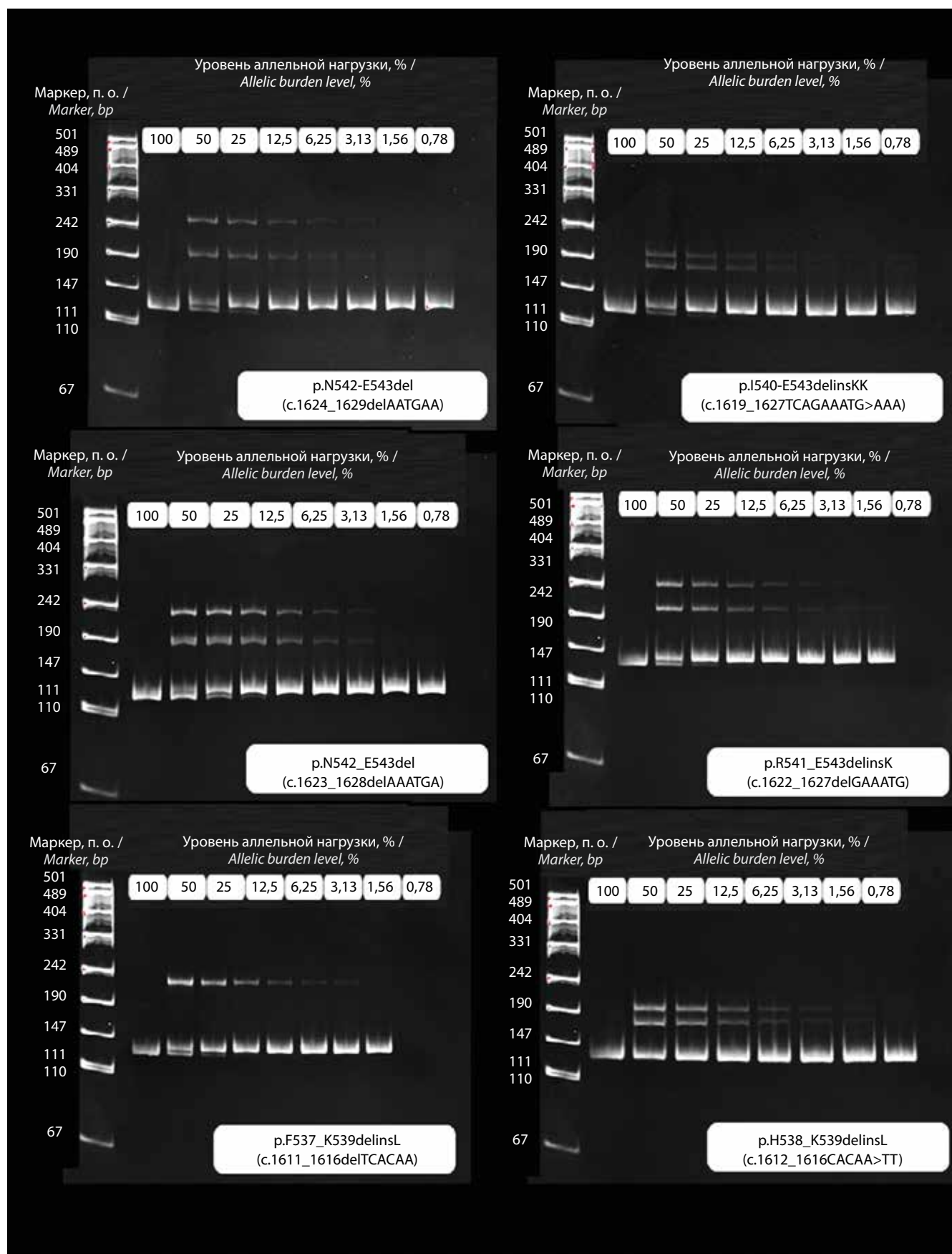
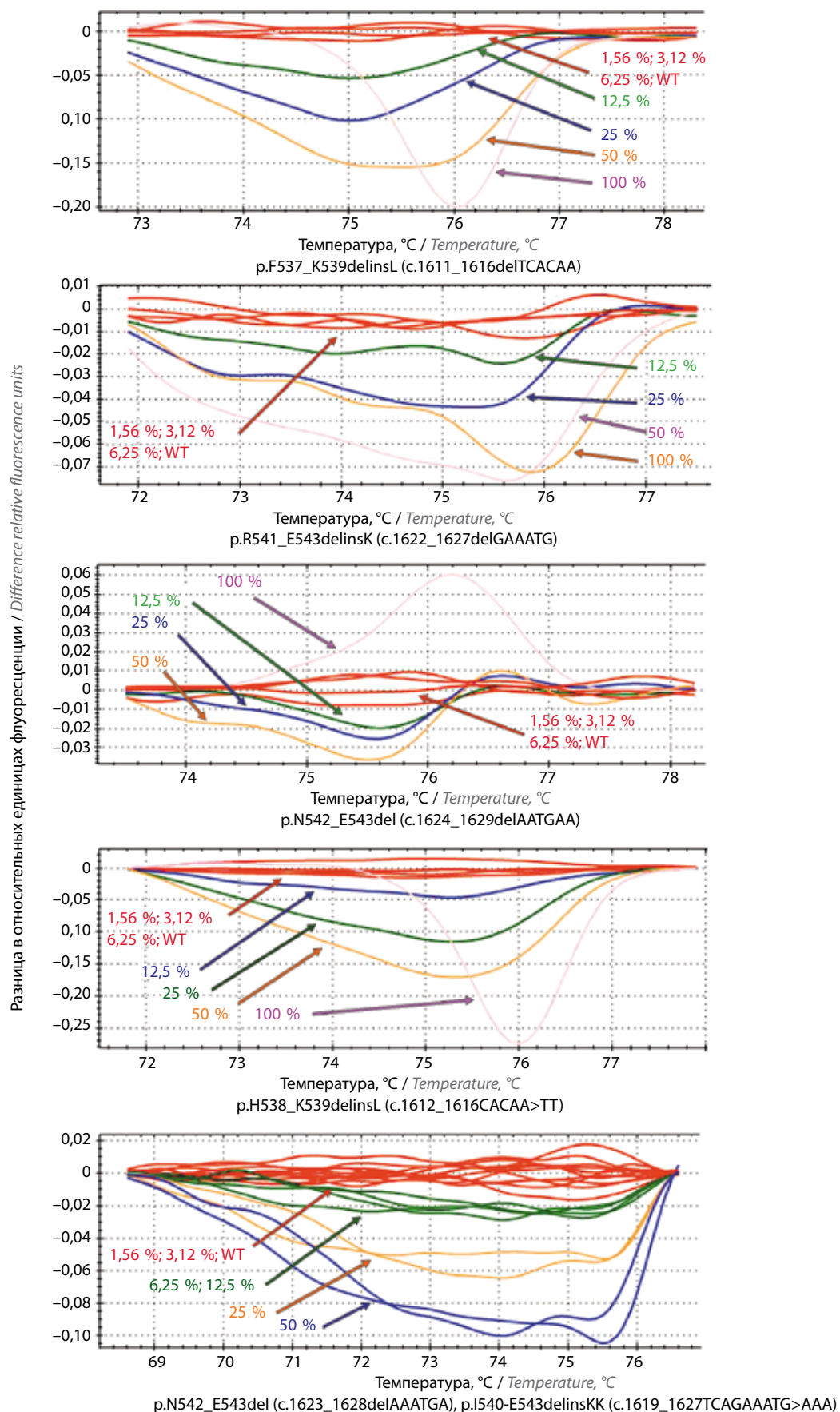


Рис. 1. Результаты анализа чувствительности гетеродуплексного анализа для 6 мутаций в экзоне 12 гена JAK2

Fig. 1. Sensitivity analysis results of heteroduplex analysis for 6 mutations in exon 12 of the JAK2 gene





**Рис. 2.** Результаты анализа чувствительности HRM-анализа для 6 мутаций в экзоне 12 гена JAK2

**Fig. 2.** Sensitivity analysis results of HRM analysis for 6 mutations in exon 12 of the JAK2 gene

«дикого» и мутантного типов аллелей, при этом для всех 6 мутаций можно уверенно отличить наличие гетеродуплексов при аллельной нагрузке в пределах от 3,13–6,25 % наличия мутантного аллеля.

На рис. 2 приведены результаты анализа чувствительности HRM-анализа для 6 различных мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*. При проведении анализа падения уровня флуоресценции с повышением температуры на этапе плавления все кривые плавления продуктов амплификации были четко разделены на несколько кластеров в соответствии с уровнями аллельной нагрузки. Для мутаций с.1611\_1616delTCACAA, с.1622\_1627delGAAATG, с.1624\_1629delAATGAA и с.1612\_1616CACA>TT порог чувствительности метода HRM составил 12,5 % мутантного аллеля, тогда как для мутаций с.1619\_1627TCAGAAATG>AAA и с.1623\_1628delAAATGA порог чувствительности оказался ниже – 6,25 % мутантного аллеля.

### Обсуждение

Для анализа соматических мутаций в области экзона 12 гена *JAK2* используют различные молекулярно-генетические методы, основанные на секвенировании ДНК [11], фрагментном анализе [12], а также на различных модификациях ПЦР в реальном времени: аллель-специфичной ПЦР [3], методах детекции мутаций на основании анализа кривых плавления [10] и др. Тем не менее ни один из предложенных методов не позволяет определить все возможные варианты указанных соматических мутаций ввиду их разнообразия, а также того, что уровень аллельной нагрузки соматической мутации в крови пациента зачастую оказывается ниже порога чувствительности метода. В связи с этим выявление мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* на сегодняшний день не является рутинной процедурой в практике клинко-диагностических лабораторий. Также стоит отметить, что большинство молекулярно-генетических лабораторий, предлагающих услуги по анализу мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, исследуют только наиболее часто встречающиеся варианты му-

таций. В то же время с помощью предлагаемых нами методов возможно проведение анализа одновременно всех мутаций, которые представлены небольшими вставками или делециями на участке экзона 12 гена *JAK2*.

Если сравнивать между собой приведенные в настоящем исследовании методы, то гетеродуплексный анализ показал более высокую чувствительность для всех 6 проанализированных мутаций по сравнению с HRM-анализом. К преимуществам гетеродуплексного анализа с электрофорезом в ПААГ также можно отнести его более низкую стоимость в отношении как необходимых реагентов, так и оборудования и программного обеспечения для обработки результатов анализа, поскольку метод HRM требует наличия дорогостоящего оборудования (в частности, амплификатора с детекцией флуоресценции в режиме реального времени) и специального программного обеспечения. Вместе с тем метод HRM также имеет свои преимущества перед гетеродуплексным анализом, заключающиеся в простоте и более высокой скорости выполнения анализа, поскольку он не предполагает дополнительных лабораторных манипуляций после ПЦР и проводится в той же пробирке, что обеспечивает, в отличие от гетеродуплексного анализа, дополнительную защиту от контаминации продуктами ПЦР.

### Заключение

Таким образом, по результатам проведенного исследования можно заключить, что для скрининга мутаций по типу Ins/Del в экзоне 12 гена *JAK2* гетеродуплексный анализ с электрофорезом в ПААГ демонстрирует достаточно высокий уровень чувствительности, а именно 3,13–6,25 % присутствия мутантного аллеля в пробе, в зависимости от конкретной мутации. В то же время порог чувствительности HRM-анализа для скрининга тех же мутаций составил 6,25–12,5 % наличия мутантного аллеля в пробе. Оба метода могут быть рекомендованы к использованию в качестве предварительного скрининга мутаций по типу Ins/Del в экзоне 12 гена *JAK2*.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bose P., Verstovsek S. Updates in the management of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Ther Adv Hematol* 2019;10:2040620719870052. DOI: 10.1177/2040620719870052
2. Maddali M., Kulkarni U.P., Ravindra N. et al. *JAK2* exon 12 mutations in cases with *JAK2*V617F-negative polycythemia vera and primary myelofibrosis. *Ann Hematol* 2020;99(5):983–9. DOI: 10.1007/s00277-020-04004-7
3. Scott L.M. The *JAK2* exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am J Hematol* 2011;86(8):668–76. DOI:10.1002/ajh.22063
4. Tondeur S., Paul F., Riou J. et al. Long-term follow-up of *JAK2* exon 12 polycythemia vera: a French Intergroup of Myeloproliferative Neoplasms (FIM) study. *Leukemia* 2021;35(3):871–5. DOI:10.1038/s41375-020-0991-x
5. Silvennoinen O., Hubbard S.R. Molecular insights into regulation of *JAK2* in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015;125(22):3388–92. DOI: 10.1182/blood-2015-01-621110
6. Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена *JAK2*. *Лабораторная служба* 2017;6(1):29–33. Subbotina T.N., Kharsekina A.E., Dunaeva E.A. et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service* 2017;6(1):29–33. (In Russ.). DOI: 10.17116/labs20176129-33

7. Kurochkin D., Maslyukova I., Subbotina, T. et al. P1056: screening of *JAK2* exon 12 somatic mutations by high-resolution melting curve analysis. *HemaSphere* 2022;6:946–7. DOI: 10.1097/01.HS9.0000847092.01448.ed
8. Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О. и др. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2*. *Гематология и трансфузиология* 2016;61(4):196–200. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200  
Subbotina T.N., Dunaeva E.A., Mironov K.O. et al. Using of pyrosequencing method for the detection and quantitative determination of mutant *JAK2* exon 12 allele burden. *Gematologiya i transfuziologiya* = Russian Journal of Hematology and Transfusiology 2016;61(4):196–200. (In Russ.). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200
9. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
10. Jones A.V., Cross N.C., White H.E. et al. Rapid identification of *JAK2* exon 12 mutations using high resolution melting analysis. *Haematologica* 2008;93(10):1560–4. DOI: 10.3324/haematol.12883
11. Pietra D., Li S., Brisci A. et al. Somatic mutations of *JAK2* exon 12 in patients with *JAK2* (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 2008;111(3):1686–9. DOI: 10.1182/blood-2007-07-101576
12. Furtado L.V., Weigelin H.C., Elenitoba-Johnson K.S. et al. A multiplexed fragment analysis-based assay for detection of *JAK2* exon 12 mutations. *J Mol Diagn* 2013;15(5):592–9. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.04.006

#### Вклад авторов

Т.Н. Субботина: разработка дизайна исследования, написание текста статьи, редактирование текста статьи;  
А.А. Шалёва: обзор литературы по теме исследования, получение экспериментальных данных, анализ полученных данных, написание части текста статьи;  
А.И. Шевченко: получение экспериментальных данных, анализ полученных данных;  
Е.А. Поздышева, Я.А. Войцеховская, К.О. Миронов: синтез и предоставление материала для проведения исследования, редактирование текста статьи.

#### Authors' contributions

T.N. Subbotina: research design development, article writing, article editing;  
A.A. Shalyova: review of publications on the article topic, obtaining experimental data, analysis of the data obtained, article writing;  
A.I. Shevchenko: obtaining experimental data, analysis of the data obtained;  
E.A. Pozdysheva, Ya.A. Voytsekhovskaya, K.O. Mironov: synthesis and provision of research material, article editing.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Субботина / T.N. Subbotina: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>  
А.А. Шалёва / A.A. Shalyova: <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>  
А.И. Шевченко / A.I. Shevchenko: <https://orcid.org/0009-0007-9678-328X>  
Е.А. Поздышева / E.A. Pozdysheva: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>  
Я.А. Войцеховская / Ya.A. Voytsekhovskaya: <https://orcid.org/0000-0003-0201-429X>  
К.О. Миронов / K.O. Mironov: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Funding.** The study was performed without external funding.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства».

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

#### Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Federal Siberian Research Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 19.11.2023. **Принята к публикации:** 28.12.2023.

**Article submitted:** 19.11.2023. **Accepted for publication:** 28.12.2023.