ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ШАТИЛОВА АЛЕКСИНА АЛЕКСЕЕВНА

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ (*DNMT3A, IDH1, IDH2, ASXL1*) У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата медицинских наук
3.1.28. Гематология и переливание крови

Научный руководитель:
Гиршова Лариса Леонидовна,
кандидат медицинских наук

Санкт-Петербург — 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14

1.1 Нарушение регуляции эпигенетических процессов при ОМЛ 14

1.2 Клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом 17

1.3 Современные методы молекулярной диагностики: цифровая капельная ПЦР и секвенирование нового поколения 20

1.4 Соматические мутации генов *IDH1* и *IDH2* 23

1.5 Соматические мутации гена *DNMT3A* 30

1.6 Соматические мутации в гене *ASXL1* 36

1.7 Подходы к терапии пациентов с мутациями эпигенетических модификаторов 42

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 45

2.1 Характеристики исследуемой группы пациентов 45

2.2 Первичная верификация диагноза 48

2.3 Оценка мутационного статуса генов *IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1* 53

2.4 Статистическая обработка данных 60

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 63

3.1 Частота определения мутаций в генах эпигенетической регуляции у пациентов с впервые выявленным ОМЛ 63

3.2 Частота детекции мутаций в генах эпигенетической регуляции у пациентов различных регионов РФ 64

3.3 Возрастные и гендерные характеристики пациентов с мутациями генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* 66

3.4 Ассоциация мутаций генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* с лабораторно-гематологическими характеристиками пациентов в дебюте заболевания 69

3.5 Особенности морфологии и иммунофенотипа бластных клеток с мутированным статусом генов *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1* 71

3.6 Ассоциация мутаций в генах эпигенетической регуляции с рутинно определяемыми цитогенетическими и молекулярными аномалиями 73

3.7 Анализ результатов секвенирования нового поколения 76

3.8 Прогностическая роль сопутствующих мутаций, выявленных по результатам NGS-исследования 82

3.9 Анализ показателей прогноза пациентов с впервые выявленным ОМЛ 84

3.10 Влияние мутаций генов эпигенетической регуляции в изолированном варианте на прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ 91

3.11 Влияние на прогноз часто детектируемых сочетаний мутаций генов эпигенетической регуляции с генетическими аномалиями известной прогностической значимости 96

3.12 Выбор оптимального режима индукционной терапии в группе пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции 102

3.13 Сравнительный анализ факторов, влияющих на прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ 106

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 110

ВЫВОДЫ 122

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 124

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 125

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 126

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой агрессивное злокачественное новообразование, характеризующееся бесконтрольной пролиферацией клональных клеток-предшественниц гемопоэза с нарушенной способностью к нормальной дифференцировке [181]. С точки зрения мутационного профиля и молекулярных механизмов патогенеза ОМЛ является крайне гетерогенным заболеванием [58]. Накопление соматических драйверных мутаций – ключевой аспект, лежащий в основе лейкемической трансформации [121]. У большей части пациентов обнаруживаются мутации в двух и более генах, приобретаемые в разные интервалы времени, что позволяет рассматривать лейкозогенез как многоступенчатый эволюционный процесс [156]. Взаимодополняющий характер приобретаемых генетических аномалий обуславливает необходимость комплексной оценки молекулярного профиля пациента. В частности, негативное прогностическое влияние мутации ITD в гене *FLT3* нивелируется сопутствующими мутациями гена *NPM1* [190]. Выявление прогностически значимых мутаций в дебюте заболевания позволяет провести распределение пациентов на группы риска [91–93]. Вместе с тем, большая часть обнаруживаемых при ОМЛ генетических аномалий имеет неопределенный прогностический потенциал и составляет группу промежуточного прогноза в актуальной модели стратификации ELN-2022 [93].

Несмотря на значительный прорыв в понимании биологии ОМЛ и оптимизацию протоколов терапии, более чем у половины пациентов развивается рецидив заболевания [85, 155]. Увеличение долгосрочной выживаемости стало возможным благодаря трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) [24, 25, 79]. Выбор тактики ведения зависит от разных факторов, важнейшим из которых является генетический профиль пациента [93]. Современные протоколы лечения предусматривают необходимость выполнения алло-ТГСК в первой полной ремиссии (ПР) в когорте неблагоприятного генетического риска [23, 93, 168]. В группах пациентов благоприятного и

промежуточного генетического риска переход на этап алло-ТГСК при достижении первой ПР остается дискутабельной опцией. Наряду с этим, пятилетняя безрецидивная выживаемость (БРВ) в данных когортах больных невысока и составляет 52,4% и 31,5% соответственно [172]. Это обуславливает необходимость модификации текущей прогностической модели путем поиска новых молекулярно-генетических событий, ассоциированных с повышением риска развития рецидива. В данном аспекте всё возрастающий интерес в настоящее время отводится изучению регуляции эпигенетических процессов при ОМЛ.

Соматические мутации гена *DNMT3A*, приводящие к возникновению аномальных паттернов метилирования ДНК, выявляются по разным исследованиям у 8,4-26% пациентов, ассоциированы со старшим возрастом, промежуточной группой генетического риска и мутациями в генах *NPM1* и *FLT3* [59, 191].

При мутациях генов *IDH1/2* происходит нарушение нормальной энзиматической активности цитозольной и митохондриальной изоформ ферментов изоцитратдегидрогиназ. В результате наблюдается накопление конкурентно ингибирующего TET-диоксигеназы онкометаболита 2-гидроксиглутарата, что приводит к характерному гиперметилированному фенотипу [81]. Мутированный статус генов *IDH1* и *IDH2* определяется примерно в 5-10% и 15-20% случаев впервые выявленного ОМЛ соответственно, чаще у пациентов с нормальным кариотипом, трисомией 8 хромосомы и мутациями в генах *NPM1*, *FLT3* и *DNMT3A* [121].

Ген *ASXL1* принимает участие в регуляции процессов убиквитинирования и метилирования гистонов (H3K27me3, H2AK119Ub и H3K4me3) [116, 179]. Мутации в области 12 экзона обнаруживаются при впервые выявленном ОМЛ с частотой до 10%, ассоциированы с миелодисплазией, мутациями гена *RUNX1* и старшим возрастом [160]. Согласно актуальной системе стратификации [93], пациенты с мутированным статусом гена *ASXL1* относятся к неблагоприятной прогностической категории лишь в случаях отсутствия сопутствующих генетических аномалий, которые характеризуют благоприятный прогноз.

Одновременно с тем, существуют работы, демонстрирующие негативное влияние мутаций гена *ASXL1* на выживаемость больных благоприятной группы риска [95, 146].

Таким образом, учитывая очевидную роль в патогенезе ОМЛ и высокую частоту выявления в дебюте заболевания, рассмотрение вышеупомянутых мутаций в качестве потенциальных прогностических маркеров как в изолированном варианте, так и в сочетаниях с другими генетическими поломками, является перспективным.

Степень разработанности научной темы

С момента публикации результатов полногеномного секвенирования ДНК пациентов с ОМЛ [129], активно ведутся работы по изучению эпидемиологических и прогностических характеристик мутаций в генах эпигенетической регуляции при данном заболевании. Опубликованные в базе данных PubMed результаты анализа прогностического значения мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1/2* и *ASXL1* неоднозначны и противоречивы.

По данным нескольких независимых ретроспективных исследований, мутированный статус гена *DNMT3A* оказывает неблагоприятное влияние на показатели общей выживаемости (ОВ), как в общей когорте пациентов с ОМЛ, так и в группе с нормальным кариотипом и мутациями генов *NPM1* или *FLT3* [130, 157, 191]. Однако существуют работы, демонстрирующие отсутствие значимой прогностической роли мутаций в гене *DNMT3A* [101, 104, 141].

Значение мутационного статуса генов *IDH1* и *IDH2* при ОМЛ также до конца не определено. Наиболее крупные ретроспективные исследования демонстрируют отсутствие независимого влияния на показатели общей и бессобытийной выживаемости (БСВ) [87, 214]. В то же время существуют данные о негативной прогностической роли мутаций в генах *IDH1/2* [51]. Мета-анализ Xu и соавт. выявил улучшение показателей ОВ в группе пациентов с мутациями в гене *IDH2*, а мутированный статус гена *IDH1*, напротив, имел негативное влияние на прогноз [207]. Благоприятная прогностическая роль мутаций в гене *IDH2* была также

продемонстрирована в исследовании Chou и соавт., в том числе среди пациентов промежуточной группы риска [73].

Вопрос отсутствия значимого негативного вклада мутаций 12 экзона гена *ASXL1* в прогноз пациентов благоприятной группы генетического риска является спорным. Metzeler и соавт. в своем исследовании выявили ухудшение показателей как ОВ, так и БСВ пациентов с благоприятной прогностической категории при обнаружении сопутствующих мутаций гена *ASXL1* [146]. Также описано повышение кумулятивной частоты рецидивов (КЧР) у пациентов с t(8;21) или inv(16) (CBF-ОМЛ) в случаях кооперации с мутациями генов-модификаторов хроматина, в частности *ASXL1* [95].

Количество публикаций по оценке влияния мутированного статуса исследуемых генов на прогноз пациентов в разных группах лечения (в том числе при выполнении алло-ТГСК) крайне ограничено. Единичные ретроспективные исследования демонстрируют преимущества в БСВ и ОВ при использовании венетоклакса у пациентов с мутациями генов *IDH1/2* [53, 112]. Анализа прогностической значимости мутаций в генах *DNMT3A* и *ASXL1* в зависимости от выбора варианта проводимой терапии до настоящего времени не проводилось.

Таким образом, были определены цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Совершенствование модели стратификации пациентов с впервые выявленным ОМЛ на группы риска путем уточнения прогностического потенциала мутаций в генах *IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1* и их сочетаний с другими хромосомными аберрациями и генными мутациями.

Задачи исследования

1. Изучить частоту встречаемости соматических мутаций в генах *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* у больных с впервые диагностированным ОМЛ;

2. Выявить взаимосвязь мутированного варианта генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* с клинико-гематологическими характеристиками и генетическим профилем пациентов в дебюте заболевания;

3. Определить спектр дополнительных молекулярных аномалий и их прогностическое значение у пациентов с мутациями генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* на основании результатов таргетного секвенирования нового поколения;

4. Оценить влияние мутированного статуса генов *IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1* в изолированном варианте и в сочетании с другими цитогенетическими и молекулярными аномалиями на частоту достижения полных ремиссий, развития ранних рецидивов, общую и безрецидивную выживаемость, а также кумулятивную частоту рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ.

Научная новизна

Впервые получены данные по частоте встречаемости мутаций в генах *DNMT3A, IDH1, IDH2, ASXL1* среди пациентов с впервые диагностированным ОМЛ, проживающих на территории Российской Федерации.

Проанализирован молекулярный профиль опухолевого клона с мутированным статусом генов *DNMT3A, IDH1, IDH2, ASXL1* методом таргетного секвенирования нового поколения и выявлена кооперация с мутациями генов сигнального пути RAS-MEPK (*NRAS, KRAS, NF1*), модификаторов хроматина (*KMT2C/D*) и генов, участвующих в репарации ДНК (*MSH6, ATM*). Впервые продемонстрировано снижение частоты достижения ПР в группе пациентов с мутациями генов *DNMT3A, IDH1, IDH2, ASXL1* при общем количестве мутированных генов ≥ 9 и выявлении сопутствующих мутаций гена *NF1*, а также ухудшение показателей ОВ в случаях кооперации с мутациями генов *NRAS/KRAS* (все виды терапии).

Уточнена прогностическая роль мутаций в генах эпигенетической регуляции. Выявлено негативное влияние мутации R882 гена *DNMT3A* на прогноз пациентов с нормальным кариотипом, мутированным статусом гена *NPM1* и благоприятной группы генетического риска (ELN-2022). Впервые по результатам комплексного

обследования выделена группа *«FND»* с крайне неблагоприятным прогнозом, характеризующаяся тройным мутационным статусом генов *FLT3* (мутация ITD), *NPM1* и *DNMT3A* (R882). Продемонстрированы худшие показатели ОВ пациентов с благоприятными генетическими аномалиями при обнаружении сопутствующих мутаций 12 экзона гена *ASXL1*.

Впервые выявлено увеличение частоты достижения ПР у пациентов с мутациями генов *DNMT3A* и *IDH1/2* при использовании венетоклакс-содержащих неинтенсивных режимов терапии.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе исследования определена высокая частота обнаружения мутаций в генах *IDH1/2, DNMT3A* и *ASXL1* у пациентов с впервые выявленным ОМЛ в реальной клинической практике.

Полученные данные по частой ассоциации мутаций в генах эпигенетической регуляции с другими молекулярно-генетическими событиями (в частности, мутациями генов *NPM1, NRAS/KRAS, NF-1, KMT2C/D, ROS1* и др.) подтверждают биологическую гетерогенность ОМЛ и непосредственный вклад нарушений эпигенетической регуляции в эволюцию заболевания. Продемонстрировано, что увеличение общего количества мутированных генов коррелирует со снижением частоты достижения ПР.

Доказана необходимость оценки мутационного статуса гена *DNMT3A* среди пациентов благоприятной группы генетического риска (ELN-2022), с нормальным кариотипом, мутацией *FLT3*-ITD и мутированным вариантом гена *NPM1*. В группе больных с благоприятными генетическими аномалиями определена целесообразность анализа мутационного статуса гена *ASXL1* в связи с ухудшением показателей ОВ при выявлении мутаций 12 экзона.

В случаях детекции мутаций в генах *IDH1/2* и *DNMT3A* продемонстрировано преимущество неинтенсивных режимов с включением венетоклакса над монотерапией гипометилирующими агентами или малыми дозами цитарабина (ГМА/МДЦ). Данный факт обуславливает необходимость оценки мутационного

статуса генов *IDH1/2* и *DNMT3A* перед выбором варианта низкоинтенсивного лечения в группе пациентов, которым невозможно проведение стандартных и/или интенсивных режимов химиотерапии.

Методология и методы исследования

Основой для проведения настоящего исследования и анализа полученных результатов являлись различные методы диагностики (морфологические, цитогенетические, молекулярно-генетические) и статистическая обработка данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации эпигенетических модификаторов являются частым биологическим феноменом при ОМЛ. Для пациентов с мутированным статусом генов эпигенетической регуляции характерны определенные лабораторно-гематологические изменения, а также отличительный цитогенетический и молекулярный профиль.

2. Для ОМЛ с мутациями в генах *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1* характерна молекулярная гетерогенность, которая проявляется множественными сопутствующими мутациями генов различных функциональных категорий. Увеличение общего числа мутированных генов отрицательно влияет на прогноз пациентов с впервые диагностированным ОМЛ.

3. Негативное прогностическое значение мутаций в генах эпигенетической регуляции может проявляться в определенных группах больных с впервые выявленным ОМЛ: мутации R882 гена *DNMT3A* – у пациентов благоприятной группы генетического риска, с нормальным кариотипом, мутированным статусом гена *NPM1* и мутацией *FLT3*-ITD, а мутации 12 экзона гена *ASXL1* – у пациентов с благоприятными генетическими аномалиями (ELN-2022).

4. Тройной мутационный статус (группа *«FND»* - мутация *FLT3*-ITD + мутированный тип гена *NPM1* + мутация R882 гена *DNMT3A*) ассоциирован с худшим прогнозом по сравнению с комбинацией только двух мутаций (в гене

NPM1 + *FLT3*-ITD).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов настоящего исследования определяется достаточным объемом выборки (147 пациентов) и её репрезентативностью, использованием высокочувствительных и достоверных методов лабораторного обследования (в том числе молекулярного анализа) и детальной статистической обработкой данных.

Основные теоретические и практические положения диссертационной работы представлены в виде устных и постерных докладов на следующих Всероссийских и Международных конференциях: «VI Конгресс гематологов России» (Москва, 2022), «VI Инновационный Петербургский Медицинский Форум» (Санкт-Петербург, 2023), «Дискуссионный клуб профессора А. Ю. Зарицкого» (Санкт-Петербург, 2022, 2023), «Острый миелоидный лейкоз: от простого к сложному» (Москва, 2023), «Генетика опухолей кроветворной системы – от диагностики к терапии» (Санкт-Петербург, 2023), «The XVIII International Symposium Acute Leukemias: Biology and Treatment Strategies» (Мюнхен, 2023), «Society of Hematologic Oncology» (Хьюстон, 2021, 2022, 2023), «IV Московская международная гематологическая школа» (Москва, 2024). Результаты исследования были также представлены в виде тезисов на следующих Всероссийских и Международных конференциях: «V Конгресс гематологов России» (Москва, 2020), «Актуальные проблемы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2021), «III Московская гематологическая школа молодых ученых и врачей» (Москва, 2023).

По теме диссертационного исследования опубликовано 20 печатных работ, из которых 6 – в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК и цитируемых в базе Scopus.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28. Гематология и переливание крови, а именно: п. 6 и п. 13.

Внедрение результатов исследования в практику

Положения настоящего исследования внедрены в практику лечебной работы отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний и трансплантации костного мозга №2 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и гематологического отделения ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко» (г. Улан-Удэ), а также в учебный процесс кафедры терапии ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» и кафедры факультетской терапии с клиникой лечебного факультета ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова».

Личное участие автора в исследовании

В ходе выполнения настоящего исследования автором был проведен анализ литературы, обнаружена высокая актуальность исследования, сформулирована цель и определены задачи. Диссертант непосредственно участвовал в организации логистики биоматериала, координации проведения диагностических процедур. Автором был выполнен сбор информации из медицинской документации пациентов, создана база данных. Автор самостоятельно выполнил статистический анализ и интерпретацию полученных результатов, на основании чего были сформулированы выводы и практические рекомендации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, библиографического списка. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 37 рисунков. Библиографический список включает 33 источника на русском языке и 183 источника на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нарушение регуляции эпигенетических процессов при ОМЛ

Анализ генетического профиля бластных клеток пациентов с ОМЛ, проведенный в рамках проекта «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas, TCGA), позволил выявить широкий спектр соматических мутаций, в том числе затрагивающих эпигенетические модификаторы [59]. При ОМЛ нарушения регуляции эпигенетических процессов, в частности метилирования ДНК и посттрансляционной модификации гистонов, приводят к аберрантной экспрессии генов, играющих ключевую роль в дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), репарации ДНК и регуляции апоптоза. Непосредственных изменений в нуклеотидных последовательностях целевых генов при этом не происходит [216].

Метилирование ДНК является важным механизмом онтогенеза, участвуя в геномном импритинге, инактивации Х-хромосомы, модификации хроматина и регуляции экспрессии генов, а аберрантные паттерны метилирования описаны при различных видах злокачественных новообразований [8, 161]. Процессы метилирования ДНК регулируются ферментами ДНК-метилтрансферазами (DNMT), а в регуляции деметилирования ведущая роль отводится метилцитозиновым диоксигеназам семейства TET [16]. Одними из ключевых аспектов патогенеза ОМЛ считаются процессы гиперметилирования генов-супрессоров опухолевого роста, приводящие к снижению уровня их экспрессии, и гипометилирования транскрипционных факторов и проонкогенов. Наиболее ранние исследования выявили глобальный гипометилированный фенотип при ОМЛ в рецидиве заболевания, предполагая, что потеря метилирования представляет собой дополнительный шаг в опухолевой прогрессии, ведущий к химиорезистентности [167]. Figueroa и соавт. в своей работе продемонстрировали, что различные генетические подтипы ОМЛ (с мутациями гена *NPM1*, inv(16), t(8;21), PML-RARa и т.д.) имеют специфический аберрантный профиль метилирования ДНК. Авторами также были обнаружены общие сигнатуры

метилирования, в частности гиперметилированными в большей части проанализированных образцов оказались гены *PDZD2* (опухолевый супрессор), *ZNF667, ZNF582, PIAS2, CDK8* (транскрипционные регуляторы), *TNPO3, IPO8* (рецепторы ядерного транспорта) [98]. Cecotka и Polanska в своем исследовании показали, что сайт инициации транскрипции TSS гиперметилирован в области генов, ответственных за апоптоз опухолевых клеток (*OXT, HTRA4, CRHBP* и других), и гипометилирован в области генов, играющих роль в выживании опухолевых клеток, ингибировании иммунного ответа и прогрессии МДС в ОМЛ (*TRPM2, ESPNL, CFD, CXCR3*) [63]. Гиперметилированными при ОМЛ часто оказываются гены *SOX7, p151NK4b, SFRP4,* являющиеся супрессорами опухолевого роста [6, 15].

Уровень экспрессии генов также определяется в ходе посттрансляционной модификации гистоновых белков, включающей в себя процессы ацетилирования, метилирования, фосфорилирования, убиквитинирования, сумоилирования и АДФ-рибозилирования их N/C-хвостовых остатков [48]. Доказано, что изменение активности гистон-модифицирующих белков (histone modifying proteines, HMP) вносит существенный вклад в патогенез ОМЛ [100]. В частности, устойчивые мутации или хромосомные транслокации, которые затрагивают гены, кодирующие ацетилтрансферазы гистонов (KAT) приводят к индукции лейкемической трансформации [128]. На мышиных моделях ОМЛ с t(8;21) было продемонстрировано, что аберрантное ацетилирование химерного белка AML1-ETO с помощью KAT3B (p300) инициирует самообновление лейкемических клеток, а ингибирование KAT3B приводило к увеличению медианы выживаемости мышей [202]. При нарушении функции DOTL1 (метилтрансфераза H3K79) наблюдается увеличение экспрессии ключевых пролейкемических генов – *HOXA* и *MEIS1* [127]. Ингибирование лизин специфичной деметилазы KDM1A, гиперэкспрессированной при ОМЛ, приводит к индукции клеточной дифференцировки и потери колонеобразующей способности опухолевых клеток [111]. Dijk и соавт. обнаружили корреляцию между повышенным уровнем

экспрессии HMP и более короткой медианой ОВ пациентов, как в общей когорте, так и в группах промежуточного и неблагоприятного генетического риска [86].

Существует взаимосвязь процессов модификации гистонов и метилирования ДНК. В исследовании Fuks и соавт. было продемонстрировано, что гистондеацетилаза 1 (HDAC1) способна связывать DNMT1, приводя к снижению её метилтрансферазной активности [102]. Фермент SUV39H1 (метилтрансфераза H3K9) также оказывает влияние на активность DNMT1 [103], а белок группы Polycomb EZH2, участвуя в образовании репрессивных комплексов Polycomb 2 и 3, способен связываться со всеми семействами DNMT и запускать метилирование генов-мишеней [198].

Вышеописанные аберрантные эпигенетические паттерны, возникающие при ОМЛ, напрямую или косвенно связаны с приобретением соматических мутаций, большая часть из которых обнаруживаются в генах, ответственных за метилирование ДНК (44%), модификацию хроматина (30%) и в генах комплекса Когезин (13%) (рисунок 1) [59]. При этом у пациентов старшего возраста, а также по мере прогрессирования заболевания, наблюдается увеличение бремени генетических мутаций и эпигенетических нарушений [131, 184]. Мутации в генах эпигенетической регуляции имеют доказанную роль в патогенезе миелопролиферативных новообразований, ассоциированы с неблагоприятным прогнозом и увеличением риска прогрессии в ОМЛ [17, 29].

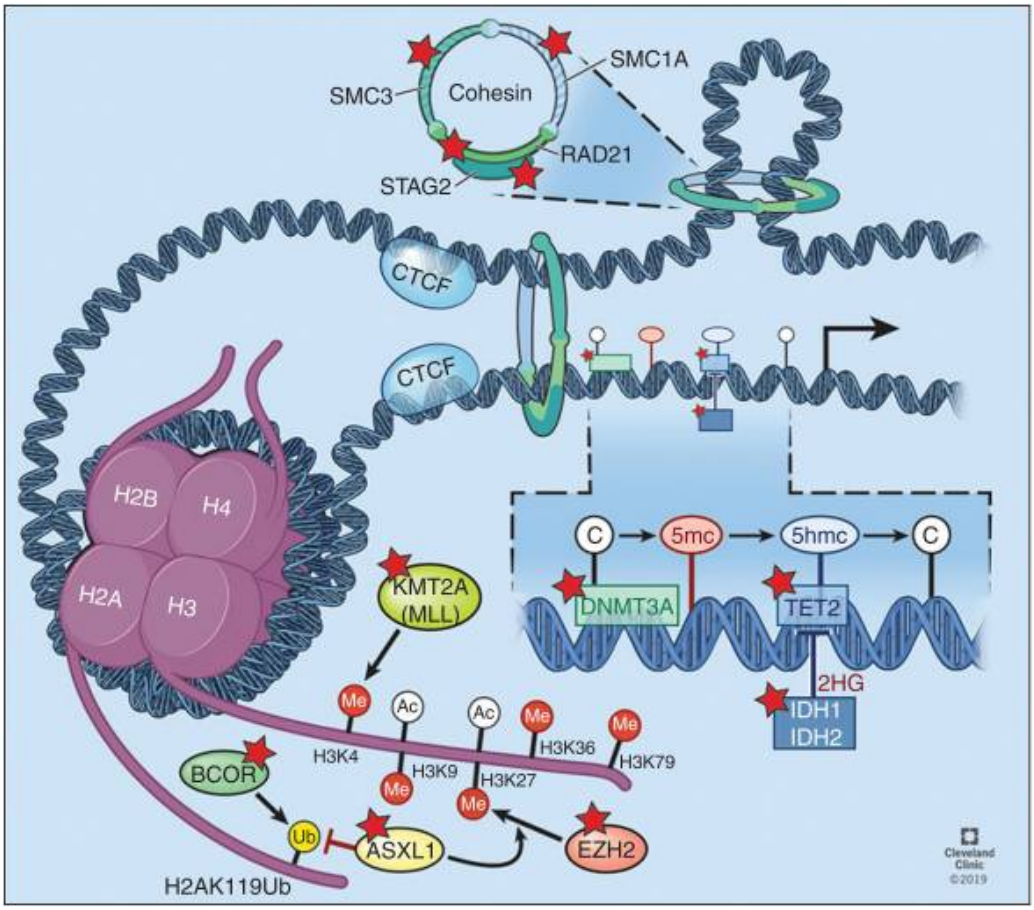

Рисунок 1 – Наиболее часто мутированные при ОМЛ гены-эпигенетические модификаторы, в частности, регулирующие процессы метилирования цитозина (*DNMT3A, TET2, IDH1/2*), посттрансляционной модификации гистонов (*ASXL1, BCOR/L1, MLL1 (KMT2A)*) и гены комплекса Когезин (*SMC1A, SMC3, RAD21,* связывающийся со *STAG1/2*). Подверженные мутациям гены помечены на рисунке красной звездой [122]

1.2 Клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом

Считается, что мутации в генах-эпигенетических модификаторах являются ранними событиями лейкозогенеза. Феномен экспансии ГСК с накопленными соматическими мутациями в отсутствие признаков гематологического заболевания носит название «клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом» (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) [26, 54]. Ключевым звеном в развитии CHIP является увеличение потенциала самообновления и пролиферации стволовой

клетки с одновременным замедлением скорости клеточной гибели, что становится возможным в ходе накопления специфических генных мутаций [54, 142, 213].

В 2012 году Busque и соавт., проанализировав когорту из 380 условно здоровых пожилых женщин, доказали более высокую частоту детекции мутаций в гене *TET2* у исследуемых старше 65 лет [57]. В дальнейшем Xie и соавт. изучили данные полноэкзомного секвенирования, проведенного в рамках проекта TCGA, и выявили ряд повторяющихся мутаций в 19 генах с доказанной ролью в патогенезе миелоидных и лимфоидных неоплазий (в частности, *DNMT3A, TET2, JAK2, ASXL1, TP53, SF3B1*) у пациентов без явных признаков гемобластоза. Аналогичные результаты были получены при анализе сопоставимой когорты условно здоровых доноров, при этом наблюдалась тенденция к увеличению частоты детекции мутаций с возрастом [206]. По данным исследования Genovese и соавт. частота соматических мутаций, ассоциированных с клональным гемопоэзом, достигает 10% в возрастной категории старше 65 лет, большая часть из которых возникает в генах *DNMT3A, ASXL1* и *TET2* [107]. Jaiswal и соавт. также продемонстрировали высокую частоту выявления клональных мутаций (преимущественно возникающих в генах *DNMT3A, ASXL1* и *TET2*) у лиц старшего возраста. Помимо прочего было обнаружено значительное увеличение риска гематологических неоплазий и тромботических событий в данной когорте исследуемых [118].

Дальнейшие исследования подтвердили ассоциацию CHIP с увеличением риска развития гематологических неоплазий, в частности ОМЛ. По результатам таргетного секвенирования образцов крови 95 пациентов, полученных за несколько лет до верификации ОМЛ, в 73,4% случаев были выявлены соматические мутации генов *DNMT3A, TET2, SRSF2, ASXL1, TP53, U2AF1, JAK2, IDH2* и других. При этом в случаях детекции мутаций генов *TP53* и *U2AF1* риск возникновения ОМЛ был наибольшим (Hazard Ratio (HR) 12,5 и 7,9, соответственно) [37]. Desai и соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что вероятность развития ОМЛ в 4,86 раз выше в случаях детекции соматических мутаций, ассоциированных с CHIP (медиана времени до верификации ОМЛ составила 9,6 месяцев). При выявлении у исследуемых мутаций генов *TP53, IDH1/2* развитие ОМЛ в дальнейшем

зарегистрировано в 100% случаев [83]. Повышенный риск возникновения ОМЛ имеют случаи CHIP с частотой вариантного аллеля (variant allele frequency, VAF) генных мутаций > 0,005-0,01, что было доказано в нескольких независимых исследованиях [37, 83, 213].

В исследовании Papaemmanuil и соавт., проведенном в 2016 году с включением 1540 пациентов с ОМЛ, также подтверждается эволюционный и ступенчатый характер лейкемической трансформации. Молекулярное профилирование опухолевых клеток позволило идентифицировать первично возникающие генетические аномалии – мутации в генах *DNMT3A, ASXL1, IDH1/2*. Развитие ОМЛ наблюдается при дальнейшем возникновении вторичных молекулярных событий, к которым отнесены мутации в гене *NPM1*, генах, кодирующих рецепторные киназы, и генах RAS-сигналинга [156].

Таким образом, обобщая результаты опубликованных к настоящему времени исследований, можно сделать вывод, что доминирующими в ландшафте CHIP генетическими аномалиями являются мутации, затрагивающие эпигенетические модификаторы: на долю мутаций в гене *DNMT3A* в среднем приходится 48,3% всех случаев CHIP, мутаций гена *TET2* – 15,5%, а *ASXL1* – 7,2% [26, 65]. Мутации генов *IDH1/2, ASXL1, EZH2, SRSF2* включены в стратификацию риска пациентов с первичным миелофиброзом, обуславливая худший прогноз и более высокий риск трансформации в ОМЛ [110]. Мутации генов эпигенетической регуляции считаются ранними событиями лейкозогенеза. Развитие гематологических неоплазий наблюдается у 0,5-1% пациентов с CHIP в год и обусловлено дальнейшим накоплением мутационного бремени (рисунок 2) [107, 118].

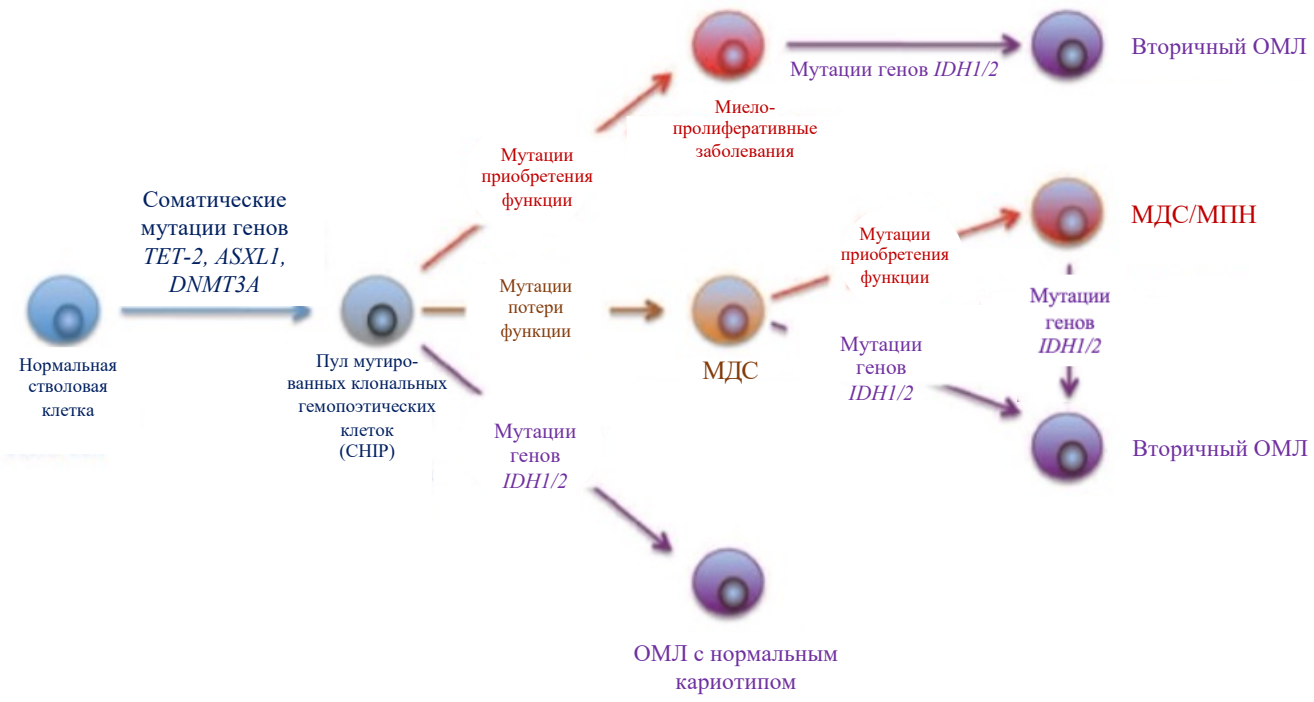

Рисунок 2 – Схематичное представление молекулярных основ злокачественных гематологических неоплазий и предполагаемая роль мутаций в генах эпигенетической регуляции [62]

1.3 Современные методы молекулярной диагностики: цифровая капельная ПЦР и секвенирование нового поколения

В связи с тем, что детекция генетических аномалий имеет высокое практическое значение, методы молекулярной диагностики активно переходят из научно-исследовательской сферы в клинические лаборатории. Последние достижения в области секвенирования сделали практически возможным одновременную оценку мутационного статуса большого количества генов.

В ходе молекулярно-генетического анализа с использованием методики *цифровой капельной полимеразной цепной реакции* (Droplet Digital PCR, ddPCR) происходит фракционирование исходной реакционной смеси на отдельные масляные капли (20000 капель при использовании платформы Bio-Rad QX100TM или QX200TM и до 5-10 миллионов капель при использовании высокочувствительной платформы RainDance (Raindrop) размером от нанолитра до пиколитра [196]. При аналитическом исследовании используется стандартная Taq-

полимераза для амплификации ДНК, однако в отличии от количественной ПЦР результат оценивается не в «режиме реального времени», а в «конечной точке» реакции, без использования стандартных кривых. Благодаря этому достигаются преимущества в прямой количественной оценке с возможностью проведения анализа в том числе на загрязненных образцах с низкой целевой концентрацией ДНК [188]. Метод ddPCR демонстрирует высокую чувствительность и специфичность при оценке однонуклеотидных вариантов (SNVs, single nucleotide variations), однонуклеотидных полиморфизмов, вариаций числа копий генов (CNVs, cope number variations), паттернов метилирования ДНК и активно используется в настоящее время для выявления генетических и эпигенетических аномалий при различных видах злокачественных новообразований [196]. Цифровая капельная ПЦР продемонстрировала свою эффективность в диагностике известных генетических аномалий при миелопролиферативных заболеваниях (*BCR-ABL,* мутации генов *CALR, JAK2, MPL*) и ОМЛ (мутации генов *NPM1, WT1, IDH1/2, CBF-AML, C-KIT*), а также при мониторинге МОБ, превосходя в некоторых случаях чувствительность RT-PCR [76]. Использование ddPCR с целью детекции мутаций в генах *IDH1/2* у пациентов с ОМЛ позволяет обнаруживать даже минорные клоны с мутированным типом гена и имеет преимущества в чувствительности перед секвенированием по Сэнгеру [166]. Также перспективным представляется использование ddPCR с целью мониторинга МОБ после алло-ТГСК, в том числе оценивая мутации в генах *DNMT3A, IDH1/2,* которые являются маркерами сохранения остаточного прелейкемического клона [55].

Секвенирование нового поколения (Next-Generation Sequencing, NGS) представляет собой высокопроизводительную технологию секвенирования, в ходе которой происходит параллельное считывание миллионов небольших фрагментов ДНК с последующим биоинформатическим анализом для объединения этих фрагментов путем сопоставления отдельных прочтений с эталонным геномом человека [22, 45]. NGS способно производить анализ по различным протоколам, включая полногеномное секвенирование, секвенирование всего экзона (22000 кодирующих генов), таргетное секвенирование, секвенирование РНК [186]. К

очевидным преимуществам NGS относят единый технический процесс при оценке большого количества генов, более низкие экономические затраты при пересчете на один ген, более высокую чувствительность (по сравнению с большинством, но не всеми молекулярными методами диагностиками), возможность проведения обширного анализа из небольшого образца клеток/ткани. Тем не менее, имеется ряд факторов, ограничивающих повсеместное использование NGS. К ним относятся технические сложности, необходимость закупок дорогостоящего оборудования и реактивов, относительно длительное время выполнения анализа (по сравнению с секвенированием по Сэнгеру или ПЦР), потребность в проведении специализированной экспертизы данных [212]. При ОМЛ метод NGS позволяет проводить оценку большого количества генов, таким образом, в рамках одного анализа возможно выявление прогностически значимых молекулярных аберраций (мутаций генов *NPM1, FLT3, TP53*), потенциальных терапевтических таргетов (мутаций генов *IDH1/2, FLT3*), мутаций, связанных с миелодисплазией (генов *ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2*), а также герминальных мутаций, ассоциированных с миелоидными новообразованиями с предиспозицией в зародышевой линии (генов *CEBPA, DDX41, RUNX1, ANKRD26, ETV6, GATA2, ELANE, G6PC3GFI1, HAX1, JAGN, TCRG1, VPS45A* и т.д.) [93]. Широкий спектр анализируемых генов открывает возможности более детального анализа молекулярного профиля каждого конкретного пациента и персонификации терапии [13, 20]. Кроме того, метод NGS становится привлекательным в аспекте мониторинга МОБ позволяя проводить сравнительную оценку всего генетического ландшафта, что делает его применимым у большинства пациентов с ОМЛ [199].

Однако несмотря на все преимущества, NGS не может рассматриваться как единственный молекулярный метод диагностики в связи с клинической необходимостью получения результата по мутационному статусу некоторых генов (*FLT3, IDH1/2*) в кратчайшие сроки для инициации таргетной терапии.

1.4 Соматические мутации генов *IDH1* и *IDH2*

Биологическая роль ферментов IDH в норме и при возникновении мутаций соответствующих генов. Семейство изоцитратдегидрогеназ (isocitrate dehydrogenase, IDH) включает в себя три изофермента – IDH1, IDH2 и IDH3. Цитозольная IDH1 и митохондриальная IDH2 являются ключевыми метаболическими гомодимерными ферментами, которые кодируются генами *IDH1* и *IDH2*, расположенными в участках хромосом 2q33 и 15q26, соответственно. Третий изофермент, IDH3, подобно IDH2 локализуется в митохондриях, но состоит из трех субъединиц, кодируемых генами *IDH3A, IDH3B* и *IDH3G* [82]. Ферменты IDHs имеют важное значение в поддержании гомеостаза, катализируя окислительное декарбоксилирование изоцитрата с дальнейшим его превращением в альфа-кетоглутарат (α-KG) в цикле трикарбоновых кислот. Каталитические реакции с участием IDH1/2 являются обратимыми, с IDH3 – необратимыми [173]. В качестве кофактора и акцептора электрона для IDH1 (в цитоплазме) и IDH2 (в митохондриях) выступает никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ, NADP), из которого в результате катализа изоцитрата образуется восстановленный NADPH, играющий ключевую роль в защите клетки от окислительного стресса за счет связывания глутатиона и тиоредоксинов [82]. Фермент IDH3 как кофактор использует никотинамидадениндинуклеотид (НАД, NAD) и в ходе окислительного декарбоксилирования изоцитрата из NAD образуется NADH. NADH в дальнейшем принимает участие в трангидрогеназной реакции, сопряженной с переносом протонов водорода в матрикс митохондрий и передаче их NADP с последующим выделением энергии [178]. Таким образом, за счет своих биологических функций ферменты IDHs напрямую или косвенно регулируют такие процессы, как митохондриальное окислительное фосфорилирование, метаболизм глутамина, чувствительность клеток к глюкозе, липогенез и клеточный окислительный стресс [39].

Впервые мутации в генах *IDH1/2* описаны при колоректальном раке [185], позже была продемонстрирована высокая частота детекции мутаций R132 в гене

IDH1 при мультиформной глиобластоме [158]. Yan и соавт. выявили, что мутированный вариант генов *IDH1/2* чаще встречается у молодых пациентов со вторичными глиомами и ассоциирован с лучшими показателями ОВ [210]. Было выявлено, что при глиомах мутации в гене *IDH2* выявляются гораздо реже, чем в гене *IDH1,* а оба гена не бывают мутированными одновременно [10]. В 2009 году Mardis и соавт., выполнив полногеномное секвенирование ДНК опухолевых клеток 188 образцов костного мозга пациентов с ОМЛ, впервые описали высокую частоту детекции мутации R132 в гене *IDH1*, которая превалировала среди пациентов с нормальным кариотипом и промежуточной группы генетического риска [140].

Подавляющее большинство миссенс-мутаций затрагивают остаток аргинина в активном центре фермента. Остатки, заменяющие аргинин (R), разнообразны: гистидин (H), серин (S), цистеин (C), глицин (G), лейцин (L), что позволяет предположить, что именно замена аргинина, а не варианты альтернативных аминокислот, играет решающую роль в канцерогенезе [171]. В гене *IDH1* мутации детектируется в кодоне 132 экзона 4, в гене *IDH2* – в кодоне 172 или 140 экзона 4 [77]. Соматические мутации в генах *IDH1* и *IDH2* гетерозиготны, в результате чего сохраняется белковый продукт дикого типа, необходимый для нормального клеточного метаболизма, а мутированный аллель приводит к синтезу альтернативного фермента [203]. Неоморфная энзиматическая активность мутантного фермента проявляется в ингибировании нормального окислительного декарбоксилирования и активации NADP-зависимого синтеза онкометаболита 2-гидроксиглутарата (2-HG) из α-KG [77]. Высокие уровни 2-HG при мутациях в генах *IDH1/2* у пациентов с ОМЛ были задокументированы несколькими независимыми исследовательскими группами [41, 97, 109], что позволяет рассматривать его в качестве потенциального метаболического биомаркера [109].

Активно изучаются механизмы канцерогенеза при мутациях в генах *IDH1/2*. Ключевым аспектом является снижение концентрации α-KG и накопление 2-HG, как было упомянуто выше. По своему строению 2-HG является структурным аналогом α-КГ и отличается от него заменой кетогруппы в α-положении кислоты на гидроксильную группу, тем самым приобретая способность выступать в

качестве конкурентного субстрата для α-KG-зависимых ферментов [99]. Так, 2-HG ингибирует лизин-специфичные гистоновые деметилазы (в частности JMJD2A) и гидроксилазы семейства TET, которые катализируют конверсию 5-метилцитозина (5mC) в 5-гидрокси-метилцитозин (5-OH-mC), приводя к нарушению регуляции процессов деметилирования гистонов и ДНК [75, 208]. Проанализировав профиль метилирования ДНК пациентов с впервые выявленным ОМЛ, Figueroa и соавт. выявили тенденцию к глобальному гиперметилированному фенотипу в случаях детекции мутаций в генах *IDH1/2* и *TET2*. Более 93% генов, аберрантно экспрессирующихся при мутированном варианте α-KG-зависимого фермента TET2, были также аберрантно экспрессированы при мутациях в генах *IDH1/2*. Гиперметилированными при мутациях генов *IDH1/2* в частности становятся ДНК-связывающие участки для GATA1/GATA2 и EVI1 – транскрипционных факторов, необходимых для нормальной миелоидной дифференцировки. В связи с пересекающимися биологическими эффектами, мутации в генах *IDH1, IDH2* и *TET2* являются взаимоисключающими [99]. Аберрантная экспрессия других генов-транскрипционных факторов (*PU.1, RUNX1* и, особенно, *CEBPα*) и гиперэкспрессия генов кластера *HOXA* и *HOXB* также способствует увеличению потенциала самообновления опухолевых клеток и блоку дифференцировки [151]. Chaturvedi и соавт. на мышиных моделях продемонстрировали, что мутированный тип гена *IDH1* в гемопоэтических предшественниках приводит к ускорению клеточного деления путем репрессии CDKN2A/B и активации MAPK-сигналинга, способствуя индукции лейкозогенеза [68].

Ингибирование деметилазы KDM4C высокими концентрациями 2-HG приводит к блоку дифференцировки адипоцитов с мутированным статусом гена *IDH2* in vitro [134]. Клеточная линия TF-1, продуцируя R-энантиомер 2-HG, приобретает способность к независимой от уровня цитокинов пролиферации с нарушением дифференцировки [133]. Доказано, что R-2-HG ингибирует активность цитохром-С-оксидазы в митохондриальной электрон-транспортной цепи, что делает мутированные клетки более восприимчивыми к bcl-2 зависимому пути апоптоза [67]. Кроме того, 2-HG оказывает паракринный эффект, активируя

сигнальный путь NF-kB в стромальных клетках по ERK-зависимому пути, что приводит к увеличению секреции IL-6, IL-8 и C5 и способствует пролиферации опухолевых клеток. За счет повышения уровня EAM-1 и CXCR4 наблюдается усиление контакта бластных клеток со стромальной нишей и ускользание их от апоптоза, индуцируемого цитостатической химиотерапией [69]. Само по себе снижение концентрации α-KG, участвующего в гидроксилировании белка HIF-1α, опосредованно приводит к нарушениям регуляции одноименного сигнального пути, накоплению транскрипционного фактора HIF-1α и индукции ангиогенеза, что способствует опухолевой прогрессии при глиомах [215] (рисунок 3).

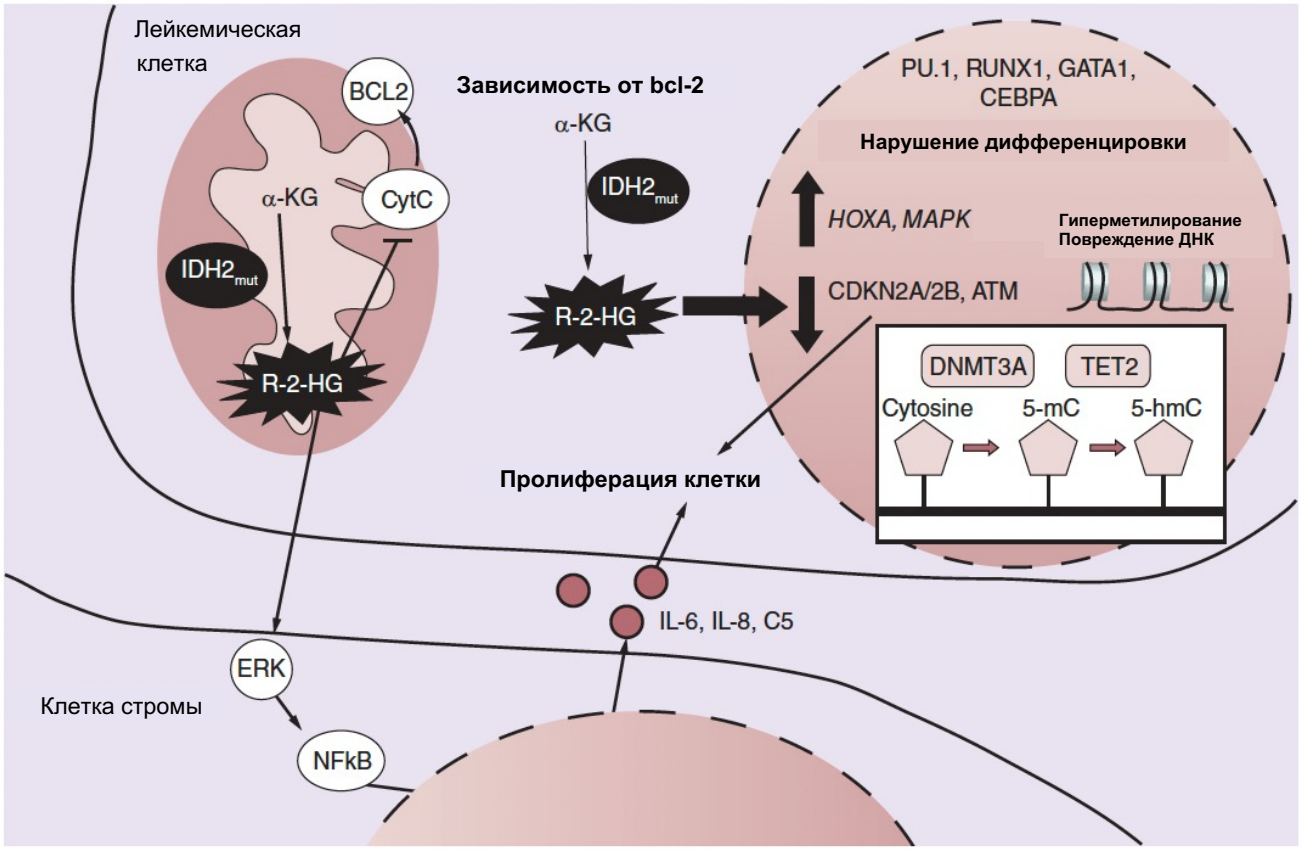

Рисунок 3 – Мутации генов *IDH1/2* при ОМЛ и роль мутированных форм одноименных ферментов в лейкозогенезе [151]

Особенности ОМЛ с мутированным типом генов IDH1/2. С момента первого описания устойчиво выявляемых соматических мутаций в генах *IDH1/2* при ОМЛ [140] было инициировано большое количество исследований, оценивающих частоту их детекции и влияние на прогноз пациентов. Средняя частота детекции

мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* в общей когорте пациентов с впервые выявленным ОМЛ по данным разных исследовательских групп составляет 7,3% и 9,7%, соответственно [171]. Следует отметить, что в группе педиатрических пациентов (моложе 18 лет) мутированный статус генов *IDH1* и *IDH2* встречается значительно реже и частота детекции мутаций в данных генах не превышает 1,7% и 2,2%, соответственно [41, 80]. Ассоциация мутаций генов *IDH1/2* с пожилым возрастом была продемонстрирована во многих независимых исследованиях [87, 135, 214]. По данным исследования DiNardo и соавт., для пациентов с детектируемыми мутациями генов *IDH1/2* характерна более высокая медиана уровня тромбоцитов и бластных клеток в костном мозге и периферической крови, а также более глубокая степень нейтропении по сравнению с когортой с диким типом генов [87]. В исследовании Пеховой и соавт. отмечена тенденция к лейкоцитозу у пациентов промежуточной группы генетического риска при одновременном выявлении мутаций генов эпигенетических факторов (*IDH1/2, DNMT3A, TET2)* с мутациями генов *FLT3, NPM1* или *CEBPA* ($p < 0{,}0001$) [27]. В то же время исследование Patel и соавт. продемонстрировало отсутствие отличительных клинико-лабораторных характеристик ОМЛ с мутациями генов *IDH1/2* [163].

Во многих исследованиях продемонстрировано, что мутированный тип генов *IDH1/2* значительно чаще выявляется среди пациентов с нормальным кариотипом [80, 140, 171, 214], изолированной трисомией 8 хромосомы [74] и промежуточной группы генетического риска [87, 96, 209]. Кроме того, известна ассоциация мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* с мутированным статусом генов *NPM1, ASXL1* и *DNMT3A*, а также мутацией *FLT3*-ITD [59, 88, 132, 135, 159, 163, 214]. До 26% пациентов с мутацией *FLT3*-ITD несут сопутствующие мутации в генах *IDH1/2*, причем в данной когорте также выше и частота определения мутированного статуса гена *NPM1* (65% против 48%, $p=0{,}04$) [50].

Особенностью мутаций в генах *IDH1/2* при ОМЛ является их персистенция на протяжении всего течения заболевания. Приобретение данных мутаций является ранним событием лейкозогенеза, а клоны с мутированным типом генов *IDH1/2* сохраняются после проведения химиотерапии и определяются в рецидиве

заболевания [78, 151, 183]. По данным исследования Ok и соавт. персистенция мутаций в генах *IDH1/2* на фоне сохранения ПР является предиктором развития рецидива в дальнейшем (59% в случаях с обнаруживаемыми мутациями генов *IDH1/2* против 24% при их отсутствии, p<0,01) [153]. Известна ассоциация мутаций в генах *IDH1/2* с клональными цитопениями неопределенного значения [137] и с CHIP, как было описано ранее. Мутированный статус генов *IDH1/2* играет доказанную роль в прогрессии МДС в ОМЛ [88].

Влияние мутаций в генах *IDH1/2* на прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ в настоящий момент однозначно не определено, а имеющиеся литературные данные расходятся в зависимости от исследуемых групп пациентов и профиля сопутствующих генетических аномалий. В наиболее крупном ретроспективном исследовании Zarnegar-Lumley и соавт. при анализе общей когорты из 3141 пациента значимых различий в зависимости от мутационного статуса генов *IDH1/2* в показателях ОВ и БСВ выявлено не было. Тем не менее, наблюдалось улучшение прогноза в группе пациентов с мутациями генов *IDH1/2* при детекции сопутствующих мутаций гена *NPM1*: показатели 5-летней БСВ составили 55,1% против 17% (p<0,001), ОВ – 66,5% против 35,2% (p<0.001) [214]. Аналогичные данные получены при анализе группы больных промежуточного цитогенетического риска в исследовании Patel и соавт. – при отсутствии мутации *FLT3*-ITD наилучшие показатели ОВ были характерны для пациентов с мутированным типом гена *NPM1* в сочетании с мутациями генов *IDH1/2* [162]. Однако имеются работы с абсолютно противоположными результатами. Так, в исследовании Marcucci и соавт. выявлено, что пациенты с мутациями гена *NPM1* без мутации *FLT3*-ITD имели худшие показатели БРВ в случаях детекции сопутствующих мутаций гена *IDH1*, а мутированный вариант гена *IDH2* ассоциировался со снижением частоты достижения ПР в общей когорте пациентов [139]. Аналогично, по данным исследования Paschka и соавт., негативное прогностическое влияние мутаций в генах *IDH1/2* проявлялось в группе пациентов с мутированным статусом гена *NPM1* при отсутствии мутации *FLT3*-ITD: показатели 5-летней БРВ составили 37% в случае детекции мутаций против 67% у

пациентов с диким типом генов *IDH1/2* (p=0,02), а 5-летней ОВ – 41% против 65%, соответственно (p=0,03) [159]. Boissel и соавт. продемонстрировали схожие данные о негативном влиянии на показатели ОВ и КЧР мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*, но уже в когорте пациентов с нормальным кариотипом [51]. А в исследовании Abbas и соавт. было выявлено статистически значимое снижение показателей как ОВ, так и БСВ в группе больных с диким типом гена *NPM1* и отсутствием мутации *FLT3*-ITD при детекции сопутствующих мутаций гена *IDH1* [34].

В нескольких независимых исследованиях отмечено благоприятное прогностическое значение мутированного статуса гена *IDH2*, но не *IDH1*. Chou и соавт. в своей работе продемонстрировали улучшение показателей ОВ в случае детекции мутаций гена *IDH2*, как в общей когорте 309 взрослых пациентов с впервые выявленным ОМЛ, получивших стандартные режимы химиотерапии, так и в группах больных с нормальным кариотипом и промежуточным генетическим риском. Независимое прогностическое значение на ОВ мутированного статуса гена *IDH2* было подтверждено также в многофакторном анализе (HR 0,311; [95% ДИ 0,142–0,680], p=0,003), с учетом возможного влияния данных цитогенетического исследования, мутаций в генах *NPM1, RUNX1, WT1, CEBPA* и возраста. Наилучшие показатели ОВ имела когорта пациентов с мутированным статусом гена *IDH2* в сочетании с отсутствием мутации *FLT3*-ITD (медиана ОВ не была достигнута, p=0,003) [74]. Благоприятное влияние на показатели ОВ как в целом всех мутаций гена *IDH2* (медиана 49,4 мес. против 16,3 мес., p=0,01), так и мутации R140 в частности (медиана не достигнута против 16,6 мес., p=0,009) в общей когорте 398 пациентов с ОМЛ, получивших стандартные режимы терапии, выявлено также в исследовании Patel и соавт. [162]. Мета-анализ Xu и соавт. (2017) выявил улучшение показателей ОВ в группе пациентов с мутациями гене *IDH2*, а мутированный статус гена *IDH1*, напротив, имел негативное влияние на прогноз [207]. Исследование Middeke и соавт. на обширной когорте из 4390 пациентов с впервые выявленным ОМЛ также подчеркивает принципиальные различия в биологии и прогнозе различных вариантов мутаций генов *IDH1* и *IDH2*. Так, для пациентов с мутациями R132C гена *IDH1* характерны старший возраст, редкая

частота ассоциации с мутациями в генах *NPM1* и *FLT3* (мутация ITD) (по сравнению с мутацией R132H) и худший прогноз (частота достижения ПР 62% [95% CI 54-69] против 73% [95% CI 72-75] в группе с диким типом генов *IDH1/2*, p=0,003). В то же время мутации R172 гена *IDH2* улучшают показатели ОВ среди пациентов промежуточной и неблагоприятной групп генетического риска (ОР 0,72; [95% ДИ 0,56-0,93], p=0,012) [150].

В исследовании Green и соавт. подчеркиваются принципиальные различия в клинических характеристиках и прогнозе пациентов с различными вариантами мутаций гена *IDH2*: благоприятное влияние на показатели ОВ и КЧР имела только мутация R140, для которой также было характерно более частое сочетание с другими молекулярными аномалиями, в частности с мутациями гена *NPM1* [108].

Напротив, в работе Thol и соавт. продемонстрировано отсутствие какого-либо влияния мутаций гена *IDH2* (как в изолированном варианте, так и в сочетании с мутациями гена *IDH1*) на прогноз пациентов с нормальным кариотипом [192]. Нейтральное влияние мутированного варианта генов *IDH1/2* на показатели прогноза больных с впервые выявленным ОМЛ также продемонстрировано в исследовании DiNardo и соавт. [87], Chotirat и соавт. [71] и Koszarska и соавт. [125].

Таким образом, учитывая противоречивые литературные данные, вопрос независимой прогностической значимости мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* на сегодняшний день остается открытым.

1.5 Соматические мутации гена *DNMT3A*

Функционирование ферментов DNMT в норме и биологическая роль мутаций гена DNMT3A. Метилирование динуклеотидов CpG является ключевым механизмов эпигенетической модификации ДНК и катализируется семейством ДНК-метилтрансфераз (DNA methyltransferase, DNMT): DNMT1, DNMT3A и DNMT3B. Фермент DNMT3A, наряду с DNMT3B, участвует в метилировании de novo, в то время как DNMT1 поддерживает уже существующие паттерны метилирования, связываясь с полуметилированными участками ДНК и копируя

метильные метки в реплицирующуюся нить [154]. В экспериментальных моделях было продемонстрировано, что отсутствие фермента DNMT3A приводит к нарушению процессов дифференцировки ГСК при сохранении их способности к аккумуляции [66].

Ген *DNMT3A* расположен на коротком плече 2 хромосомы (2p23) и содержит три домена: PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro), ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) и MT (метилтрансферазный домен). Домен PWWP связывается с триметилированным гистоном H3 по лизину 36 (H3K36me3), маркирующим активный хроматин. ADD домен активно участвует в процессе аутоингибирования DNMT3A путем взаимодействия с H3K4me3, который маркирует активно экспрессирующиеся участки генома. Кроме того, с ADD доменом прямо или косвенно взаимодействуют другие ферменты, участвующие в эпигенетической регуляции (такие как HP1, HDAC1, UHRF1, EZH2, SUV39H1/2, SETDB1, G9a), в результате чего формируется взаимосвязь между процессами модификации хроматина и гистонов. И, наконец, MT домен связывается с неметилированными участками ДНК, олигомеризуясь и запуская процессы метилирования de novo [56, 197].

Большинство мутаций в гене *DNMT3A*, описанных при гематологических новообразованиях, затрагивают его MT домен [30, 176, 204]. При ОМЛ более половины всех мутаций гена *DNMT3A* являются гетерозиготными миссенс-мутациями в 882 кодоне с заменой аргинина на другую аминокислоту, чаще всего на гистидин (R882H) [59, 204]. Реже выявляются нонсенс мутации, мутации сдвига рамки считывания и сайтов сплайсинга (не-R882, non-R882), затрагивающие другие транскрибируемые участки гена *DNMT3A* [64, 130]. Также описано одновременное обнаружение нескольких вариантов мутаций [141, 174].

Мутация R882 в гене *DNMT3A* доминантно ингибирует экспрессию *DNMT3A* дикого типа за счет нарушения образования активных тетрамеров, снижая метилтрансферазную активность de novo и приводя к фокальному гипометилированию специфических CpG участков на всем протяжении генома бластных клеток. Также гипометилированный фенотип объясняется непосредственной гаплонедостаточностью DNMT3A на фоне гетерозиготной

миссенс-мутации R882 [177]. Тем не менее, глобальные уровни метилирования ДНК у пациентов с мутациями гена *DNMT3A* остаются неизмененными. Это объясняется тем, что наблюдаемые при мутациях R882 нарушения процессов образования димеров и тетрамеров DNMT3A приводят к синтезу функционально активного фермента, но с измененными каталитическими свойствами [114]. Исследование Rui Lu и соавт. также выявило активацию процессов ацетилирования гистона H3K27 при мутации R882, что вносит дополнительный вклад в нарушение эпигенетической регуляции [136]. В результате возникающих аномальных паттернов метилирования наблюдаются нарушения транскрипции генов, ответственных за дифференцировку и самообновление нормальных и лейкемических ГСК. В экспериментальных моделях выявлено повышение экспрессии генов кластера *HOXA, Meis1* и *Mn1*, играющих роль в лейкемогенезе и прогрессии ОМЛ [136]. В своем исследовании Yan и соавт. выявили тенденцию к гипометилированию с последующим повышением экспрессии генов кластера *HOXB* при возникновении мутаций гена *DNMT3A* [211]. В *DNMT3A*-нокаутных ГСК обнаруживаются гипометилированные локусы таких генов, как *Runx1, Erg, Myc, Smad3*, а обычно экспрессируемые здоровыми ГСК гены оказываются гиперметилированными [115].

Стоит также отметить, что у трансплантированных *DNMT3A*-нокаутными ГСК мышей, хотя и изменялись паттерны метилирования ДНК, развития миелоидных или лимфоидных неоплазий не наблюдалось. Лейкемической трансформации способствует приобретение дополнительных генных аномалий, в частности мутаций генов *KRAS, NRAS*, *NOTCH1*, мутации *FLT3*-ITD [47]. Исследование Mayle и соавт., в котором проводилось длительное (до одного года) наблюдение за мышами, трансплантированными *DNMT3A*-нокаутными ГСК, также подтвердило, что потеря нормальной энзиматической активности DNMT предопределяет повышенный риск развития гематологического заболевания в дальнейшем, однако критически-важным является факт накопления дополнительных молекулярных альтераций [144]. Исходя из всего вышеописанного очевидно, что мутации гена *DNMT3A* являются ранними

событиями лейкозогенеза и характеризуют прелейкемический клон. Ассоциация мутаций в гене *DNMT3A* с CHIP и роль дополнительных молекулярных событий, способствующих дальнейшей опухолевой эволюции, подробно описаны в соответствующей главе.

Однако несмотря на доказанный в доклинических исследованиях вклад мутаций гена *DNMT3A* в процесс лейкозогенеза, фундаментальные механизмы, обеспечивающие преимущества лейкемическим ГСК с мутированным статусом гена *DNMT3A* в выживаемости остаются до конца не ясными.

Мутации гена DNMT3A при ОМЛ. Частота детекции мутаций в гене *DNMT3A* при впервые выявленном ОМЛ по данным разных исследований в среднем составляет 17-23%, с преобладанием в группах пациентов с нормальным кариотипом и старшего возраста [104, 204]. Известно, что мутированный статус гена *DNMT3A* также чаще детектируется среди пациентов промежуточного генетического риска [130, 157, 174, 191]. Распространено сочетание мутаций гена *DNMT3A* другими молекулярными аномалиями, в частности мутациями генов *FLT3*, *NPM1* и *IDH1/2*. У 60-80% пациентов с мутациями в гене *DNMT3A* обнаруживаются сопутствующие мутации гена *NPM1*, а примерно у 30% выявляется комбинация трех мутаций – *FLT3*-ITD в сочетании с мутированным статусом генов *DNMT3A* и *NPM1* [56, 104, 105, 204]. Мутированный статус генов *IDH1* или *IDH2* детектируется у 29% пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутацией R882 в гене *DNMT3A* [194]. В исследовании Gaidzik и соавт. подчеркивается, что данные особенности молекулярного профиля и высокая частота кооперации с мутациями в гене *NPM1* и мутацией *FLT3*-ITD характерны исключительно для мутации R882 (частота сочетания с мутациями в гене *NPM1* составила 72,1% для мутации R882 против 49,2% для не-R882 мутаций ($p<0,00001$), с мутацией *FLT3*-ITD – 38,2% против 26,7% ($p=0,04$), соответственно) [104].

Несколькими исследованиями отмечена тенденция к более высокому уровню лейкоцитов и тромбоцитов в дебюте заболевания у пациентов с мутациями гена *DNMT3A*, а также высокая распространенность данных мутаций при

миеломонобластном (M4) и монобластном (M5) морфологических вариантах ОМЛ (FAB) [130, 138, 141, 174, 191, 211].

Исследования, оценивающие прогностическую роль мутированного статуса гена *DNMT3A* при впервые выявленном ОМЛ, демонстрируют разнонаправленные результаты. Большинство из них описывают негативное влияние мутаций гена *DNMT3A* на показатели прогноза пациентов, однако есть данные и об отсутствии какого-либо прогностического значения. Так, по данным анализа, проведенного в рамках проекта TCGA, мутации в гене *DNMT3A*, детектируемые в 26% случаев (n=21), не оказывали статистически значимого влияния на прогноз пациентов [59]. Fried и соавт. получили аналогичные результаты при анализе когорты пациентов со вторичным ОМЛ (n=37) и ОМЛ после предшествующей химиотерапии (n=61) [101]. В опубликованном исследовании рабочей группы по изучению ОМЛ (AMLSG) с включением 1770 пациентов моложе 60 лет также не было выявлено статистически достоверной зависимости прогноза больных (как в общей когорте, так и при анализе группы с нормальным кариотипом) от мутационного статуса гена *DNMT3A* [104].

Напротив, работа Yan и соавт., посвященная исследованию мутационного профиля пациентов с M5 морфологическим вариантом ОМЛ (FAB), демонстрирует высокую частоту детекции мутаций в гене *DNMT3A* (20,5%) и ухудшение показателей ОВ в данной когорте больных (медиана ОВ 7 мес. против 19,5 мес. в группе с диким типом гена, p=0,004) [211].

Bezerra и соавт. выявили, что мутационный статус гена *DNMT3A* является независимым негативным прогностическим фактором в аспекте ОВ (HR 1,4; [95% ДИ 1,01-2,1], p=0,04; 5-летняя ОВ 9% [95% ДИ 3-18] против 22% [95% ДИ 17-27], p=0,0035). Показатель КЧР составил 72% (95% ДИ 58-86) среди пациентов с мутациями гена *DNMT3A* против 50% (95% ДИ 42-57) у пациентов с диким типом этого гена (p<0,0001) [49]. В анализе Ley и соавт. обнаружено неблагоприятное влияние мутированного статуса гена *DNMT3A* на показатели ОВ как в общей когорте (медиана 12,3 мес. против 41,1 мес., p<0,001), так и в разных подгруппах пациентов: с нормальным кариотипом (p=0,007), мутацией *FLT3*-ITD (p<0,001),

промежуточной группы генетического риска (p=0,006) и мутациями гена *NPM1* (p=0,0241) [130]. Аналогичные данные представлены в исследовании Thol и соавт., в которое было включено 489 пациентов с впервые выявленным ОМЛ моложе 60 лет. Несмотря на отсутствие достоверного влияния на БРВ и частоту достижения ПР, мутации в гене *DNMT3A* являлись независимым неблагоприятным фактором при анализе ОВ (HR 1,59; [95% ДИ 1,15-2,21], p=0,005) в общей когорте пациентов. В группе больных с нормальным кариотипом, где частота детекции мутаций гена *DNMT3A* составила 27,2%, также отмечалось её негативное влияние на частоту достижения ПР (HR 0,42; [95% ДИ 0,21-0,84], p=0,015) и ОВ (HR 2,46; [95% ДИ 1,58-3,83], p<0,001) [191]. Интересно, что в исследовании Patel и соавт. неблагоприятная роль мутированного статуса гена *DNMT3A* проявлялась только в группе пациентов с мутацией *FLT3*-ITD [162].

Таким образом, с учетом вышеописанного, крайне важное значение имеет не столько изолированное влияние мутационного статуса генов на прогноз, сколько индивидуальные особенности молекулярного профиля пациента и сочетания различных мутаций друг с другом. Данный факт подчеркивается в исследовании Torabi и соавт., в котором была оценена прогностическая роль мутации в гене *DNMT3A* на наиболее обширной когорте из 3142 пациентов с ОМЛ разных возрастных групп. Показатель 5-летней ОВ больных с мутированным статусом гена *DNMT3A* напрямую зависел от спектра сопутствующих мутаций: наиболее благоприятным оказалось сочетание с мутациями гена *NPM1* или с одновременной детекцией мутаций в генах *NPM1* и *IDH1/2* (54,2% и 62,9%, соответственно, p<0,0001). Сочетание с мутацией *FLT3*-ITD приводило к ухудшению прогноза: показатель 5-летней ОВ в группе *DNMT3A+IDH1/2+FLT3*-ITD составил 13,7%, а в группе *DNMT3A+FLT3*-ITD – 13,9% [194]. В работе Dunlap и соавт. худший прогноз отмечен в когорте больных с комбинацией трех мутаций – в генах *DNMT3A*, *NPM1* и *IDH1/2* (по сравнению с пациентами с мутациями только в одном гене): показатель 5-летней ОВ составил 30% [94].

В исследовании Marcucci и соавт. отмечаются различия во влиянии на показатели прогноза мутированного варианта гена *DNMT3A* в зависимости от типа

выявляемой мутации и возраста пациентов. Так, пациенты старшей возрастной группы имели худшие показатели 3-летней БРВ и 3-летней ОВ (3% против 21%, p=0,006 и 4% против 24%, p=0,01, соответственно) в случаях обнаружения мутации R882. В то же время в группе больных моложе 60 лет статистически значимое негативное значение имели лишь не-R882 мутации (3-летняя БРВ 20% против 49%, p=0,007), а мутация R882 не несла какой-либо прогностической роли [138]. Отличные результаты приводятся в исследовании Ribeiro и соавт.: среди пациентов моложе 60 лет ухудшение показателей ОВ и БРВ наблюдалось в случаях детекции как в целом любых мутаций гена *DNMT3A* (ОВ – HR 1,38; [95% ДИ 1,04-1,81], p=0,022; БРВ – HR 1,52; [95% ДИ 1,13-2,05], p=0,005), так и мутации R882 в частности (ОВ – HR 1,49; [95% ДИ 1,07-2,07], p=0,018; БРВ – HR 1,5; [95% ДИ 1,04-2,15], p=0,029) [174].

Таким образом, исходя из анализа литературы, можно сделать вывод, что в настоящий момент значение мутированного статуса гена *DNMT3A* при впервые выявленном ОМЛ однозначно не определено. Влияние мутаций гена *DNMT3A* на прогноз может варьироваться в зависимости от многих факторов, в частности от выявляемых сопутствующих генетических поломок, варианта возникающей мутации, характера проводимой терапии и возраста пациентов.

1.6 Соматические мутации в гене *ASXL1*

Биологическая роль белка ASXL1 в норме и при возникновении мутаций соответствующего гена. Ген *ASXL1* (additional sex combs-like 1) располагается на длинном плече 20-й хромосомы (20q11.21) и кодирует один из трех гомологичных белков семейства ASXL, функционирующих в качестве эпигенетических модификаторов. Первоначально гены группы *Asx* были идентифицированы у дрозофил в качестве энхансеров генов комплекса Trithorax (TrxG) и Polycomb (PcG) [148]. С появлением данных о высокой частоте обнаружения соматических мутаций гена *ASXL1*, характеризующих неблагоприятный прогноз, при различных видах злокачественных новообразований (в большей степени при

гематологических неоплазиях), было инициировано множество исследований в области патогенетических аспектов функционирования гена *ASXL1* дикого и мутированного типов.

Одними из важнейших механизмом регуляции экспрессии генов являются процессы модификации гистонов, в частности их убиквитинирование и деубиквитинирование [9]. В норме белок ASXL1, взаимодействуя с BAP1 (BRCA-ассоциированный белок 1) через свой ASXH домен и образуя репрессивный деубиквитиназный комплекс Polycomb (PR-DUB), выступает кофактором в реакциях деубиквитинирования гистона H2AK119Ub. Репрессивные комплексы Polycomb 1 (Polycomb repressive complex 1, PRC1), основным компонентом которыъ является E3-лигаза RING1A/RING1B, напротив, участвуют в реакциях убиквитинирования (Ub) гистона H2AK119, приводящих к угнетению экспрессии генов-мишеней для PRC1, в частности генов кластера *HOX* [152, 179]. Мутантный ASXL1 способен не только связываться с BAP1, но и усиливать его каталитическую функцию, в результате чего образуется гиперактивный PR-DUB. Усиление активности PR-DUB приводит к снижению глобального уровня H2AK119Ub в ГСК и нарушению регуляции экспрессии генов, ответственных за их дифференцировку, в частности *HOXA* и *IRF8,* создавая основу для лейкемической трансформации [43] (рисунок 4).

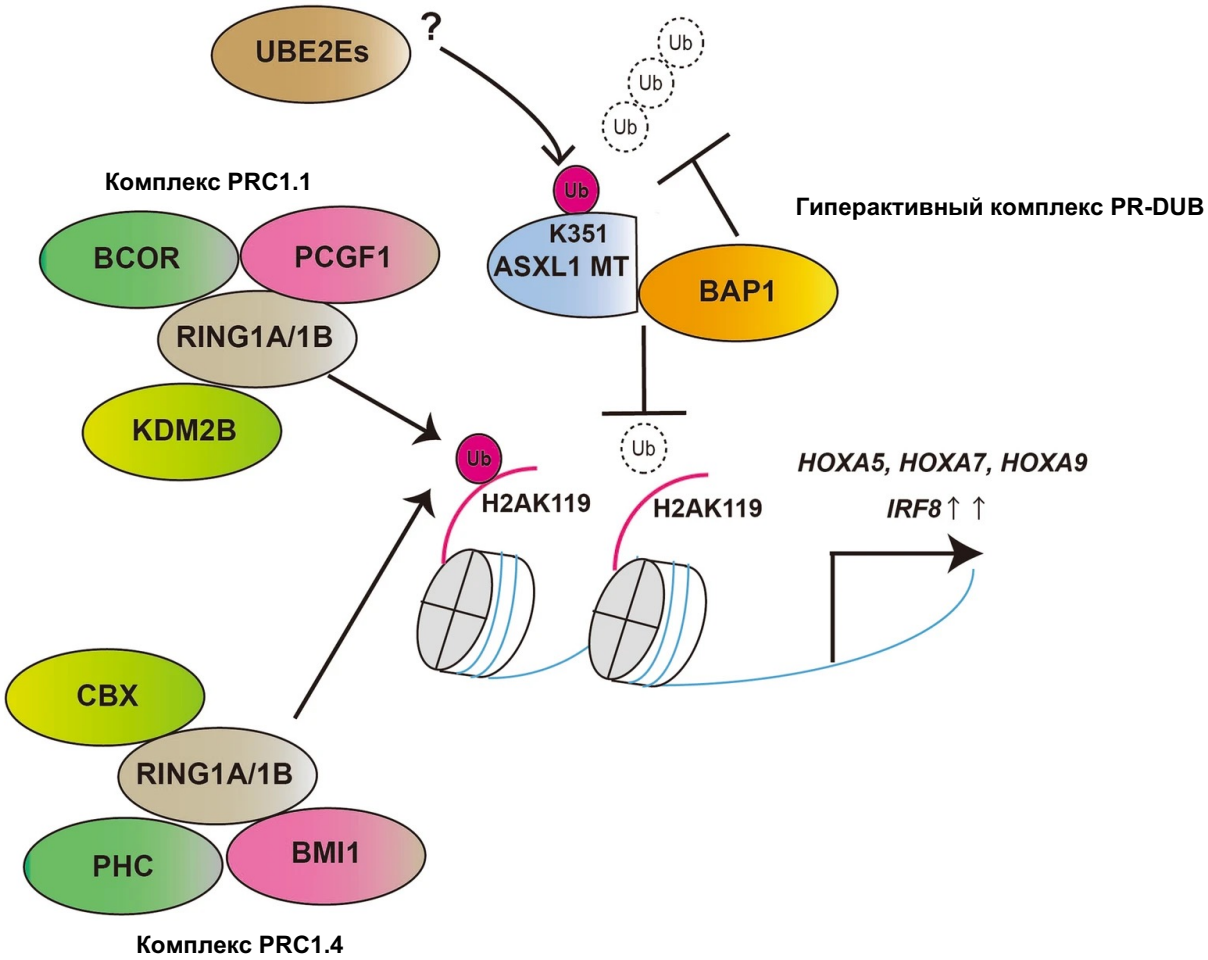

Рисунок 4 – Механизмы модификации H2AK119Ub и роль мутантного (MT) ASXL1 [42].

Существует предположение, что белок ASXL1 также взаимодействует с комплексом PRC2 и опосредованно участвует в триметилировании гистонов H3 по лизину 27 (H3K27). При потере нормальной активности ASXL1, возникающий вследствие соматических мутаций соответствующего гена, наблюдается снижение уровня H3K27me3 за счет нарушения функционирования PRC2. В результате этого также обнаруживаются повышенные уровни экспрессии генов кластера *HOXA* (в частности *HOXA9*), что приводит к усилению потенциала самообновления гемопоэтических стволовых клеток [35].

Патогенетическая роль мутантного ASXL1 в запуске процессов лейкемической трансформации была также доказана в экспериментах in vivo. В исследовании Wang и соавт. у *ASXL1*-нокаутных мышей наблюдалось уменьшение пула здоровых ГСК со смещением способности к дифференцировке в сторону гранулоцитов и развитие МДС-подобного состояния с дисплазией нейтрофильного

ряда и мультилинейной цитопенией [201]. Аналогичные результаты продемонстрировали Abdel-Wahab и соавт.: у мышей, трансплантированных *ASXL1*-нокаутными ГСК, отмечалась развитие летального МДС-подобного заболевания, характеризующегося гипоцеллюлярностью костного мозга и прогрессирующей анемией [36].

Мутации гена ASXL1 при миелоидных неоплазиях. Чаще всего соматические мутации затрагивают 11 или 12 экзоны гена *ASXL1* и представляют собой гетерозиготные нонсенс-мутации или мутации сдвига рамки считывания. Как было упомянуто выше, соматические мутации гена *ASXL1* с высокой частотой выявляются при широком спектре гематологических неоплазий, в частности при МДС (10-25%), ХММЛ (40-50%) и МПН (реже при истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии (0-2%) и, чаще при пост-полицитемическом/пост-эссенциальном миелофиброзе (18-28%) и ПМФ (до 54%)) [148].

Частота обнаружения мутаций 12 экзона гена *ASXL1* при впервые диагностированном ОМЛ составляет около 10% и коррелирует с возрастом [72, 160]. Мутированный вариант гена *ASXL1* часто сочетается с дисрагулоцитопоэзом у пациентов с впервые выявленным ОМЛ (75% против 55%, p=0,03) [84]. Prats-Martin и соавт. также продемонстрировали достоверное увеличение частоты детекции мутаций гена *ASXL1* в группе пациентов с ОМЛ с изменениями, связанными с миелоидсплазией (31% против 4,3%, p=0,007) [170]. В исследовании Paschka и соавт. мутированный статус гена *ASXL1* статистически значимо чаще встречался в группе пациентов с анамнезом предшествующего МДС [160]. Согласно последнему обновлению классификации ВОЗ 2022 года, обнаружение мутированного варианта гена *ASXL1* является молекулярным критерием, определяющим ОМЛ связанный с миелодисплазией (myelodysplasia-related-ОМЛ, MR-ОМЛ) [120]. Существуют данные об ассоциации мутаций гена *ASXL1* с мужским полом [72, 146, 160] и M0 (FAB) морфологическим вариантом ОМЛ [72]. В некоторых исследованиях продемонстрировано, что для пациентов с

мутированным вариантом гена *ASXL1* характерны более низкие медианы уровня лейкоцитов и бластных клеток в дебюте ОМЛ [146, 160, 170].

Среди характерных для *ASXL1*-мутированного ОМЛ цитогенетических аномалий выделяют изолированную трисомию 8 хромосомы (+8), аномалии 7 хромосомы (del7q/-7) [72, 160] и t(8;21)(*RUNX1-RUNX1T1*) [126, 149]. Есть сведения как по увеличению частоты детекции мутаций гена *ASXL1* в группе пациентов с нормальным кариотипом [170], так и об отсутствии данной взаимосвязи [72, 160]. По результатам исследования Chou и соавт. для пациентов с комплексным кариотипом выявление мутаций в гене *ASXL1* является нехарактерным [72].

Известна высокая частота кооперации мутаций в гене *ASXL1* с мутациями генов, кодирующих факторы сплайсинга (*SRSF2, U2AF1*), регулирующих сигнальную трансдукцию (*NRAS, JAK2, NF1*), генов-транскрипционных факторов (*RUNX1*) [156]. При анализе ассоциации мутированного статуса гена *ASXL1* с мутациями других генов, ответственных за эпигенетическую модификацию, обнаружена как высокая частота их совместного выявления (с мутациями в генах *TET2, IDH1/2*) [46, 132, 160], так и, наоборот, редкое сочетание с некоторыми из них (в частности, с мутациями гена *DNMT3A*) [160, 180]. Carbuccia и соавт. при анализе небольшой когорты пациентов с ОМЛ (n=63) обнаружили взаимоисключающий характер мутаций гена *ASXL1* и мутированного статуса гена *NPM1*, выдвинув предположение о том, что данные генетические поломки являются альтернативными путями лейкемической трансформации [60]. Редкая кооперация мутаций в гене *ASXL1* с мутациями гена *NPM1* и *FLT3*-ITD была продемонстрирована также в исследованиях Schnittger и соавт., Chou и соавт., Paschka и соавт. и Pratcorona и соавт. [72, 160, 169, 180].

Неблагоприятная прогностическая роль мутированного варианта гена *ASXL1* доказана многими независимыми исследованиями при различных видах гематологических неоплазий, в частности при ХММЛ [117, 164], МДС [46, 193], ПМФ [18, 195] и ОМЛ [60, 84, 146, 156, 160, 162, 169, 170, 175, 180]. В связи с ростом накопленных данных, мутации гена *ASXL1* интегрировались в качестве

негативного прогностического фактора в различные модели стратификации и шкалы риска: CPSS-Mol, молекулярная модель Mayo и модель GFM для пациентов с ХММЛ [165], а также MIPSS70, MIPSS70v2, MTSS и GIPSS для пациентов с ПМФ [189].

При ОМЛ, согласно обновленным рекомендациям и актуальной прогностической модели (ELN-2022), выявление мутированного варианта гена *ASXL1* наряду с другими генными мутациями, ассоциированными с миелодисплазией, позволяет стратифицировать пациента в группу неблагоприятного генетического риска, но лишь в случаях отсутствия сопутствующих аномалий, характеризующих благоприятный прогноз [93]. Тем не менее лишь половина пациентов благоприятной группы генетического риска живут более пяти лет (5-летняя ОВ – 54,6% [95% ДИ 49,6-60]), что обусловлено высокой частотой развития рецидивов (5-летняя БРВ – 52,4% [95% ДИ 46,6-58,9]) [172]. В связи с тем, что в данной когорте выполнение алло-ТГСК в первой ПР не рекомендовано (за исключением случаев персистенции МОБ) [23, 93], изучение дополнительных генетических аномалий, способных негативно влиять на прогноз пациентов, является особенно актуальным.

В данном аспекте интерес привлекают результаты нескольких независимых исследований, оценивающих прогноз больных благоприятной прогностической группы в зависимости от мутационного статуса гена *ASXL1*. Metzeler и соавт. при анализе когорты 423 пациентов с впервые выявленным ОМЛ и нормальным кариотипом, продемонстрировали ухудшение показателей как 3-летней ОВ, так и 3-летней БСВ в группе больных с благоприятным генетическим профилем (мутации гена *NPM1* без *FLT3*-ITD или мутации гена *CEBPA*) при обнаружении сопутствующих мутаций гена *ASXL1* (0% против 34% [95% ДИ 25-44]) и 0% против 27% [95% ДИ 17-37], соответственно (p<0,001)). Риск смерти от любых причин или развития рецидива в данной когорте пациентов был более чем в 4 раза выше при выявлении мутаций 12 экзона гена *ASXL1* (HR 4,38; p<0,001) [146]. В исследовании Duployez и соавт. отмечено увеличение КЧР в группе CBF-ОМЛ (t(8;21) или inv(16)) при наличии у пациентов сопутствующих мутаций генов, кодирующих

модификаторы хроматина, в частности *ASXL1* (HR 5,44; [95% ДИ 1,82-16,27], p=0,002) [95]. Krauth и соавт., анализируя пациентов с t(8;21)(*RUNX1-RUNX1T1*), пришли к выводу, что обнаружение сопутствующих мутаций гена *ASXL1* негативно влияет на показатели 2-летней БСВ в данной когорте (28,6% против 56,7% в группе с диким типом *ASXL1*, p=0,021), хотя и не оказывает значимого влияния на показатели ОВ [126]. В исследовании Micol и соавт., напротив, статистически достоверного влияния мутированного варианта генов *ASXL1/2* на 3-летнюю КЧР в группе пациентов с t(8;21)(*RUNX1-RUNX1T1*) не отмечено [149].

Таким образом, несмотря на доказанное негативное прогностическое значение мутированного статуса гена *ASXL1* при впервые диагностированном ОМЛ, его роль в аспекте изменения подхода к ведению пациентов с благоприятными генетическими аномалиями требует дальнейшего изучения.

1.7 Подходы к терапии пациентов с мутациями эпигенетических модификаторов

Учитывая обратимый характер мутаций генов-эпигенетических модификаторов, многообещающим представляется их рассмотрение в качестве потенциальных мишеней для воздействия таргетных лекарственных препаратов [61]. ГМА (5-азацитидин и децитабин), неконкурентно ингибирующие DNMT1 и приводящие к остановке процессов метилирования цитозина в реплицирующейся нити ДНК, в настоящее время широко применяются в терапии ОМЛ [5, 24, 93, 168, 216]. [5, 24, 93, 168, 216]. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США одобрило пероральные таргетные ингибиторы мутированных ферментов: IDH2 – енасидениб (*AG-221, Agios Pharmaceuticals, Inc.*) и IDH1 – ивосидениб (*AG-120, Celgene*) в августе 2017 и июле 2018 года соответственно [61]. Национальная Всеобщая Онкологическая сеть (NCCN) рекомендует их применение при рецидивах и рефрактерных формах *IDH1/2* – мутированного ОМЛ, а также в терапии первой линии у пациентов с мутациями генов *IDH1/2*, не являющихся кандидатами на проведение интенсивной полихимиотерапии [168]. Недавно опубликованные результаты 3 фазы

рандомизированного исследования NCT02577406, однако, демонстрируют отсутствие преимуществ в отношении ОВ при использовании енасидениба по сравнению с другими вариантами лечения в третьей или четвертой линиях терапии пациентов с мутациями гена *IDH2* [52]. В настоящий момент активно ведутся исследования, посвященные оценке эффективности комбинаций ингибиторов *IDH1/2* со стандартными режимами химиотерапии как в дебюте, так и в рецидиве ОМЛ (исследование NCT03839771, NCT04250051), комбинаций с ингибитором bcl-2 венетоклаксом (исследования NCT03471260, NCT04774393, NCT04092179), ингибиторами тирозинкиназ (исследование NCT05756777), ингибиторами МЕК (NCT05441514), а также поддерживающей терапии ингибиторами *IDH1/2* (исследования NCT03839771, NCT05010772, NCT03728335) в том числе после алло-ТГСК (NCT03515512). Ингибиторы IDH второго поколения находятся на различных этапах доклинической и клинической апробации. Химические соединения от компаний Новартис (IDH305), Agios (AG881, ворасидениб) и Bayer (BAY1436032) уже прошли 1 фазу клинических испытаний. Наилучшим ответом на применение двойного ингибитора IDH1 и IDH2 ворасидениба в группе пациентов с ОМЛ было достижение морфологического статуса, свободного от лейкемии (2 из 34 пациентов, 5,9%), поэтому в настоящее время фокус внимания сосредоточен на эффективности ворасидениба при рецидивной/рефрактерной *IDH*-мутированной глиоме с учетом его способности проникать через ГЭБ [90].

Интересным представляется также изучение механизмов резистентности опухолевых клеток к ингибиторам *IDH1/2*. В исследовании Amatangelo и соавт. продемонстрировано, что пациенты с сопутствующими мутациями генов, ответственных за регуляцию сигнального пути RAS, хуже отвечают на терапию енасиденибом [40]. Аналогичные данные были получены в исследовании Choe и соавт. в отношении механизмов резистентности к ивосиденибу у пациентов с мутациями гена *IDH1* [70].

В двух небольших независимых исследованиях, представленных на ASH в 2022 году, продемонстрировано, что пациенты с мутированным статусом генов *IDH1/2* лучше отвечают на венетоклакс-содержащие режимы терапии [53, 112]. Это

может быть объяснено пересекающими биологическими механизмами: накопление 2-HG в результате мутаций в генах *IDH1/2* приводит к ингибированию цитохром с-оксидазы и зависимости клетки от регуляции апоптоза посредством белков семейства bcl-2 [151].

Литературные данные по влиянию различных вариантов терапии на исходы пациентов с мутациями гена *DNMT3A* крайне ограничены. Небольшое ретроспективное исследование Metzeler и соавт. продемонстрировало тенденцию к увеличению частоты достижения ПР в группе пациентов с мутациями гена *DNMT3A* при использовании ГМА (децитабина) по сравнению с когортой без мутаций (75% против 34%, p=0,05) [147]. Patel и соавт. в своем исследовании подчеркивают возможность преодоления негативного прогностического влияния мутации в гене *DNMT3A* при использовании высоких доз даунорубицина (90 мг/м^2) в индукции ремиссии [162].

Учитывая особенности биологии мутантного ASXL1, обсуждается возможность использования ингибиторов BAP1, BRD1 (броменсодержащий белок 4, участвующий в ацетилировании гистона H3 по лизину 122 (H3K122Ac)), гистодиацетилазы (HIDAC) и OGA (белок O-GlcNAcase, участвующий в процессах метилирования гистона H3 (H3K4me3)) при *ASXL1*-мутированном ОМЛ, однако исследования эффективности данных агентов ограничиваются экспериментами in vivo линий трансгенных мышей (C57BL/6) *ASXL1*$_{Y588X}$ и экспериментами in vitro [44].

Таким образом, изучение особенностей эпигенетической регуляции при ОМЛ представляет большой интерес не только в аспекте прогностического значения некоторых генных мутаций и их комбинаций, но также и с точки зрения перспективы усовершенствования и персонификации протоколов терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристики исследуемой группы пациентов

Исследование проводилось на базе отделения химиотерапии онкогематологических заболеваний и ТКМ №2 и лаборатории генной инженерии и клеточной терапии Центра доклинических и трансляционных исследований ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» при сотрудничестве с гематологическими отделениями республиканских, краевых, городских и районных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) различных регионов РФ (ГАУЗ «Республиканская Клиническая Больница имени Н.А. Семашко», г. Улан-Удэ, БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница», г. Вологда, ГБУЗ «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер», г. Ставрополь, ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1», г. Краснодар, КБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск, ГБУЗ «Пермская краевая клиническая больница», г. Пермь, ГБУЗ "ОКБ", г. Тверь).

В ходе исследования проводилась изолированная оценка частоты выявления мутаций в отдельных регионах РФ, в частности в Ленинградской области, Вологодской области, Краснодарском крае, Ставропольском крае и Республике Бурятия. В ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» проходили обследование и лечение пациенты и из других регионов РФ (Калининградская область, Ямало-Ненецкий АО, Республика Дагестан, Красноярский край и т.д.). Оценка частоты встречаемости мутаций в данных регионах не проводилась ввиду малого общего количества пациентов (не более пяти из каждого региона).

Сотрудничество с региональными ЛПУ было организовано в рамках наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования № Z-0419 «Скрининг мутаций *IDH1/IDH2* и сопутствующих мутаций у пациентов с впервые диагностированном острым миелобластным лейкозом» (Celgene), получившего одобрение Этического Комитета ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России №19072019 08 июля 2019 года.

К критериям включения относились впервые верифицированный диагноз ОМЛ (в том числе после предшествующей химиотерапии и как исход МДС или МПН) и возраст старше 18 лет. Пациенты с диагностированным острым промиелоцитарным лейкозом и рецидивом ОМЛ исключались из исследования. Пациентам, соответствующим критериям включения, было проведено молекулярно-биологическое исследование с целью определения мутационного статуса генов *ASXL1, IDH1, IDH2, DNMT3A* и *FLT3*. Все включенные в исследование пациенты подписали добровольное информированное согласие на биобанкирование костного мозга и/или периферической крови (забор, хранение биоматериала, проведение молекулярных исследований) и участие в наблюдательном исследовании.

Критериям включения соответствовало 147 пациентов (50,3% мужчин (74/147) и 49,7% женщин (73/147)), медиана возраста которых составила 51 год (от 18 до 90 лет). Среди них 56,5% (83/147) проходили первичную верификацию диагноза и лечение в региональных ЛПУ РФ в период с 2018 по 2021 год. Полный анамнез заболевания и данные первичной медицинской документации для ретроспективного анализа были доступны у 97,3% (143/147) пациентов. Информация по вариантам индукционной терапии, частоте рефрактерности к ним и ранней летальности (в течении первых 30 дней от начала индукционного курса терапии) представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Разновидности режимов полихимиотерапии, применяемых с целью индукции ремиссии

Варианты индукционной терапии	Доля пациентов, % (n)	Ранняя летальность, % (n)	Рефрактер-ность, % (n)
«7+3»	60,1% (86/143)	9,3% (8/86)	59,3% (51/86)
«FLAG+/-Ida»	9,8% (14/143)	7,1% (1/14)	21,4% (3/14)
Монотерапия ГМА/МДЦ	10,5% (15/143)	13,3% (2/15)	6,7% (14/15)
ГМА/МДЦ+ венетоклакс	11,2% (16/143)	6,3% (1/16)	37,5% (6/16)

Продолжение таблицы 1

Варианты индукционной терапии	Доля пациентов, % (n)	Ранняя летальность, % (n)	Рефрактер-ность, % (n)
Паллиативная помощь	6,3% (9/143)	66,7% (6/9)	-
Неадекватная предлеченность	2,1% (3/143)	0% (0/3)	66,7% (2/3)
Итого:		12,6% (18/143)	56,7% (76/134)

Примечание: 1) режим «7+3»: цитарабин 200 мг/м^2/сут (7 дней) + даунорубицин 60 мг/м^2/сут (3 дня); 2) режим «FLAG+/-Ida»: цитарабин 1,5-2 г/м^2/сут (1-5 дни) + флударабин 30 мг/м^2/сут (1-5 дни) + Г-КСФ +/- идарубицин 8 мг/м^2/сут (3-5 дни); 3) монотерапия ГМА: 5-азацитидин 75 мг/м^2 (дни 1-7); 4) монотерапия МДЦ: цитарабин 20-40 мг/м^2/сут (дни 1-10); 5) ГМА/МДЦ+венетоклакс: комбинированная терапия венетоклакс 100 → 400 мг/сут + 5-азацитидин/МДЦ.

Среди пациентов, которым были назначены различные варианты химиотерапии (n=134) достижение ПР после первого индукционного курса верифицировано у 43,3% (58/134), летальность на этапе индукционной терапии составила 9% (12/134). Варианты режимов консолидации ремиссии (второй курс химиотерапии у пациентов, достигших ПР после первого курса) и реиндукции (второй курс химиотерапии, проводимый с целью индукции ремиссии после неудачи первого курса) представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Режимы консолидации, используемые для пациентов, достигших полной ремиссии после первого индукционного курса и режимы реиндукции, используемые для пациентов, не достигших полной ремиссии после первого индукционного курса

Вариант терапии	Доля пациентов, % (n)
Консолидация ремиссии (n=58)	
«7+3»	17,2% (10/58)
Высокие дозы цитарабина («FLAG+/-Ida» или «HiDAC»)	39,7% (23/58)

Продолжение таблицы 2

Вариант терапии	Доля пациентов, % (n)
Консолидация ремиссии (n=58)	
Монотерапия ГМА/МДЦ	3,4% (2/58)
ГМА/МДЦ+ венетоклакс	19% (11/58)
Переход на этап алло-ТГСК	13,8% (8/58)
Неизвестно	5,2% (3/58)
Не проводилась	1,7% (1/58)
Реиндукция ремиссии (n=76)	
«7+3»	13,2% (10/76)
Высокие дозы цитарабина («FLAG+/-Ida» или «HiDAC»)	27,6% (21/76)
Монотерапия ГМА/МДЦ	17,1% (13/76)
ГМА/МДЦ+ венетоклакс	13,2% (10/76)
Переход на этап алло-ТГСК	3,9% (3/76)
Неизвестно	2,6% (2/76)
Не проводилась	22,4% (17/76)

Примечание: режим «HiDAC» – цитарабин 1,5-3 мг/м^2 2 раза в сутки в дни 1, 3 и 5

2.2 Первичная верификация диагноза

Верификация диагноза проводилась согласно критериям ВОЗ 2016 года на основании данных морфологических (анализ мазка периферической крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, миелограмма, цитохимические исследования), цитофлюориметрических (иммунофенотипирование клеток крови или костного мозга), цитогенетических (стандартное кариотипирование, FISH-исследование) и молекулярно-биологических (RT-ПЦР, секвенирование по Сэнгеру) методов исследования [120].

Морфологические методы исследования. Морфологическое исследование пунктата костного мозга с дифференциальным подсчетом не менее 500 клеток в

мазках, а также цитохимическое (реакции на миелопероксидазу, PAS и альфа-нафтилэстеразу с оценкой наличия подавления NaF) проводилось всем пациентам в дебюте заболевания. В случае получения «сухого» аспирата исследования проводились на образцах периферической крови. По совокупности морфологических и цитохимических характеристик у 91,2% (134/147) пациентов было возможно определение подтипа ОМЛ согласно Франко-Америко-Британской классификации (таблица 3).

Таблица 3 – Распределение пациентов согласно Франко-Америко-Британской (FAB) классификации

Вариант ОМЛ (FAB)	M0	M1	M2	M4	M5	M6	M7
Доля пациентов, % (n)	14,9% (20/134)	21,6% (29/134)	23,1% (31/134)	27,6% (37/134)	9% (12/134)	0,7% (1/134)	3% (4/134)

Иммунофенотипирование. Стандартное цитофлуориметрическое исследование (иммунофенотипирование, ИФТ) клеток костного мозга или периферической крови на этапе первичной верификации диагноза с целью определения линейной направленности бластных клеток выполнялось методом проточной цитофлуориметрии с использованием многоцветного цитофлуориметра FASCAria III (BD, США). Диагностическая скрининговая панель включала в себя набор антител к миелоидным и лимфоидным маркерам, конъюгированных с различными флуоресцентными красителями: FITC – HLA-DR, CD14, cytMPO, CD7, CD235; PE – CD13, CD123, CD64, CD200, cytCD79a; PerCp – CD34, CD4, CD34, CD41a; PE-Cy7 – CD33, CD19; APC – CD15, CD56, cytCD3; APC-H7 – CD3, CD45; V450 – CD38, CD117, CD11c и V500 – CD45 (BD, США).

Результаты ИФТ бластных клеток, выполненного в дебюте заболевания, были доступны у 96% (141/147) пациентов. Частота экспрессии различных маркеров бластными клетками в общей когорте пациентов представлена на рисунке 5.

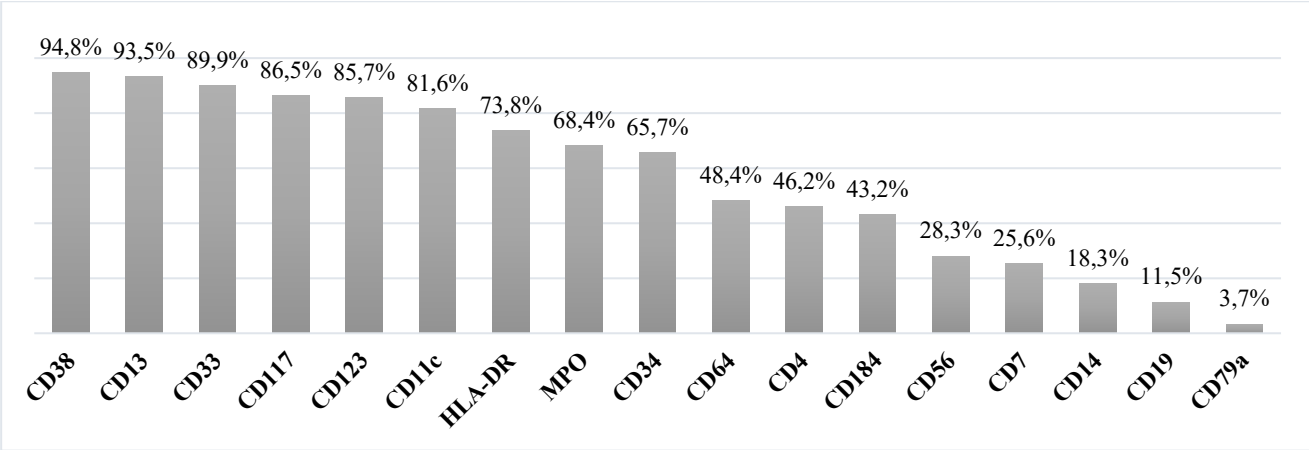

Рисунок 5 – Частота экспрессии миелоидных и лимфоидных маркеров бластными клетками в общей группе пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Цитогенетические исследования. С целью выявления хромосомных аберраций выполнялись стандартное кариотипирование и FISH-исследование с использованием образцов костного мозга или периферической крови (при общем количестве бластных клеток в периферической крови больше 30%), полученных в дебюте заболевания. Для проведения стандартного цитогенетического исследования клетки костного мозга или периферической крови в течении 24 часов культивировали при температуре 37С в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 20% эмбриональной телячьей сыворотки, глютамина и антибиотика с дальнейшей фиксацией и G-окрашиванием хромосом. Достоверным считался результат с оценкой не менее 20 метафазных пластинок. Анализ проводился с использованием микроскопа AxioImadgerM1 (Кат№3156001735, Zeiss, Германия) и программного обеспечения MetaSystems Ikaros. Кариотип описывали в соответствии с ISCN 2020 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2020).

FISH-исследование проводилось с использованием локус-специфичных ДНК-зондов BCR/ABL t(9;22), MECOM t(3,3)/inv(3)(3q26), DEK/NUP2 t(6;9), RUNX1/RUNX1T1 t(8;21), p53(17p13)/MPO (17q22) ISO 17q, CBFB t(16;16)/inv(16), 7q- (7q22; 7q36), 20q- (20q12)/20q11, 5q- (5q31; 5q33)/hTERT (5p15), DLEU1 (13q14)/TP53 (17p13), KMT2A/MLLT3 t(9;11), PML/RARA t(15;17), KMT2A (11q23), KMT2A/MLLT1 t(11;19) (Kreatech, Leica Biosystems, Германия). Анализ

сигналов на хромосомах включал просмотр не менее 200 интерфазных ядер с использованием флуоресцентного микроскопа AxioImadgerM1 (Кат№3156001735, Zeiss, Германия) и фильтров DAPI (Кат№49000), AQUA (Кат№49302), GREEN (Кат№49303), ORANGE (Кат№49305) (MetaSystems, Германия).

Стандартное кариотипирование было выполнено у 78,9% (116/147) пациентов, из них у 6% (7/116) исследование оказалось неинформативным в связи с отсутствием роста культуры. FISH-исследование проведено у 66% (97/147) пациентов. По данным цитогенетических исследований в 51,4% (56/109) случаев у пациентов не было выявлено каких-либо хромосомных альтераций. Комплексный кариотип, определяемый как обнаружение ≥3 независимых хромосомных перестроек, наблюдался в 11% (12/109) случаев. Полный спектр выявленных цитогенетических аномалий представлен на рисунке 6.

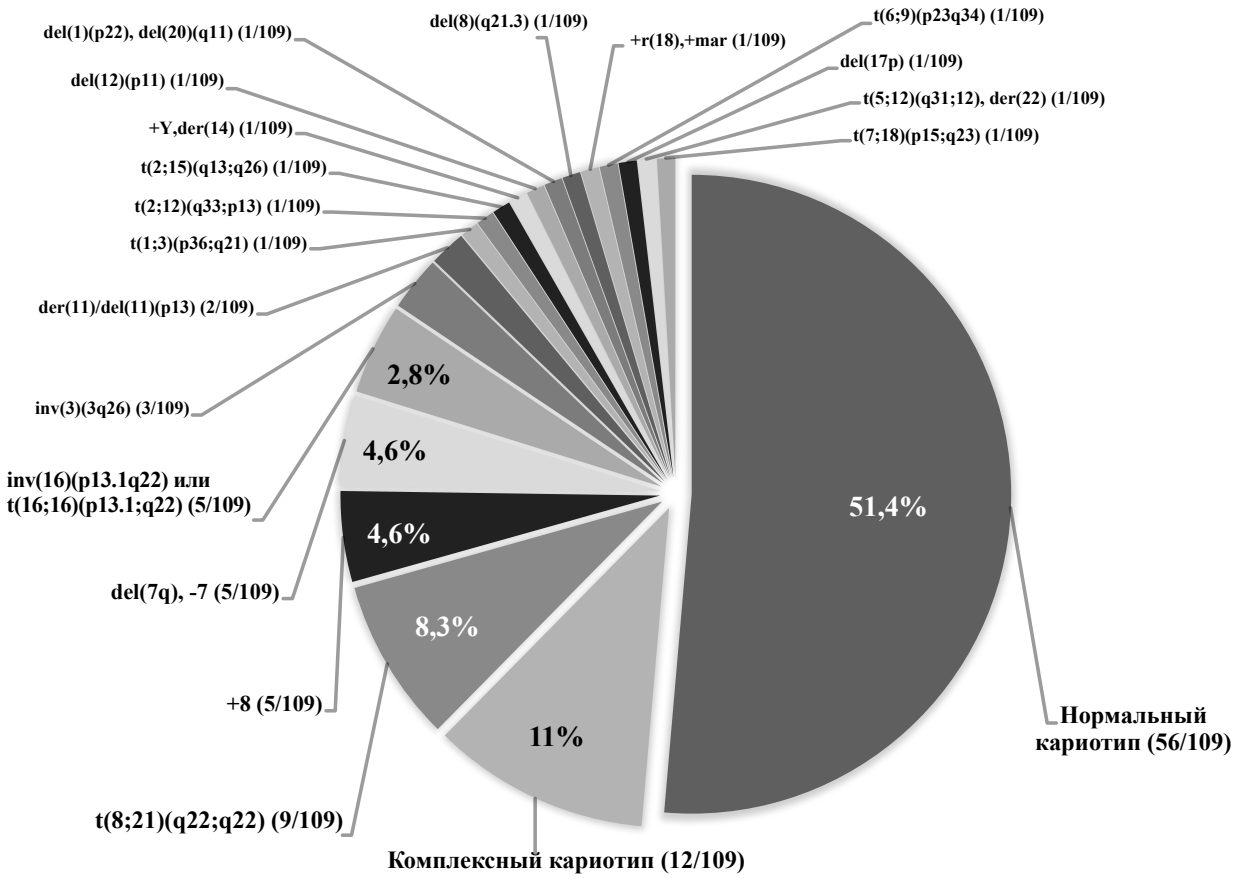

Рисунок 6 – Выявленные по результатам стандартного кариотипирования и FISH-исследования хромосомные аберрации у пациентов с впервые диагностированным ОМЛ

Проведение молекулярно-генетического анализа. Выделение геномной ДНК из замороженных образцов костного мозга или периферической крови для молекулярно-биологических исследований (RT-PCR, ddPCR, секвенирование по Сэнгеру, NGS) проводилось с использованием коммерческого набора ExtractDNA Blood (Кат№BM011, Евроген, Россия) согласно методике производителя. Качество и количество выделенной ДНК оценивали на приборе Implen NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Итоговая концентрация тотальной ДНК в образцах варьировалась в диапазоне 50-70 нг/мкл.

В рамках первичного обследования пациентам проводилось молекулярно-биологическое исследование с целью детекции основных прогностически значимых генных аномалий: мутаций в генах *FLT3* (мутации ITD и TKD), *NPM1*, *JAK2* (V617F), *CKIT*, определение транскриптов химерных генов *RUNX1-RUNX1T1, CBF-MYH11, PML-RARA.*

Молекулярно-генетическое исследование с целью выявления мутаций *FLT3*-ITD/TKD было проведено всем пациентам методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, подобранных с помощью программного обеспечения Primer-BLAST. Для диагностики мутации *FLT3*-ITD подбирались праймеры, комплиментарные к области 14 и 15 экзонов гена *FLT3*, а для мутации *FLT3*-TKD D835 – комплиментарные к области участка 20 экзона гена *FLT3*. Дальнейшая амплификация, разделение продуктов реакции с помощью гель-электрофореза и интерпретация результатов производились согласно локально апробированной методике [7].

ПЦР-анализ на наличие мутации *FLT3*-ITD был выполнен всем пациентам, частота встречаемости оказалась равной 25,2% (37/147). Мутация *FLT3*-TKD встречалась значимо реже и была выявлена у 6 пациентов из 144 обследованных, что составило 4,2%. Мутационный статус гена *NPM1* был оценен у 74,1% (109/147) пациентов, частота детекции мутаций среди которых составила 29,4% (32/109). Мутация ITD в гене *FLT3* статистически значимо чаще определялась в группе пациентов с мутированным статусом гена *NPM1*: 45,8% против 21,2% (p=0,016).

Информация по частоте встречаемости всех генетических аномалий и количеству проанализированных образцов (n) представлена на рисунке 7.

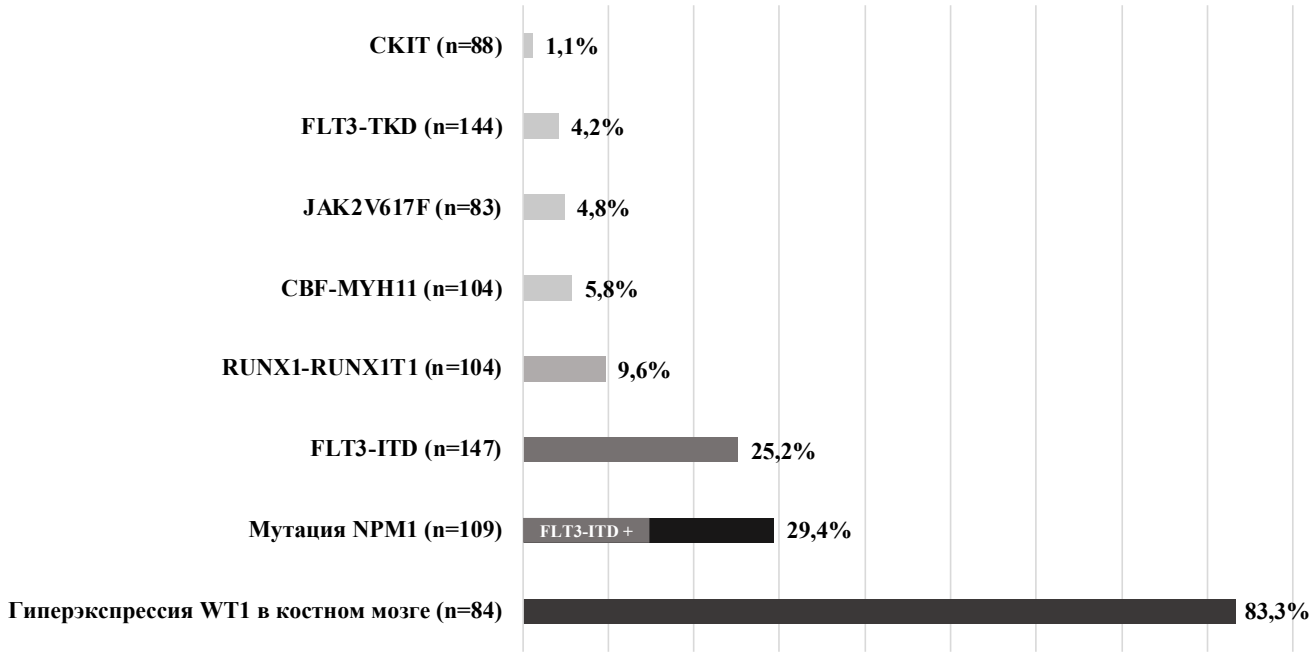

Рисунок 7 – Спектр генных мутаций пациентов с впервые диагностированным ОМЛ и экспрессируемых транскриптов сливных генов, выявленные по результатам молекулярно-биологического исследования

Распределение пациентов по группам генетического риска. Опираясь на выявленные в дебюте заболевания генетические аномалии, пациенты были ретроспективно стратифицированы на группы риска согласно актуальным рекомендациям ELN-2022 [93]. Необходимый для стратификации объем обследований был выполнен у 84,4% пациентов (124/147), среди которых к благоприятной группе генетического риска отнесено 24,2% (30/124), к промежуточной – 46,8% (58/124) и к неблагоприятной – 29% (36/124).

2.3 Оценка мутационного статуса генов *IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1*

Всем пациентам, соответствующим критериям включения было выполнено молекулярно-генетическое исследование (секвенирование по Сэнгеру ± ddPCR) с целью детекции мутаций в генах эпигенетической регуляции (*DNMT3A, IDH1,*

IDH2, ASXL1). Анализ на наличие мутации R172 в гене *IDH2* методом секвенирования по Сэнгеру был проведен у 84 пациентов.

Цифровая капельная ПЦР. В настоящем исследовании методом ddPCR на приборе «QX200 Droplet Reader» (Bio-Rad, США, Кат№1864003) проводилась детекция мутаций R132 и R140 в генах *IDH1* и *IDH2* соответственно. Для анализа использовалось 100 нг. геномной ДНК, выделенной из образцов периферической крови или костного мозга пациентов с впервые выявленным ОМЛ. В качестве положительного контроля применялась смесь 7 нг. ДНК с мутацией R132 гена *IDH1* или R140 гена *IDH2*, подтвержденных методом секвенирования по Сэнгеру, и 130 нг. ДНК с диким типом генов *IDH1* и *IDH2*. Использовались стандартные наборы праймеров для *IDH1* и *IDH2* дикого типа, R132 (*IDH1*) и R140 (*IDH2*), согласно данным по валидации Bio-Rad. Подготовка ПЦР-смеси и настройка условий реакции осуществлялась согласно рекомендациям производителя коммерческих наборов: набор Bio-Rad (Кат№1055255) для определения дикого типа *IDH2* и R140Q и набор Bio-Rad (Кат№1055257) для определения дикого типа *IDH1* и R132C.

Результаты оценивались с помощью программного обеспечения QuantaSoft. Частота мутантных аллелей была рассчитана с использованием модели распределения Пуассона как отношение мутированных аллелей к аллелям дикого типа (*IDH*mut/*IDH*wt x 100).

Примеры положительного и отрицательного результата анализа на наличие мутаций R132 и R140 в генах *IDH1* и *IDH2* представлены на рисунке 8.

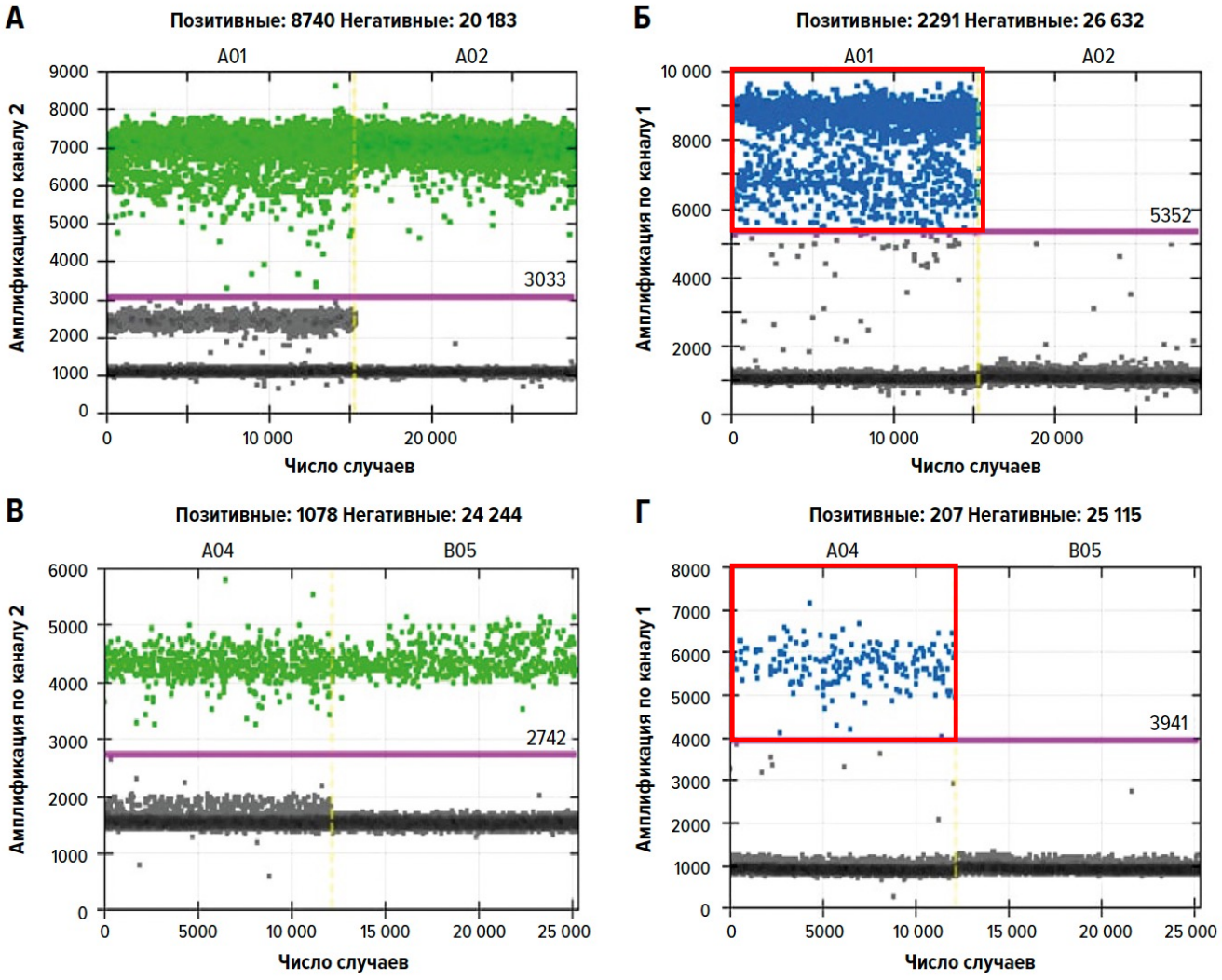

Рисунок 8 – Графики результатов амплификации: А – гена *IDH1* дикого типа для образцов A01 (с мутацией R132), A02 (без мутации R132); Б – гена *IDH1* (R132C) для образцов A01 (с мутацией R132), A02 (без мутации R132); В – гена *IDH2* дикого типа для образцов A04 (с мутацией R140), B05 (без мутации R140); Г – гена *IDH2* (R140Q) для образцов A04 (с мутацией R140), B05 (без мутации R140).

Примечание: Горизонтальная черта розового цвета на рисунках является пороговым значением. Совокупность точек с зеленым (Hex) или синим (Fam) сигналом, расположенных выше порогового значения, указывает на положительный результат амплификации соответствующего варианта гена (дикий тип или мутированный тип).

Секвенирование по Сэнгеру. Мутационный статус генов *DNMT3A* и *ASXL1*, а также генов *IDH1* и *IDH2* (подтверждающее исследование) оценивался методом

прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием Applied Biosystems 3500xL (Thermo Fisher Scientific, США). Амплификацию проводили с применением коммерческой смеси реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия, Кат№РК101). Олигонуклеотиды, использовавшиеся для амплификации и секвенирования целевых последовательностей, указаны в таблице 4.

Таблица 4 – Праймеры для секвенирования по Сэнгеру с целью детекции мутаций в генах *IDH1, IDH2, DNMT3A, ASXL1*

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ПЦР-фрагмента (п.о.)
IDH1 [205]	5' - CTG TGT TTA GGG TGT GCC AG	5' - AAT TTC ATA CCT TGC TTA ATG GG	573
IDH2 [47]	5' - GCT TGG GGT TCA AAT TCT GG	5' - GAA AGG AAA GCC ACG AGA CAG	534
ASXL1 [106]	5' - AGG TCA GAT CAC CCA GTC AGT T	5' - TAG CCC ATC TGT GAG TCC AAC TGT	561
ASXL1 [106]	5' - AGA GGA CCT GCC TTC TCT GAG AAA	5' - TTC GAT GGG ATG GGT ATC CAA TGC	558
DNMT3A [182]	5' - TCC TGC TGT GTG GTT AGA CG	5' - ACA GAA AAC CCC TCT GAA AAG	546

Участком отжига праймеров для оценки мутационного статуса гена *ASXL1* был 12 экзон (G652, Q748, Q768), генов *IDH1/IDH2* (R132 и R140/R172) – 4 экзон, гена *DNMT3A* (R882) – 23 экзон. В ПЦР-смесь добавляли по 0,2 мкмоль каждого из праймеров и 100 нг. геномной ДНК. Примеры хроматограмм участков генов *IDH1/2, ASXL1* и *DNMT3A* продемонстрированы на рисунке 9.

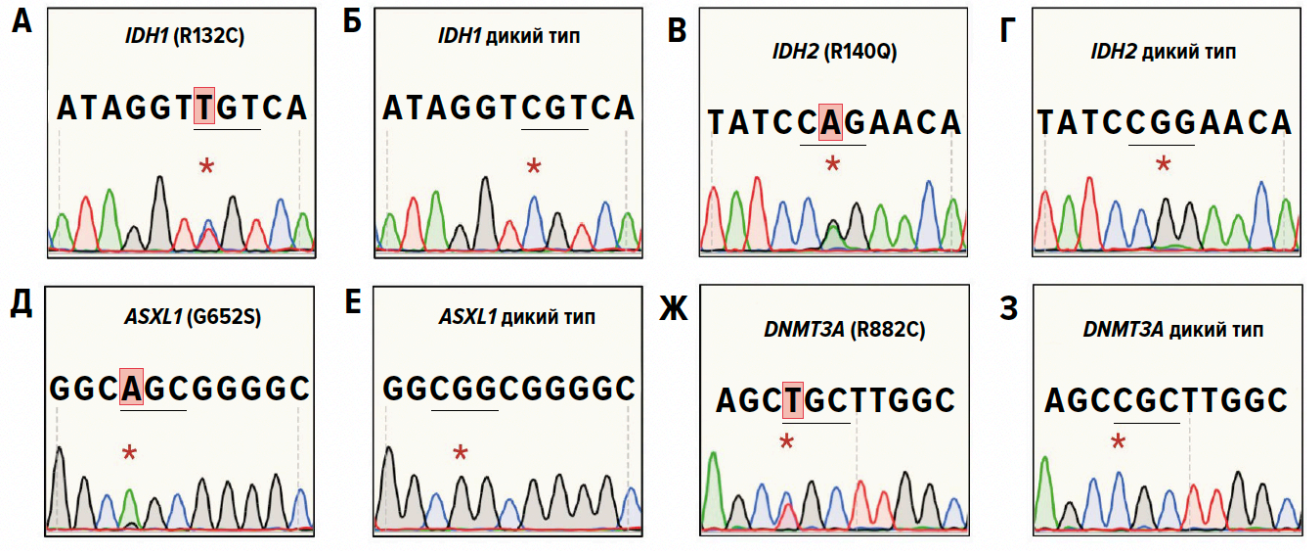

Рисунок 9 – Результаты секвенирования по Сэнгеру: А – образец ДНК с мутацией R132C гена *IDH1*; Б – образец ДНК дикого типа *IDH1*; В – образец ДНК с мутацией R140Q гена *IDH2*; Г – образец ДНК дикого типа *IDH2*; Д – образец ДНК с мутацией G652S гена *ASXL1*; Е – образец ДНК дикого типа *ASXL1*; Ж – образец ДНК с мутацией R882C гена *DNMT3A*, З – образец ДНК дикого типа *DNMT3A*

Секвенирование нового поколения. В настоящем исследовании NGS было выполнено 18 пациентам с выявленными мутациями в генах эпигенетической регуляции. Для NGS-анализа были отобраны образцы с суммарным количеством тотальной ДНК не менее 750 нг. (концентрация варьировалась от 50 нг/мкл до 1000 нг/мкл) и охарактеризованными на спектрофотометре соотношениями A260/A280 и A260/A230 более 1,8. Обогащение ДНК производилось с помощью набора для целевого обогащения с пользовательским дизайном, заказанным у компании Agilent Technologies, Inc. Дизайн панели зондов (SureSelect, Custom Tier1, 16Rxns) сформирован с помощью утилиты Agilent SureDesign (США). ДНК подвергалась фрагментации до среднего размера 200 пар оснований на соникаторе M220 Focused-ultrasonicator (Covaris, США, Кат№500295). Библиотеки подготавливались с помощью набора SureSelect Library Prep Kit ILM-96 Reactions (Agilent Technologies, США, Кат№5500-0133) согласно протоколу производителя (SureSelectXT Target Enrichment System for the Illumina Platform Protocol, Version D1, July 2021). Качество библиотеки оценивалось с помощью автоматического

гель-электрофореза на приборе Agilent 4200 TapeStation System в соответствии инструкцией по эксплуатации (Agilent Technologies, США, Кат№G2991BA). Секвенирование производилось на приборе MiSeq System (Illumina, США) с использованием реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v3 (150-cycles) (Illumina, США, Кат№MS-102-3001).

Анализ полученных .fastq.gz файлов производился по следующему алгоритму:

1) Контроль качества и очистка низкокачественных и адаптерных последовательностей (программы fastqc, cutadapt);

2) Картирование очищенных последовательностей, прочтение на референсный геном человека версии hg38 (программные пакеты bwa,samools,biobambam);

3) Маркировка дубликатных последовательностей (программа Picard MarkDublucates);

4) Вторичный контроль качества и генерация отчётов по качеству (собственное программное обеспечение);

5) Поиск генетических вариантов с помощью программ gatk, deepvariant, freebayes, vardict;

6) Объединение полученных вариантов в формате .vcf из различных программ, их аннотация по генетическим базам данных, первичная фильтрация (собственное программное обеспечение, программы VEP, Annovar, SnpEff);

7) Приведение полученных на предыдущем этапе данных в табличный вид для последующего анализа. Фильтрация и приоритезация генетических вариантов (собственное программное обеспечение).

В ходе биоинформатической обработки данных анализировались участки генома с минимальным общим количеством покрытий 10x (при минимальном покрытии альтернативного аллеля 3x). Учитывались однонуклеотидные варианты (SNV), выявляемые в кодируемых участках таргетных генов, с частотой вариантного аллеля (Variant Allele Frequency, VAF) ≥ 5%. Требуемая максимальная популяционная частота обнаружения SNV по данным Genome Aggregation Database

(gnomAD) определялась как ≤ 0,0001. Патогенность мутаций оценивалась по базам данных ClinVar,HGMDf а также по программам-предсказателям патогенности InterVar, CancerVar, PolyPhen, Sift, CADD, SpliceAi.

Панель для таргетного секвенирования включала в себя 133 гена: *ABCB1, ABL1, ACVR1, AKT1, ALK, APOBEC3B, AR, ARID2, ASTE1, ASXL1, ATM, ATR, ATRX, AXIN2, B2M, BCL2, BCOR, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CARD11, CASP8, CCNB1, CCND1, CDH1, CDK1, CDK12, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2C, CEBPA, CHEK2, CIC, CREBBP, CTNNB1, DICER1, DNMT3A, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, EZH2, FAT1, FBXW7, FGFR1, FGFR3, FLT3, FLT4, FOXA1, FUBP1, GATA3, GNA11, GNAQ, H3F3A, HRAS, IDH1, IDH2, IGF1R, JAK1, JAK2, JAK3, KDM5C, KDM6A, KIT, KMT2C, KMT2D, KRAS, LATS1, LATS2, LZTR1, MAP2K1, MAPK1, MAX, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MTOR, MYB, MYC, MYCL, MYCN, MYD88, NCOR1, NF1, NF2, NFE2L2, NOTCH1, NOTCH2, NRAS, NSD1, NTRK1, PAX5, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, PMS1, PPM1D, PPP6C, PTCH1, PTEN, PTPN11, RHOA, RNF43, ROS1, RUNX1, SERPINB3, SERPINB4, SETBP1, SETD2, SF3B1, SMAD2, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMO, SRSF2, STK11, TAF1B, TCF7L2, TET2, TGFBR1, TP53, TSC1, VHL, WT1.*

Таргетные гены были разделены на следующие подкатегории:

1) Факторы сплайсинга: *SF3B1, SRSF2*;

2) Гены, участвующие в ключевых сигнальных путях: *KRAS, NRAS, HRAS, PTPN11, NF1* и *NF2* – сигнальный путь RAS-MEPK; *PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, AKT1* и *MTOR* – сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR; *RHOA* и *SMO* – сигнальный путь Hedgehog; *PPP6C, NOTCH1, NOTCH2, ABL1, AXIN2, GNA11, GNAQ, LATS1, MYD88, PTCH1*;

3) Транскрипционные факторы: *RUNX1, BCOR, CEBPA, SETBP1, WT1 GATA3, FOXA1, CREBBP, CIC, MAX, MYB, MYC, MYCL, MYCN, NCOR1, NFE2L2, PAX5, SETD2, SMAD2, SMAD4, TAF1B, TCF7L2*;

4) Эпигенетические модификаторы (ответственные за метилирование ДНК и другие модификации хроматина): *ASXL1, DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, KDM5C,*

KDM6A, EZH2, KMT2C, KMT2D, APOBEC3B, ARID2, DICER1, H3F3A, LZTR1, NSD1, RNF43, SMARCA4, SMARCB1;

5) Рецепторные киназы: *FLT3, FLT4, JAK1, JAK2, JAK3, BRAF, PDGFRA, PDGFRB, KIT, FGFR1, FGFR3, EGFR, IGF1R, TGFBR1, MAP2K1, MAPK1, ROS1, MET, ERBB2, ERBB3, ERBB4, BTK, ALK, ACVR1, NTRK1, STK11, CARD11*;

6) Гены, участвующие в репарации ДНК: *BRCA1, BRCA2, CHEK2, ATM, CDK12, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, ATRX, ATR, ASTE1*;

7) Гены – регуляторы клеточного цикла и апоптоза: *BCL2, CASP8, TP53, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2C, CCNB1, CCND1, PPM1D, PTEN*;

8) Другие: *CDH1, ABCB1, AR, B2M, CTNNB1, ESR1, FAT1, FBXW7, FUBP1, PTCH1, SERPINB3, SERPINB4, TSC1, VHL*.

2.4 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакетов для статистического анализа R v.3.0.1 и SPSS Statistics Version 26 (2019), а также программной системы Microsoft Excel for Mac Version 16.74 (23061100) и расширения XLSTAT 2023.1.6 (1410). Для проверки статистических гипотез о виде распределения количественных величин использовался критерий W Шапиро-Уилка. Во всех случаях распределение признаков не соответствовало закону нормального распределения.

Для сравнения долей использовались критерии χ2 Пирсона и χ2 Пирсона с моделированием значений p методом Монте-Карло. При анализе четырехпольных таблиц в случаях малых выборок (значение в одной или нескольких ячейках от 5 до 9), критерий χ2 рассчитывался с поправкой Йейтса. При сравнении медиан значений различных факторов (количество лейкоцитов, тромбоцитов, нейтрофилов, бластных клеток в дебюте заболевания, активность ЛДГ, возраст) в двух группах использовался непараметрический U-тест Манна-Уитни.

С целью определения порогового значения возраста для прогнозирования наличия мутаций в генах эпигенетической регуляции, а порогового значения факторов с целью прогнозирования достижения или недостижения ПР использовался метод характеристических кривых (receiver operator characteristic, ROC-кривых) [14].

В ходе исследования анализировались такие показатели прогноза как вероятность достижения ПР (после первого индукционного курса и в целом, в том числе после двух и более курсов химиотерапии, до этапа алло-ТГСК), вероятность развития раннего (в течении первого полугода) рецидива (РР), ОВ, БРВ и КЧР. Взаимосвязь различных факторов (генетическая группа риска, наличие или отсутствие эпигенетических мутаций и т.д.) с вероятностью достижения ПР была оценена у 119 пациентов из общей когорты. Из анализа исключались пациенты, которым была выбрана паллиативная терапия (9/147), с неадекватной предлеченностью (3/147), умершие на этапе первого индукционного курса (12/147), и с отсутствием полноценного анамнеза о ходе лечения (4/146).

Анализ ОВ и БРВ проводился методом Каплан-Майера. Значимость различий между группами при анализе выживаемости оценивали с помощью логрангового теста. Анализ ОВ проводился среди всех пациентов, которым была инициирована стандартная специфическая химиотерапия (131/147). Событием считалась смерть пациента от любой причины (ранняя летальность, смерть в период ремиссии от любой причины, смерть в период рецидива). Вероятность развития РР и БРВ оценивались среди пациентов, которые получили стандартные режимы терапии и достигли ПР (83/147). Пациенты, длительность наблюдения которых составляла менее 6 месяцев, исключались из анализа вероятности развития РР. Событиями при анализе БРВ считались рецидив и смерть от любой причины. Для сравнительной оценки КЧР в разных группах использовался метод кумулятивной частоты событий (cumulative incidence) с учетом конкурирующих факторов (конкурирующий фактор – смерть от других причин). Сравнительный анализ частоты событий проводили методом Грея. Пациенты, перешедшие на этап алло-ТГСК подвергались цензурированию при оценке ОВ, БРВ и КЧР.

Многофакторный анализ выполнялся с помощью модели пропорциональных интенсивностей Кокса и показателя отношения рисков (OP, HR).

Статистически значимыми считались результаты анализа при значении $p<0,05$. Данное исследование являлось эксплоративным.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Частота определения мутаций в генах эпигенетической регуляции у пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Частота детекции всех исследуемых мутаций в генах эпигенетической регуляции (*IDH1* и *IDH2, DNMT3A, ASXL1*) в общей когорте пациентов составила 35,4% (52/147).

Мутация R882 в гене *DNMT3A* выявлена у 17,7% (26/147) пациентов. У одного пациента данные секвенирования по Сэнгеру оказались сомнительными, в дальнейшем по результатам анализа NGS был обнаружен вариант мутации D286E.

Общая частота выявления мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* (R132 и R140/R172 соответственно) составила 16,3% (24/147). Мутация R140 гена *IDH2* была выявлена у 9,5% (14/147), R172 – у 1,2% (1/84). У девяти пациентов (6,1%) была обнаружена мутация R132 в гене *IDH1*. Следует отметить, что у одной пациентки методом ddPCR был обнаружен минорный опухолевой клон, несущий мутацию R140 в гене *IDH2*, в то время как по данным секвенирования по Сэнгеру ген имел дикий тип. Ни у одного пациента не было зафиксировано одновременной детекции мутаций в обоих генах *IDH1* и *IDH2*.

Частота мутации в 12 экзоне гена *ASXL1* среди пациентов с впервые выявленным ОМЛ составила 9,6% (14/147) (рисунок 10).

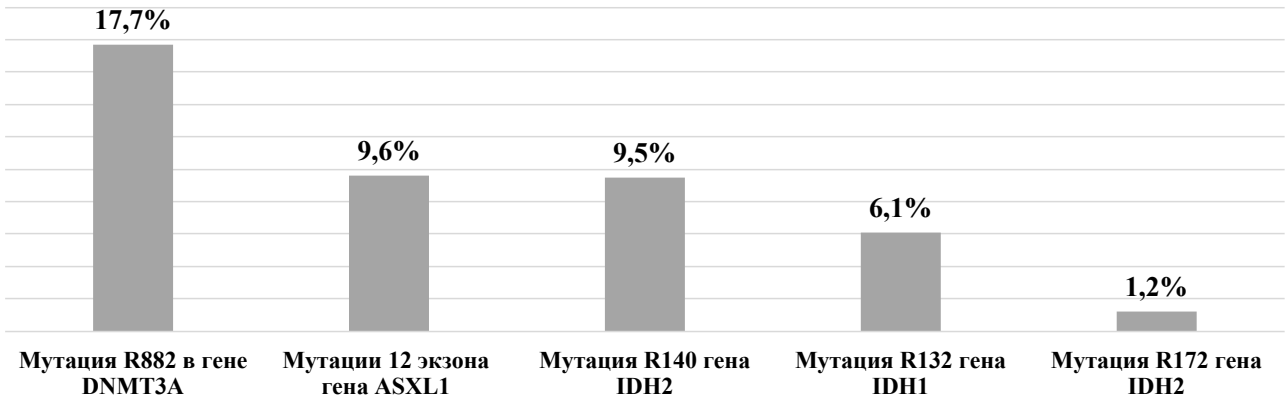

Рисунок 10 – Частота детекции мутаций в генах эпигенетической регуляции среди пациентов с впервые выявленным ОМЛ

У 11 пациентов (7,5%) наблюдалась одновременная детекция нескольких эпигенетических мутаций. Более чем в половине случаев было обнаружено сочетание мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутацией R140 в гене *IDH2* (54,5%, 6/11). У одной пациентки данные мутации сочетались с мутированным статусом гена *ASXL1*. Другими детектируемыми комбинациями эпигенетических мутаций были *ASXL1* + *IDH1* (R132), *ASXL1* + *IDH2* (R140), *ASXL1* + *DNMT3A* (R882) и *DNMT3A* (R882) + *IDH1* (R132).

В общей когорте трансформация из предшествующего МДС, или исход МПН или ХММЛ в ОМЛ наблюдались у 14,4% (33/130) пациентов. Первичный ОМЛ верифицирован у 74,6% (97/130), у остальных пациентов данная информация не была представлена в первичной медицинской документации. Следует отметить, что частота верификации вторичного ОМЛ (как трансформация МДС или исход МПН/ХММЛ) коррелировала с возрастом: медиана 57 (31-84) лет против 46,5 (18-82) лет в группе пациентов с первичным ОМЛ ($p=0,039$). Мутации в генах эпигенетической регуляции встречались одинаково часто как у пациентов с первичным ОМЛ, так и при ОМЛ вследствие прогрессирования МДС или как исхода МПН/ХММЛ ($p>0,05$).

3.2 Частота детекции мутаций в генах эпигенетической регуляции у пациентов различных регионов РФ

Среди 14 проанализированных образцов, полученных из БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница» (г. Вологда), у семи были выявлены мутации эпигенетических модификаторов (50%), преимущественно генов *IDH1/2*. Мутации R132 и R140 в генах *IDH1* и *IDH2* также часто детектировались у пациентов, проживающих на территории Ленинградской области и проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». В группе пациентов ГБУЗ «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (г. Ставрополь) чаще других обнаруживалась мутация R882 гена *DNMT3A*, а среди пациентов ГАУЗ «Республиканская клиническая

больница им. Н.А. Семашко» (Республика Бурятия) – мутации 12 экзона гена *ASXL1* (таблица 5).

Таблица 5 – Детекция мутаций в генах эпигенетической регуляции по результатам анализа полученных образцов костного мозга пациентов с впервые выявленным ОМЛ из различных регионов Российской Федерации

ЛПУ (количество образцов)	Мутации генов *IDH1* и *IDH2*, (n)	Мутация R882 в гене *DNMT3A*, (n)	Мутации 12 экзона гена *ASXL1*, (n)
ГБУЗ «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (n=25)	8% (2/25)	**20%** (5/25)	0% (0/25)
ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер №1» (n=16)	6,25% (1/16)	6,25% (1/16)	6,25% (1/16)
БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница» (n=14)	**28,6%** (4/14)	14,3% (2/14)	14,3% (2/14)
ГАУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко» (n=19)	15,8% (3/19)	15,8% (3/19)	**21%** (4/19)
ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» (n=21)	**28,6%** (6/21)	14,3% (3/21)	4,8% (1/21)

У части пациентов также были выявлены комбинации нескольких мутаций. Наиболее часто детектировались различные сочетания мутации R140 в гене *IDH2* с другими мутациями, в частности R882 в гене *DNMT3A* и мутациями 12 экзона гена *ASXL1*. У одного пациента из Республики Бурятия было одновременно обнаружено три мутации: R140 в гене *IDH2*, R882 в гене *DNMT3A* и мутация гена *ASXL1*. Перечень детектируемых мутаций и их комбинаций у пациентов различных региональных ЛПУ РФ представлен на рисунке 11.

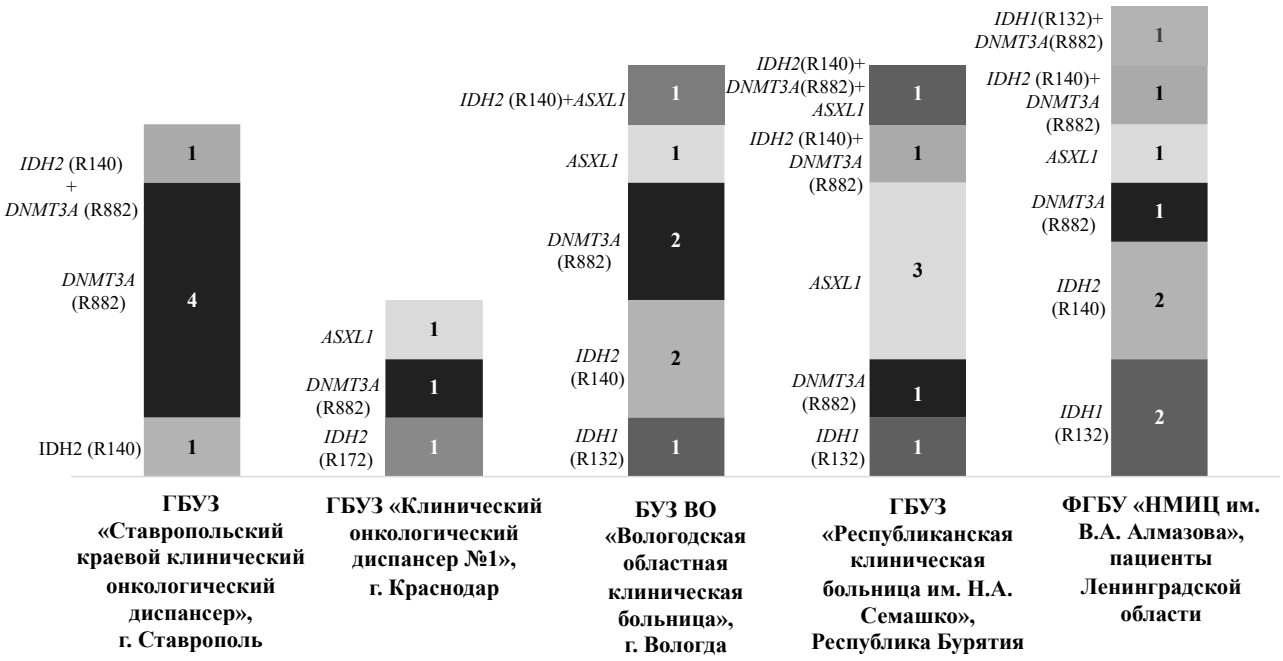

Рисунок 11 – Спектр выявляемых мутаций в генах эпигенетической регуляции и их сочетаний друг с другом у пациентов с впервые выявленным ОМЛ, проходивших обследование и лечение в различных ЛПУ РФ

3.3 Возрастные и гендерные характеристики пациентов с мутациями генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1*

Медиана возраста пациентов с любыми мутациями в генах эпигенетической регуляции составила 53 года (от 24 до 84 лет) и статистически значимо не отличалась от медианы возраста пациентов без мутаций (50 лет (от 18 до 90 лет), $p>0,05$).

Частота детекции мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140/R172) была выше у пациентов старше 55 лет (23,8% против 9,9% в группе больных, моложе 55 лет, $p=0,024$). Степень статистической значимости возрастала при исключении из анализа пациентов с мутацией R132 в гене *IDH1* и оценке группы пациентов с изолированной мутацией R140 в гене *IDH2* (19% против 2,5%, $p<0,001$). При сравнительном анализе с использованием критерия Манна-Уитни также была продемонстрирована взаимосвязь мутаций в генах *IDH1/2* (и, в частности, мутации

R140 в гене *IDH2*) с более высоко медианой возраста пациентов. Мутации в генах *DNMT3A* и *ASXL1*, однако, встречались одинаково часто во всех возрастных группах (p>0,05) (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительная оценка медиан возраста пациентов в группах с определяемыми мутациями в генах эпигенетической регуляции и с диким типом этих генов

Мутационный статус гена	**Медиана возраста, лет (диапазон)**	**p**
IDH1/2 дикий тип	50 (18-90)	**0,046**
IDH1/2 R132/R140	57,5 (32-84)	
IDH1 дикий тип	51 (18-90)	0,692
IDH1 R132	51 (39-84)	
IDH2 дикий тип	50 (18-90)	**0,013**
IDH2 R140	61 (40-74)	
DNMT3A дикий тип	51 (18-90)	0,803
DNMT3A R882	50 (24-71)	
ASXL1 дикий тип	51 (18-90)	0,122
Мутация в 12 экзоне *ASXL1*	51 (29-75)	

С целью определения статистически значимого порогового значения возраста был проведен ROC-анализ. Вероятность обнаружения мутаций в гене *IDH1* (R132) и в гене *IDH2* (R140/R172) была статистически значимо выше в группе пациентов старше 56,5 лет (порог отсечения, ПО) (p=0,048; чувствительность – 70%, специфичность – 66%). Площадь под кривой (AUC) составила 0,711 (95% ДИ 0,618-0,804), что соответствует хорошему качеству модели. Мутация R140 гена *IDH2* имела более значимую корреляцию с возрастом: AUC составила 0,810 ([95% ДИ 0,736-0,885]; очень хорошее качество модели), при пороге отсечения 59 лет чувствительность достигла 85%, а специфичность – 71% (p=0,038) (рисунок 12).

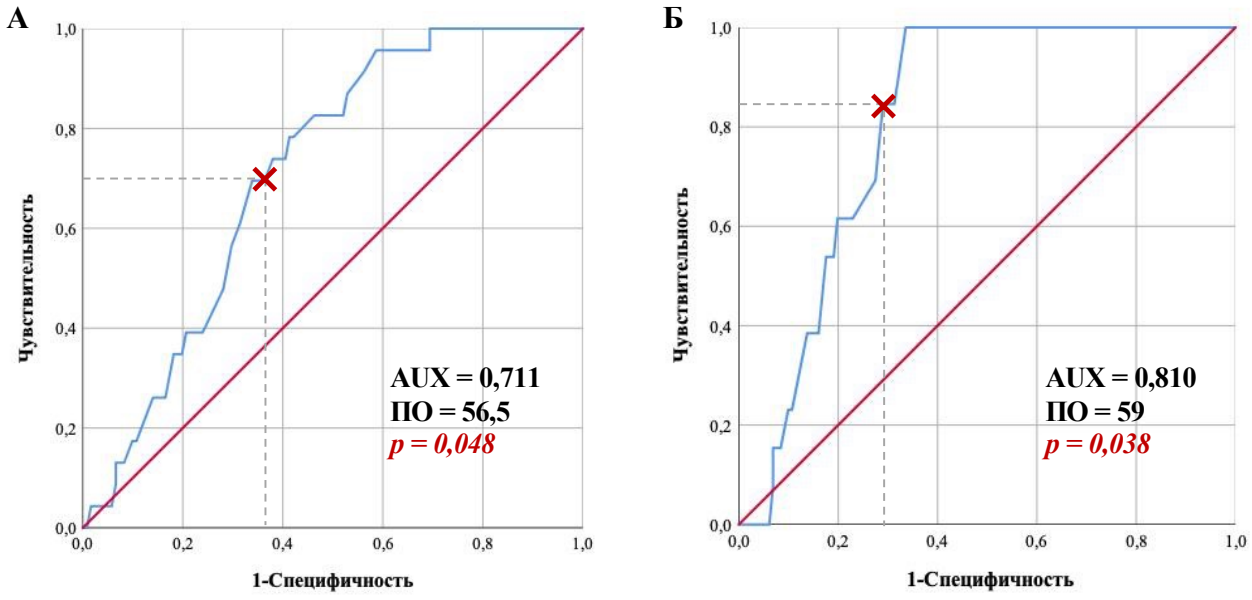

Рисунок 12 – ROC-кривые для модели прогнозирования наличия мутаций R132, R140/R172 генов *IDH1* и *IDH2* (А) и мутации R140 гена *IDH2* (Б) у пациентов с впервые выявленным ОМЛ разного возраста

Было выявлено, что частота встречаемости мутаций в генах *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1* статистически значимо не отличалась у пациентов разного пола (p>0,05) (таблица 7).

Таблица 7 – Гендерные характеристики пациентов с мутациями в генах эпигенетической регуляции

Мутации	**Мужчины (n) : Женщины (n)**
R132/R140 в генах *IDH1/2*	12:12
R882 в гене *DNMT3A*	16:10
Мутации 12 экзона гена *ASXL1*	7:7

Эпигенетические мутации встречались одинаково часто в группах пациентов с первичным ОМЛ и трансформацией из предшествующего МДС, МПН, МДС/МПН (p>0,05).

3.4 Ассоциация мутаций генов *IDH1, IDH2, DNMT3A* и *ASXL1* с лабораторно-гематологическими характеристиками пациентов в дебюте заболевания

Мутации генов IDH1 и IDH2. Для пациентов с мутированным типом генов *IDH1/2* были характерны более высокая медиана уровня тромбоцитов (p=0,006), и, в то же время, низкая медиана уровня лейкоцитов (p=0,043), нейтрофилов (p=0,008) и активности общей ЛДГ (p=0,008) в дебюте заболевания. Более высокая медиана уровня тромбоцитов была характерна, в частности, для пациентов с мутацией R140 в гене *IDH2* (p=0,006), а более низкое абсолютное число нейтрофилов – для пациентов с мутацией R132 в гене *IDH1* (p=0,02). Кроме того, отмечалась тенденция к более высокому уровню бластных клеток в костном мозге у пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2*, по сравнению с группой пациентов без мутаций (медиана 80% против 57%, p=0,062) (таблица 8).

Таблица 8 – Ассоциации мутационного статуса генов *IDH1/2* с данными лабораторных исследований, выполненных в дебюте заболевания

Характеристика	*IDH1/2* ДТ	*IDH1/2* М	p	*IDH1* ДТ	*IDH1* R132	p	*IDH2* ДТ	*IDH2* R140	p
Уровень тромбоцитов в дебюте, x10^9									
Медиана	45	83	**0,006**	51	56,5	0,728	47	102	**0,006**
Диапазон	2-369	9-354		2-369	9-202		2-369	26-354	
Уровень лейкоцитов в дебюте, x10^9									
Медиана	29	5,3	**0,043**	22,9	16,6	0,676	26	3,3	0,123
Диапазон	0,2-516	1,5-165		0,2-516	1,5-165		0,2-516	1,6-165	
Абсолютное число нейтрофилов в дебюте, x10^9									
Медиана	2,4	0,5	**0,008**	1,9	0,3	**0,02**	1,9	1	0,154
Диапазон	0-68	0-10		0-68	0-1,8		0-68	0-10	
Уровень бластных клеток в КМ, %									
Медиана	57	80	0,062	57	87	0,055	60	64	0,735
Диапазон	12-98	23-98		12-95	40-98		12-98	23-95	

Продолжение таблицы 8

Характеристика	*IDH1/2* ДТ	*IDH1/2* М	p	*IDH1* ДТ	*IDH1* R132	p	*IDH2* ДТ	*IDH2* R140	p
Уровень бластных клеток в ПК, %									
Медиана	49	45	0,806	44,5	75	0,241	50,5	29	0,722
Диапазон	0-98	0-96		0-98	12-96		0-98	0-91	
Активность общей ЛДГ крови, Ед/л									
Медиана	527	285	**0,007**	505	283,5	0,214	521,5	331	0,063
Диапазон	115-3943	193-978		115-3943	209-978		115-3943	193-661	

Примечание: ДТ – дикий тип генов, КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь

Мутации генов DNMT3A и ASXL1. Мутированный статус гена *DNMT3A* не имел строгой ассоциации с уровнем тромбоцитов, лейкоцитов, нейтрофилов и ЛДГ у пациентов с впервые выявленным ОМЛ. Статистически значимым различием в лабораторных данных пациентов в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A* был уровень бластных клеток в миелограмме: в группе пациентов с мутацией R882 медиана составила 78%, а в группе пациентов с диким типом гена – 56% (p=0,048).

У пациентов с мутациями 12 экзона гена *ASXL1* не было обнаружено значимых различий в показателях гемограммы, миелограммы и уровне ЛДГ, по сравнению с пациентами с диким типом гена *ASXL1* (таблица 9).

Таблица 9 – Ассоциации мутационного статуса генов *DNMT3A* и *ASXL1* с данными лабораторных исследований, выполненных в дебюте заболевания

Характеристика	***DNMT3A* ДТ**	***DNMT3A* R882**	**p**	***ASXL1* ДТ**	***ASXL1* М**	**p**
Медиана уровня тромбоцитов в дебюте, x10^9 (диапазон)	46 (2-369)	68 (7-260)	0,301	56 (2-369)	37,5 (6-106)	0,072
Медиана уровня лейкоцитов в дебюте, x10^9 (диапазон)	19,1 (0,2-516)	38,9 (0,9-469)	0,368	19,6 (0,2-516)	38,3 (2-123)	0,662
Медиана уровня нейтрофилов в дебюте, x10^9 (диапазон)	1,6 (0-68)	2,75 (0-15)	0,491	1,6 (0-68)	3,4 (0-18)	0,586

Продолжение таблицы 9

Характеристика	***DNMT3A* ДТ**	***DNMT3A* R882**	**p**	***ASXL1* ДТ**	***ASXL1* M**	**p**
Медиана количества бластных клеток в ПК, % (диапазон)	40 (0-98)	55 (0-95)	0,084	40 (0-98)	63 (0-95)	0,384
Активность общей ЛДГ крови, Ед/л (диапазон)	459 (115-3943)	527 (210-2499)	0,685	453,5 (115-3934)	679 (168-2351)	0,353

Примечание: ДТ – дикий тип генов, *ASXL1* M – мутации 12 экзона гена *ASXL1*, КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь

3.5 Особенности морфологии и иммунофенотипа бластных клеток с мутированным статусом генов *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1*

Статистически значимой взаимосвязи между морфологическим вариантом ОМЛ (FAB) и частотой детекции тех или иных мутаций в генах эпигенетической регуляции выявлено не было (p>0,05). На рисунке 13 представлен спектр определяемых мутаций в разных морфологических подтипах ОМЛ.

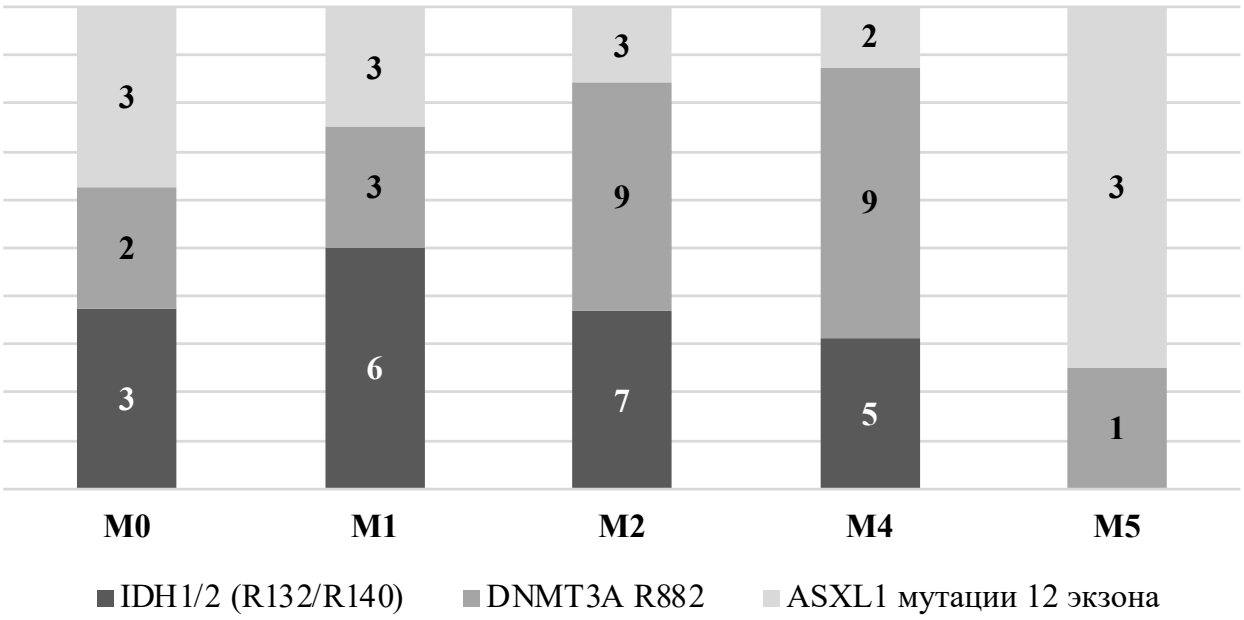

Рисунок 13 – Детекция мутаций в генах *IDH1/2, DNMT3A* и *ASXL1* при различных морфологических вариантах ОМЛ

По результатам анализа результатов проточной цитофлуориметрии, частота экспрессии бластными клетками, несущими те или иные мутации в генах-эпигенетических модификаторах, миелоидных маркеров (CD33 – 87,8% (43/49), CD13 – 93,9% (46/49), цитоплазматическая MPO – 77,3% (34/44)) и маркеров клеток-предшественников CD117 (87,5% (42/48)) и HLA-DR (78,4% (29/37)) статистически значимо не отличалась от данных по когорте с диким типом генов *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1* (p>0,05).

Частота обнаружения экспрессии бластными клетками маркеров созревания и антигенов моноцитарного ряда была также равнозначной вне зависимости от мутационного статуса исследуемых генов (при обнаружении мутаций частота экспрессии CD64 составила 56,8% (25/44), CD14 – 19,6% (9/46), CD4 – 48,5% (15/39), CD38 – 96,9% (31/32), CD11c – 81,8% (27/33)), а в случаях с диким типом генов – 43,8% (35/80), 17,6% (15/85), 50,7% (34/67), 96,3% (79/82) и 81,5% (53/65) соответственно).

Было выявлено, что потеря экспрессии маркера CD34 статистически значимо чаще наблюдается при наличии мутаций в генах *IDH1/2* (54,1% (13/24) против 30,1% (34/113), p=0,025). Аберрантная экспрессия антигена CD56 чаще обнаруживалась у пациентов с мутированным статусом гена *ASXL1* (63,6% (7/11) против 23,4% (22/94), p=0,005) (рисунок 14).

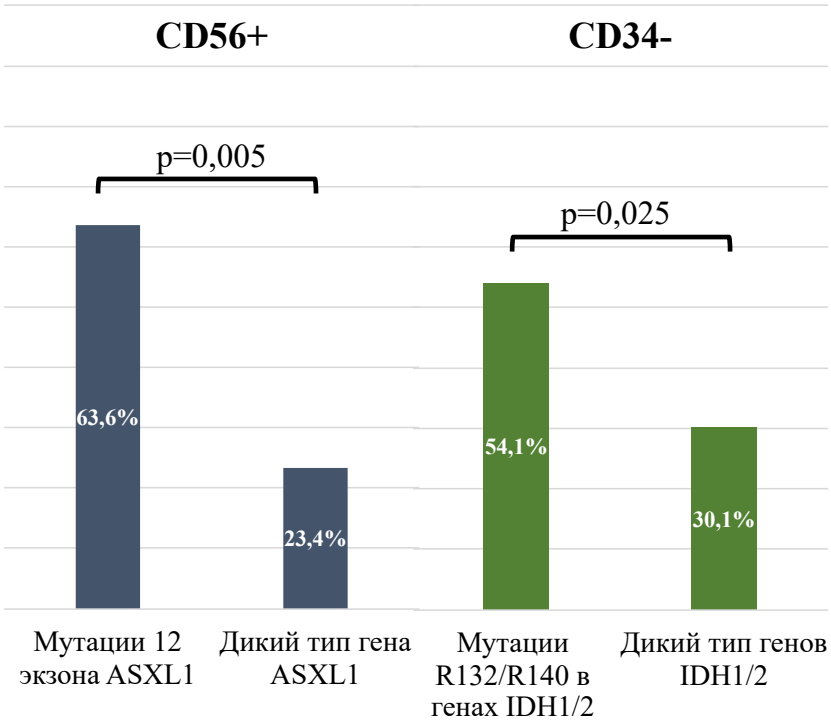

Рисунок 14 – Различия в частоте обнаружения экспрессии маркера CD56 в зависимости от мутационного статуса гена *ASXL1* и частоте потери экспрессии маркера CD34 в зависимости от мутационного статуса генов *IDH1/2*

Частота аберрантной коэкспрессии В-линейного маркера CD19 среди пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2, DNMT3A* или *ASXL1* составила 9,8% (4/41) и была сопоставимой с группой пациентов с диким типом этих генов (12,5% (9/72), p>0,05).

3.6 Ассоциация мутаций в генах эпигенетической регуляции с рутинно определяемыми цитогенетическими и молекулярными аномалиями

Мутации генов IDH1 и IDH2. Наблюдалось увеличение частоты обнаружения мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140 и R172) среди пациентов благоприятной группы генетического риска (ELN-2022) (30% против 12,8%, p=0,029). В частности, стоит отметить, что мутации в гене *IDH2* также ассоциировались с благоприятными генетическими аномалиями (23,3% против 7,4%, p=0,017), в то время как мутация R132 в гене *IDH1* встречалась одинаково часто во всех прогностических категориях (p>0,05) (таблица 10, рисунок 15).

Таблица 10 – Частота обнаружения мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* среди пациентов различных групп генетического риска (ELN-2022)

Мутации	Благоприятная (n=30)	Промежуточная и неблагоприятная (n=94)	p
IDH1/IDH2 (n=21)	**30%** (9/30)	**12,8%** (12/94)	**0,029**
IDH1 R132 (n=7)	6,7% (2/30)	5,3% (5/94)	0,781
IDH2 R140/R172 (n=14)	**23,3%** (7/30)	**7,4%** (7/94)	**0,017**

Среди пациентов неизвестной цитогенетической группы риска частота детекции мутации R132 в гене *IDH1* составила 8,7% (2/23), мутации R140 в гене *IDH2* – 4,3% (1/23).

Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* (R132 и R140) статистически значимо чаще встречались среди пациентов с нормальным кариотипом (26,8% против 7,5%, p=0,009). Была также выявлена ассоциация вышеперечисленных мутаций с мутированным статусом гена *NPM1* (31,3% против 11,7%, p=0,015) и мутацией R882 в гене *DNMT3A* (30,8% против 12,4%, p=0,02). Статистически значимой взаимосвязи мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* с мутациями гена *FLT3* (ITD и TKD) и 12 экзона гена *ASXL1* выявлено не было (p>0,05) (таблица 11).

Таблица 11 – Ассоциации мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) с нормальным кариотипом, мутациями в гене *NPM1*, R882 в гене *DNMT3A* и ITD в гене *FLT3*

Сочетания	**Мутации в генах *IDH1* (R132) или *IDH2* (R140)**	**Дикий тип генов *IDH1* и *IDH2***	**p**
Нормальный кариотип (n=56)	**26,8%** (15/56)	73,2% (41/56)	**0,009**
Патологический кариотип (n=53)	**7,5%** (4/53)	92,5% (49/53)	
Мутации в гене *NPM1* (n=32)	**31,3%** (10/32)	68,7% (22/32)	**0,015**
Дикий тип *NPM1* (n=77)	**11,7%** (9/77)	88,3% (68/77)	

Продолжение таблицы 11

Сочетания	**Мутации в генах *IDH1* (R132) или *IDH2* (R140)**	**Дикий тип генов *IDH1* и *IDH2***	**p**
Мутация R882 в гене *DNMT3A* (n=26)	**30,8%** (8/26)	69,2% (18/26)	**0,02**
Дикий тип *DNMT3A* (n=121)	**12,4%** (15/121)	87,6% (106/121)	
FLT3-ITD (n=37)	8,1% (3/37)	91,9% (34/37)	0,14
Дикий тип *FLT3* (n=109)	18,3% (20/109)	81,7% (89/109)	

Вариант мутации R172 в гене *IDH2* был выявлен у одного пациента, при этом наблюдалось сочетание с нормальным кариотипом и мутированным статусом генов *NPM1* и *ASXL1*.

Мутации в генах DNMT3A и ASXL1. Мутация R882 в гене *DNMT3A* встречалась одинаково часто во всех группах генетического риска ELN-2022 (p>0,05) (рисунок 15).

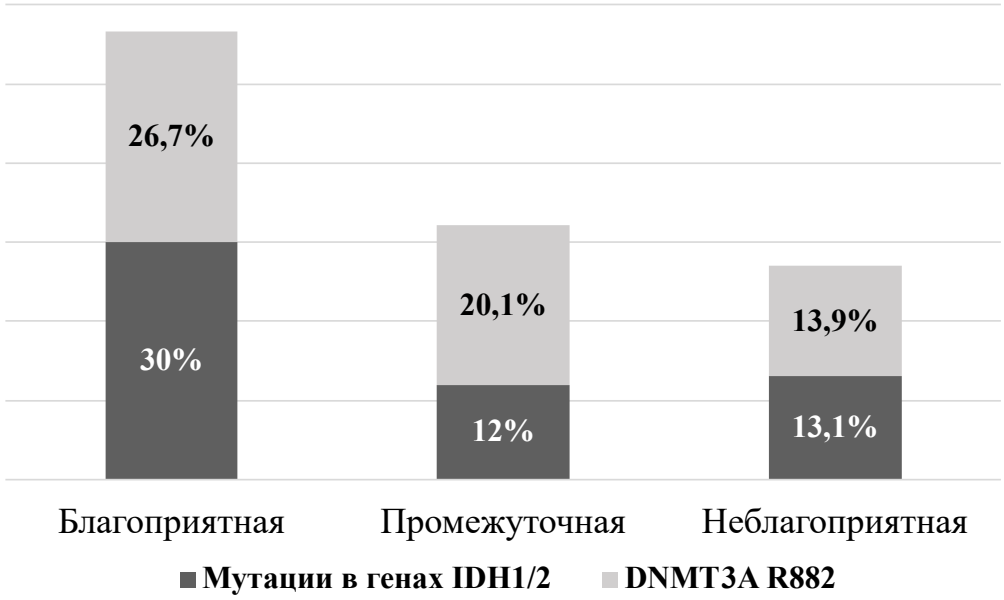

Рисунок 15 – Частота детекции мутаций в генах *IDH1/2* и *DNMT3A* среди пациентов с впервые выявленным ОМЛ различных генетических групп риска (ELN-2022)

В категории пациентов неизвестного цитогенетического риска частота встречаемости данной мутации составила 4,3% (1/23). Прослеживалась тенденция к увеличению частоты определения мутации R882 в группе пациентов с нормальным кариотипом (26,8% (15/56) против 17% (9/53)), однако данное наблюдение не было статистически значимым (p>0,05).

Отмечалась строгая взаимосвязь мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутациями в гене *NPM1*: частота её детекции среди пациентов с мутированным статусом *NPM1* составила 40,6% (13/32), а в группе с диким типом *NPM1* – 13% (10/77) (p=0,002). Также, как было упомянуто выше, мутация R882 в гене *DNMT3A* сочеталась с мутированным типом генов *IDH1* и *IDH2* (p=0,02). Корреляций мутационного статуса гена *DNMT3A* с мутациями в генах *FLT3* и *ASXL1* выявлено не было (p>0,05).

Существенных различий по частоте встречаемости мутаций в гене *ASXL1* среди пациентов с нормальным и патологическим кариотипом выявлено не было (5,5% (3/55) и 13,5% (7/52) соответственно, p>0,05). Однако в группе пациентов с t(8;21)(q22;q22) (*RUNX1-RUNX1T1*) мутации в гене *ASXL1* детектировались статистически значимо чаще (36,4% (4/11) против 7,5% (7/94) в группе без t(8;21)(q22;q22), p=0,004). Мутированный статус *ASXL1* не имел ассоциации с мутациями в генах *NPM1, IDH1/2, DNMT3A* и *FLT3* (p>0,05).

3.7 Анализ результатов секвенирования нового поколения

По данным NGS-исследования во всех проанализированных образцах (n=18) были обнаружены дополнительные однонуклеотидные замены в генах различных функциональных категорий. Большинство пациентов, которым было выполнено NGS, несло мутацию R882 в гене *DNMT3A* (66,7% (12/18), у одного из которых была также выявлена сопутствующая мутация R140 в гене *IDH2*. Медиана числа мутированных генов на один проанализированный образец составила 8 (от 4 до 43), при этом у большинства пациентов (66,7% (12/18)) количество обнаруженных мутаций варьировалось от 5 до 10. Подробная информация (кариотип,

молекулярный профиль, тактика проводимой терапии и исход) по отдельным пациентам, которым было выполнено высокопроизводительное секвенирование, представлена в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристики пациентов, которым было проведено секвенирование нового поколения

Пациент, пол, возраст	**Карио-тип**	**Мутации генов (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру)**	**Гены с детектируемыми SNVs методом NGS**	**Характер проводимой терапии**	**Исход (причина смерти), период наблюдения (мес)**
1. АПМ Ж, 39	46, XX, inv(3) (3q26)	R882 (*DNMT3A*), *NPM1B*	*NRAS, VHL, NF1, CEBPA*	«7+3» → «HiDAC» → «ГМА+Вен» → ПР → алло-ТГСК	Жива, 27,8
2. АСП М, 47	46, XY	R132 (*IDH1*)	*PIK3CA, KIT, ROS1, ABCB4, KRAS, AKT1, NF1, ERBB2, LZTR1, AR, ATRX*	«7+3» → «FLAG» → ПР → алло-ТГСК	Жив, 9,2
3. ААН М, 69	46, XY	R140 (*IDH2*), *NPM1A*	*ALK, SETD2, ESR1, BRAF, KMT2C, KMT2D, BRCA2, AKT1, TP53, SRSF2, AKT2*	«7+3» → ПР → «HiDAC» → монотерапия ГМА	Жив, 8,1
4. БОН Ж, 40	46, XX	R140 (*IDH2*), R882 (*DNMT3A*), *NPM1A*	*NRAS, ESR1, KMT2C, BRCA2, CHEK2*	«7+3»	Умерла (инфекционные осложнения), 0,8
5. ВСВ М, 61	46, XY	R140 (*IDH2*), *NPM1A*	*FAT1, SMO, KMT2C*	Монотерапия МДЦ №11	Жив, 19
6. КЛН Ж, 62	46, XX, del(11) (q23)	R882 (*DNMT3A*)	*TET2, BRCA2, NF1*	«7+3» → ПР → «HiDAC» №3	Умерла (прогрессия ОМЛ), 24,7
7. КЕА М, 64	н/д	экзон 12 *ASXL1*, *FLT3*-TKD, *NPM1A*	*NOTCH2, MSH6, FBXO11, MLH1, FLT3, DICER1, BRCA1*	«7+3»	Умер (COVID-инфекция), 0,8
8. КВП Ж, 61	н/д	R882 (*DNMT3A*), *FLT3*-ITD	*KMT2C, ATM, BRCA2*	Не проводилась	Умерла (геморраги-ческие осложнения), 0,1

Продолжение таблицы 12

Пациент, пол, возраст	**Карио-тип**	**Мутации генов (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру)**	**Гены с детектируемыми SNVs методом NGS**	**Характер проводимой терапии**	**Исход (причина смерти), период наблюдения (мес)**
9. МЕВ Ж, 53	н/д	R882 (*DNMT3A*)	*NRAS, MSH6, FBXO11, GATA2, ROS1, FGFR1, PTEN, WT1, BRCA2, LZTR1*	«7+3» №2	Умерла (прогрессия ОМЛ), 3,7
10. НБВ М, 67	46, XY	R882 (*DNMT3A*)	*KMT2C, NOTCH1, ERBB2, SRSF2, RUNX1, KDM6A*	«ГМА+Вен»	Жив, 13,2
11. РНФ Ж, 52	46, XX	экзон 12 *ASXL1*	Множественные SNVs в 83-х таргетных генах, включая *TP53, KIT, NOTCH1/2, NRAS, KRAS, WT1, NF1, KMT2C/D, ROS1*	«ГМА+Вен» №1 → ПР → «ГМА+Вен» №2 → РР → «FLAG-Mito» → алло-ТГСК	Умерла (инфекционные осложнения), 7,6
12. СНМ Ж, 65	46, XX	R882 (*DNMT3A*), *NPM1A*	*NRAS, MSH6, FBXO11, EGFR, ARID2*	«7+3» №1 → ПР → «7+3» №2, 3 → монотерапия ГМА №5 → РР	Умерла (прогрессия ОМЛ), 23,6
13. СИИ Ж, 34	КК	R882 (*DNMT3A*)	*NRAS, PTEN, WT1, PTCH1*	«FLAG-Ida» → ПР → «ГМА+ Вен» → алло-ТГСК	Жива, 16,1
14. ТПБ М, 50	46, XY	R882 (*DNMT3A*), *NPM1A, FLT3*-ITD	*MLH1, ROS1, ESR1, PTPN11, BRCA2, CREBBP, SMARCA4, LZTR1, CHEK2*	«7+3+Мидостаурин» → ПР → «HiDAC+ Мидостаурин» №3» → РР → «ГМА+Вен» → ПР №2 → алло-ТГСК → РР	Умер (прогрессия ОМЛ), 16,4
15. ТАА М, 46	46, XY	R882 (*DNMT3A*), *NPM1A*, *FLT3*-ITD	*MSH6, FBXO11, ATR, ROS1, MET, ATM, TP53, NF1*	«7+3» → «FLAG» → ПР → «HiDAC» → РР → «CLAG-M» → алло-ТГСК	Умер (инфекционные осложнения), 6,3
16. УНН Ж, 64	46, XX	R882 (*DNMT3A*), *NPM1A*, *FLT3*-ITD	*VHL, KIT, ESR1, PTEN, ATM, PTPN11, BRCA2, IGF1R, CREBBP, NF1, AKT2*	«МДЦ + Мидостаурин» №4	Жива, 5,9

Продолжение таблицы 12

Пациент, пол, возраст	**Карио-тип**	**Мутации генов (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру)**	**Гены с детектируемыми SNVs методом NGS**	**Характер проводимой терапии**	**Исход (причина смерти), период наблюдения (мес)**
17. ЧЛИ Ж, 57	46, XX, t(2;15) (q13;q26)	R882 (*DNMT3A*), *NPM1A*, *FLT3*-ITD, *FLT3*-TKD	*KMT2C, NOTCH1, ERBB2, SETBP1*	«7+3» №2 → ПР → «HiDAC» → РР → «FLAG»	Умерла (прогрессия ОМЛ), 10,7
18. ЯРФ М, 44	46, XY, inv(16) (p13;q22)	экзон 12 *ASXL1*	*NRAS, VHL, KIT, PTEN, ATM, KRAS, ARID2, CREBBP, NF1, LZTR1*	«ГМА+Вен» → ПР → «ГМА+Вен»	Умер, 3,5 (инфекционные осложнения)

Примечание: М – мужской пол, Ж – женский пол, КК – комплексный кариотип, н/д – нет данных, ПР – достижение полной ремиссии, РР – развитие раннего рецидива, Вен – венетоклакс.

Суммарно результаты NGS пациентов с полным перечнем мутированных генов, распределенных по функциональным категориям представлены на рисунке 16.

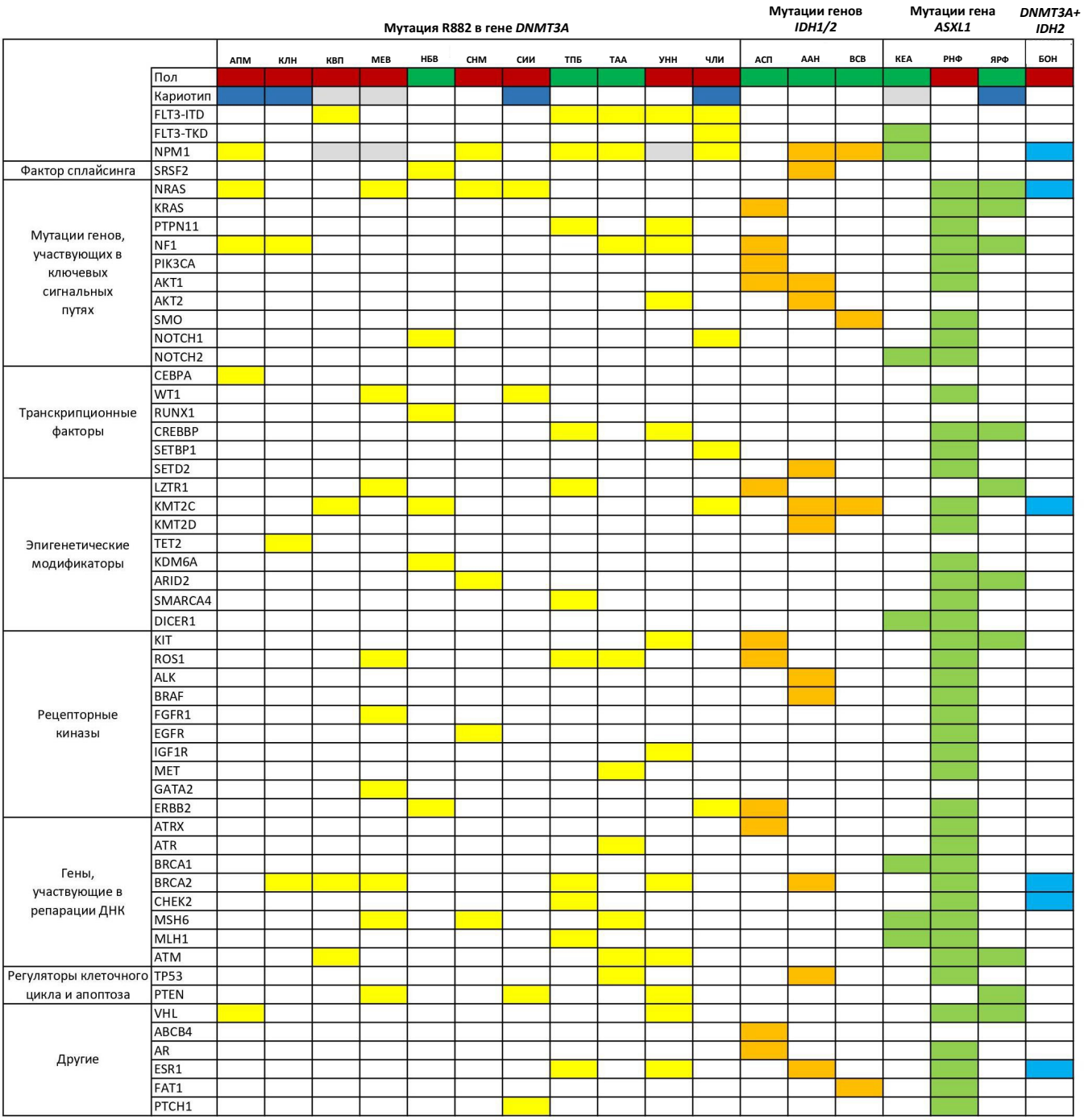

Рисунок 16 – Спектр сопутствующих генных мутаций у отдельных пациентов с мутированным статусом генов эпигенетической регуляции с распределением по функциональным категориям (каждый столбец соответствует отдельному биообразцу)

Большинство сопутствующих мутаций затрагивало гены, вовлеченные в регуляцию различных сигнальных путей (20,3%), репарацию ДНК (18%) и кодирующие рецепторные киназы (15,6%). Реже мутированными оказались гены,

кодирующие факторы транскрипции (7,8%), эпигенетические модификаторы (13,8%) и гены-регуляторы клеточного цикла и апоптоза (13,8%) (рисунок 17). Фактор сплайсинга *SRSF2* оказался мутированным у двух пациентов.

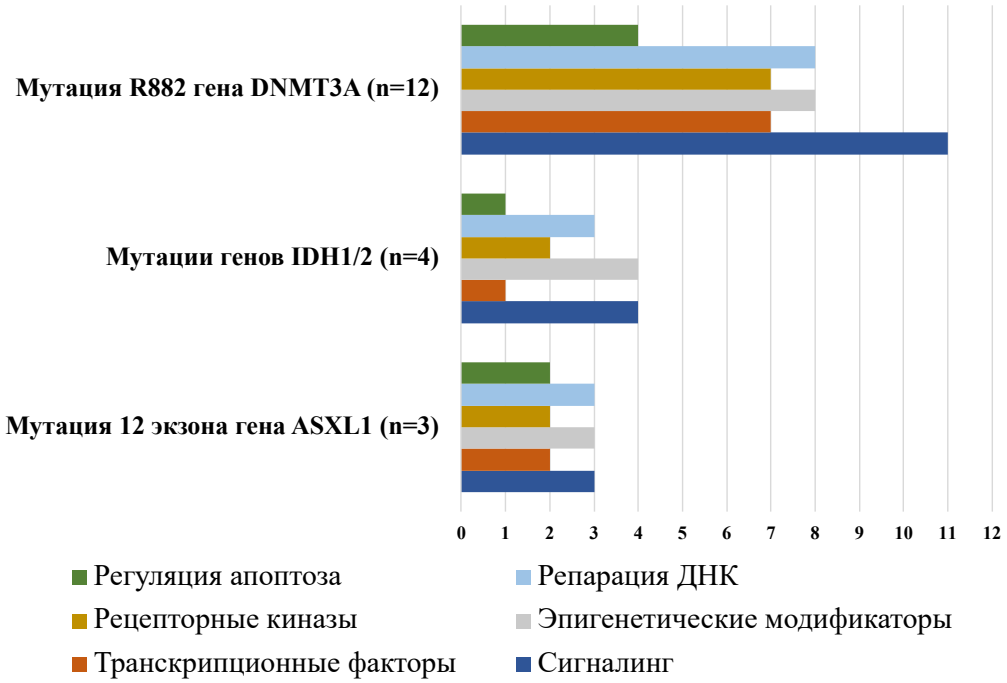

Рисунок 17 – Функциональные категории генов, мутированных в группе пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутациями в генах *DNMT3A, IDH1/2, ASXL1*

Наиболее часто у пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции мутированными оказывались следующие гены: *NRAS/KRAS* – 44,4% (8/18), *NF1* – 38,9% (7/18), *KMT2C/D* – 38,9% (7/18), *ROS1* – 27,8% (5/18), *MSH6* – 27,8% (5/18), *ATM* – 27,8% (5/18) (рисунок 18).

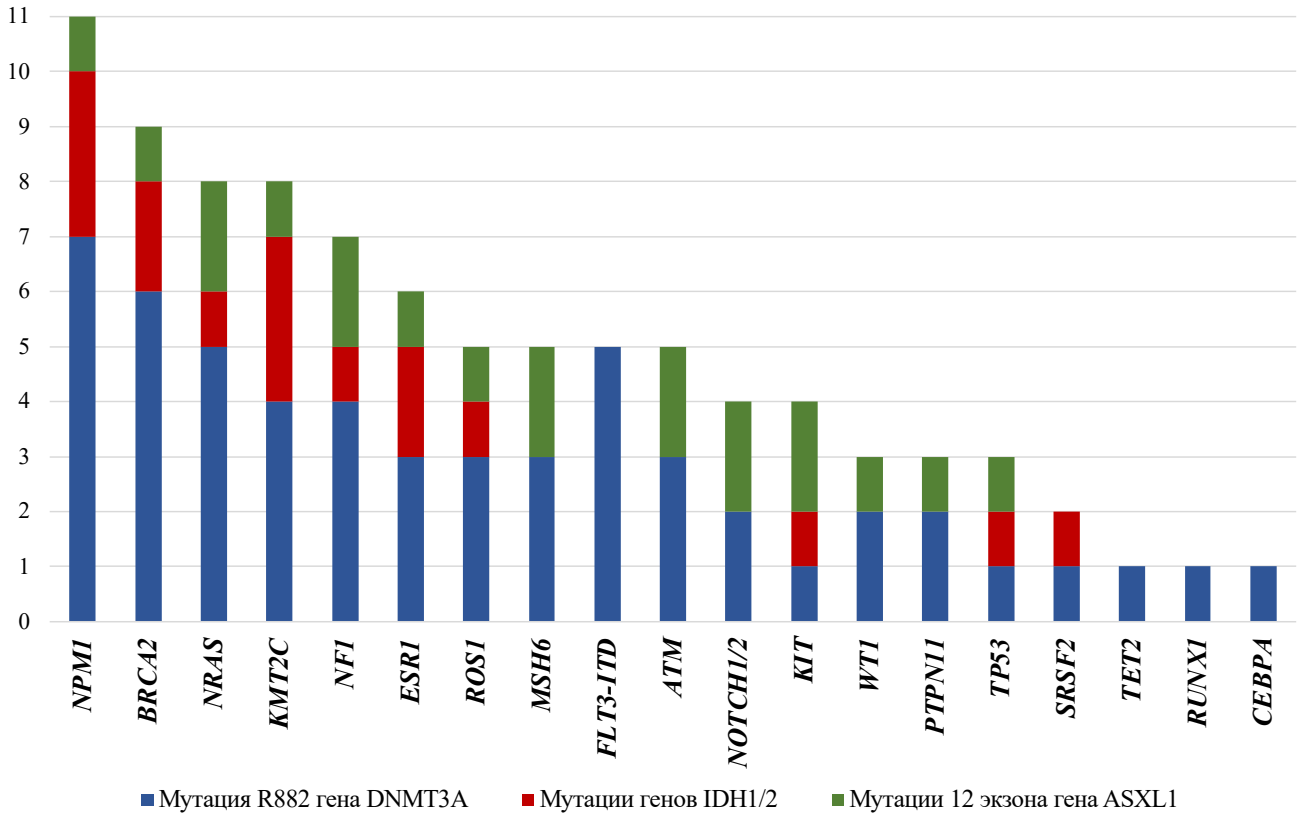

Рисунок 18 – Профиль сопутствующих мутаций в генах различных функциональных категорий, выявляемых у пациентов с впервые диагностированным ОМЛ и мутациями генов эпигенетической регуляции

3.8 Прогностическая роль сопутствующих мутаций, выявленных по результатам NGS-исследования

Увеличение мутационного бремени оказывало негативное прогностическое влияние. Порогом отсечения для прогнозирования недостижения ПР по данным ROC-анализа было общее количество мутированных генов в дебюте заболевания ≥ 9 (чувствительность – 75%, специфичность – 85,7%, AUX=0,804, p=0,049) (рисунок 19, А). Пациенты в этой группе реже достигали ПР после первого индукционного курса терапии (27,3% (3/11)) по сравнению с группой больных с меньшим количеством мутированных генов (83,3% (5/6), p=0,027) (рисунок 19, Б).

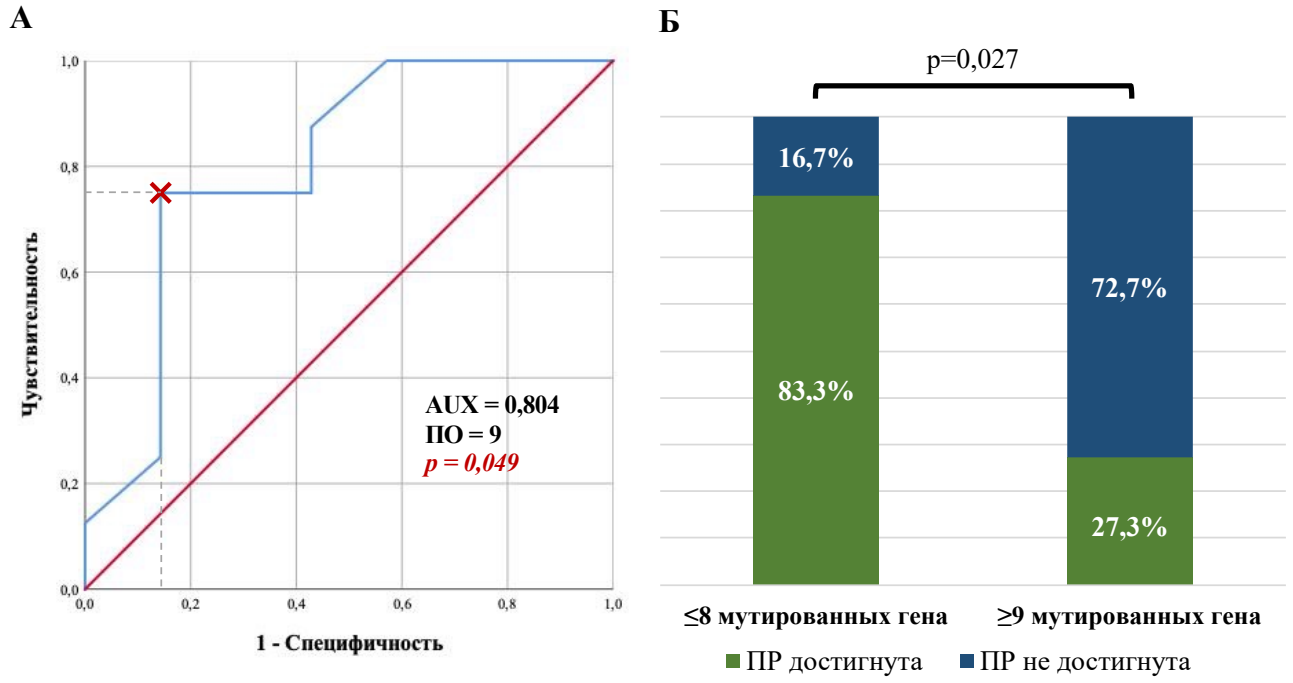

Рисунок 19 – Достижение полной ремиссии после первого индукционного курса терапии у пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутациями в генах эпигенетических регуляторах в зависимости от общего количества мутированных генов: А – ROC-анализ определения порога отсечения (ПО) общего количества мутаций для прогнозирования недостижения полной ремиссии; Б – Достижение полной ремиссии у пациентов с разным общим количеством мутированных генов

Прогностическое значение имело не только общее количество детектируемых мутаций, но и то, какие именно гены оказываются мутированными. При одновременной детекции мутаций в гене *NF1* у пациентов с мутированным статусом генов эпигенетической регуляции также отмечалось снижение вероятности достижения ПР после первого индукционного курса терапии (28,6% (2/7) против 87,5% (7/8), p=0,021) (рисунок 20, А). Сопутствующие мутации генов *NRAS/KRAS*, хотя и не оказывали статистически значимого влияния на вероятность достижения ПР, развития РР и БРВ, негативно отражались на показателях ОВ: медиана 14 мес. (95% ДИ 4-6,3) против 21,2 мес. (95% ДИ 4,3-12,8) при диком типе генов *NRAS/KRAS*, p=0,045 (рисунок 20, Б).

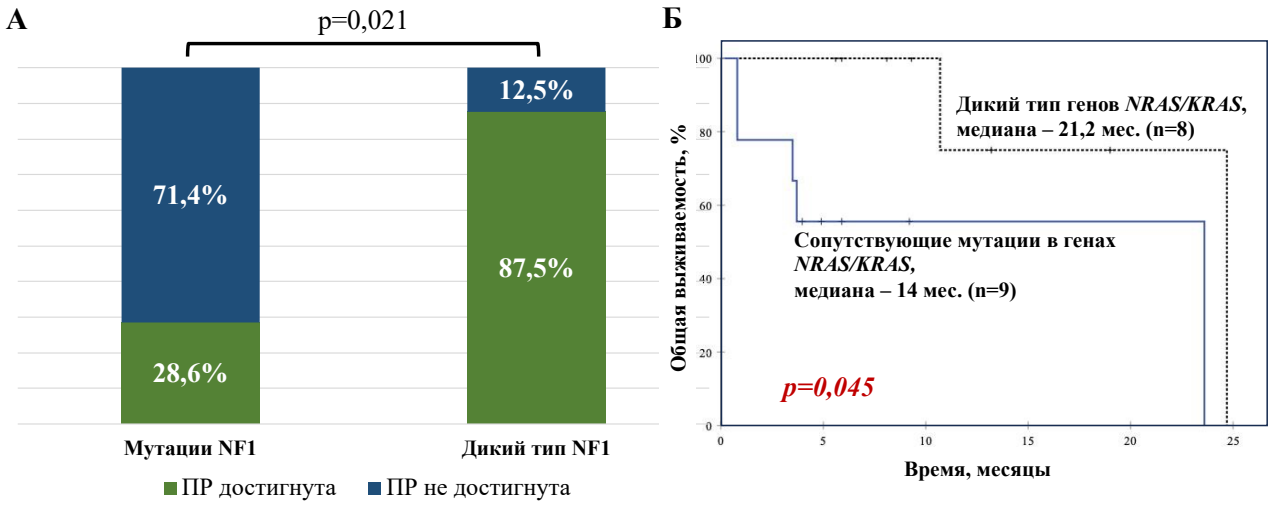

Рисунок 20 – Прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутациями в генах эпигенетической регуляции в зависимости от мутационного статуса генов *NF1* и *NRAS/KRAS*: А – Достижение полной ремиссии у пациентов с мутациями гена *NF1* и с диким типом гена *NF1*; Б – Общая выживаемость пациентов с и без мутаций генов, кодирующих сигнальный путь RAS (*NRAS/KRAS*) (все варианты терапии)

3.9 Анализ показателей прогноза пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Перед проведением исследования прогностического значения мутаций в генах эпигенетической регуляции были проанализированы такие факторы прогноза, как группа генетического риска (ELN-2022), мутационный статус генов *NPM1* и *FLT3* (мутация ITD) и выбор варианта индукционной терапии с целью оценки репрезентативности выборки.

Анализ прогноза в группах генетического риска (ELN-2022). Группа генетического риска ELN-2022 коррелировала с частотой достижения ПР, в том числе после первого индукционного курса полихимиотерапии, а также с вероятностью развития РР (таблица 13).

Таблица 13 – Валидация системы стратификации ELN-2022 в общей когорте пациентов с впервые выявленным ОМЛ: достижение полной ремиссии и развитие раннего рецидива в разных прогностических категориях

Группа генетического риска (ELN-2022)	Благоприятная (n=24)	Промежуточная (n=55)	Неблагоприятная (n=29)	p
Достижение ПР после первого индукционного курса	87,5% (21/24)	43,6% (24/55)	31% (9/29)	**<0,001**
Достижение ПР на фоне химиотерапии (до этапа алло-ТГСК)	100% (24/24)	69,1% (38/55)	89,7% (16/29)	**0,002**
Развитие раннего рецидива	0% (0/21)	26,7% (8/30)	33,3% (4/12)	**0,022**

Было продемонстрировано преимущество в ОВ и БРВ у пациентов благоприятной группы генетического риска. Медиана ОВ в этой группе не была достигнута, в то время как медиана в группах промежуточного и неблагоприятного риска составила 14,7 мес. (95% ДИ 8,8-20,6) и 11,3 мес. (95% ДИ 5,8-16,8) соответственно (p=0,026). В группе пациентов с благоприятными генетическими поломками медиана БРВ составила 14,8 мес. (95% ДИ 2,1-27,5) против 7,2 мес. (95% ДИ 4,6-9,7) и 8,1 мес. (95% ДИ 4,7-11,5) в когортах промежуточного и неблагоприятного риска (p=0,041) (рисунок 21).

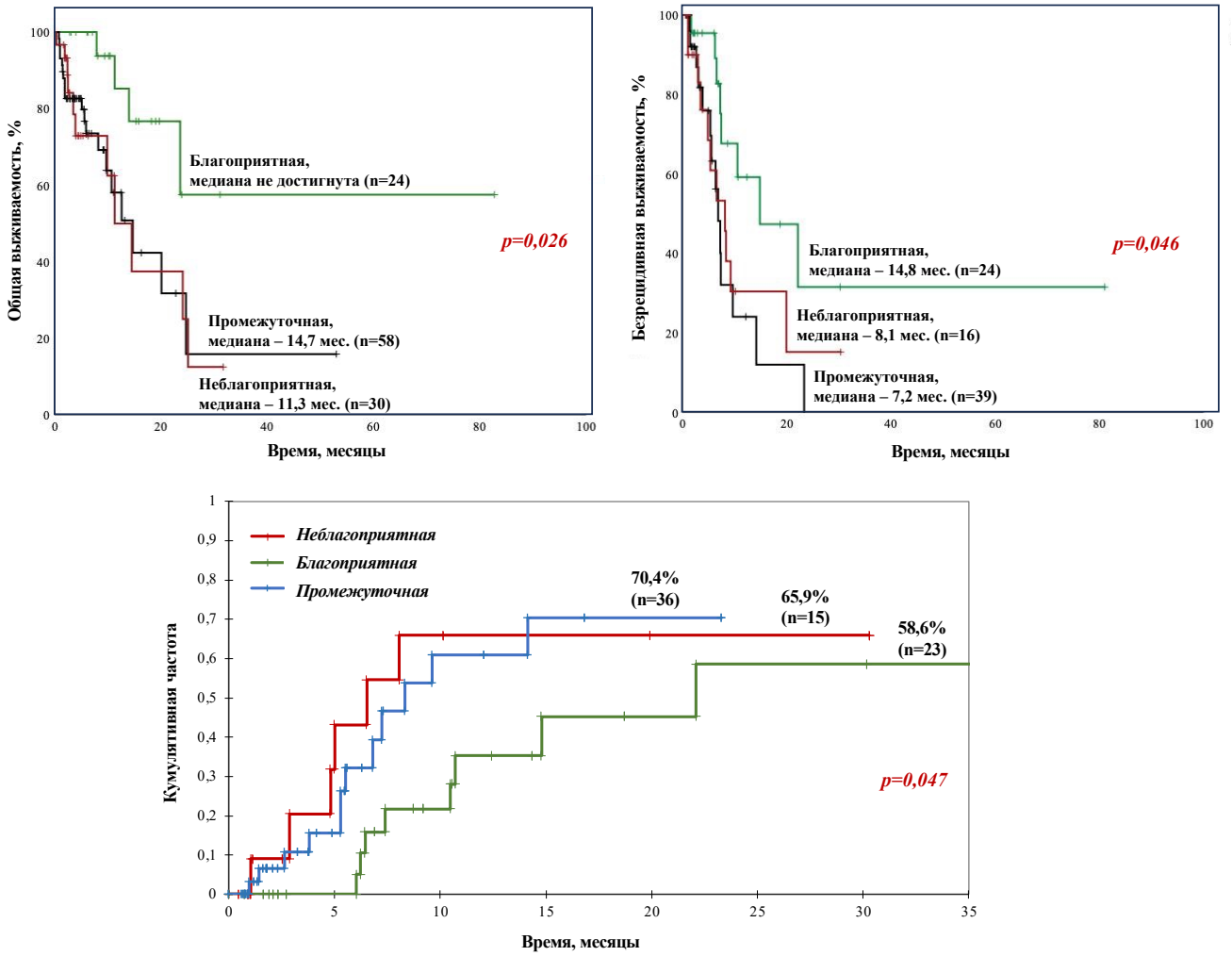

Рисунок 21 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ различных генетических групп риска (ELN-2022) (все варианты терапии)

Медиана ОВ пациентов, не стратифицированных по группам генетического риска (n=15), составила 4,3 месяца (95% ДИ 1,84-6,76), что оказалось статистически значимо ниже по сравнению с остальными группами (p<0,001). Аналогичная закономерность наблюдалась при оценке БРВ (медиана – 3 мес. [95% ДИ 0,45-5,55], p=0,027) (рисунок 22). Ранняя летальность в данной когорте составила 26,7% (4/15), а частота достижения ПР – 45,5% (5/11).

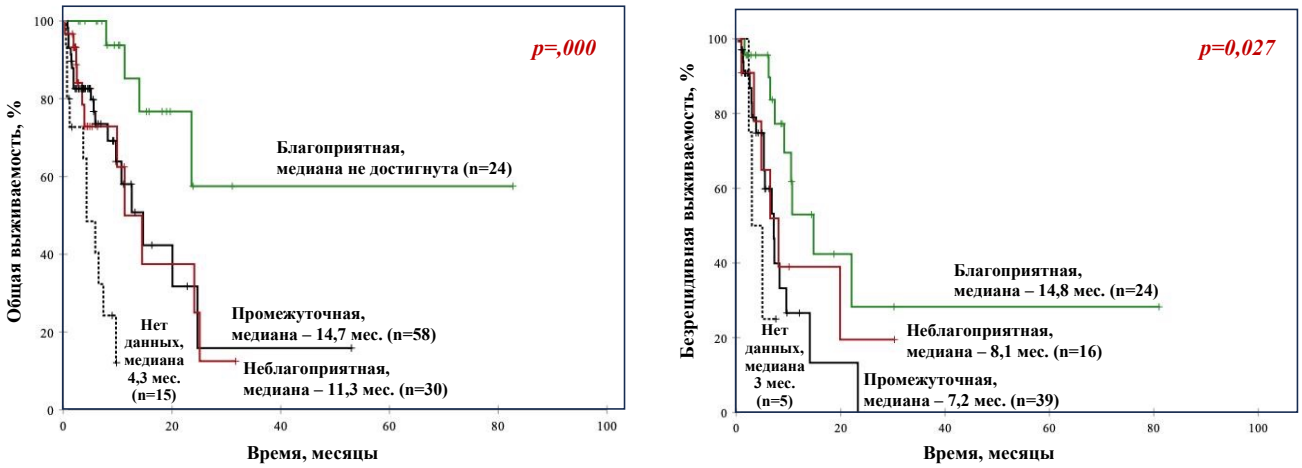

Рисунок 22 – Общая выживаемость и безрецидивная выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ неизвестной прогностической категории (нет данных) в сравнении с пациентами, стратифицированными согласно критериям ELN-2022 (все варианты терапии)

Мутации в генах NPM1 и FLT3 (мутация ITD). Пациенты с мутированным статусом гена *NPM1* чаще достигали ПР (88,9% (24/27) против 65,8% (48/73) в группе с диким типом *NPM1*, p=0,023). Выявление сопутствующей мутации ITD в гене *FLT3* негативно влияло на показатели прогноза данной когорты пациентов по сравнению с группой с диким типом гена *FLT3*. Так, при наличии сопутствующей мутации *FLT3*-ITD пациенты реже достигали ПР (66,7% (8/12) против 100% (15/15), p=0,016) и имели более высокий риск развития РР (57,1% (4/7) против 7,1% (1/14), p=0,012). Кроме того, в группе пациентов с мутированным статусом гена *NPM1* мутация *FLT3*-ITD негативно влияла на показатели как ОВ, так и БРВ. Медиана ОВ в группе без сопутствующей мутации *FLT3*-ITD не была достигнута, а при наличии мутации *FLT3*-ITD она составила 12,6 мес. (95% ДИ 5,2-20) (p=0,047), при расчете БРВ данные показатели соответствовали 14,8 мес. (95% ДИ 6,5-23) и 5,5 мес. (95% ДИ 3,7-7,3) (p=0,008). КЧР составила 82,1% (95% ДИ 56-120) в группе пациентов с сопутствующей мутацией *FLT3*-ITD и 68,8% (95% ДИ 40-120) при негативном мутационном статусе (p=0,012) (рисунок 23).

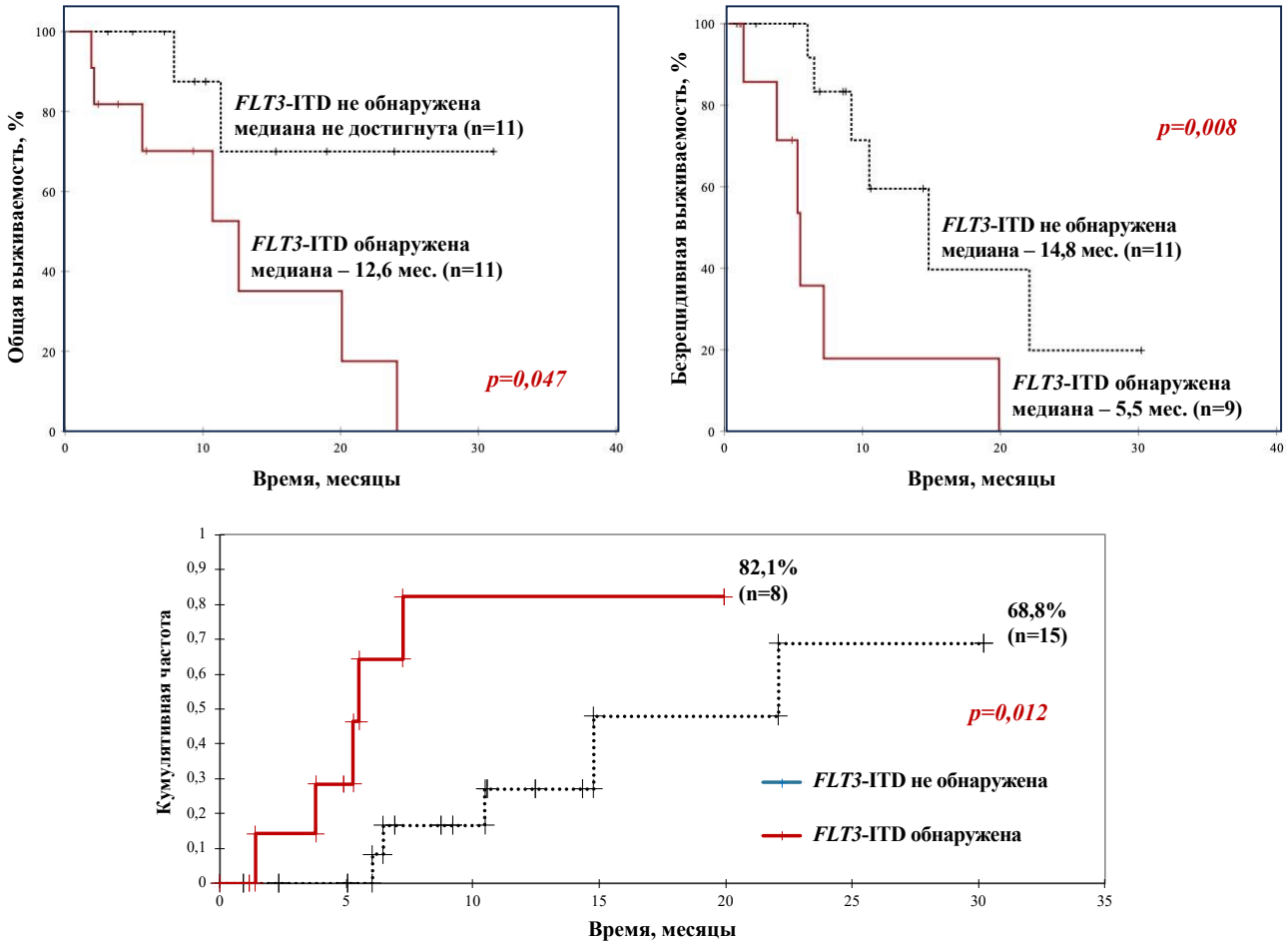

Рисунок 23 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов в группе пациентов с впервые диагностированным ОМЛ и мутированным статусом гена *NPM1* в зависимости от выявления сопутствующей мутации *FLT3*-ITD (все варианты терапии)

Негативная прогностическая роль мутации *FLT3*-ITD прослеживалась и при анализе общей когорты пациентов. Так, в случаях выявления мутации *FLT3*-ITD отмечалось увеличение вероятности развития РР (14,6% (7/48) против 40% (8/20), p=0,022) и снижение показателей БРВ (медиана 5,5 мес. [95% ДИ 2,34-8,66] против 10,5 мес. [95% ДИ 7,78-20,42], p=0,036). КЧР составила 73,3% у пациентов с мутацией ITD в гене *FLT3* (95% ДИ 54,3-98,9) против 63,5% в группе без мутации ITD (95% ДИ 46,3-87,1) (p=0,044) (рисунок 24).

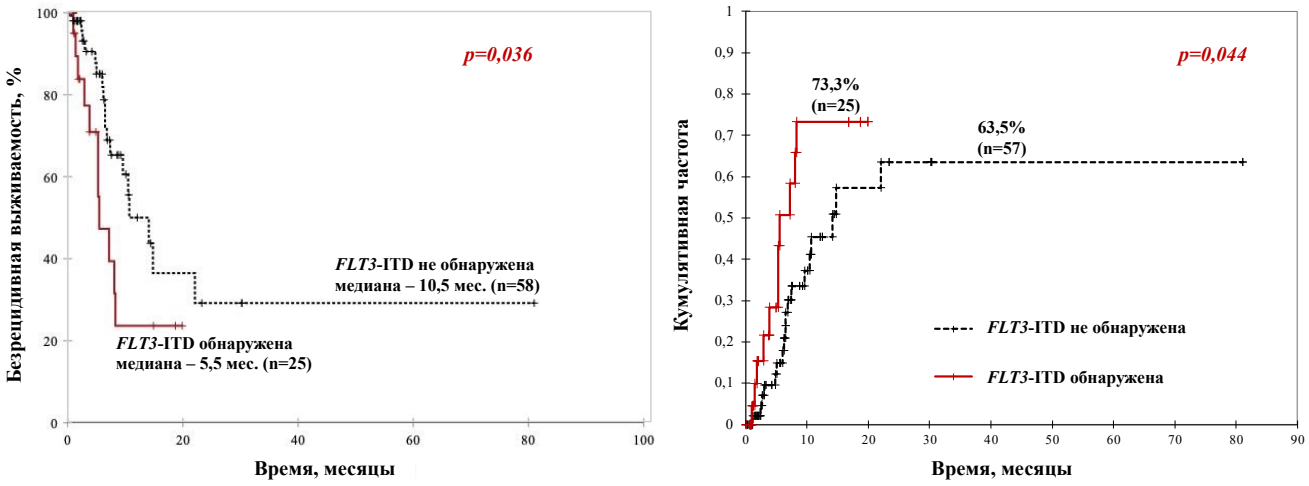

Рисунок 24 – Безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ в зависимости от наличия или отсутствия мутации *FLT3*-ITD (все варианты терапии)

Терапия индукции ремиссии. Выбор варианта индукционного режима терапии закономерно оказывал влияние на прогноз пациентов. Так, пациенты, которым по тем или иным причинам назначались низкоинтенсивные режимы без включения венетоклакса (монотерапия МДЦ или ГМА) реже достигали ПР, по сравнению с когортой пациентов, получивших другие варианты лечения (комбинации венетоклакса с МДЦ/ГМА, «7+3», режимы с использованием ВДЦ) (7,7% (1/13) против 52,8% (56/106), p=0,003). Примечательно, что пациенты, пролеченные в индукционном периоде комбинациями венетоклакса с ГМА/МДЦ, имели сопоставимую частоту достижения ПР с пациентами, которым были назначены режимы стандартной («7+3») или высокой («FLAG+/-Ida») интенсивности (p>0,05) (рисунок 25).

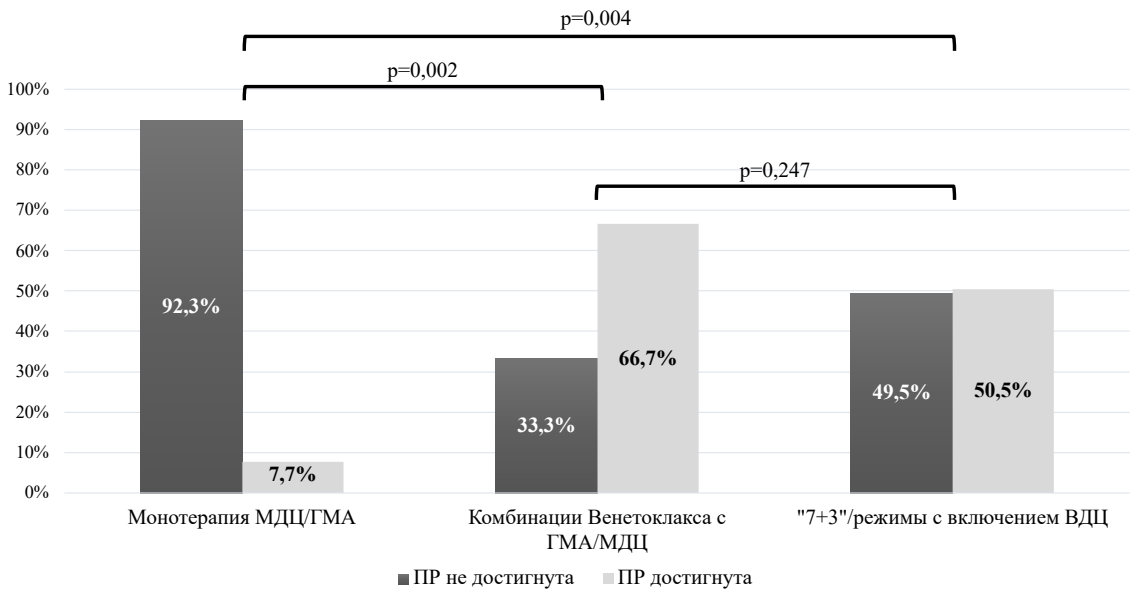

Рисунок 25 – Достижение полной ремиссии у пациентов с впервые выявленным ОМЛ в зависимости от варианта проводимой терапии

Медиана ОВ пациентов статистически значимо не отличалась в группах, получивших венетоклакс-содержащие режимы (20,1 мес.), стандартный режим «7+3» (11,3 мес.) и режимы с включением ВДЦ (25,1 мес.) (p>0,05). В то же время, использование неинтенсивных режимов терапии приводило к ухудшению показателей ОВ (медиана – 5,1 мес. [95% ДИ 3-7,2]), как в целом по сравнению с другими вариантами лечения (венетоклакс-содержащие схемы, «7+3», режимы на основе ВДЦ, медиана – 14 мес. [95% ДИ 5,4-22,6], p=0,032), так и в частности по сравнению с низкоинтенсивными режимами с включением венетоклакса (медиана – 20,1 мес., [95% ДИ 9,83-30,37], p=0,029). Медиана времени наблюдения при анализе вариантов терапии составила 9,2 мес. (рисунок 26).

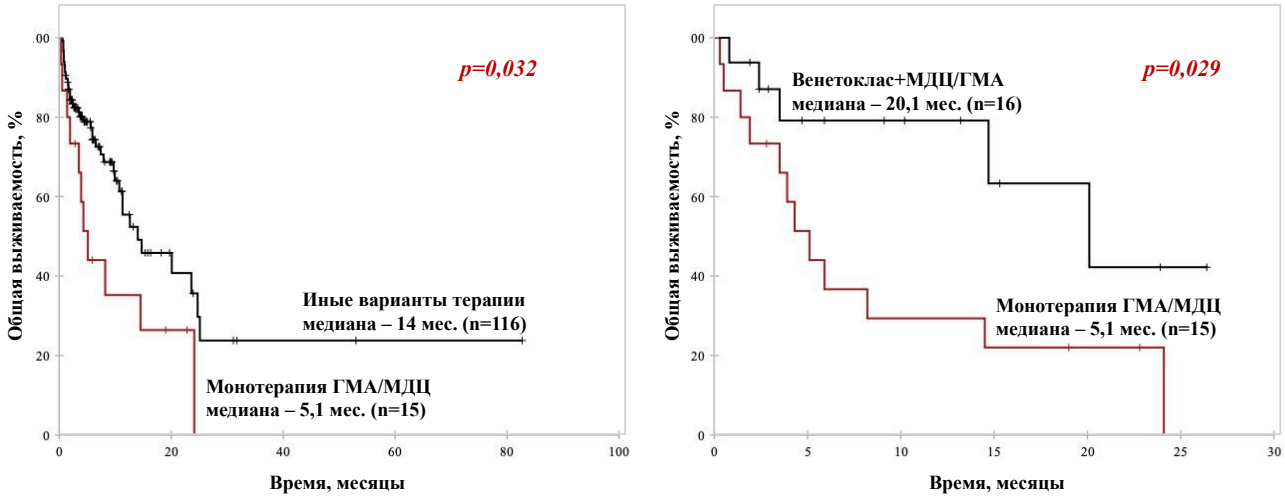

Рисунок 26 – Показатели общей выживаемости пациентов с впервые выявленным ОМЛ в зависимости от выбора варианта индукционной терапии

3.10 Влияние мутаций генов эпигенетической регуляции в изолированном варианте на прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Мутации в генах IDH1 и IDH2. В группе пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2* частота достижения ПР была равной 85,7% (18/21), рецидив в течении первых 6 месяцев зарегистрирован у одного пациента (6,25%, 1/16). Медиана БРВ составила 14,1 мес., а КЧР – 48,4%. Статистически значимых различий по сравнению с группой пациентов без мутаций выявлено не было (p>0,05). При анализе показателей ОВ, напротив, было продемонстрировано преимущество в случаях обнаружения мутаций в генах *IDH1/2*: медиана ОВ составила 30,7 мес. (95% ДИ 0-68,5), в то время как в когорте пациентов с диким типом генов она была равной 11,3 мес. (95% ДИ 7,2-15,4) (p=0,03) (рисунок 27).

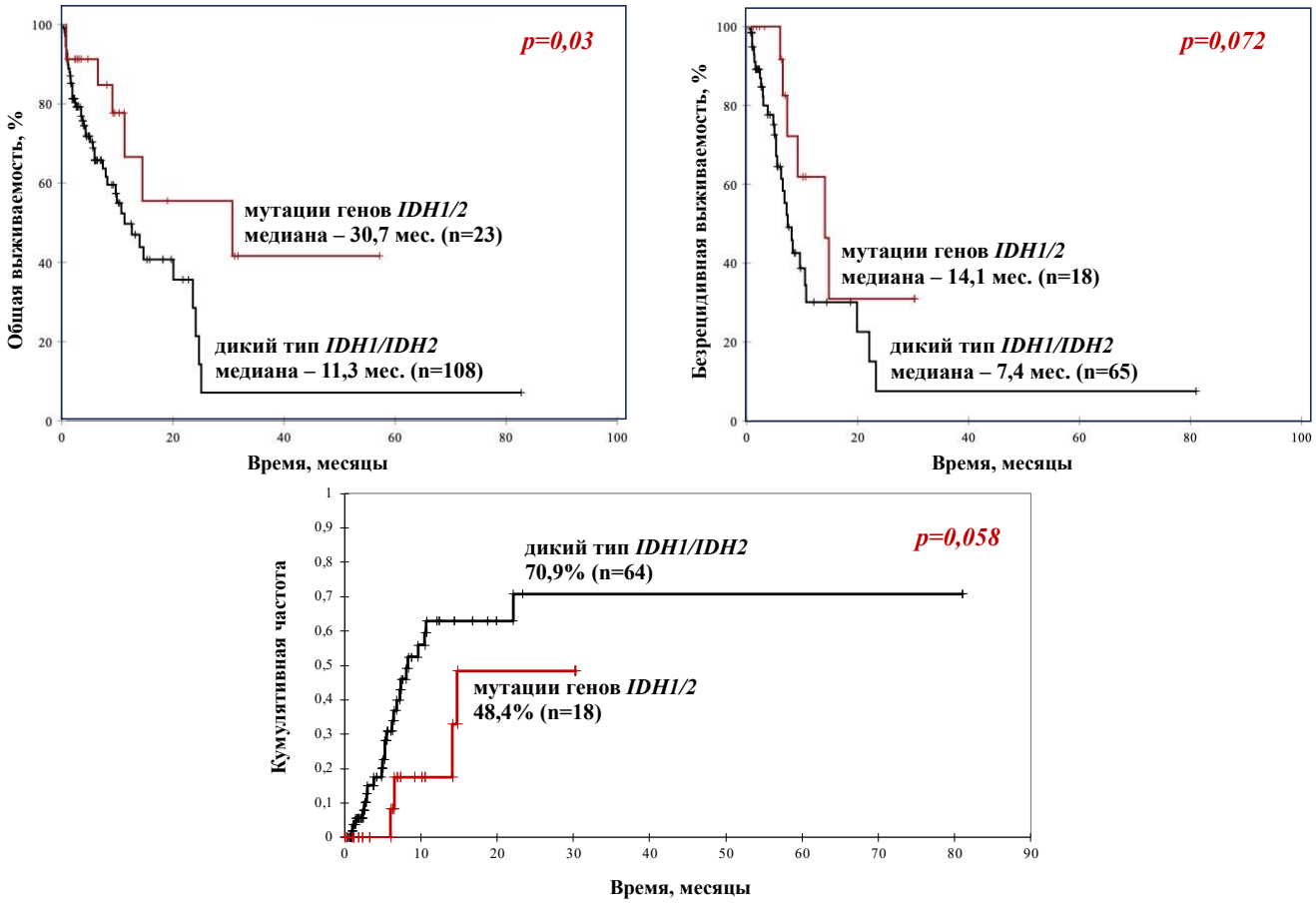

Рисунок 27 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов в группе пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутациями в генах *IDH1* или *IDH2* в сравнении с диким типом этих генов (все варианты терапии)

При анализе мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* изолированно друг от друга благоприятного прогностического значения на показатели ОВ выявлено не было (p>0,05, рисунок 28).

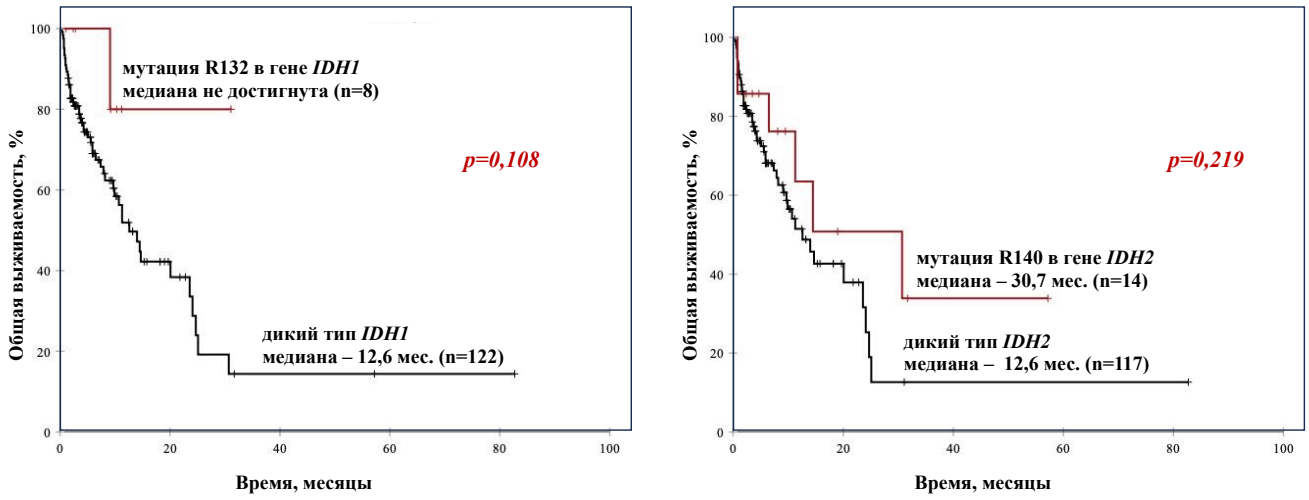

Рисунок 28 – Общая выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ с мутацией R132 в гене *IDH1* и мутацией R140 в гене *IDH2* в сравнении с пациентами с диким типом генов *IDH1* и *IDH2* соответственно (все варианты терапии)

Расхождения в результатах анализа ОВ и БРВ, возможно, обусловлены характером проводимой противорецидивной терапии у пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2* в случаях развития рецидива. Анализ эффективности различных вариантов противорецидивной терапии в рамках настоящего исследования не проводился.

В группе пациентов с нормальным кариотипом мутационный статус генов *IDH1* и *IDH2* не оказывал статистически значимого влияния на показатели ОВ, БРВ и КЧР (p>0,05). Частота достижения ПР и вероятность развития РР также была сопоставимой в данной когорте вне зависимости от наличия или отсутствия мутаций в генах *IDH1/2* (p>0,05).

Мутация R882 гена DNMT3A. В общей группе пациентов с мутацией R882 частота достижения ПР составила 81,8% (18/22). В течении первого полугода развитие рецидива зарегистрировано у четырех пациентов. Алло-ТГСК была выполнена 11 пациентам (42,3%), в дальнейшем при анализе ОВ и БРВ они были цензурированы. Медиана ОВ в группе пациентов с мутированным статусом гена *DNMT3A* составила 14,5 мес., БРВ – 9,2 мес., а КЧР оказалась равной 67,3%.

Мутация R882 в гене *DNMT3A* не приводила к значимым изменениям показателей ОВ, БРВ, КЧР, частоты достижения ПР и вероятности развития РР в общей когорте пациентов (p>0,05, рисунок 29).

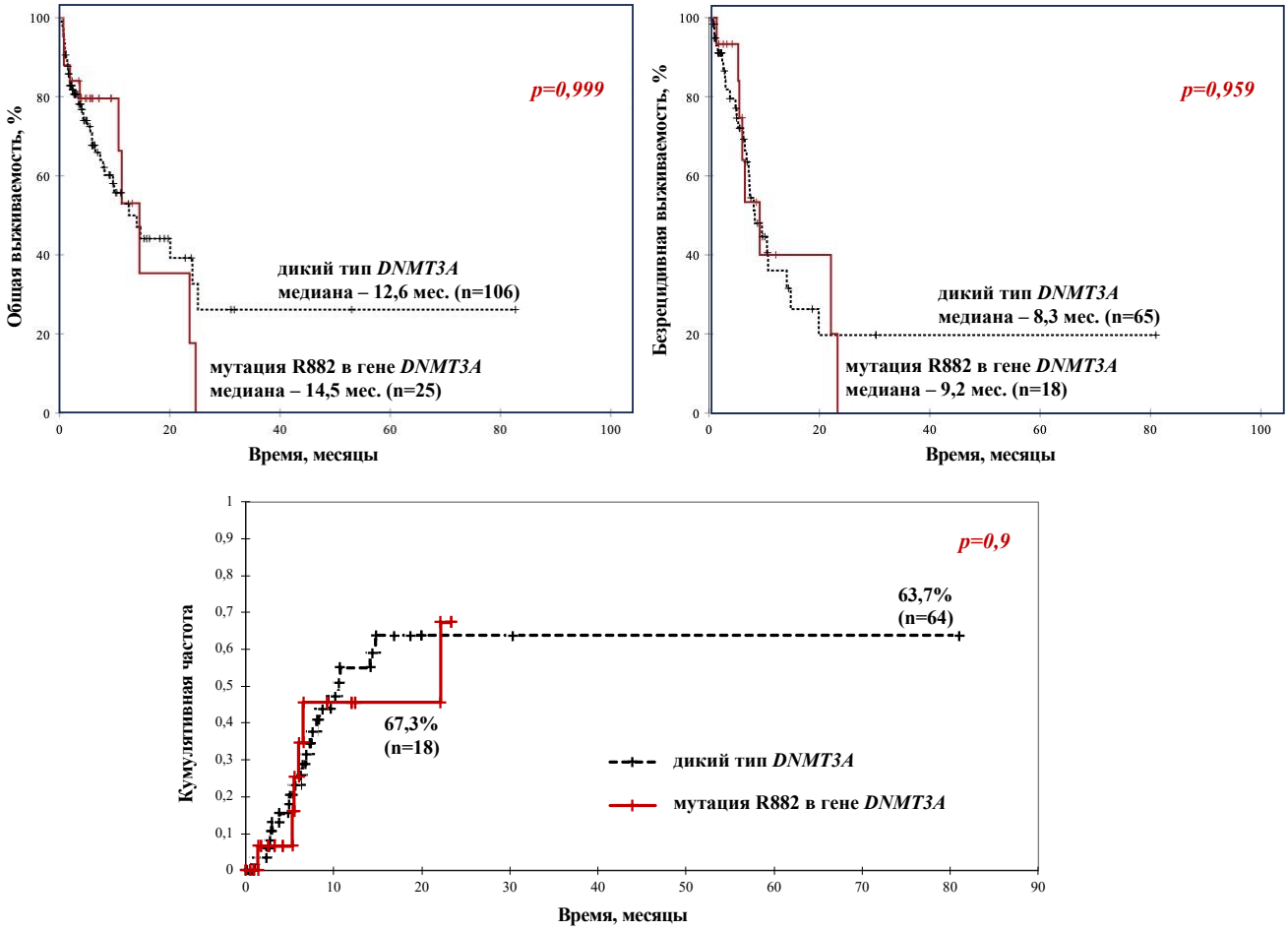

Рисунок 29 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A* (все варианты терапии)

Напротив, в группе пациентов с нормальным кариотипом мутированный статус гена *DNMT3A* имел неблагоприятное прогностическое значение. Медиана ОВ пациентов с диким типом гена *DNMT3A* составила 24,1 мес. (95% ДИ 16,7-31,5), а при наличии мутации R882 – 11,3 мес. (95% ДИ 1-21,6) (p=0,048). Медиана БРВ также была ниже в группе пациентов с мутированным типом гена (9,2 мес. [95% ДИ 0-24,08] против 14,1 мес. [95% ДИ 6,9-21,3]), однако данное различие не было статистически значимым (p>0,05). КЧР оказалась равной 85,2% (95% ДИ 62,2-117)

для пациентов с мутацией R882 и 64,1% (95% ДИ 43-95,8) для пациентов с диким типом гена (p>0,05) (рисунок 30).

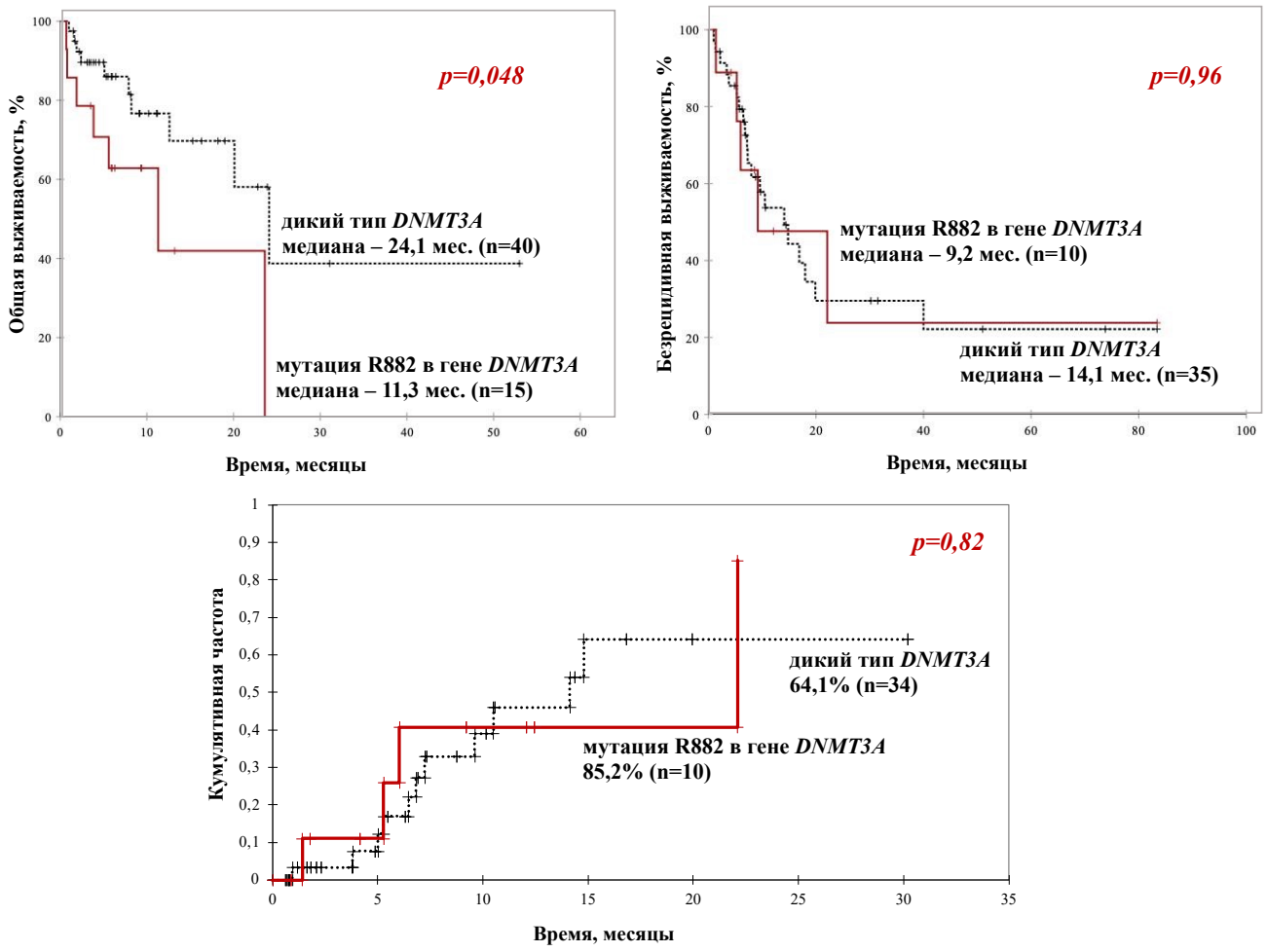

Рисунок 30 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ и нормальным кариотипом в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A* (все варианты терапии)

Мутации 12 экзона гена ASXL1. В случаях обнаружения мутаций 12 экзона гена *ASXL1* статистически значимых различий в вероятности достижения ПР (в том числе после первого индукционного курса) выявлено не было (p>0,05).

Тем не менее, пациенты, несущие мутации 12 экзона гена *ASXL1*, без дополнительных генетических аномалий благоприятного риска (t(8;21), inv(16), мутации гена *NPM1* без *FLT3*-ITD) имели худший прогноз, чем пациенты с диким типом гена *ASXL1*. Так, средний срок до регистрации неблагоприятного исхода в

группе пациентов с мутациями гена *ASXL1* составил 2,5 мес. (95% ДИ 0-5) (общее количество неблагоприятных исходов – 3), в то время как медиана ОВ пациентов с диким типом гена *ASXL1* была равной 14 мес. (95% ДИ 9,9-18,1) при общем количестве неблагоприятных исходов – 46 (p=0,01, логранговый критерий) (рисунок 31). Показатели БРВ, КЧР и частота развития РР в данной когорте не оценивались ввиду низкой достоверности на фоне малого количества пациентов с мутациями гена *ASXL1*, достигших ПР (n=2).

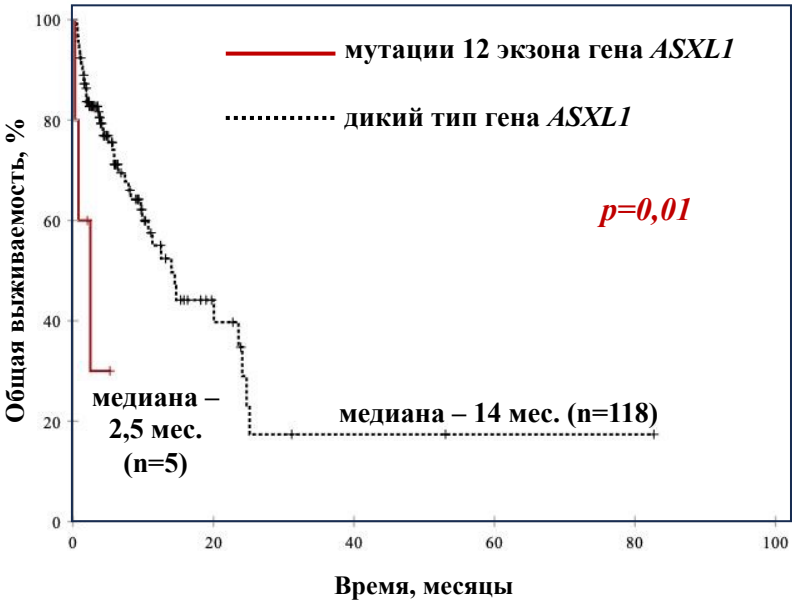

Рисунок 31 – Общая выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ без сопутствующих мутаций благоприятного риска в зависимости от мутационного статуса гена *ASXL1* (все варианты терапии)

Пациенты с нормальным кариотипом имели сопоставимые показатели ОВ, БРВ и КЧР, а также одинаковую частоту достижения ПР и развития РР вне зависимости от мутационного статуса гена *ASXL1* (p>0,05).

3.11 Влияние на прогноз часто детектируемых сочетаний мутаций генов эпигенетической регуляции с генетическими аномалиями известной прогностической значимости

Мутации генов IDH1/2. Несмотря на выявленную кооперацию мутаций в генах *IDH1/2* с благоприятными генетическими аномалиями, в частности с

мутациями гена *NPM1*, статистически значимых различий в частоте достижения ПР, развития РР, показателях ОВ, БРВ и КЧР в зависимости от мутационного статуса генов *IDH1/2* в данных группах выявлено не было (p>0,05, таблица 14).

Таблица 14 – Влияние мутационного статуса генов *IDH1* и *IDH2* на показатели ОВ и БРВ пациентов различных генетических групп риска (ELN-2022) и с мутированным статусом гена *NPM1*

Группа	Медиана ОВ, мес. (n)	95% ДИ	p	Медиана БРВ, мес. (n)	95% ДИ	p
Благоприятный риск ELN-2022 (n=24)						
IDH1/2 М	30,7 (n=9)	0,9-60,5	0,848	4,4 (n=7)	6,2-23,4	0,722
IDH1/2 ДТ	23,6 (n=15)	9,6-37,5		5,2 (n=17)	0,5-21	
Промежуточный риск ELN-2022 (n=56)						
IDH1/2 М	не достигнута (n=7)	-	0,155	7,3 (n=6)	-	0,519
IDH1/2 ДТ	14,7 (n=49)	8,7-20,7		6,8 (n=32)	4,3-9,3	
Высокий риск ELN-2022 (n=31)						
IDH1/2 М	не достигнута (n=5)	-	0,1	не достигнута (n=4)	-	0,094
IDH1/2 ДТ	9,9 (n=26)	2,7-17,1		5 (n=12)	2,7-7,3	
Пациенты с мутированным статусом гена *NPM1* (n=24)						
IDH1/2 М	30,7 (n=9)	1,3-60,1	0,19	18 (n=7)	8,4-27,6	0,339
IDH1/2 ДТ	20,1 (n=15)	10,5-29		7,2 (n=13)	0-17,3	

Примечание: ДТ – дикий тип гена, М – мутация

Мутация R882 гена DNMT3A. Мутация R882 в гене *DNMT3A* часто сочеталась с мутированным статусом гена *NPM1* и в данной когорте больных проявляла неблагоприятное прогностическое влияние. Несмотря на отсутствие различий в частоте достижения ПР (p>0,05), наличие сопутствующей мутации в гене *DNMT3A* увеличивало вероятность развития РР (50% (4/8) против 7,7% (1/13)

в группе с диким типом гена *DNMT3A*, p=0,028). Кроме того, мутированный статус гена *DNMT3A* негативно влиял на показатели ОВ, БРВ и КЧР в данной когорте. Медиана ОВ у пациентов с мутацией в гене *NPM1* составила 24,1 мес. (95% ДИ 17,9-30,3) в случаях сочетания с диким типом *DNMT3A* и 10,7 мес. (95% ДИ 0-23,3) при наличии мутации R882 (p=0,006), а БРВ – 14,8 мес. (95% ДИ 0,8-28,8) и 5,5 мес. (95% ДИ 4,6-6,4) соответственно (p=0,03). КЧР составила 83,3% (95% ДИ 58-119) в когорте с двойным мутационным статусом и 55% (95% ДИ 26-117) при отсутствии мутации R882 (p=0,045) (рисунок 32).

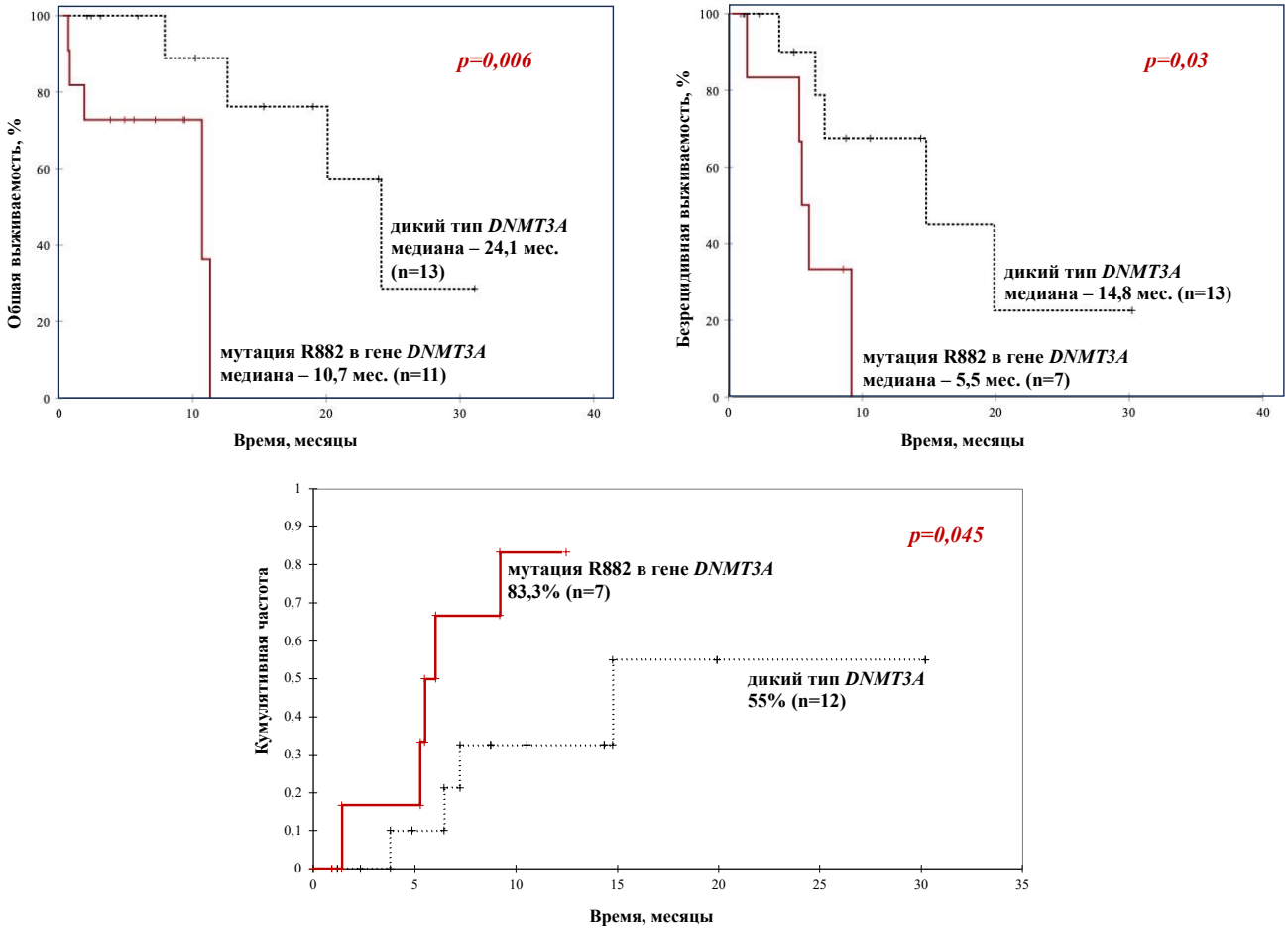

Рисунок 32 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутированным статусом гена *NPM1* в зависимости от обнаружения сопутствующей мутации R882 в гене *DNMT3A* (все варианты терапии)

Мутационный статус гена *DNMT3A* не изменял прогноз в группах промежуточного и неблагоприятного риска (ELN-2022): пациенты имели

сопоставимую частоту достижения ПР, развития РР, показатели ОВ, БРВ и КЧР (p>0,05). Однако в группе благоприятного генетического риска мутация R882 в гене *DNMT3A* негативно влияла на показатели ОВ. Медиана ОВ пациентов с благоприятными генетическими аномалиями и отсутствием сопутствующей мутации R882 гена *DNMT3A* не была достигнута, в то время как в случаях детекции мутации она составила 11,3 мес. (95% ДИ 0-26,7) (p=0,027). Статистически значимых различий в показателях БРВ, КЧР, вероятности достижения ПР и развития РР выявлено не было (p>0,05) (рисунок 33).

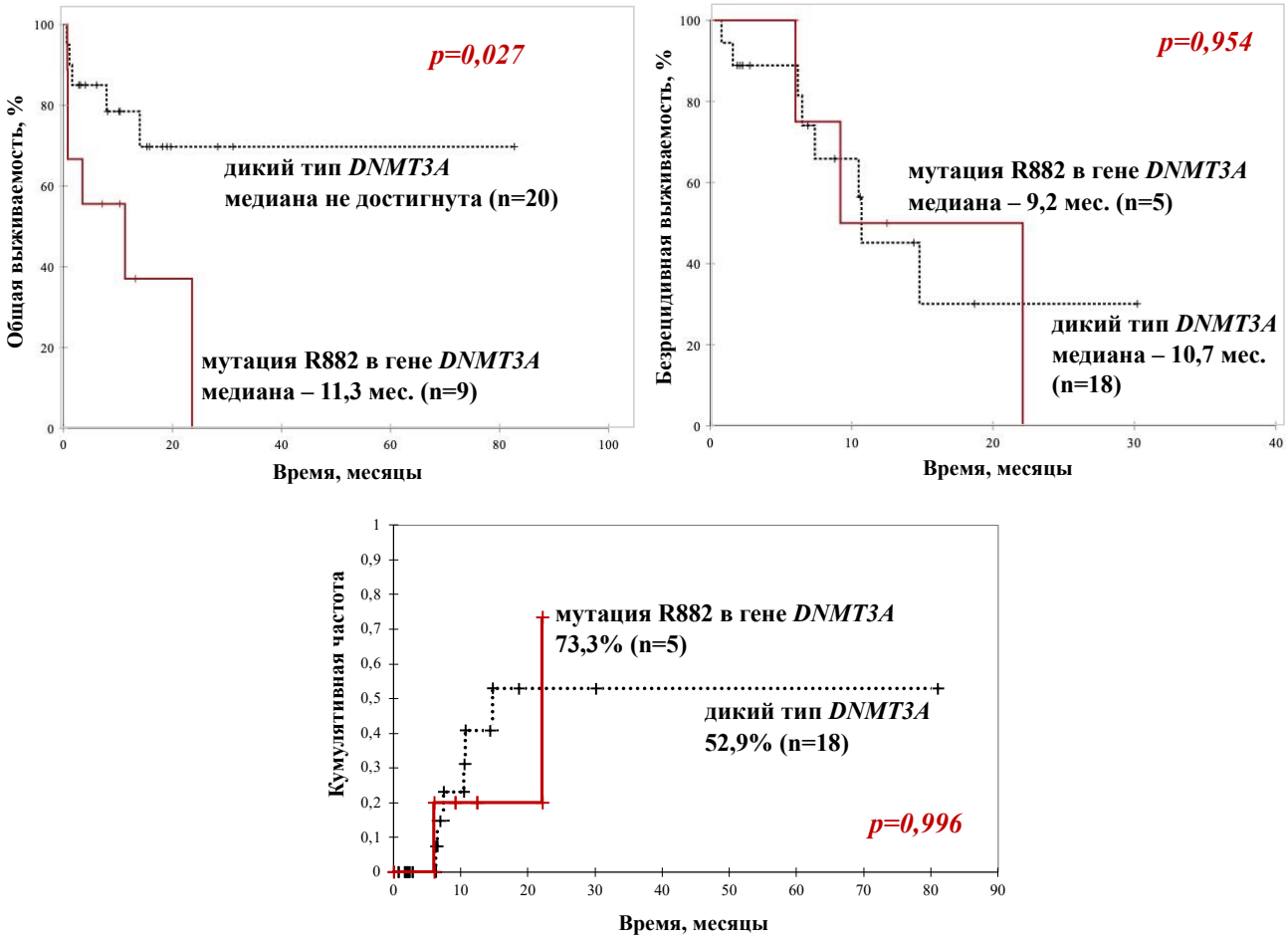

Рисунок 33 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ благоприятной группы генетического риска (ELN-2022) в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A* (все варианты терапии)

Мутированный статус гена *DNMT3A* также ухудшал прогноз в когорте пациентов с мутацией *FLT3*-ITD: несмотря на сопоставимую частоту достижения

ПР, пациенты с двойным мутационным статусом имели выше риск развития РР (100% (3/3) против 29,4% (5/17), p=0,022). Помимо этого, отмечалось увеличение КЧР в случаях детекции сопутствующей мутации R882 в гене *DNMT3A* у пациентов с мутацией *FLT3*-ITD (100% против 60,8% [95% ДИ 37-100], p=0,036) (рисунок 34).

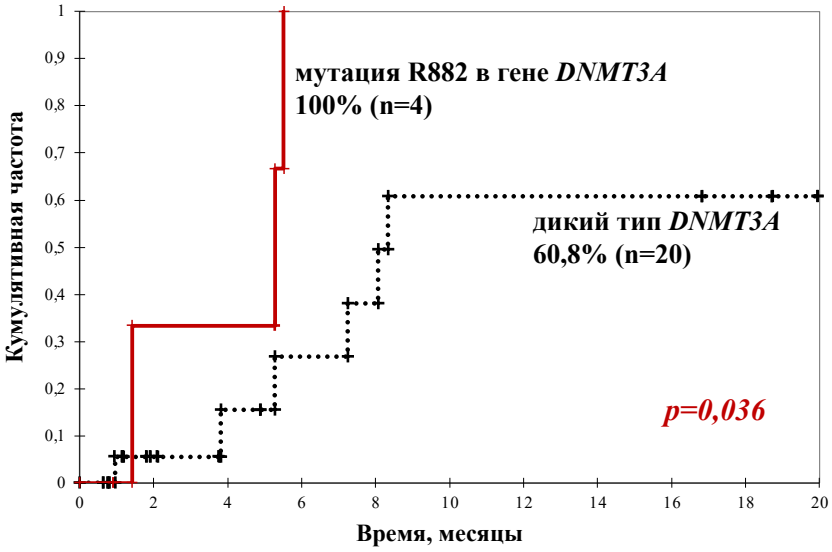

Рисунок 34 – Кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутацией *FLT3*-ITD в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A* (все варианты терапии)

Наиболее неблагоприятное течение ОМЛ отмечено в когорте с тройным мутационным статусом, когда мутация R882 в гене *DNMT3A* сочеталась с мутацией *FLT3*-ITD и мутированным статусом гена *NPM1* (группа «*FND*»). Кооперация трех мутаций (R882 в гене *DNMT3A*, *FLT3*-ITD, гена *NPM1*) была обнаружена у 4,6% (5/109) пациентов. В этой группе показатели ОВ и БРВ оказались статистически значимо ниже в сравнении с когортой пациентов с двумя мутациями (в гене *NPM1* и *FLT3*-ITD при диком типе гена *DNMT3A* – группа «*FN*»). Медиана ОВ в группе «*FND*» составила 10,7 мес., а в группе «FN» - 20,1 мес. (95% ДИ 8,1-32,1) (p=0,049). Показатели БРВ составили 5,3 мес. (95% ДИ 0-11,5) и 19,9 мес. (95% ДИ 0,1-39,7) соответственно (p=0,04). КЧР у пациентов группы *«FND»* составила 100%, а в когорте без мутации R882 гена *DNMT3A* – 50% (p=0,037) (рисунок 35). Частота развития рецидива в течение полугода также была выше в когорте *«FND»* – 100% (3/3) против 25% (1/4) (p=0,048).

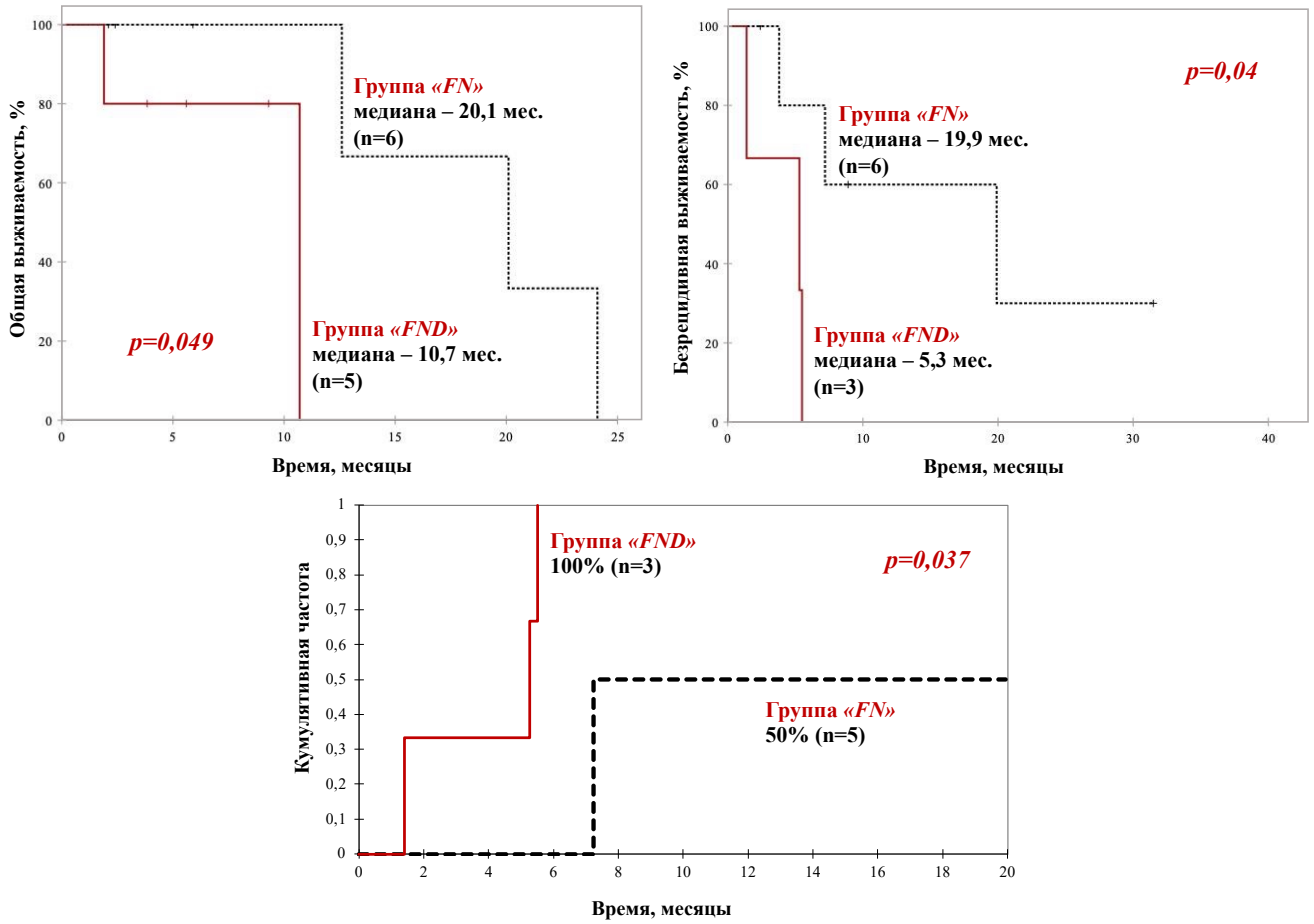

Рисунок 35 – Общая выживаемость, безрецидивная выживаемость и кумулятивная частота рецидивов пациентов с впервые выявленным ОМЛ, мутированным статусом гена *NPM1* и сопутствующей мутацией *FLT3*-ITD в зависимости от обнаружения мутации R882 в гене DNMT3A (все варианты терапии)

Примечание: группа *«FND»* – мутация R882 гена *DNMT3A* + мутации гена *NPM1* + *FLT3*-ITD; группа *«FN»* – мутации гена *NPM1* + *FLT3*-ITD, дикий тип гена *DNMT3A*

Мутации 12 экзона гена ASXL1. Мутации гена *ASXL1* имели кооперацию с хромосомной аберрацией t(8;21) (q22;q22), относящейся к благоприятной, с точки зрения прогноза, поломке (ELN-2022) [93]. Тем не менее, обнаружение мутаций 12 экзона гена *ASXL1* было ассоциировано со снижением частоты достижения ПР после первого индукционного курса терапии (50% (3/6) против 94,7% (18/19), p=0,01) у пациентов благоприятной прогностической категории. Также наблюдалось снижение показателей ОВ в данной когорте: медиана ОВ в случаях дикого типа гена *ASXL1* составила 30,7 мес. (95% ДИ 13,6-47,8) (при общем

количестве неблагоприятных исходов – 8), в то время как при детекции мутаций 12 экзона средний срок до регистрации неблагоприятного исхода составил 3,5 мес. (95% ДИ 0-8,5) (общее количество неблагоприятных исходов – 4, p=0,034, логранговый критерий) (рисунок 36, А).

Неблагоприятное прогностическое значение мутаций гена *ASXL1* также проявлялось при анализе группы пациентов с мутированным статусом гена *NPM1*. При одновременном выявлении у пациентов мутаций генов *ASXL1* и *NPM1* (n=4) средний срок до регистрации неблагоприятного исхода составил 0,8 мес. (общее количество неблагоприятных исходов – 3), в то время как медиана ОВ пациентов без сопутствующих мутаций гена *ASXL1* была равной 23,6 мес. (95% ДИ 10,5-35,7) (при общем количестве неблагоприятных исходов – 12, p=0,036, логранговый критерий) (рисунок 36, Б).

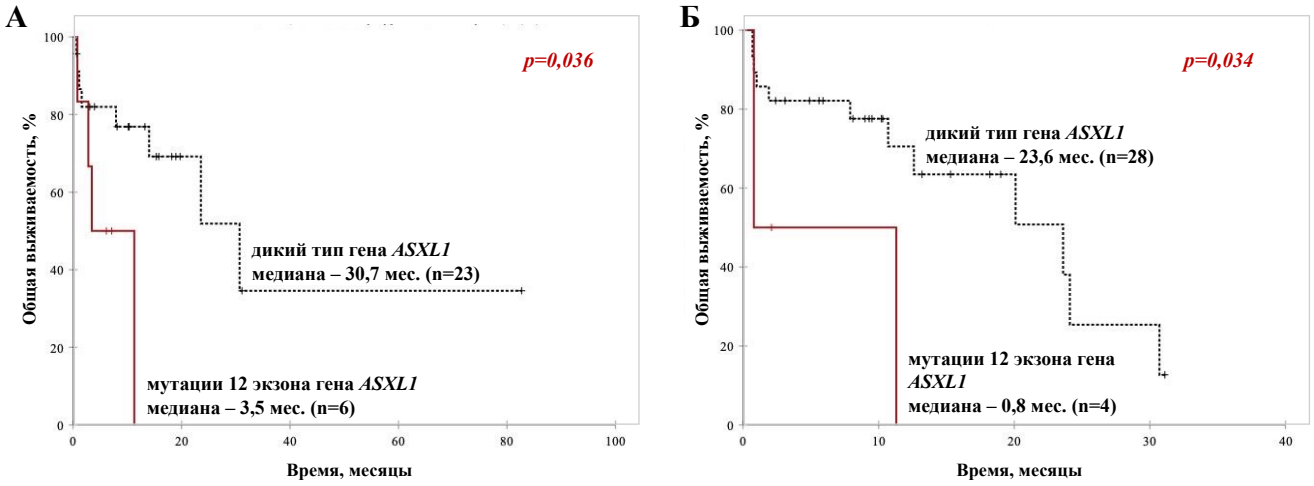

Рисунок 36 – Общая выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ благоприятной группы генетического риска (ELN-2022) (А) и с мутированным статусом гена *NPM1* (Б) в зависимости от наличия или отсутствия сопутствующих мутаций 12 экзона гена *ASXL1* (все варианты терапии)

3.12 Выбор оптимального режима индукционной терапии в группе пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции

В анализ были включены пациенты с мутациями в генах *IDH1/2, DNMT3A* и/или *ASXL1*, получившие те или иные варианты индукционной терапии. Более чем

половине пациентов назначался стандартный режим «7+3», либо высокоинтенсивные режимы («FLAG+/-Ida», «HiDAC»). Низкоинтенсивные схемы терапии на основе комбинаций венетоклакса с ГМА или МДЦ были назначены 10 пациентам с мутациями в генах-эпигенетических модификаторах (таблица 15).

Таблица 15 – Варианты индукционной терапии в группе пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутациями генов эпигенетической регуляции

Мутированные гены	Неинтенсивные режимы без включения венетоклакса	Венетоклакс + ГМА/МДЦ	«7+3», режимы с включением ВДЦ
IDH1 или *IDH2* (n=23)	8,7% (2/23)	21,7% (5/23)	69,6% (16/23)
DNMT3A (n=25)	12% (3/25)	12% (3/25)	76% (19/25)
ASXL1 (n=12)	8,3% (1/12)	16,7% (2/12)	75% (9/12)
Всего (n=60)	**10% (6/60)**	**16,7% (10/60)**	**73,3% (44/60)**

Частота ранней летальности группе терапии стандартной («7+3») или высокой («FLAG+/-Ida») составила 8,6% (3/35). На этапе индукционной терапии при использовании низкоинтенсивных режимов (ГМА/МДЦ +/- Венетоклакс) умерло два пациента. Общая частота достижения ПР после первого индукционного курса была наиболее высокой среди пациентов, получивших венетоклакс в комбинации с ГМА/МДЦ (87,5%, 7/8). При использовании стандартного индукционного режима «7+3» или высокоинтенсивных режимов частота достижения ПР составила 57,5% (23/40). В группе пациентов, которым были назначены низкоинтенсивные режимы терапии без включения венетоклакса, достижения ПР после первого индукционного курса не было зарегистрировано ни в одном случае (таблица 16).

Таблица 16 – Достижение полной ремиссии и развитие раннего рецидива среди пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции в различных группах лечения

Вариант индукционной терапии	***IDH1* R132 или *IDH2* R140**		***DNMT3A* R882**		**Мутации 12 экзона гена *ASXL1***	
	ПР+, (n)	РР+, (n)	ПР+, (n)	РР+, (n)	ПР+, (n)	РР+, (n)
Неинтенсивные режимы без включения венетоклакса	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/3)	0% (0/1)	-	-
Венетоклакс + ГМА/МДЦ	75% (3/4)	0% (0/3)	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	100% (1/1)
«7+3», режимы с включением ВДЦ	60% (9/15)	9,1% (1/11)	52,9% (9/17)	30,8% (4/13)	62,5% (5/8)	0% (0/6)

Примечание: ПР+ - достижение ПР после первого индукционного курса, РР+ - развитие РР у пациентов, достигших ПР (после 1 и более курсов терапии).

Было выявлено, что прогноз пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2* и/или *DNMT3A* улучшается при добавлении венетоклакса к ГМА/МДЦ: вероятность достижения ПР после первого индукционного курса составила 83,3% (5/6) при использовании неинтенсивных режимов с включением венетоклакса и 0% (0/5) в группе пациентов, получивших монотерапию ГМА или МДЦ (p=0,006) (рисунок 37).

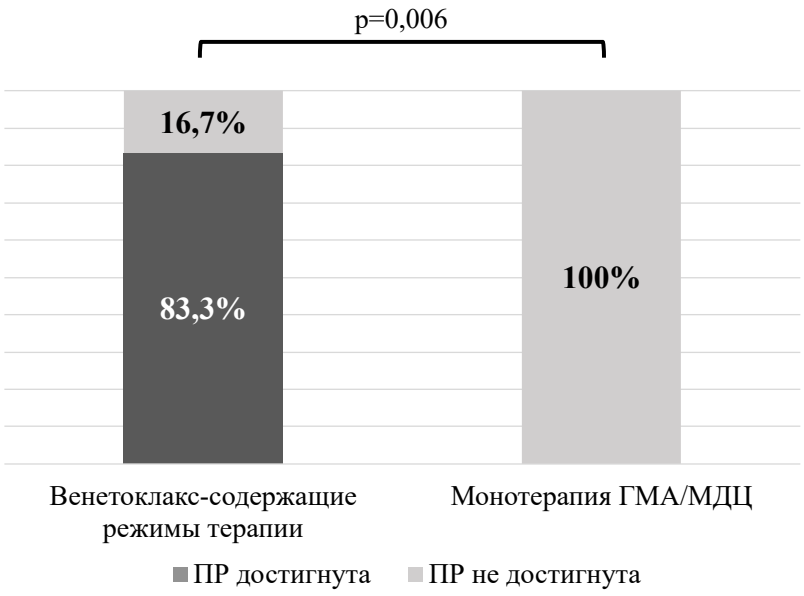

Рисунок 37 – Достижение полной ремиссии у пациентов с впервые выявленным ОМЛ и мутированным статусом генов *IDH1/2* или *DNMT3A* в зависимости от выбора варианта индукционной терапии

При многофакторном анализе (с учетом таких факторов, как возраст, кариотип, мутированный статус генов *NPM1, DNMT3A, IDH1/2*) когорты пациентов с мутациями генов *IDH1/2* режимы «Венетоклакс+ГМА/МДЦ», «7+3» и «FLAG+/-Ida» имели преимущество над монотерапией ГМА/МДЦ в контексте влияния на ОВ. В группе пациентов с мутированным статусом генов *NPM1* и *DNMT3A* улучшение показателей ОВ и БРВ выявлено при использовании стандартного режима «7+3» (таблица 17).

Таблица 17 – Влияние различных вариантов терапии на общую выживаемость и безрецидивную выживаемость (многофакторный анализ)

Вариант терапии	**Влияние на показатели выживаемости**	**HR; [95% ДИ]**	**p**
Пациенты с мутациями генов *IDH1/2* – влияние на ОВ			
Венетоклакс+ГМА/МДЦ	Преимущество над монотерапией ГМА/МДЦ	0,33; [0,1-1]	**0,049**
«7+3»		0,17; [0,05-0,52]	**0,002**
«FLAG+/-Ida»		0,26; [0,075-0,9]	**0,033**

Продолжение таблицы 17

Вариант терапии	Влияние на показатели выживаемости	HR; [95% ДИ]	p
Пациенты с мутированным статусом генов *NPM1* и *DNMT3A* – влияние на ОВ			
Венетоклакс+ГМА/МДЦ	-	0,35; [0,12-1,07]	0,066
«7+3»	Преимущество над другими вариантами	0,17; [0,06-0,55]	**0,003**
«FLAG+/-Ida»	-	0,3; [0,08-1,13]	0,076
Пациенты с мутированным статусом генов *NPM1* и *DNMT3A* – влияние на БРВ			
Венетоклакс+ГМА/МДЦ	-	0,89; [0,3-2,57]	0,83
«7+3»	Преимущество над другими вариантами	0,31; [0,1-0,98]	0,466
«FLAG+/-Ida»	-	0,84; [0,13-5,33]	0,85

3.13 Сравнительный анализ факторов, влияющих на прогноз пациентов с впервые выявленным ОМЛ

С целью сравнительной оценки независимого влияния различных факторов на ОВ пациентов с впервые выявленным ОМЛ была выбрана мультипараметрическая модель, включающая в себя следующие ковариаты: возраст старше 60 лет, активность общей ЛДГ сыворотки выше верхней границы нормы, гиперлейкоцитоз (WBC > $100x10^9$/л), трансформация из предшествующего МДС или МПН, мутированный вариант гена *NPM1* (без сопутствующей мутации R882 в гене *DNMT3A*), неблагоприятный кариотип (ELN-2022), мутация *FLT3*-ITD и комбинация мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутированным статусом гена *NPM1*.

В данной мультипараметрической модели независимое негативное прогностическое значение в аспекте ОВ имели следующие факторы: вариант ОМЛ как трансформация из предшествующего МДС или исход МПН (HR 4,13; [95% ДИ 1,485-11,483], p=0,007), неблагоприятные цитогенетические аномалии (HR 3,945; [95% ДИ 1,205-12,919], p=0,023) и кооперация мутированного статуса гена *NPM1* с мутацией R882 в гене *DNMT3A* (HR 8,248; [95% ДИ 1,493-45,557], p=0,016).

Стоит отметить, что наиболее весомым фактором с точки зрения показателя отношения рисков являлась комбинация мутаций в гене *NPM1* с мутацией R882 в гене *DMNT3A* (таблица 18).

Таблица 18 – Сравнительный анализ факторов, оказывающих влияние на общую выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Фактор	**Отношение рисков (ОР, HR)**	**95% ДИ**	**p**
Возраст >60 лет	1,028	0,407-2,595	0,953
Активность общей ЛДГ >250 Ед/л	2,247	0,682-7,408	0,307
Гиперлейкоцитоз (WBC>100x10^9/л)	2,303	0,465-11,417	0,307
Трансформация из предшествующего МДС/МПН	**4,13**	**1,485-11,483**	**0,007**
Мутированный статус гена *NPM1*	0,437	0,124-1,537	0,183
Неблагоприятные цитогенетические аберрации	**3,945**	**1,205-12,919**	**0,023**
Мутация *FLT3*-ITD	0,568	0,144-2,238	0,419
Сочетание мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутированным статусом гена *NPM1*	**8,248**	**1,493-45,557**	**0,016**

При анализе БРВ с использованием аналогичной мультипараметрической модели, негативное прогностическое значение имели мутация *FLT3*-ITD (HR 7,419; [95% ДИ 1,751-31,423], p=0,007) и сочетание мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутированным статусом гена *NPM1* (HR 11,401; [95% ДИ 1,494-86,979], p=0,019). При этом негативное прогностическое значение неблагоприятных цитогенетических аберраций нивелировалось.

Благоприятный прогноз в аспекте БРВ имели пациенты с мутациями гена *NPM1* в изолированном варианте (HR 0,101; [95% ДИ 0,019-0,543], p=0,008). (таблица 19).

Таблица 19 – Сравнительный анализ факторов, оказывающих влияние на безрецидивную выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ

Фактор	**Отношение рисков (ОР, HR)**	**95% ДИ**	**p**
Возраст >60 лет	0,639	0,204-2,002	0,442
Активность общей ЛДГ >250 Ед/л	0,331	0,091-1,201	0,093
Гиперлейкоцитоз (WBC>100x109/л)	1,003	0,207-4,872	0,997
Трансформация из предшествующего МДС/МПН	1,164	0,354-3,824	0,803
Мутированный статус гена *NPM1*	**0,101**	**0,019-0,543**	**0,008**
Неблагоприятные цитогенетические аберрации	1,055	0,19-5,84	0,951
Мутация *FLT3*-ITD	**7,419**	**1,751-31,423**	**0,007**
Сочетание мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутированным статусом гена *NPM1*	**11,401**	**1,494-86,979**	**0,019**

С целью уточнения независимого прогностического потенциала комбинации «*FND*» на ОВ и БРВ пациентов с впервые выявленным ОМЛ была построена мультипараметрическая модель с включением таких факторов, как пол, гиперлейкоцитоз в дебюте заболевания (WBC > $100x10^9$/л), неблагоприятный кариотип, трансформация из предшествующего МДС/МПН и сочетание мутации *FLT3*-ITD с мутированным статусом генов *NPM1* и *DNMT3A*. В комбинации данных ковариат существенное негативное влияние на ОВ (HR 4,21; [95% ДИ 1,08-16,4], p=0,038) и БРВ (HR 14,1; [95% ДИ 3,06-65,04], p=0,001) имела комбинации «*FND*», при этом показатели отношения рисков были выше, по сравнению с фактором наличия у пациента цитогенетических аномалий неблагоприятного риска (ОВ – HR 3,22; [95% ДИ 1,18-8,78], p=0,022 и БРВ – HR 3,75; [95% ДИ 1,017-13,86], p=0,047) (таблица 20).

Таблица 20 – Сравнительный анализ факторов, оказывающих влияние на общую и безрецидивную выживаемость пациентов с впервые выявленным ОМЛ (для группы «*FND*»)

Фактор	**Отношение рисков (OP, HR)**	**95% ДИ**	**p**
Общая выживаемость			
Группа *«FND»*	**4,21**	**1,08-16,4**	**0,038**
Мутации 12 экзона гена *ASXL1*	0,948	0,52-6,85	0,33
Неблагоприятные цитогенетические аберрации	**3,22**	**1,183-8,776**	**0,022**
Трансформация из предшествующего МДС/МПН	0,146	0,81-4,54	0,146
Пол	0,740	0,341-1,605	0,446
Гиперлейкоцитоз в дебюте заболевания	1,630	0,579-4,587	0,355
Безрецидивная выживаемость			
Группа *«FND»*	**14,107**	**3,06-65,04**	**0,001**
Мутации 12 экзона гена *ASXL1*	1,5	0,394-5,708	0,552
Неблагоприятные цитогенетические аберрации	**3,753**	**1,016-13,858**	**0,047**
Трансформация из предшествующего МДС/МПН	2,117	0,751-5,97	0,156
Пол	0,522	0,217-1,258	0,522
Гиперлейкоцитоз в дебюте заболевания	0,858	0,28-2,63	0,789

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ОМЛ является высокогетерогенным и крайне агрессивным злокачественным новообразованием [23, 28, 93, 120, 181]. Долгосрочный прогноз пациентов определяется комплексом клинико-лабораторных факторов, включая возраст, соматический статус, морфологический и иммунофенотипический профиль опухолевых клеток, ответ на индукционный курс терапии. Критически важными прогностическими биомаркерами принято считать специфические цитогенетические и молекулярно-генетические события, лежащие в основе патофизиологии ОМЛ и приводящие к формированию злокачественного опухолевого фенотипа [19]. Основываясь на их выявлении в дебюте заболевания, Европейской сетью по изучению лейкозов регулярно обновляется шкала стратификации пациентов по группам риска [91–93].

Примерно у половины больных с ОМЛ обнаруживаются устойчивые хромосомные аберрации (t(8;21)(q22;q22.1), inv(16)(p13.1q22) или t(16;16)(p13.1;q22), t(9;11)(p21.3;q23.3) и другие реаранжировки KMT2A, t(6;9)(p22.3;q34.1), inv(3)(q21.3q26.2) или t(3;3) (q21.3;q26.2) и так далее), в большинстве случаев затрагивающие локусы генов-активаторов транскрипции и приводящие к синтезу онкопротеинов – продуктов экспрессии химерных генов (*RUNX1-RUNX1T1, CBF-MYH11, MLLT3-KMT2A, DEK-NUP214* и других). В основе лейкемической трансформации при этом лежит способность данных онкопротеинов аберрантно привлекать корепрессоры к локусам активаторов транскрипции, что приводит к нарушениям экспрессии таргетных генов, ответственных за развитие миелоидных клеток [143]. У другой половины больных в дебюте заболевания отсутствуют те или иные нарушения кариотипа [200].

Детальный анализ генома бластных клеток позволил выявить большое количество лейкоз-ассоциированных молекулярных событий, не выявляемых стандартными цитогенетическими методами. К ним относятся мутации генов различных функциональных категорий, в частности ответственных за сигнальную трансдукцию (*FLT3, NRAS, PTPN11, WT1, KRAS, KIT, CBL, NF1, CBLB* и т. д.),

регуляцию транскрипции (*CEBPA, RUNX1, GATA2, ETV6, CUX1* и т. д.), эпигенетические модификации (*DNMT3A, TET2, IDH1/2, ASXL1, EZH2, EP300, BCOR*), сплайсинг (*STP3B1, SRSF1, SRSF*) и так далее [2, 212]. Прогностически значимые соматические мутации (такие как мутации генов *NPM1, FLT3, CEBPA* и др.) были внедрены в текущую систему стратификации риска наряду с данными цитогенетического исследования, что позволило значительно оптимизировать тактику ведения пациентов с впервые выявленным ОМЛ [93].

Однако даже в благоприятной прогностической категории у половины пациентов в течении пяти лет развивается рецидив заболевания [172]. Улучшение долгосрочного прогноза стало возможным при выполнении алло-ТГСК [24, 25, 79]. Совершенствование и стандартизация методик детекции уровня МОБ наряду с полноценным анализом генетического профиля позволяет определить показания для выполнения алло-ТГСК для большинства больных [4, 23-25, 93, 113, 181]. Тем не менее, у пациентов промежуточной группы генетического риска вопрос целесообразности проведения алло-ТГСК в первой ПР остается открытым.

Бóльшая часть выявляемых при ОМЛ мутаций не включена в актуальную на сегодняшний день систему стратификации пациентов по группам генетического риска ELN-2022. В данную категорию, в частности, попадает часть соматических мутаций генов, ответственных за эпигенетическую регуляцию. Согласно последнему пересмотру классификации миелоидных новообразований ВОЗ-2022, некоторые из них (*ASXL1, BCOR, EZH2, STAG2, U2AF1*) включены в перечень молекулярных аномалий, ассоциированных с миелодисплазией [120]. Обнаружение данных соматических мутаций позволяет стратифицировать пациента в группу неблагоприятного риска при условии отсутствия дополнительных генетических аномалий с благоприятной прогностической значимостью [93]. В то же время роль мутированного статуса других генов-регуляторов эпигенетических процессов остается неопределенной. Настоящая работа посвящена исследованию не вошедших в текущую систему стратификации, но устойчиво выявляющихся при ОМЛ, потенциальных прогностических факторов

– мутаций генов *IDH1/2*, *DNMT3A*, а также гена *ASXL1* среди пациентов с благоприятными генетическими аномалиями.

Полученные результаты по частоте выявления мутаций в генах эпигенетической регуляции (*IDH1/2, DNMT3A* и *ASXL1*) при впервые диагностированном ОМЛ, согласуются с общемировыми данными [72, 104, 160, 171, 204]. Подобных крупных исследований в Российской Федерации до настоящего времени не проводилось. Согласно данным исследования ФГБУ «НМИЦ гематологии Минздрава России» с включением 90 пациентов частота обнаружения мутаций генов *IDH1* и *IDH2* при впервые выявленном ОМЛ 7,8% и 12,2% соответственно, мутаций гена *DNMT3A* – 20% [11, 12]. Опубликованные раннее результаты исследований ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» на меньших когортах пациентов сопоставимы с данными по частоте встречаемости, представленными в настоящей работе [1, 32, 33].

Большинство исследований демонстрируют увеличение частоты обнаружения мутаций в генах эпигенетической регуляции с возрастом, что лежит в основе концепции возрастного клонального гемопоэза (CHIP) [87, 107, 160, 204, 214]. В нашем исследовании мутации генов *IDH1/2* имели ассоциацию со старшим возрастом (медиана – 57,5 лет, p=0,046), статистическая достоверность при этом достигалась преимущественно за счет наличия данной закономерности у пациентов с мутированным вариантом гена *IDH2* (медиана – 61 год против 50 лет в группе с диким типом гена *IDH2*, p=0,013). Аналогичные результаты получены в исследовании Koszarska и соавт.: медиана возраста пациентов с мутациями гена *IDH2* составила 56,5 лет, в то время как в группе с диким типом генов *IDH* она составила 49 лет (p=0,009) [125]. Нами не было обнаружено взаимосвязи мутированного варианта генов *DNMT3A* и *ASXL1* с возрастом больных. Исследования с аналогичными данными также существуют. Так, Marcucci и соавт. при анализе двух возрастных групп пациентов с впервые выявленным ОМЛ (старше (n=234) и моложе (n=181) 60 лет) зарегистрировали сопоставимую частоту встречаемости мутаций гена *DNMT3A* (33,3% (78/234) и 35,3% (64/181) соответственно, p>0,05) [138]. Наблюдаемые различия с общемировыми

тенденциями, вероятнее всего, обусловлены характеристиками исследуемых когорт пациентов: Marcucci и соавт. анализировали только пациентов с de novo ОМЛ. В нашем исследовании доля пациентов со вторичным ОМЛ (трансформация из предшествующего МДС или исход МПН/ХММЛ) составила 14,4% (33/130) среди которых мутации в генах *DNMT3A* или *ASXL1* были обнаружены лишь у пяти пациентов.

Среди характерных для *IDH1/2*-мутированного ОМЛ лабораторных особенностей нами были выделены более высокая медиана уровня тромбоцитов ($83x10^9$/л против $45x10^9$/л, p=0,006) и более низкие медианы уровня лейкоцитов ($5,3x10^9$/л против $29x10^9$/л, p=0,043), нейтрофилов ($0,5x10^9$/л против $2,4x10^9$/л, p=0,008) и активности общей ЛДГ сыворотки (285 Ед/л против 527 Ед/л, p=0,007) по сравнению с таковыми у пациентов с диким типом генов *IDH1/2*. Полученные результаты полностью согласуются с данными исследования DiNardo и соавт. – одного из наиболее крупных исследований, посвященному анализу особенностей ОМЛ с мутациями генов *IDH1/2* [87]. Интересные результаты были продемонстрированы в недавно опубликованной работе Komrokji и соавт.: для пациентов с МДС, имеющих тяжелую нейтропению (АЧН < 0,8 x 10^9/л), также характерно частое выявление мутаций в генах *IDH1/2* (13% (61/462) против 6% (85/1489) в группе пациентов без тяжелой нейтропении, p<0,005) [123]. В статье Chou и соавт. отмечено, что у пациентов с мутированным вариантом генов *IDH1/2* реже обнаруживается экспрессия маркеров HLA-DR, CD34, CD15, CD7 и CD56 на поверхности бластных клеток [74]. Отмеченная в настоящем исследовании частая потеря экспрессии маркера CD34 у пациентов с мутациями генов *IDH1/2* может быть обусловлена высокой частотой кооперации данных мутаций с *NPM1*-мутированным ОМЛ, для которого такая особенность является характерной [38, 187]. Помимо наблюдаемой кооперации с мутированным статусом гена *NPM1*, мутации в генах *IDH1/2* часто сочетались с нормальным кариотипом и мутацией R882 в гене *DNMT3A*, что соотносится со многими более ранними исследованиями [59, 87, 88, 132, 135, 159, 163, 209, 214]. Известна широкая распространенность мутаций в генах *IDH1/2* в группе пациентов промежуточного генетического риска

(ELN-2022) [87], однако в нашем исследовании мутантный вариант генов *IDH1/2* преобладал среди пациентов благоприятной прогностической категории, что является интересным и уникальным наблюдением, возможно косвенно обусловленным ассоциацией с мутациями гена *NPM1*.

Для пациентов с мутацией R882 гена *DNMT3A* была характерна более высокая медиана уровня бластных клеток в костном мозге (78% против 56% у пациентов с диким типом *DNMT3A*, p=0,048). Gaidzik и соавт. также обнаружили данную закономерность в своем исследовании (медиана 80% против 73%, p<0,0001) и, помимо этого, отметили тенденцию к более высокому уровню тромбоцитов, лейкоцитов и активности общей ЛДГ сыворотки в дебюте заболевания [104]. Мутации в гене *DNMT3A* имеют ассоциацию с нормальным кариотипом, мутированным вариантом генов *NPM1* и *IDH1/2*, что продемонстрировано в нескольких независимых исследованиях [59, 130, 174]. В нашей работе не было выявлено статистически значимой взаимосвязи мутации R882 в гене *DNMT3A* с нормальным кариотипом, хотя частота её выявления в данной когорте была выше, по сравнению со всей группой пациентов, и составила 26,8% (15/56).

Мутации генов *ASXL1* и *ASXL2* часто сопутствуют ОМЛ с t(8;21)(*RUNX1-RUNX1T1*) [126, 149], что было продемонстрировано и в настоящем исследовании. Высокая частота ассоциации мутаций в гене *ASXL1* с *RUNX1*-мутацией и t(8;21)(*RUNX1-RUNX1T1*) предполагает совместное участие данных перестроек в процессах модификации хроматина в ходе лейкозогенеза [72]. Интересным наблюдением является обнаруженная более частая экспрессия антигена CD56 в группе пациентов с мутированным вариантом гена *ASXL1*. По мнению Johnson и соавт., высокая частота экспрессии антигена CD56 в группе пациентов с кооперацией мутаций генов *ASXL1* и *SRSF2* является доказательством более частой моноцитарной дифференцировки ОМЛ с данными мутациями, поскольку подобная аберрантная экспрессия CD56 часто встречается на моноцитах при ХММЛ [119].

Представленные в настоящем исследовании результаты NGS позволяют более детально проанализировать генетический профиль ОМЛ с мутациями генов-

эпигенетических модификаторов. Отмечена высокая частота обнаружения сопутствующих мутаций – во всех проанализированных образцах детектировались те или иные SNVs, а более чем у половины пациентов выявлено от 5 до 10 одновременно мутированных генов, что подчеркивает выраженную биологическую гетерогенность ОМЛ. В 2021 году были опубликованы результаты исследования Lu и соавт., в котором анализировались данные таргетного высокопроизводительного секвенирования 485 взрослых пациентов и оценивался молекулярный профиль *IDH*-мутированного ОМЛ. Сопутствующие дополнительные генные мутации были обнаружены у 91,7% пациентов с мутациями генов *IDH1/2.* Большинство из них возникало в генах, вовлеченных в регуляцию транскрипции и RAS-сигналинга, а также ответственных за метилирование ДНК – *DNMT3A, TET2, NRAS, PTPN11, RUNX1* [135]. Согласно данным нашего исследования у пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции наиболее часто выявлялись мутации генов *NRAS/KRAS* (44,4%), *NF1* (38,9%) и *KMT2C/D* (38,9%). Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что нарушениям регуляции эпигенетических процессов зачастую сопутствуют аномальные паттерны активации сигнальных путей. В экспериментах in vivo, проводимых Lu и соавт., продемонстрировано, что кооперация мутации R882 в гене *DNMT3A* с мутациями гена *NRAS* необходима для запуска трансформации гемопоэтических клеток-предшественниц и индукции лейкозогенеза [136]. Частая кооперация мутаций в гене *DNMT3A* с мутациями гена *KRAS* были продемонстрированы в исследовании Виноградова и соавт., что позволило выдвинуть предположение о кооперации их белковых продуктов в ходе злокачественной трансформации [3].

Несколько независимых исследований продемонстрировали, что сопутствующие мутации в генах, регулирующих RAS-сигналинг, могут обуславливать резистентность к ингибиторам мутантных IDH1/2 у пациентов с *IDH1/2*-мутированным ОМЛ [40, 70]. В настоящей работе было выявлено, что пациенты с сопутствующими мутациями генов сигнального пути RAS имеют худшие показатели ОВ (медиана ОВ 14 мес. против 21,2 мес., p=0,045) во всех

группах терапии. Ингибиторы мутантных форм ферментов IDH1/2 не использовались в лечении исследуемой когорты пациентов. В настоящий момент остается до конца неясным, приводит ли конститутивная активация RAS-сигналинга к непосредственному блоку 2-HG-независимой дифференцировки клеток и, в связи с этим, к развитию резистентности к ингибиторам мутантных форм IDH1/2. Также описано, что мутации генов RAS-сигналинга превалируют среди пациентов, рефрактерных к ингибиторам FLT3 и bcl-2. В исследовании McMahon и соавт. выдвинуто предположение о роли мутаций, активирующих сигнальный путь RAS/MAPK (в частности в генах *NRAS* и *KRAS*) в развитии резистентности к терапии ингибитором FLT3 второго поколения гилтеритинибом [145]. Исследование 2020 года DiNardo и соавт., проведенное с использованием технологии секвенирования ДНК одиночных клеток (single-cell DNA sequencing), выявило увеличение частоты мутаций в генах, кодирующих RAS-сигналинг, в субклонах с приобретенной резистентностью к терапии венетоклаксом [89]. Помимо мутаций генов *NRAS/KRAS*, в нашем исследовании негативными прогностическими факторами также являлись увеличение общего количества мутированных генов (9 и больше) и наличие сопутствующих мутаций гена *NF1*. В исследовании Цветкова и соавт. медиана времени до прогрессирования в группе пациентов с МДС была ниже при увеличении общего количества мутированных генов, обнаруженных методом NGS (12 мес. в случаях выявления двух и более мутаций против недостижения медианы при наличии одного мутированного гена, p=0,024) [31]. Можно сделать косвенный вывод, что сопутствующие мутации генов *NRAS/KRAS* и *NF1* являются маркерами более тяжелого мутационного бремени, а ухудшение прогноза при увеличении общего количества мутированных генов свидетельствует в пользу клональной эволюции и экспансии более злокачественных клонов.

Выборка пациентов, включенных в настоящее исследование, является репрезентативной и позволяет достоверно оценить прогностическое значение мутаций генов эпигенетической регуляции. Доказательством этому является сопоставимые с общемировыми данные по прогнозу больных различных

генетических групп риска (ELN-2022) – пациенты с благоприятными генетическими аномалиями имели лучшие показатели ОВ, БРВ, более низкую КЧР, частоту развития РР и более частую частоту достижения ПР. Кроме того, была продемонстрирована частая кооперация мутированного варианта гена *NPM1* с мутацией *FLT3*-ITD и их взаимодополняющее влияние на прогноз, что также соответствует современной концепции стратификации пациентов [23, 93, 168, 172].

Большинство исследований, посвященных изучению прогноза пациентов с мутированным статусом генов *IDH1/2*, демонстрируют его нейтральную прогностическую роль [71, 87, 125, 192, 214]. В нашей работе выявлено улучшение показателей ОВ в группе пациентов с мутациями генов *IDH1/2*. При этом при анализе прогностического значения мутаций генов *IDH1* и *IDH2* изолированно друг от друга, а также в комбинациях с другими известными и рутинно определяемыми генетическими аномалиями достоверно значимого влияния на показатели прогноза выявлено не было. Исследования Chou и соавт. [74], Patel и соавт. [162], а также Xu и соавт. [207] подчеркивают возможное улучшение прогноза пациентов с мутациями гена *IDH2*, но не *IDH1*. Полученные расхождения можно объяснить разнородными по объемам выборок, молекулярным, цитогенетическим, возрастным и терапевтическим характеристикам популяциями пациентов, включенных в анализ, что делает невозможным прямые сравнения с результатами других исследований. Так, в анализ Chou и соавт. были включены только пациенты с de novo ОМЛ, получившие стандартную интенсивную химиотерапию, в анализ Patel и соавт. – только пациенты моложе 60 лет, которым также были назначены режимы химиотерапии стандартной или высокой интенсивности, а исследование Xu и соавт. представляет собой мета-анализ 33-х разнородных исследований.

Во многих исследованиях, включая настоящую работу, приводятся доказательства того, что мутированный вариант гена *DNMT3A* не стоит рассматривать как независимый и самостоятельный фактор прогноза изолированно от сопутствующего цитогенетического и молекулярного профиля пациента. В общей когорте больных различий в показателях прогноза в зависимости от

мутационного статуса гена *DNMT3A* выявлено не было. При этом в группе пациентов с нормальным кариотипом наблюдалось ухудшение показателей ОВ при обнаружении мутации R882, что подтверждает и дополняет результаты ранее опубликованных исследований. В анализе Park и соавт. мутации в гене *DNMT3A* негативно влияли на показатели как ОВ, так и БСВ в данной когорте пациентов (p=0,0376 и p=0,0019 соответственно) [157]. Аналогичные результаты были продемонстрированы в более ранних работах Ley и соавт. [130] и Thol и соавт. [191] при включении большего количества пациентов в анализ. Интересным наблюдением было также ухудшение прогноза пациентов благоприятной группы риска (ELN-2022) в случаях обнаружения мутированного варианта гена *DNMT3A* (медиана ОВ – 11,3 мес. против недостижения медианы при диком типе гена *DNMT3A*, p=0,027). Известны работы, демонстрирующие негативное влияние мутаций гена *DNMT3A* на прогноз пациентов промежуточного генетического риска [130, 141]. Ухудшение прогноза пациентов с благоприятным кариотипом при наличии сопутствующей мутации гена *DNMT3A* продемонстрировано впервые.

В нашем исследовании мутированный вариант гена *DNMT3A* имел неблагоприятное прогностическое значение в когорте больных с мутациями в гене *NPM1*. Похожие данные представлены в исследовании Ley и соавт., которое выявило ухудшение показателей ОВ пациентов с мутированным вариантом гена *NPM1* при наличии сопутствующих мутаций гена *DNMT3A* (p=0,0241) [130]. В работе Gale и соавт. мутированный вариант гена *DNMT3A* проявлял негативное влияние на показатели БРВ и ОВ только в группе пациентов с мутациями гена *NPM1* (ОР 1,35; [95% ДИ 1,07-1,72], p=0,01 и ОР 1,37; [95% ДИ 1,12-1,87], p=0,002), при этом в общей когорте больных влияния на прогноз обнаружено не было (аналогично представленным нами данным). Авторы исследования справедливо объясняют полученные результаты примером парадокса Симпсона, с учетом высокой частоты кооперации мутаций в генах *DNMT3A* и *NPM1* друг с другом и их противоположного прогностического значения [105].

Негативное влияние обнаружения сопутствующей мутации R882 в гене *DNMT3A* также проявлялось у пациентов с мутацией *FLT3*-ITD в виде увеличения

вероятности развития РР (100% против 29,4%, p=0,022) и показателей КЧР (100% против 60,8%, p=0,036). Аналогичные результаты были получены Markova и соавт., которые, помимо этого, выявили ухудшение показателей ОВ в группе пациентов промежуточного генетического риска с мутацией *FLT3*-ITD, достигших ПР, при наличии сопутствующих мутаций гена *DNMT3A* (11 мес. против 19,1 мес., p=0,012) [141]. Мутированный вариант гена *DNMT3A*, а также мутации гена *TET2*, *MLL*-PTD или трисомия 8 хромосомы являлись независимыми прогностическими факторами, негативно влияющими на показатели ОВ пациентов с мутацией *FLT3*-ITD в исследовании Patel и соавт. [162]. В исследовании Мотыко и соавт. отмечено ухудшение прогноза пациентов при комбинации двух мутаций: медиана ОВ составила 18,1 мес. в группе пациентов с одним мутированным геном (*DNMT3A, NPM1* или *FLT3*) против 12,2 мес. при наличии сочетания мутаций в двух генах (p=0,003) [21].

Группа пациентов с тройным мутационным статусом («*FND*»), выделенная в настоящем исследовании, характеризовалась наиболее плохим прогнозом. В работе Papaemmanuil и соавт. (2016 год) впервые было продемонстрировано, что негативная прогностическая роль мутации *FLT3*-ITD наиболее выражена именно в когорте пациентов с сопутствующими мутациями генов *NPM1* и *DNMT3A* [156]. В дальнейшем в исследовании Bezerra и соавт. (2020 год) также были выявлены худшие показатели выживаемости в группе пациентов с тройным мутационным статусом по сравнению с больными без данной комбинации: 5-летняя ОВ составила 4% (95% ДИ 2-15) против 21% (95% ДИ 17-26) (p=0,011), 5-летняя БРВ – 5% (95% ДИ 1-20) против 42% (95% ДИ 34-49) (p<0,0001), КЧР – 85% (95% ДИ 71-98) против 50% (95% ДИ 43-56) (p<0,0001) [49]. В конце 2022 года на ASH были представлены результаты ретроспективного исследования Torabi и соавт., в котором оценивалась прогностическая роль мутаций в гене *DNMT3A* в сочетаниях с другими молекулярными аномалиями. Наиболее неблагоприятные исходы наблюдались в группе пациентов с комбинацией трех мутаций (в генах *DNMT3A*, *NPM1* и мутацией *FLT3*-ITD, 5-летняя ОВ – 11,8%) [194]. Стоит отметить, что в нашей работе показатель отношения рисков при анализе влияния на ОВ и БРВ

группы «*FND*» был даже выше, чем для фактора наличия у пациента неблагоприятных цитогенетических аномалий. Учитывая полученные данные и имеющиеся результаты опубликованных исследований, дальнейшее изучение прогностического значения комбинации «*FND*» представляется крайне перспективным и многообещающим.

В нашей работе была подтверждена роль мутаций 12 экзона гена *ASXL1* как негативного прогностического фактора в группе пациентов с впервые выявленным ОМЛ без сопутствующих генетических аномалий благоприятного риска. Полученные нами данные расходятся с опубликованными результатами исследования Carbuccia и соавт. [60] о взаимоисключающем характере мутаций в генах *NPM1* и *ASXL1* – у четырех пациентов было выявлено сочетание данных мутаций друг с другом. Более того, пациенты с мутациями гена *NPM1* и, в целом, благоприятной генетической группы риска (ELN-2022), имели худший прогноз в случаях детекции сопутствующих мутаций 12 экзона гена *ASXL1*. Полученные нами данные соотносятся с ранее упомянутыми результатами исследований Metzeler и соавт. [146], Duployez и соавт. [95] и Krauth и соавт. [126]. Это ставит под сомнение текущую концепцию стратификации пациентов на группы риска и корректность отнесения больных с мутациями гена *ASXL1* в благоприятную прогностическую категорию в случаях сочетания с благоприятными генетическими аномалиями. Накопление опыта и проведение дальнейших подобных исследований на более однородных и крупных когортах пациентов может послужить толчком к оптимизации текущей прогностической модели и пересмотру подхода в пользу расширения показаний к выполнению алло-ТГКС в первой ПР.

Согласно актуальным рекомендациям ELN-2022 и NCCN пациентам с рецидивами или рефрактерным течением *IDH1/2* – мутированного ОМЛ, а также коморбидным пациентам с мутациями генов *IDH1/2*, не являющимся кандидатами на проведение интенсивной полихимиотерапии, возможно использование таргетных препаратов ивосединиба или енасидениба (в монотерапии или в комбинациях с ГМА) [93, 168]. В работе Konopleva и соавт. (2016 год) было

высказано предположение о большей чувствительности опухолевых клеток с мутированным вариантом генов *IDH1/2* к терапии венетоклаксом [124]. Подтверждающие данную гипотезу исследования были представлены на ASH в 2022 году. Bouligny и соавт., проанализировав когорту из 103 пациентов с ОМЛ, получавших терапию венетоклаксом в комбинации с ГМА, отметили наиболее длительную медиану ОВ в группе больных с мутированным вариантом генов *IDH1/2* (37,5 мес. для пациентов с впервые выявленным ОМЛ и 11,6 мес. для пациентов с рецидивным/рефрактерным ОМЛ, p=0,0448) [53]. В исследовании Hayden и соавт. с включением 144 больных с впервые выявленным ОМЛ, которым в качестве индукции ремиссии назначался режим в комбинации 5-азацитидина с венетоклаксом, частота выявления мутаций в генах *IDH1/2* была достоверно выше в когорте ответивших на терапию пациентов (40% против 14%, p=0,02) [112]. Ингибиторы мутантных форм ферментов IDH1/2 не использовались в лечении пациентов в настоящем исследовании. Однако нами также было обнаружено преимущество при использовании низкоинтенсивных режимов терапии с включением венетоклакса среди пациентов с мутациями генов *IDH1/2* и/или *DNMT3A* (достижение ПР 83,3% против 0% при назначении монотерапии ГМА/МДЦ, p=0,006). Вопрос целесообразности добавления венетоклакса к стандартным режимам индукции или консолидации ремиссии для пациентов с мутациями генов эпигенетической регуляции в настоящий момент остается открытым.

Таким образом, проведенное нами исследование является доказательством гетерогенного характера ОМЛ – как с точки зрения молекулярного профиля каждого конкретного пациента, так и в аспекте факторов, влияющих на показатели прогноза. Полученные результаты позволяют однозначно постулировать о необходимости продолжения исследований, нацеленных на изучение нарушений эпигенетических процессов при ОМЛ, с целью оптимизации подхода к стратификации пациентов и персонификации стратегий терапии.

ВЫВОДЫ

1. По результатам оценки мутационного статуса генов *IDH1/2, DNMT3A, ASXL1* в группе пациентов с впервые диагностированным ОМЛ, общая частота выявления мутаций эпигенетических модификаторов составила 35,4%. Мутации R140 гене *IDH1* и R132 в гене *IDH2* были обнаружены у 9,6% и 6,1% больных соответственно, R882 в гене *DNMT3A* у 17,7% больных, а мутации 12 экзона гена *ASXL1* – у 9,6% больных.

2. Мутации в генах-эпигенетических модификаторах ассоциированы с определенными клинико-гематологическими и генетическими характеристиками. Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* – со старшим возрастом (медиана – 57,5 лет), нейтропенией (медиана – $0,5x10^9$/л) и более высокой медианой уровня тромбоцитов ($83x10^9$/л) в дебюте заболевания, благоприятной группой генетического риска (ELN-2022), нормальным кариотипом и мутированным статусом гена *NPM1*.

У пациентов с мутацией R882 в гене *DNMT3A* отмечается более высокая медиана уровня бластных клеток в дебюте заболевания (78%) и чаще выявляются мутации в генах *NPM1* и *IDH1/2*.

Мутированный статус гена *ASXL1* ассоциирован с гиперэкспрессией CD56 на бластных клетках и чаще определяется у пациентов с t(8;21)(q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1).

3. В группе пациентов с мутированным статусом генов эпигенетической регуляции отмечается высокая частота выявления сопутствующих однонуклеотидных замен: генов *NRAS/KRAS* в 44,8%, *NF1* – в 38,9%, *KMT2C/D* – в 38,9%, *ROS1* – в 27,8%, *MSH6* – в 27,8%, *ATM* – в 27,8% проанализированных образцов.

Неблагоприятное прогностическое значение несут мутации в генах *NRAS/KRAS* (медиана ОВ 14 мес. против 21,2 мес.) и *NF1* (частота достижения ПР 40% против 87,5%). Одновременная детекция мутаций в 9 и более генах ассоциирована со снижением вероятности достижения ПР после первого индукционного курса терапии (27,3% против 83,3%).

4. Выявлено, что мутации генов эпигенетической регуляции проявляют негативное прогностическое значение в определенных когортах больных с впервые выявленным ОМЛ. В частности, мутация R882 гена *DNMT3A* – у пациентов с нормальным кариотипом (медиана ОВ 11,3 мес. против 24,1 мес.), благоприятной группы генетического риска (медиана ОВ 11,3 мес. против недостижения медианы), мутированным статусом гена *NPM1* (медиана ОВ 24,1 мес. против 10,7 мес., HR 8,248 (p=0,016); БРВ – 14,8 мес. против 5,5 мес., HR 11,401 (p=0,019); кумулятивная частота рецидивов – 83,3% против 55%, частота ранних рецидивов – 50% против 7,7%) и мутацией *FLT3*-ITD (частота рецидивов в течение полугода – 100% против 29,4%), кумулятивная частота рецидивов – 100% против 60,8%). Также было обнаружено, что пациенты благоприятной группы генетического риска и с мутированным статусом гена *NPM1* имеют худший прогноз при наличии сопутствующей мутации 12 экзона гена *ASXL1* (медиана ОВ – 3,5 мес. против 30,7 мес. и 0,8 мес. против 23,6 мес., соответственно)

5. Тройной мутационный статус (группа *«FND»* - мутация *FLT3*-ITD + мутированный тип гена *NPM1* + мутация R882 гена *DNMT3A*) ассоциирован с худшим прогнозом: медиана ОВ 10,7 мес. против 20,1 мес. в случаях кооперации только двух мутаций (мутация *FLT3*-ITD + мутированный тип гена *NPM1)*, медиана БРВ – 5,3 мес. против 19,9 мес., кумулятивная частота рецидивов – 100% против 50%, развитие раннего рецидива – 100% против 25%.

Негативное влияние кооперации *«FND»* на показатели ОВ (HR 4,21; [95% ДИ 1,08-16,4], p=0,038) и БРВ (HR 14,1; [95% ДИ 3,06-65,04], p=0,001) в многофакторном анализе характеризуется значением отношения рисков, превышающим фактор наличия неблагоприятных цитогенетических аномалий (ELN-2022) (HR 3,22; [95% ДИ 1,18-8,78], p=0,022 и HR 3,75; [95% ДИ 1,017-13,86], p=0,047, соответственно).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам благоприятной группы генетического риска (ELN-2022), с нормальным кариотипом, мутированным статусом генов *NPM1* и *FLT3* (мутация ITD) рекомендовано проведение оценки мутационного статуса генов *IDH1/2, DNMT3A* и *ASXL1*.

2. Обнаружение мутации R882 в гене *DNMT3A* в сочетании с нормальным кариотипом, мутациями в генах *NPM1* и/или *FLT3* (мутация ITD) является неблагоприятным прогностическим фактором. В данной категории пациентов целесообразно рассмотрение вопроса о возможности выполнения алло-ТГСК в первой полной ремиссии. Аналогичная тактика применима к когорте пациентов благоприятного генетического риска (ELN-2022) при выявлении сопутствующей мутации R882 в гене *DNMT3A* или мутаций 12 экзона гена *ASXL1*.

3. Пациентам, не являющимся кандидатами на проведение интенсивной терапии, показано определение мутационного статуса генов *IDH1/2* и *DNMT3A*. В случаях обнаружения мутаций рекомендовано отдавать предпочтение неинтенсивным вариантам терапии с включением ингибитора bcl-2 венетоклакса.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в ходе настоящей работы данные подчеркивают необходимость продолжения исследований, посвященных изучению эпигенетических нарушений при ОМЛ. Актуальными для дальнейшего изучения в настоящее время остаются следующие вопросы:

1. Изучение патогенетических механизмов, объясняющих взаимосвязь множественных молекулярных альтераций, сопутствующих эпигенетическим нарушениям.

2. Оценка прогностической значимости сопутствующих дополнительных генных мутаций, выявляемых при NGS на большей когорте пациентов.

3. Определение показаний к выполнению алло-ТГСК в первой полной ремиссии для пациентов когорты «*FND*» и благоприятной прогностической группы риска в случаях сопутствующей детекции мутаций в генах эпигенетической регуляции.

4. Анализ эффективности добавления ингибитора bcl-2 венетоклакса к стандартным режимам индукционной терапии для пациентов с определяемыми мутациями генов-эпигенетических модификаторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

Алло-ТГКС – трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

АЧН – абсолютное число нейтрофилов

БРВ – безрецидивная выживаемость

БСВ – бессобытийная выживаемость

ВДЦ – высокие дозы цитарабина

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ГМА – гипометилирующие агенты

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДИ – доверительный интервал

ИФТ – иммунофенотипирование

КЧР – кумулятивная частота рецидивов

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛПУ – лечебно-профилактические учреждения

МДЦ – малые дозы цитарабина

МДС – миелодиспластический синдром

МОБ – минимальная остаточная болезнь

МПН – миелопролиферативные новообразования

НАД – никотинамидадениндинуклеотид (NAD)

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP)

ОВ – общая выживаемость

ОМЛ – острый миелоидный лейкоз

ОР – отношение рисков

ПМФ – первичный миелофиброз

ПО – порог отсечения

ПР – полная ремиссия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РР – ранний (в течение первых 6 месяцев) рецидив

ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз

ASH – American Society of Hematology

CHIP – clonal hematopoiesis of indeterminate potential (клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом)

CNV – cope number variations (вариации числа копий генов)

ddPCR – droplet digital Polymerase Chain Reaction (цифровая капельная полимеразная цепная реакция)

DNMT – DNA methyltransferase, ДНК-метилтрансфезара

ELN – European LeukemiaNet (Европейская сеть по изучению лейкозов)

FAB – French-American-British classification (Франко-Америко-Британская классификация)

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

FISH – флуоресцентная in situ гибридизация

FLT3 – *FMS*-like tyrosine kinase 3 (*FMS*-подобная тирозинкиназа 3)

FLT3-ITD – FLT3-internal tandem duplication (внутренняя тандемная дупликация в гене *FLT3*)

FLT3-TKD – точечные мутации в тирозинкиназном домене гена *FLT3*

FN – кооперация мутации *FLT3*-ITD с мутированным типом гена *NPM1* (без мутации R882 в гене *DNMT3A*)

FND – кооперация мутации *FLT3*-ITD с мутированным типом гена *NPM1* и мутацией R882 гена *DNMT3A*

HDAC – histone deacetylases (деацителазы гистонов)

HMP – histone modifying proteines (гистон-модифицирующие белки)

HR – Hazard Ratio

IDH1/2 – Isocitrate Dehydrogenase 1/2 (изоцитратдегидрогеназы 1/2)

NGS – Next-Generation Sequencing (секвенирование нового поколения)

NPM1 – nucleophosmin 1 (нуклеофосмин 1)

RT-ПЦР – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (real-time)

RUNX1 – Runt-related transcription factor 1 (Runt-ассоциированный транскрипционный фактор 1)

SNVs – single nucleotide variants (однонуклеотидных варианты)

TCGA – проект The Cancer Genome Atlas (Атлас ракового генома)

TET2 – Tet Metylcytosine Dioxygenase 2 (TET-метилцитозиндегидрогеназа)

VAF – Variant Allele Frequency (частота вариантного аллеля)

WBC – white blood count (общее количество лейкоцитов)

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоцерковская, Е.В. Выявление мутаций генов эпигенетической регуляции генома IDH1/2, DNMT3A, ASXL1 и их сочетания с мутациями FLT3, NPM1, RUNX1 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами / Е.В. Белоцерковская, Е.К. Зайкова, А.В. Петухов и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2021. – Т. 14, № 1. – С. 13-21.

2. Блау, О.В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах / О.В. Блау // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 245-256.

3. Виноградов, А.В. Детекция точечных мутаций в гене DNMT3A при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования / А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 18-23.

4. Гальцева, И.В. Методические аспекты детекции минимальной остаточной болезни у больных острыми лейкозами / И.В. Гальцева, С.Ю. Смирнова, Е.Н. Паровичникова // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67, № 1. – С. 108-120.

5. Грицаев, С.В. Азацитидин при остром миелобластном лейкозе и миелодиспластическом синдроме / С.В. Грицаев, И.С. Мартынкевич, И.И. Кострома // Гематология и трансфузиология. – 2012. – Т. 57, № 1. – С. 23-29.

6. Грицаев, С.В. Анализ статуса метилирования генов p15 INK4b и SOX7 у больных миелодиспластическим синдромом и острым миелоидным лейкозом / С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова, С.И. Капустин и др. // Гематология и трансфузиология. – 2015. – Т. 60, № 1. – С. 12-17.

7. Зайкова, Е.К. Молекулярная диагностика мутаций гена FLT3 у пациентов с острыми миелоидными лейкозами / Е.К. Зайкова, Е.В. Белоцерковская, Д.В. Зайцев и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2020. – Т. 13, № 2. – С. 150-160.

8. Залетаев, Д.В. Аномалии метилирования в процессах канцерогенеза: поиск новых генов, разработка методов и систем ДНК-маркеров для диагностики / Д.В. Залетаев, В.В. Стрельников, Т.В. Кекеева и др. // Экологическая генетика. – 2011. – Т. 9, № 3. – С. 27-32.

9. Карпенко, Д.В. Роль эпигенетических модификаций ДНК и гистонов в лечении онкогематологических заболеваний / Д.В. Карпенко, Н.А. Петинати, Н.И. Дризе и др. // Гематология и трансфузиология. – 2021. – Т. 66, № 2. – С. 263-279.

10. Карташев, А.В. Генетические маркеры злокачественных глиом / А.В. Карташев, Е.И. Якубович // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. ИИ Мечникова. – 2016. – Т. 8, № 3. – С. 107-114.

11. Кашлакова, А.И. Исследование мутаций генов IDH1, IDH2 при острых миелоидных лейкозах взрослых / А.И. Кашлакова, Ю.В. Сидорова, В.В. Троицкая и др. // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65, № S1. – С. 149-150.

12. Кашлакова, А.И. Определение молекулярно-генетического профиля у взрослых больных острыми миелоидными лейкозами методом секвенирования нового поколения / А.И. Кашлакова, Е.Н. Паровичникова, Б.В. Бидерман и др. // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 444-459.

13. Кириенко, А.Н. Секвенирование следующего поколения (NGS) в диагностике, определении прогноза и особенностей течения заболевания у Ph-негативных пациентов с хроническими миелоидными новообразованиями / А.Н. Кириенко, Е.В. Мотыко, Д.В. Кустова и др. // Вестник гематологии. – 2022. – Т. 18, № 2. – С. 57-58.

14. Ковалев, А.А. Оценка качества бинарного классификатора в научных исследованиях / А.А. Ковалев, Б.К. Кузнецов, А.А. Ядченко и др. // Проблемы здоровья и экологии. – 2020. – № 4 (66). – С. 105-113.

15. Кострома, И.И. Аберрантное метилирование промоторных областей генов SOX7, p15INK4b и антагонистов сигнального пути Wnt у больных острыми миелоидными лейкозами / И.И. Кострома, С.В. Грицаев, Ж.Ю. Сидорова и др. // Терапевтический архив. – 2016. – Т. 88, № 7. – С. 31-36.

16. Максимова, В.П. Нарушение метилирования ДНК при злокачественных новообразованиях / В.П. Максимова, О.Г. Усалка, Ю.В. Макусь и др. // Успехи молекулярной онкологии. – 2022. – Т. 9, № 4. – С. 24-40.

17. Меликян, А.Л. Биология миелопролиферативных новообразований / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9, № 3. – С. 314-325.

18. Меликян, А.Л. Прогностическое значение мутации ASXL1 при первичном миелофиброзе. Обзор литературы и описание клинического случая / А.Л. Меликян, И.Н. Суборцева, Е.А. Гилязитдинова и др. // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92, № 7. – С. 95-99.

19. Мисюрин, А.В. Цитогенетические и молекулярно-генетические факторы прогноза острых миелоидных лейкозов / А.В. Мисюрин // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2017. – Т. 10, № 2. – С. 227-234.

20. Мотыко, Е.В. Анализ геномной гетерогенности CBF-ОМЛ с использованием метода высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Мотыко, А.Н. Кириенко, Д.В. Кустова и др. // Вестник гематологии. – 2022. – Т. 18, № 2. – С. 72-73.

21. Мотыко, Е.В. Прогностическое значение генетических мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами: результаты совместного исследования гематологических клиник Санкт-Петербурга (Россия) и клиники Шарите (Германия) / Е.В. Мотыко, О.В. Блау, Л.Б. Полушкина и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2019. – Т. 12, № 2. – С. 211-219.

22. Новикова, Е.И. Секвенирование «нового поколения» (NGS): применение для молекулярно-генетических исследований в онкологии / Е.И. Новикова, Г.П. Снигирева // Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России. – 2016. – Т. 16, № 1. – С. 6-21.

23. Паровичникова, Е. Н. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых / Ассоциация

содействия развитию гематологии и трансплантологии костного мозга «Национальное гематологическое общество». – 2022. – URL: https://npngo.ru/biblioteka/klinicheskie_rekomendatsii__2022_god_

24. Паровичникова, Е.Н. Разработка программной терапии больных острыми миелоидными лейкозами в возрасте моложе 60 лет, основанной на принципах дифференцированного воздействия / Е.Н. Паровичникова, И.А. Лукьянова, В.В. Троицкая и др. // Терапевтический архив. – 2021. – Т. 93. – №. 7. – С. 753-762.

25. Паровичникова, Е. Н. Результаты программной терапии острых миелоидных лейкозов в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России / Е.Н. Паровичникова, И.А. Лукьянова, В.В. Троицкая и др. // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, № 7. – С. 14-22.

26. Петинати, Н. А. Клональное кроветворение и его роль в развитии гематологических заболеваний / Н.А. Петинати, Н.И. Дризе // Гематология и трансфузиология. – 2021. – Т. 66, № 4. – С. 580-592.

27. Пехова, К.А. Генетический ландшафт острых миелоидных лейкозов, протекающих с лейкоцитозом / К.А. Пехова, Ю.В. Сидорова, Н.А. Северина и др. // Онкогематология. – 2023. – Т. 18, № 3. – С. 102-114.

28. Савченко, В.Г. Острые лейкозы / В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичникова // Клиническая онкогематология: руководство для врачей. Под ред. В.А. Волковой. – Москва: Медицина, 2007. – С. 409-502.

29. Треглазова, С.А. Мутации гена SRSF2 у п ациентов МДС/МПЗ: пилотное исследование / С.А. Треглазова, М.А. Соколова, Т.В. Макарик и др. // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65, № S1. – С. 228-228.

30. Храброва, Д.А. Мутации в ДНК-метилтрансферазе DNMT3A при остром миелоидном лейкозе / Д.А. Храброва, М.Г. Якубовская, Е.С. Громова // Биохимия. – 2021. – Т. 86, № 3. – С. 360-373.

31. Цветков, Н.Ю. Прогностическое значение результатов секвенирования нового поколения у пациентов с миелодиспластическим синдромом / Н.Ю. Цветков, Е.В. Морозова, И.М. Бархатов и др. // Клиническая онкогематология.

Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2020. – Т. 13, № 2. – С. 170-175.

32. Шатилова, А.А. Прогностическое значение соматических мутаций в генах эпигенетической регуляции при острых миелоидных лейкозах в реальной клинической практике: результаты наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования / А.А. Шатилова, И.Г. Будаева, А.В. Петухов и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2023. – Т. 16, № 2. – С. 174-185.

33. Шатилова, А.А. Оценка частоты встречаемости и прогностической значимости мутации DNMT3A среди пациентов с впервые выявленным острым миелобластным лейкозом / А.А. Шатилова, Л.Л. Гиршова, И.Г. Будаева и др. // Вестник гематологии. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 64-64.

34. Abbas, S. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value / S. Abbas, S. Lugthart, F.G. Kavelaars et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Vol. 116, № 12. – P. 2122-2126.

35. Abdel-Wahab, O. ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression / O. Abdel-Wahab, M. Adli, L.M. LaFave et al. // Cancer cell. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 180-193.

36. Abdel-Wahab, O. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo / O. Abdel-Wahab, J. Gao, M. Adli et al. // Journal of Experimental Medicine. – 2013. – Vol. 210, № 12. – P. 2641-2659.

37. Abelson, S. Prediction of acute myeloid leukaemia risk in healthy individuals / S. Abelson, G. Collord, S.W. Ng et al. // Nature. – 2018. – Vol. 559, № 7714. – P. 400-404.

38. Alcalay, M. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+ AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance / M. Alcalay, E. Tiacci, R. Bergomas et al. // Blood. – 2005. – Vol. 106, № 3. – P. 899-902.

39. Alzial, G. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma / G. Alzial, O. Renoult, F. Paris et al. // Oncogene. – 2022. – Vol. 41, № 5. – P. 613-621

40. Amatangelo, M.D. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response / M.D. Amatangelo, L. Quek, A. Shih // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2017. – Vol. 130, № 6. – P. 732-741.

41. Andersson, A.K. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia / A.K. Andersson, D.W. Miller, J.A. Lynch et al. // Leukemia. – 2011. – Vol. 25, № 10. – P. 1570-1577.

42. Asada, S. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms / S. Asada, T. Kitamura // International Journal of Hematology. – 2019. – Vol. 110. – P. 179-186.

43. Asada, S. Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukaemogenesis / S. Asada, S. Goyama, D. Inoue t sl. // Nature communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 2733 (1-18).

44. Asada, S. The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies / S. Asada, T. Fujino, S. Goyama et al. // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2019. – Vol. 76. – P. 2511-2523.

45. Behjati, S. What is next generation sequencing? / S. Behjati, P.S. Tarpey // Archives of Disease in Childhood-Education and Practice. – 2013. – Vol. 98. – P. 236-238.

46. Bejar, R. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes / R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab et al. // New England Journal of Medicine. – 2011. – Vol. 364, № 26. – P. 2496-2506.

47. Berenstein, R. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia / R. Berenstein, I.W. Blau, A. Kar et al. // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 1-12.

48. Berger, S.L. The complex language of chromatin regulation during transcription / S.L. Berger // Nature. – 2007. – Vol. 447, № 7143. – P. 407-412.

49. Bezerra, M.F. Co-occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 mutations identifies a subset of acute myeloid leukemia with adverse prognosis / M.F. Bezerra, A.S. Lima, M.R. Pique-Borras et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2020. – Vol. 135, № 11. – P. 870-875.

50. Boddu, P. Influence of IDH on FLT3-ITD status in newly diagnosed AML / P. Boddu, K. Takahashi, N. Pemmaraju et al. // Leukemia. – 2017. – Vol. 31, № 11. – P. 2526-2529.

51. Boissel, N. Prognostic impact of isocitrate dehydrogenase enzyme isoforms 1 and 2 mutations in acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association group / N. Boissel, O. Nibourel, A. Renneville et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2010. – Vol. 28, № 23. – P. 3717-3723.

52. Botton, S. Enasidenib vs conventional care in older patients with late-stage mutant-IDH2 relapsed/refractory AML: A randomized phase 3 trial / S. Botton, P. Montesinos, A.C. Schuh et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2023. – Vol. 141, № 2. – P. 156-167.

53. Bouligny, I.M. IDH1/2mut for the Win: Comprehensive Molecular Stratification of Venetoclax in Combination with Hypomethylating Agents in AML / I.M. Bouligny, G. Murray, V. Tran et al. // Blood. – 2022. – Vol. 140, Supplement 1. – P. 6335-6336.

54. Bowman, R.L. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies / R.L. Bowman, L. Busque, R.L. Levine // Cell stem cell. – 2018. – Vol. 22, № 2. – P. 157-170.

55. Brambati, C. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation / C. Brambati, S. Galbiati, E. Xue et al. // Haematologica. – 2016. – Vol. 101, № 4. – P. e157-e161.

56. Brunetti, L. DNMT3A in Leukemia / L. Brunetti, M.C. Gundry, M.A. Goodell // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2017. – Vol. 7, № 2. – P. a030320 (1-18).

57. Busque, L. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis / L. Busque, J.P. Patel, M.E. Figueroa et al. // Nature genetics. – 2012. – Vol. 44, № 11. – P. 1179-1181.

58. Cai, S.F. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis / S.F. Cai, R.L. Levine // Seminars in hematology. – 2019. – Vol. 56, № 2. – P. 84-89.

59. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia / New England Journal of Medicine. – 2013. – Vol. 368, № 22. – P. 2059-2074.

60. Carbuccia, N. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias / N. Carbuccia, V. Trouplin, V. Gelsi-Boyer et al. // Leukemia. – 2010. – Vol. 24, № 2. – P. 469-473.

61. Carter, J.L. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy / J.L. Carter, K. Hege, J. Yang et al. // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2020. – Vol. 5, № 1. – P. 288 (1-29).

62. Cazzola, M. IDH1 and IDH2 mutations in myeloid neoplasms–Novel paradigms and clinical implications / M. Cazzola // Haematologica. – 2010. – Vol. 95, № 10. – P. 1623.

63. Cecotka, A. Region-specific methylation profiling in acute myeloid leukemia / A. Cecotka, J. Polanska // Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences. – 2018. – Vol. 10. – P. 33-42.

64. Cerami, E. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data / E. Cerami, J. Gao, U. Dogrusoz et al. // Cancer discovery. – 2012. – Vol. 2, № 5. – P. 401-404.

65. Challen, G.A. Clonal hematopoiesis: mechanisms driving dominance of stem cell clones / G.A. Challen, M.A. Goodell // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2020. – Vol. 136, № 14. – P. 1590-1598.

66. Challen, G.A. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation / G.A. Challen, D. Sun, M. Jeong et al. // Nature genetics. – 2012. – Vol. 44, № 1. – P. 23-31.

67. Chan, S.M. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia / S.M. Chan, D. Thomas, M.R. Corces-Zimmerman et al. // Nature medicine. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 178-184.

68. Chaturvedi, A. Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML / A. Chaturvedi, M.M. Araujo Cruz, N. Jyotsana et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2013. – Vol. 122, № 16. – P. 2877-2887.

69. Chen, J.Y. The oncometabolite R-2-hydroxyglutarate activates NF-κB-dependent tumor-promoting stromal niche for acute myeloid leukemia cells / J.Y. Chen, Y.S. Lai, H.J. Tsai et al. // Scientific reports. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 32428 (1-12).

70. Choe, S. Molecular mechanisms mediating relapse following ivosidenib monotherapy in IDH1-mutant relapsed or refractory AML / S. Choe, H. Wang, C.D. DiNardo et al. // Blood Adv. – 2020. – Vol. 4, № 9. – P. 1894–1905.

71. Chotirat, S. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients / S. Chotirat, W. Thongnoppakhun, O. Promsuwicha et al. // Journal of hematology & oncology. – 2012. – Vol. 5, № 1. – P. 1-10.

72. Chou, W.C. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations / W.C. Chou, H.H. Huang, H.A. Hou et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Vol. 116, № 20. – P. 4086-4094.

73. Chou, W.C. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics / W.C. Chou, S.C. Chou, C.Y. Liu et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – Vol. 118, № 14. – P. 3803-3810.

74. Chou, W.C. The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia / W.C. Chou, W.C. Lei, B.S. Ko et al. // Leukemia. – 2011. – Vol. 25, № 2. – P. 246-253.

75. Chowdhury, R. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases / R. Chowdhury, K.K. Yeoh, Y.M. Tian et al. // EMBO reports. – 2011. – Vol. 12, № 5. – P. 463-469.

76. Cilloni D. Digital PCR in myeloid malignancies: ready to replace quantitative PCR? / D. Cilloni, J. Petiti, V. Rosso et al. // International journal of molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, № 9. – P. 2249 (1-14).

77. Clark, O. Molecular pathways: isocitrate dehydrogenase mutations in cancer / O. Clark, K. Yen, I.K. Mellinghoff // Clinical Cancer Research. – 2016. – Vol. 22, № 8. – P. 1837-1842.

78. Corces-Zimmerman, M.R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission / M.R. Corces-Zimmerman, W.J. Hong, I.L. Weissman et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Vol. 111, № 7. – P. 2548-2553.

79. Cornelissen, J.J. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach / J.J. Cornelissen, A. Gratwohl, R.F. Schlenk et al. // Nature reviews Clinical oncology. – 2012. – Vol. 9, № 10. – P. 579-590.

80. Damm, F. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML–BFM and DCOG study groups / F. Damm, F. Thol, I. Hollink et al. // Leukemia. – 2011. – Vol. 25, № 11. – P. 1704-1710.

81. Dang, L. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate / L. Dang, D.W. White, S. Gross et al. // Nature. – 2009. – Vol. 462, № 7274. – P. 739-744.

82. Dang, L. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics / L. Dang, K. Yen, E.C. Attar // Annals of Oncology. – 2016. – Vol. 27, № 4. – P. 599-608.

83. Desai, P. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis / P. Desai, N. Mencia-Trinchant, O. Savenkov et al. // Nature medicine. – 2018. – Vol. 24, № 7. – P. 1015-1023.

84. Devillier, R. Role of ASXL1 and TP53 mutations in the molecular classification and prognosis of acute myeloid leukemias with myelodysplasia-related changes / R. Devillier, V. Mansat-De Mas, V. Gelsi-Boyer et al. // Oncotarget. – 2015. – Vol. 6, № 10. – P. 8388-8396.

85. DeWolf, S. How I treat relapsed or refractory AML / S. DeWolf, M.S. Tallman // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2020. – Vol. 136, № 9. – P. 1023-1032.

86. Dijk, A.D. Histone modification patterns using RPPA-based profiling predict outcome in acute myeloid leukemia patients / A.D. van Dijk, C.W. Hu, E.S.J.M. de Bont et al. // Proteomics. – 2018. – Vol. 18, № 8. – P. 1700379 (1-10).

87. DiNardo, C.D. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML / C.D. DiNardo, F. Ravandi, S. Agresta et al. // American journal of hematology. – 2015. – Vol. 90, № 8. – P. 732-736.

88. DiNardo, C.D. IDH1 and IDH2 mutations in myelodysplastic syndromes and role in disease progression / C.D. DiNardo, E. Jabbour, F. Ravandi et al. // Leukemia. – 2016. – Vol. 30, № 4. – P. 980-984.

89. DiNardo, C.D. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML / C.D. DiNardo, I.S. Tiong, A. Quaglieri et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2020. – Vol. 135, № 11. – P. 791-803.

90. DiNardo, C.D. Safety, efficacy, and PK/PD of vorasidenib in previously treated patients with m IDH1/2 hematologic malignancies: A phase 1 study / C.D. DiNardo, S. De Botton, D.A. Pollyea et al. // American Journal of Hematology. – 2023. – Vol.98. – P. e233-e236.

91. Döhner, H. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European

LeukemiaNet / H. Döhner, E.H. Estey, S. Amadori et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Vol. 115, № 3. – P. 453-474.

92. Döhner, H. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel / H. Döhner, E. Estey, D. Grimwade et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2017. – Vol. 129, № 4. – P. 424-447.

93. Döhner, H. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN / H. Döhner, A.H. Wei, F.R. Appelbaum et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2022. – Vol. 140, № 12. – P. 1345-1377.

94. Dunlap, J.B. The combination of NPM1, DNMT3A, and IDH1/2 mutations leads to inferior overall survival in AML / J.B. Dunlap, J. Leonard, M. Rosenberg et al. // American journal of hematology. – 2019. – Vol. 94, № 8. – P. 913-920.

95. Duployez, N. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia / N. Duployez, A. Marceau-Renaut, N. Boissel et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2016. – Vol. 127, № 20. – P. 2451-2459.

96. ElNahass, Y.H. IDH mutations in AML patients; a higher association with intermediate risk cytogenetics / Y.H. ElNahass, R.H. Badawy, F.A. ElRefaey et al. //Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP. – 2020. – Vol. 21, № 3. – P. 721-725.

97. Ward, P.S. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate / P.S. Ward, J. Patel, D.R. Wise et al. // Cancer cell. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 225-234.

98. Figueroa, M.E. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia / M.E. Figueroa, S. Lugthart, Y. Li et al. // Cancer cell. – 2010. – Vol. 17, № 1. – P. 13-27.

99. Figueroa, M.E. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic

differentiation / M.E. Figueroa, O. Abdel-Wahab, C. Lu et al. // Cancer cell. – 2010. – Vol. 18, № 6. – P. 553-567.

100. Fong, C.Y. Epigenetics in the hematologic malignancies / C.Y. Fong, J. Morison, M.A. Dawson // Haematologica. – 2014. – Vol. 99, № 12. – P. 1772-1783.

101. Fried, I. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia / I. Fried, C. Bodner, M.M. Pichler et al. // Haematologica. – 2012. – Vol. 97, № 2. – P. 246-250.

102. Fuks, F. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity / F. Fuks, W.A. Burgers, A. Brehm et al. // Nature genetics. – 2000. – Vol. 24, № 1. – P. 88-91.

103. Fuks, F. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase / F. Fuks, P.J. Hurd, R. Deplus et al. // Nucleic acids research. – 2003. – Vol. 31, № 9. – P. 2305-2312.

104. Gaidzik, V.I. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG) / V.I. Gaidzik, R.F. Schlenk, P. Paschka et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2013. – Vol. 121, № 23. – P. 4769-4777.

105. Gale, R.E. Simpson's paradox and the impact of different DNMT3A mutations on outcome in younger adults with acute myeloid leukemia / R.E. Gale, K. Lamb, C. Allen et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33, № 18. – P. 2072-2083.

106. Gelsi-Boyer, V. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia / V. Gelsi-Boyer, V. Trouplin, J. Adelaide et al. // British journal of haematology. – 2009. – Vol. 145, № 6. – P. 788-800.

107. Genovese, G. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence / G. Genovese, A.K. Kähler, R.E. Handsaker et al. // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 371, № 26. – P. 2477-2487.

108. Green, C.L. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation / C.L. Green, C.M. Evans, L. Zhao et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – Vol. 118, № 2. – P. 409-412.

109. Gross, S. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations / S. Gross, R.A. Cairns, M.D. Minden et al. // Journal of Experimental Medicine. – 2010. – Vol. 207, № 2. – P. 339-344.

110. Guglielmelli, P. MIPSS70: mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis / P. Guglielmelli, T.L. Lasho, G. Rotunno et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36, № 4. – P. 310-318.

111. Harris, W.J. The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells / W.J. Harris, X. Huang, J.T. Lynch et al. // Cancer cell. – 2012. – Vol. 21, № 4. – P. 473-487.

112. Hayden, A. Clinical and Molecular Features of Highly Durable Response to Azacitidine+ Venetoclax in Acute Myeloid Leukemia / A. Hayden, G. Bosma, J.A. Gutman et al. // Blood. – 2022. – Vol. 140, Supplement 1. – P. 9163-9164.

113. Heuser, M. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party / M. Heuser, S.D. Freeman, G.J. Ossenkoppele et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2021. – Vol. 138, № 26. – P. 2753-2767.

114. Holz-Schietinger, C. Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation / C. Holz-Schietinger, D.M. Matje, N.O. Reich // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287, № 37. – P. 30941-30951.

115. Im, A.P. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies / A.P. Im, A.R. Sehgal, M.P. Carroll et al. // Leukemia. – 2014. – Vol. 28, № 9. – P. 1774-1783.

116. Inoue, D. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering ASXL1 mutations / D. Inoue, J. Kitaura, K. Togami et al. // The Journal of clinical investigation. – 2013. – Vol. 123, № 11. – P. 4627-4640.

117. Itzykson, R. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia / R. Itzykson, O. Kosmider, A. Renneville et al. // Journal of clinical oncology. – 2013. – Vol. 31, № 19. – P. 2428-2436.

118. Jaiswal, S. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes / S. Jaiswal, P. Fontanillas, J. Flannick et al. // New England Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 371, № 26. – P. 2488-2498.

119. Johnson, S.M. Acute myeloid leukemia with co-mutated ASXL1 and SRSF2 exhibits monocytic differentiation and has a mutational profile overlapping with chronic myelomonocytic leukemia / S.M. Johnson, D.R. Richardson, J. Galeotti et al. // Hemasphere. – 2019. – Vol. 3, № 5. – P. e292 (1-4).

120. Khoury, J.D. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms / J.D. Khoury, E. Solary, O. Abla et al. // Leukemia. – 2022. – Vol. 36, № 7. – P. 1703-1719.

121. Kishtagari, A. Driver mutations in acute myeloid leukemia / A. Kishtagari, R.L. Levine, A.D. Viny // Current opinion in hematology. – 2020. – Vol. 27, № 2. – P. 49-57.

122. Kishtagari, A. The role of somatic mutations in acute myeloid leukemia pathogenesis / A. Kishtagari, R.L. Levine // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. a034975 (1-23).

123. Komrokji, R. IDH mutations are enriched in myelodysplastic syndrome patients with severe neutropenia and can be a potential for targeted therapy / R. Komrokji, N. Al Ali, O. Chan et al. // Haematologica. – 2023. – Vol. 108, № 4. – P. 1168-1172.

124. Konopleva, M. Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia / M. Konopleva, D.A. Pollyea, J. Potluri et al. // Cancer discovery. – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. 1106-1117.

125. Koszarska, M. Type and location of isocitrate dehydrogenase mutations influence clinical characteristics and disease outcome of acute myeloid leukemia / M. Koszarska, A. Bors, A. Feczko et al. // Leukemia & lymphoma. – 2013. – Vol. 54, № 5. – P. 1028-1035.

126. Krauth, M.T. High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome / M.T. Krauth, C. Eder, T. Alpermann et al. // Leukemia. – 2014. – Vol. 28, № 7. – P. 1449-1458.

127. Krivtsov, A.V. H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias / A.V. Krivtsov, Z. Feng, M.E. Lemieux et al. // Cancer cell. – 2008. – Vol. 14, № 5. – P. 355-368.

128. Lavau, C. Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia / C. Lavau, C. Du, M. Thirman et al. // The EMBO journal. – 2000. – Vol. 19, № 17. – P. 4655-4664.

129. Ley, T.J. DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome / T.J. Ley, E.R. Mardis, L. Ding et al. // Nature. – 2008. – Vol. 456, № 7218. – P. 66-72.

130. Ley, T.J. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / T.J. Ley, L. Ding, M.J. Walter et al. // New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 363, № 25. – P. 2424-2433.

131. Li, S. Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia / S. Li, F.E. Garrett-Bakelman, S.S. Chung et al. // Nature medicine. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 792-799.

132. Lin, C.C. IDH mutations are closely associated with mutations of DNMT3A, ASXL1 and SRSF2 in patients with myelodysplastic syndromes and are stable during disease evolution / C.C. Lin, H.A. Hou, W.C. Chou et al. // American journal of hematology. – 2014. – Vol. 89, № 2. – P. 137-144.

133. Losman, J.A. (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible / J.A. Losman, R.E. Looper, P. Koivunen et al. // Science. – 2013. – Vol. 339, № 6127. – P. 1621-1625.

134. Lu, C. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation / C. Lu, P.S. Ward, G.S. Kapoor et al. // Nature. – 2012. – Vol. 483, № 7390. – P. 474-478.

135. Lu, J. Additional mutations in IDH1/2-mutated patients with acute myeloid leukemia / J. Lu, M. Chen, H. Hua et al. // International Journal of Laboratory Hematology. – 2021. – Vol. 43, № 6. – P. 1483-1490.

136. Lu, R. Epigenetic perturbations by Arg882-mutated DNMT3A potentiate aberrant stem cell gene-expression program and acute leukemia development / R. Lu, P. Wang, T. Parton et al. // Cancer cell. – 2016. – Vol. 30, № 1. – P. 92-107.

137. Malcovati, L. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia / L. Malcovati, A. Gallì, E. Travaglino et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2017. – Vol. 129, № 25. – P. 3371-3378.

138. Marcucci, G. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia / G. Marcucci, K.H. Metzeler, S. Schwind et al. // Journal of clinical oncology. – 2012. – Vol. 30, № 7. – C. 742-750.

139. Marcucci, G. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study / G. Marcucci, K. Maharry, Y.Z. Wu et al. // Journal of clinical oncology. – 2010. – Vol. 28, № 14. – C. 2348-2355.

140. Mardis, E.R. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome / E.R. Mardis, L. Ding, D.J. Dooling et al. // New England Journal of Medicine. – 2009. – Vol. 361, № 11. – P. 1058-1066.

141. Markova, J. Prognostic impact of DNMT3A mutations in patients with intermediate cytogenetic risk profile acute myeloid leukemia / J. Markova, P. Michková, K. Burčková et al. // European journal of haematology. – 2012. – Vol. 88, № 2. – P. 128-135.

142. Marnell, C.S. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP): Linking somatic mutations, hematopoiesis, chronic inflammation and cardiovascular

disease / C.S. Marnell, A. Bick, P. Natarajan // Journal of molecular and cellular cardiology. – 2021. – Vol. 161. – P. 98-105.

143. Martens, J.H.A. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia / J.H.A. Martens, H.G. Stunnenberg // FEBS letters. – 2010. – Vol. 584, № 12. – P. 2662-2669.

144. Mayle, A. Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation / A. Mayle, L. Yang, B. Rodriguez et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2015. – Vol. 125, № 4. – P. 629-638.

145. McMahon, C.M. Clonal selection with RAS pathway activation mediates secondary clinical resistance to selective FLT3 inhibition in acute myeloid leukemia / C.M. McMahon, T. Ferng, J. Canaani et al. // Cancer discovery. – 2019. – Vol. 9, № 8. – P. 1050-1063.

146. Metzeler, K.H. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category / K.H. Metzeler, H. Becker, K. Maharry et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – Vol. 118, № 26. – P. 6920-6929.

147. Metzeler, K.H. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia / K.H. Metzeler, A. Walker, S. Geyer et al. // Leukemia. – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 1106-1107.

148. Micol, J.B. The role of additional sex combs-like proteins in cancer / J.B. Micol, O. Abdel-Wahab // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2016. – Vol. 6, № 10. – P. a026526 (1-16).

149. Micol, J.B. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations / J.B. Micol, N. Duployez, N. Boissel et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – Vol. 124, № 9. – P. 1445-1449.

150. Middeke, J.M. Differential impact of IDH1/2 mutational subclasses on outcome in adult AML: results from a large multicenter study / J.M. Middeke, K.H. Metzeler, C. Röllig et al. // Blood Advances. – 2022. – Vol. 6, № 5. – P. 1394-1405.

151. Montalban-Bravo, G. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia / G. Montalban-Bravo, C.D. DiNardo // Future Oncology. – 2018. – Vol. 14, № 10. – P. 979-993.

152. Napoles, M. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation / M. de Napoles, J.E. Mermoud, R, Wakao et al. // Developmental cell. – 2004. – Vol. 7, № 5. – P. 663-676.

153. Ok, C.Y. Persistent IDH1/2 mutations in remission can predict relapse in patients with acute myeloid leukemia / C.Y. Ok, S. Loghavi, D. Sui et al. // Haematologica. – 2019. – Vol. 104, № 2. – P. 305-311.

154. Okano, M. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development / M. Okano, D.W. Bell, D.A. Haber et al. // Cell. – 1999. – Vol. 99, № 3. – P. 247-257.

155. Oliva, E.N. The real-world incidence of relapse in acute myeloid leukemia (AML): a systematic literature review (SLR) / E.N. Oliva, J. Franek, D. Patel et al. // Blood. – 2018. – Vol. 132, Supplement 1. – C. 5188.

156. Papaemmanuil, E. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia / E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Bullinger et al. // New England Journal of Medicine. – 2016. – Vol. 374, № 23. – P. 2209-2221.

157. Park, D.J. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / D.J. Park, A. Kwon, B.S. Cho et al. // Blood research. – 2020. – Vol. 55, № 1. – P. 17-26.

158. Parsons, D.W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme / D.W. Parsons, S. Jones, X. Zhang et al. // Science. – 2008. – Vol. 321, № 5897. – P. 1807-1812.

159. Paschka, P. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication / P. Paschka, R.F. Schlenk, V.I. Gaidzik et al. // J Clin Oncol. – 2010. – Vol. 28, № 22. – P. 3636-3643.

160. Paschka, P. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group / P. Paschka, R.F. Schlenk, V.I. Gaidzik et al. // Haematologica. – 2015. – Vol. 100, № 3. – P. 324-330.

161. Paska, A. Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view / A.V. Paska, P. Hudler // Biochemia medica. – 2015. – Vol. 25, № 2. – P. 161-176.

162. Patel, J.P. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia / J.P. Patel, M. Gönen, M.E. Figuero et al. // New England Journal of Medicine. – 2012. – Vol. 366, № 12. – P. 1079-1089.

163. Patel, K.P. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features / K.P. Patel, F. Ravandi, D. Ma et al. // American journal of clinical pathology. – 2011. – Vol. 135, № 1. – P. 35-45.

164. Patnaik, M.M. ASXL1 and SETBP1 mutations and their prognostic contribution in chronic myelomonocytic leukemia: a two-center study of 466 patients / M.M. Patnaik, R. Itzykson, T.L. Lasho // Leukemia. – 2014. – Vol. 28, № 11. – P. 2206-2212.

165. Patnaik, M.M. Chronic myelomonocytic leukemia: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management / M.M. Patnaik, A. Tefferi // American journal of hematology. – 2022. – Vol. 97, № 3. – P. 352-372.

166. Petiti, J. Highly sensitive detection of IDH2 mutations in acute myeloid leukemia / J. Petiti, V. Rosso, E. Croce et al. // Journal of Clinical Medicine. – 2020. – Vol. 9, № 1. – P. 271 (1-11).

167. Pfeifer, G.P. DNA methylation levels in acute human leukemia / G.P. Pfeifer, S. Steigerwald, T.L.J. Boehm et al. // Cancer letters. – 1988. – Vol. 39, № 2. – P. 185-192.

168. Pollyea, D.A. Acute myeloid leukemia, version 3.2023, NCCN clinical practice guidelines in oncology / D.A. Pollyea, J.K. Altman, R. Assi et al. // Journal of the National Comprehensive Cancer Network. – 2023. – Vol. 21, № 5. – P. 503-513.

169. Pratcorona, M. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value / M. Pratcorona, S. Abbas, M.A. Sanders et al. // Haematologica. – 2012. – T. 97. – №. 3. – C. 388-392.

170. Prats-Martín, C. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype / C. Prats-Martín, S. Burillo-Sanz, R.M. Morales-Camacho et al. // Cancer Medicine. – 2020. – Vol. 9, № 11. – P. 3637-3646.

171. Rakheja, D. IDH mutations in acute myeloid leukemia / D. Rakheja, S. Konoplev, L.J. Medeiros et al. // Human pathology. – 2012. – Vol. 43, № 10. – P. 1541-1551.

172. Rausch, C. Validation and refinement of the 2022 European LeukemiaNet genetic risk stratification of acute myeloid leukemia / C. Rausch, M. Rothenberg-Thurley, A. Dufour et al. // Leukemia. – 2023. – Vol. 37, № 6. – P. 1234-1244.

173. Reitman, Z.J. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism / Z.J. Reitman, H. Yan // Journal of the National Cancer Institute. – 2010. – Vol. 102, № 13. – P. 932-941.

174. Ribeiro, A.F.T. Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia / A.F.T. Ribeiro, M. Pratcorona, C. Erpelinck-Verschueren et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – Vol. 119, № 24. – P. 5824-5831.

175. Richardson, D.R. Genomic characteristics and prognostic significance of co-mutated ASXL1/SRSF2 acute myeloid leukemia / D.R. Richardson, D.M. Swoboda, D.T. Moore et al. // American journal of hematology. – 2021. – Vol. 96, № 4. – P. 462-470.

176. Roller, A. Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies / A. Roller, V. Grossmann, U. Bacher et al. // Leukemia. – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 1573-1578.

177. Russler-Germain, D.A. The R882H DNMT3A mutation associated with AML dominantly inhibits wild-type DNMT3A by blocking its ability to form active tetramers / D.A. Russler-Germain, D.H. Spencer, M.A. Young et al. // Cancer cell. – 2014. – Vol. 25, № 4. – P. 442-454.

178. Sazanov, L.A. Proton-translocating transhydrogenase and NAD-and NADP-linked isocitrate dehydrogenases operate in a substrate cycle which contributes to fine regulation of the tricarboxylic acid cycle activity in mitochondria / L.A. Sazanov, J.B. Jackson // FEBS letters. – 1994. – Vol. 344, № 2-3. – P. 109-116.

179. Scheuermann, J.C. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB / J.C. Scheuermann, A.G. de Ayala Alonso, K. Oktaba et al. // Nature. – 2010. – Vol. 465, № 7295. – P. 243-247.

180. Schnittger, S. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome / S. Schnittger, C. Eder, S. Jeromin et al. // Leukemia. – 2013. – Vol. 27, № 1. – P. 82-91.

181. Shimony, S. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management / S. Shimony, M. Stahl, R.M. Stone // American Journal of Hematology. – 2023. – Vol. 98, № 3. – P. 502-526.

182. Shivarov, V. Rapid detection of DNMT3A R882 mutations in hematologic malignancies using a novel bead-based suspension assay with BNA (NC) probes / V. Shivarov, M. Ivanova, E. Naumova // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 6. – P. e99769 (1-8).

183. Shlush, L.I. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia / L.I. Shlush, S. Zandi, A. Mitchell et al. // Nature. – 2014. – Vol. 506, № 7488. – P. 328-333.

184. Silva, P. Acute myeloid leukemia in the elderly is characterized by a distinct genetic and epigenetic landscape / P. Silva, M. Neumann, M.P. Schroeder et al. // Leukemia. – 2017. – Vol. 31, № 7. – P. 1640-1644.

185. Sjoblom, T. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers / T. Sjoblom, S. Jones, L.D. Wood et al. // Science. – 2006. – Vol. 314, № 5797. – P. 268-274.

186. Slatko, B.E. Overview of next-generation sequencing technologies / B.E. Slatko, A.F. Gardner, F.M. Ausubel // Current protocols in molecular biology. – 2018. – Vol. 122, № 1. – P. e59 (1-15).

187. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition) / S.H. Swerdlow, E. Campo, N. L. Harris et al. // Lyon: IARC, 2017. – P. 129-171.

188. Taylor, S.C. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data / S.C. Taylor, G. Laperriere, H. Germain // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 2409 (1-8).

189. Tefferi, A. Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management / A. Tefferi // American journal of hematology. – 2023. – Vol. 98, № 5. – P. 801-821.

190. Thiede, C. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) / C. Thiede, S. Koch, E. Creutzig et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107, № 10. – P. 4011-4020.

191. Thol, F. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia / F. Thol, F. Damm, A. Lüdeking et al. // J Clin Oncol. – 2011. – Vol. 29, № 21. – P. 2889-2896.

192. Thol, F. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia / F. Thol, F. Damm, K. Wagner et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2010. – Vol. 116, № 4. – P. 614-616.

193. Thol, F. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes / F. Thol, I. Friesen, F. Damm et al. // Journal of Clinical Oncology. – 2011. – Vol. 29, № 18. – P. 2499-2506.

194. Torabi, A. Characteristics and prognostic effects of DNMT3A Co-mutations / A. Torabi, T.A. Alonzo, M. Othus et al. // Blood. – 2022. – Vol. 140, Supplement 1. – P. 745-747.

195. Vannucchi, A.M. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis / A.M. Vannucchi, T.L. Lasho, P. Guglielmelli et al. // Leukemia. – 2013. – Vol. 27, № 9. – P. 1861-1869.

196. Vanova, B. Droplet digital PCR as a novel diagnostic tool / B. Vanova, B. Malicherova, T. Burjanivova et al. // Klinicka Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti. – 2021. – Vol. 34, № 1. – P. 33-39.

197. Venugopal, K. Alterations to DNMT3A in hematologic malignancies / K. Venugopal, Y. Feng, D. Shabashvili et al. // Cancer research. – 2021. – Vol. 81, № 2. – P. 254-263.

198. Vire, E. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation / E. Vire, C. Brenner, R. Deplus et al. // Nature. – 2006. – Vol. 439, № 7078. – P. 871-874.

199. Vonk, C.M. Molecular minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia / C.M. Vonk, A.S.A. Al Hinai, D. Hanekamp et al. // Cancers. – 2021. – Vol. 13, № 21. – P. 5431 (1-19).

200. Walker, A. Molecular prognostic factors in cytogenetically normal acute myeloid leukemia / A. Walker, G. Marcucci // Expert review of hematology. – 2012. – Vol. 5, № 5. – P. 547-558.

201. Wang, J. Loss of Asxl1 leads to myelodysplastic syndrome–like disease in mice / J. Wang, Z. Li, Y. He et al. // Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – Vol. 123, № 4. – P. 541-553.

202. Wang, L. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation / L. Wang, A. Gural, X.J. Sun et al. // Science. – 2011. – Vol. 333, № 6043. – P. 765-769.

203. Ward, P.S. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting α-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate / P.S. Ward, J. Patel, D.R. Wise et al. // Cancer cell. – 2010. – Vol. 17, № 3. – P. 225-234.

204. Weinstein, J.N. The cancer genome atlas pan-cancer analysis project / J.N. Weinstein, E.A. Collisson, G.B. Mills et al. // Nature genetics. – 2013. – Vol. 45, № 10. – P. 1113-1120.

205. Whitehall, V.L.J. Isocitrate dehydrogenase 1 R132C mutation occurs exclusively in microsatellite stable colorectal cancers with the CpG island methylator

phenotype / V.L.J. Whitehall, T.D. Dumenil, D.M. McKeone et al. // Epigenetics. – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. 1454-1460.

206. Xie, M. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies / M. Xie, C. Lu, J. Wang et al. // Nature medicine. – 2014. – Vol. 20, № 12. – P. 1472-1478.

207. Xu, Q. Correlation between isocitrate dehydrogenase gene aberrations and prognosis of patients with acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis / Q. Xu, Y. Li, N. Lv et al. // Clinical Cancer Research. – 2017. – Vol. 23, № 15. – P. 4511-4522.

208. Xu, W. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α-ketoglutarate-dependent dioxygenases / W. Xu, H. Yang, Y. Liu et al. // Cancer cell. – 2011. – Vol. 19, № 1. – P. 17-30.

209. Yamaguchi, S. IDH 1 and IDH 2 mutations confer an adverse effect in patients with acute myeloid leukemia lacking the NPM 1 mutation / S. Yamaguchi, E. Iwanaga, K. Tokunaga // European journal of haematology. – 2014. – Vol. 92, № 6. – P. 471-477.

210. Yan, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas / H. Yan, D.W. Parsons, G. Jin et al. // New England journal of medicine. – 2009. – Vol. 360, № 8. – P. 765-773.

211. Yan, X.J. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia / X.J. Yan, J. Xu, Z.H. Gu et al. // Nature genetics. – 2011. – Vol. 43, № 4. – P. 309-315.

212. Yang, F. Clinical utility of next-generation sequencing in acute myeloid leukemia / F. Yang, T. Anekpuritanang, R.D. Press // Molecular diagnosis & therapy. – 2020. – Vol. 24. – P. 1-13.

213. Young, A.L. Clonal hematopoiesis and risk of acute myeloid leukemia / A.L. Young, R.S. Tong, B.M. Birmann et al. // Haematologica. – 2019. – Vol. 104, № 12. – P. 2410-2417.

214. Zarnegar-Lumley, S. Characteristics and prognostic impact of IDH mutations in AML: a COG, SWOG, and ECOG analysis / S. Zarnegar-Lumley, T.A. Alonzo, R.B. Gerbing et al. // Blood Advances. – 2023. – Vol. 7, № 19. – P. 5941-5953.

215. Zhao, S. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1α / S. Zhao, Y. Lin, W. Xu // Science. – 2009. – Vol. 324, № 5924. – P. 261-265.

216. Pan, D. Clinical developments in epigenetic-directed therapies in acute myeloid leukemia / D. Pan, R. Rampal, J. Mascarenhas et al. // Blood Advances. – 2020. – Vol. 4, № 5. – P. 970-982.