

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Выявление мутаций генов эпигенетической регуляции генома *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* и их сочетания с мутациями *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* у пациентов с острыми миелоидными лейкозами

Identification of Mutations in *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* Genes of Genome Epigenetic Regulation and Their Co-Occurrence with *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* Mutations in Acute Myeloid Leukemia

Е.В. Белоцерковская^{1,2}, Е.К. Зайкова^{1,2},
А.В. Петухов^{1,2,3}, О.Н. Демидов², К.А. Левчук¹,
И.Г. Будаева¹, Д.В. Зайцев¹, Ю.Д. Роговая¹,
А.А. Шатилова¹, К.В. Богданов¹, Ю.В. Миролюбова¹,
Т.С. Никулина¹, А.Ю. Зарицкий¹, Л.Л. Гиршова¹

EV Belotserkovskaya^{1,2}, EK Zaikova^{1,2}, AV Petukhov^{1,2,3},
ON Demidov², KA Levchuk¹, IG Budaeva¹, DV Zaitsev¹,
YuD Rogovaya¹, AA Shatilova¹, KV Bogdanov¹,
YuV Mirolyubova¹, TS Nikulina¹, AYU Zaritsky¹,
LL Girshova¹

¹ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

¹ VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

² ФГБУН «Институт цитологии РАН», Тихорецкий пр-т, д. 4, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194064

² Institute of Cytology, 4 Tikhoretskii pr-t, Saint Petersburg, Russian Federation, 194064

³ НТУ «Сириус», Олимпийский пр-т, д. 1, Сочи, Российская Федерация, 354340

³ Sirius University of Science and Technology, 1 Olimpiiskii pr-t, Sochi, Russian Federation, 354340

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Цель. Выявление мутаций генов *IDH1/IDH2*, *DNMT3A* и *ASXL1*, ответственных за эпигенетическую регуляцию генома, при впервые диагностированных острых миелоидных лейкозах (ОМЛ) у взрослых и их сочетания с мутациями генов *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1*.

Aim. To identify mutations in *IDH1/IDH2*, *DNMT3A*, and *ASXL1* genes responsible for genome epigenetic regulation and their co-occurrence with *FLT3*, *NPM1*, and *RUNX1* mutations in newly diagnosed adult acute myeloid leukemias (AML).

Материалы и методы. В исследование включено 56 пациентов с впервые выявленным ОМЛ, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России. Среди них было 34 мужчины и 22 женщины в возрасте 18–76 лет (медиана 46 лет). Мутационный статус генов эпигенетической регуляции *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A* и *ASXL1* определяли методом секвенирования по Сэнгеру. Молекулярно-генетический анализ генов *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1-RUNX1T1* выполняли с использованием коммерческих наборов.

Materials & Methods. The study included 56 patients with newly diagnosed AML treated at the VA Almazov National Medical Research Center. Among them there were 34 men and 22 women aged 18–76 years (median 46 years). Mutation status of *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, and *ASXL1* genes of epigenetic regulation was assessed by Sanger sequencing method. Molecular genetic analysis of *FLT3*, *NPM1*, and *RUNX1-RUNX1T1* genes was performed using commercial kits.

Результаты. Мутации генов эпигенетической регуляции обнаружены у 14 (25 %) из 56 пациентов. Распространенность мутаций не была связана с группами риска ($p = 0,072$). Мутации *IDH1/2* выявлены у 15,6 % пациентов и статистически значимо чаще обнаруживались одновременно с мутациями *NPM1* (62,5 %; $p = 0,01$) по сравнению с пациентами с диким типом *IDH1/2*. У большинства пациентов мутации *IDH1/2* были связаны с нормальным кариотипом ($p = 0,002$). Мутация *DNMT3A* (R882) определена у 4 (7,1 %) из 56 пациентов анализируемой группы. У 6 (11,1 %) пациентов были идентифицированы мутации *ASXL1*, которые сочетались мутациями с *RUNX1-RUNX1T1* и *FLT3-ITD*.

Results. Mutations in epigenetic regulation genes were detected in 14 (25 %) out of 56 patients. Mutation prevalence was not associated with risk groups ($p = 0.072$). *IDH1/2* mutations were identified in 15.6 % of patients and were significantly oftener observed concurrent with *NPM1* mutations (62.5 %; $p = 0.01$) compared to patients with wild-type *IDH1/2*. In most patients *IDH1/2* mutations were associated with normal karyotype ($p = 0.002$). The *DNMT3A* (R882) mutation was identified in 4 (7.1 %) out of 56 patients within the analyzed group. In 6 patients (11.1 %) *ASXL1* mutations were detected co-occurring with *RUNX1-RUNX1T1* and *FLT3-ITD* mutations.

Заключение. Мутации генов эпигенетической регуляции часто обнаруживаются у пациентов с ОМЛ и могут сочетаться с нарушениями в генах *NPM1*, *FLT3* и *RUNX1*.

Conclusion. Mutations in epigenetic regulation genes are often identified in AML patients and can be concurrent with abnormalities in *NPM1*, *FLT3* and *RUNX1* genes.

Ключевые слова: острые миелоидные лейкозы, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, эпигенетические факторы.

Keywords: acute myeloid leukemias, *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, epigenetic factors.

Получено: 20 августа 2020 г.

Принято в печать: 2 декабря 2020 г.

Received: August 20, 2020

Accepted: December 2, 2020

Для переписки: Екатерина Васильевна Белоцерковская, канд. биол. наук, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

For correspondence: Ekaterina Vasilevna Belotserkovskaya, PhD in Biology, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; e-mail: belotserkovskaya.ev@gmail.com

Для цитирования: Белоцерковская Е.В., Зайкова Е.К., Петухов А.В. и др. Выявление мутаций генов эпигенетической регуляции генома *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* и их сочетания с мутациями *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* у пациентов с острыми миелоидными лейкозами. Клиническая онкогематология. 2021;14(1):13–21.

For citation: Belotserkovskaya EV, Zaikova EK, Petukhov AV, et al. Identification of Mutations in *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* Genes of Genome Epigenetic Regulation and Their Co-Occurrence with *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* Mutations in Acute Myeloid Leukemia. Clinical oncohematology. 2021;14(1):13–21. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21

DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21

ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — злокачественные опухоли системы крови, характеризующиеся различными нарушениями генетического материала, такими как хромосомные aberrации, мутации генов, нарушение эпигенетической регуляции генома.

Успех лечения ОМЛ в значительной степени определяется наиболее оптимальной стратификацией пациентов по группам риска. В настоящее время основу диагностики нарушений в геноме пациентов с ОМЛ составляет кариотипирование, позволяющее выделять группы благоприятного, промежуточного и неблагоприятного прогноза. При этом пациенты с нормальным кариотипом (40–50 % всех случаев ОМЛ), относящиеся к промежуточной группе риска, представляют собой гетерогенную группу по показателям выживаемости и эффективности терапии [1]. Стратификация таких пациентов и подбор адекватной терапии определяются рядом молекулярно-генетических факторов [2]. Несмотря на успехи в лечении ОМЛ, достигнутые за последние десятилетия, прогностическая классификация пациентов остается несовершенной, что связано с высокой степенью гетерогенности генетических детерминант и с клиническим разнообразием данного заболевания [3]. Большинство молекулярно-генетических факторов с доказанной ролью в патогенезе ОМЛ до сих пор не включено в систему стратификации пациентов на группы риска по причине недостаточной доказательной базы и требует более детального изучения. Среди них особое место занимают гены эпигенетической регуляции генома, контролирующие метилирование ДНК (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) и посттрансляционную модификацию гистонов (*EZH2*, *ASXL1*) [3].

Кроме того, возрастающий интерес к эпигенетическим детерминантам ОМЛ связан с развитием таргетной эпигенетической терапии. В отличие от нарушений генома эпигенетические изменения носят обратимый характер, что делает мутации в генах этой группы перспективными мишенями для создания таргетных препаратов [3]. В настоящее время в клинической практике уже нашли применение такие

гипометилирующие агенты, как децитабин и азацитидин [4], а также недавно одобренные препараты энасидениб [5] и ивосидениб [6].

Важной особенностью эпигенетических факторов ОМЛ считается высокая частота их выявления при клональном гемопоэзе неопределенного потенциала (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) [7]. Этот феномен связан с наличием клональной популяции клеток крови или костного мозга, содержащей мутации, ассоциированные с развитием неоплазий. Среди молекулярно-генетических детерминант CHIP первое место по частоте занимают мутации в генах *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* [8, 9], которые часто выявляются в предшественниках лейкозных стволовых клеток на ранних стадиях лейкозогенеза. Показано, что носители CHIP характеризуются повышенным риском развития гематологических неоплазий [10], сердечно-сосудистых заболеваний [11] и хронических заболеваний легких [12]. Однако степень риска развития заболевания у таких индивидуумов не определена, что следует из самого названия термина с аббревиатурой CHIP. На сегодня частота развития неоплазий среди носителей CHIP оценивается как 0,5–1,0 % в год [8].

Следует отметить, что эпигенетические нарушения при ОМЛ изучены значительно хуже по сравнению с генетическими детерминантами. Как правило, мутации в генах регуляции эпигенома связаны с неблагоприятным прогнозом [13–16]. Однако в отношении прогностического значения мутаций *IDH1/2*, а также *DNMT3A* отмечается противоречивость данных [17–20]. Немаловажный аспект в определении влияния маркеров эпигенетической регуляции на прогноз — изучение их роли совместно с другими хорошо описанными маркерами ОМЛ. В настоящее время сообщается о сочетании с мутациями в таких генах, как *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1* и *TET2* [1]. В этой связи в данное исследование были включены гены *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1*. Ниже приведена характеристика генов эпигенетической регуляции ОМЛ: *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*.

IDH1/2

Гены *IDH1* и *IDH2* (isocitrate dehydrogenase 1 and 2) кодируют цитозольную и митохондриальную формы

изоцитратдегидрогеназы, катализирующей превращение изоцитрата в α -кетоглутарат [21].

В норме изоцитратдегидрогеназа вовлечена в различные процессы, такие как модификация ДНК, деметилирование гистонов, адаптация к гипоксии [22]. Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* приводят к образованию мутантной формы фермента, приобретающего способность катализировать превращение α -кетоглутарата в онкометаболит 2-гидроксиглутарат, который ингибирует большую группу α -кетоглутарат-зависимых ферментов (α -кетоглутарат-зависимые деметилазы лизина, гидроксилазы семейства ТЕТ), что приводит к гиперметилированию ДНК и метилированию гистонов [23]. Нарушение эпигенетической регуляции, в свою очередь, вызывает подавление процесса дифференцировки гемопоэтических клеток [24]. Считается, что ингибирование дифференцировки клеток с участием 2-гидроксиглутарата способствует патологическому самообновлению стволовых клеток-предшественниц и создает условия для их злокачественной трансформации [23].

Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* наиболее характерны для таких злокачественных новообразований, как глиома [25], глиобластома [26], рак толстой кишки [27] и ОМЛ [28].

Частота мутаций *IDH1/2* при ОМЛ может достигать 33 % [14]. Наиболее часто встречающаяся мутация в гене *IDH1* — точечная мутация R132, приводящая к замене аргинина на гистидин (R132H). Реже происходят замены на цистеин (R132C), лейцин (R132L), серин (R132S) и глицин (R132G) [23]. В гене *IDH2* выделяют две точечных мутации: R140 и R172; последняя встречается в 4 раза реже. Превалирующей мутацией является замена аргинина на глутамин (R140Q), намного реже выявляются замены на лейцин (R140L), триптофан (R140W) и глицин (R140G). Для положения 172 характерна замена аргинина на лизин (R172K) [29].

Для определения точечных мутаций генов *IDH1/2* адаптированы такие методы молекулярной генетики, как полиморфизм длин рестрикционных фрагментов, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) [30], ПЦР в реальном времени с плавлением ПЦР-продуктов высокого разрешения (high resolution melting, HRM) [30–33], цифровая капельная ПЦР [34, 35], секвенирование [36, 37]. Среди перечисленных методов наиболее популярны HRM и секвенирование по Сэнгеру, однако чувствительность этих методов оценивается в пределах 20 % [31]. Следует отметить, что метод цифровой ПЦР привлекателен не только высокой чувствительностью (0,001 %), но и возможностью оценивать аллельную нагрузку [34]. Отдельный интерес вызывает метод ПЦР с использованием пептидонуклеиновых кислот (peptide nucleic acid, PNA), который в силу высокой специфичности и чувствительности может стать альтернативой традиционным методам определения мутаций *IDH1/2* [38].

К настоящему времени прогностическое значение мутаций *IDH1/2* не до конца ясно. Следует отметить, что ряд публикаций указывает на отсутствие ассоциации мутаций *IDH1/2* с прогнозом ОМЛ [17, 18] либо демонстрирует неубедительную связь [39]. В нескольких источниках сообщается, что *IDH1* и *IDH2* (R172) — факторы неблагоприятного прогноза, осо-

бенно при цитогенетически нормальном кариотипе, тогда как *IDH2* (R140) отдельно или в сочетании с *NPM1* оказывает благоприятное влияние на прогноз ОМЛ [14, 40, 41]. Отмечается также, что влияние мутаций *IDH1/2* на патогенез ОМЛ определяется локализацией мутаций и их сочетаний с нарушениями в других прогностически значимых генах [42].

Важно отметить, что для лечения пациентов с рефрактерным/рецидивирующим ОМЛ, у которых выявлены мутации в генах *IDH1/2*, разработаны таргетные препараты. Так, в 2017 г. для пациентов с мутациями *IDH2* Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) был одобрен таргетный ингибитор энаседениб (enasidenib) [5], а в 2018 г. — ивосидениб (ivosidenib) для пациентов с мутацией *IDH1* [6]. Энаседениб и ивосидениб представляют собой низкомолекулярные ингибиторы мутантных форм изоцитратдегидрогеназы. Показано, что подавление активности мутантных форм *IDH1* и *IDH2* с участием энаседениба и ивосидениба приводит к снижению уровня онкометаболита 2-гидроксиглутарата и, как следствие, к восстановлению процесса дифференцировки бластных клеток с мутациями *IDH1/2* [43].

DNMT3A

Ген *DNMT3A* (DNA methyltransferase) кодирует ДНК-метилтрансферазу 3A, осуществляющую метилирование *de novo* CpG-островков различных генов, тем самым участвуя в эпигенетической модификации экспрессии генов [44]. Мутации *DNMT3A* диагностируются в 18–22 % случаев ОМЛ у взрослых [45] и связаны с плохим прогнозом [13] вне зависимости от возраста пациентов [45]. Соматические мутации в гене *DNMT3A* принято разделять на две категории: точечные мутации в положении R882 и прочие мутации (non R882) [45].

Наиболее распространенной и изученной мутацией *DNMT3A* является однонуклеотидная замена в кодоне R882, входящем в состав метилтрансферазного домена белка [45]. Как правило, R882 — это гетерозиготные миссенс-мутации [46], приводящие к полной или частичной потере каталитической функции метилтрансферазы либо к нарушению ее взаимодействия с другими белками [47].

Помимо стратификации на группы риска данные о мутационном статусе *DNMT3A* могут оказаться информативными при выборе терапии. Согласно опубликованным данным, у пациентов с мутацией в *DNMT3A* высокодозная терапия даунорубицином повышает продолжительность жизни по сравнению со стандартной химиотерапией [19]. Кроме того, в модельных экспериментах показано, что мутация R882 обуславливает снижение чувствительности к препаратам антрациклинового ряда, особенно к акла-рубицину [48].

Особенностью мутации R882 является ее стабильность. Она выявляется как в дебюте заболевания, так и при рецидивах и даже во время полной ремиссии [49, 50]. Сохранение этой мутации ухудшает прогноз у пациентов с ОМЛ старшей возрастной группы [51].

В большинстве опубликованных исследований ОМЛ с мутациями *DNMT3A* характеризуются плохим

прогнозом [13, 45, 52]. Однако имеются данные об отсутствии прогностического значения мутаций *DNMT3A* [20] или о неубедительной их связи с прогнозом [53].

Методы выявления мутации R882 сходны с методологическими подходами, используемыми для определения мутаций *IDH1/2*, и включают полиморфизм длины рестрикционных фрагментов [30, 54], аллель-специфическую ПЦР [54, 55], ПЦР в реальном времени с плавлением ПЦР-продуктов высокого разрешения [31, 32], цифровую капельную ПЦР [35, 56], секвенирование [31, 56].

ASXL1

Ген *ASXL1* (additional sex combs-like 1) (20q11) кодирует белок, вовлеченный в эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, контролирующих пролиферацию клеток. Мутационный статус *ASXL1* выявляется при всех типах миелоидных опухолей [57], при этом частота мутаций при ОМЛ у взрослых пациентов достигает 10 % [58]. При ОМЛ мутации *ASXL1* часто обнаруживаются вместе с мутациями в генах *RUNX1* [15] и *IDH2* [59].

Большинство описанных мутаций в гене *ASXL1* относится к нонсенс-мутациям, мутациям со сдвигом рамки считывания, реже — к миссенс-мутациям и локализуется в последнем экзоне гена [60]. Как правило, в результате мутаций синтезируется укороченный белок, что приводит к изменению статуса метилирования гистона H3K27 и нарушению нормального гемопоэза [60]. Показано, что мутации *ASXL1* связаны с неблагоприятным прогнозом [15, 16].

Основной метод определения мутационного статуса *ASXL1* — прямое секвенирование последнего экзона, а также высокопродуктивное секвенирование нового поколения. Обнаружение данного гена осложнено протяженностью анализируемого экзона и разнообразием выявленных мутаций.

Таким образом, все возрастающее число доказательств клинического значения мутаций в генах эпигенетической регуляции подчеркивает необходимость их более детального изучения. Это позволит расширить понимание их роли в патогенезе ОМЛ, в т. ч. в комплексе с хорошо описанными молекулярно-генетическими факторами, а также разработать новые более эффективные стратегии терапии.

Цель настоящей работы — выявление мутаций генов *IDH1/IDH2*, *DNMT3A* и *ASXL1*, ответственных за эпигенетическую регуляцию генома, при впервые диагностированных ОМЛ у взрослых и их сочетания с мутациями генов *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 56 пациентов с впервые выявленным ОМЛ в возрасте 18–76 лет (медиана 46 лет), среди них было 34 (61 %) мужчины и 22 (39 %) женщины. Все пациенты проходили лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России в период с 2012 по 2019 г. и дали письменное информированное согласие на забор биоматериала и выполнение исследований. Верификация диагноза

ОМЛ проводилась с использованием морфологических, цитофлюориметрических, цитогенетических и молекулярно-биологических методов исследования согласно критериям ВОЗ 2016 г. Группа риска устанавливалась в соответствии с критериями ELN 2017 г. [2]. Пациентам проводились стандартные программы терапии, включавшие этапы индукции и консолидации, основанные на рекомендациях ELN 2010/2017. По показаниям (группы высокого и промежуточного риска, отсутствие ремиссии после 1–2 курсов терапии) 29 из 56 пациентов выполнена трансплантация аллогенного костного мозга.

Для определения уровня транскриптов химерного гена *RUNX1-RUNX1T1*, а также мутантного варианта гена *NPM1* выделяли тотальную РНК из образцов красного костного мозга с помощью реагентов QIAGEN RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции осуществляли с помощью набора реактивов RT² Easy First Strand Kit (QIAGEN, Германия). Уровень транскрипции оценивали методом ПЦР в реальном времени на приборе Rotor Gene Q (QIAGEN, Германия) с использованием коммерческих наборов Ipsogen RUNX1-RUNX1T1 Kit, Ipsogen NPM1 mutA MutaQuant Kit.

Для определения мутационного статуса генов *FLT3*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *ASXL1* использовали геномную ДНК. Выделение геномной ДНК из клинических образцов красного костного мозга осуществляли коммерческим набором ExtractDNA Blood («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя.

Мутации генов эпигенетической регуляции *DNMT3A* (R882), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140, R172) и *ASXL1* идентифицировали методом прямого секвенирования по Сэнгеру на приборе Applied Biosystems 3500xL. Амплификацию проводили с использованием коммерческой смеси реактивов для ПЦР Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). В ПЦР-смесь добавляли по 0,2 мкмоль каждого из праймеров и 100 нг ДНК. Для амплификации и секвенирования целевых последовательностей использовали праймеры, указанные в табл. 1. Режим амплификации включал предварительную денатурацию при температуре 96 °С в течение 5 мин; затем 25 циклов, состоящих из денатурации (96 °С, 10 с), отжига (58 °С, 20 с), элонгации (72 °С, 30 с). Заключительную элонгацию проводили при температуре 72 °С в течение 1 мин.

Мутационный статус гена *FLT3* (ITD и TKD) диагностировали с помощью набора FLT3 Mutation Assay for Gel Detection (Invivoscribe, США).

Данные секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения SnapGene, версия 4.3 (<https://www.snapgene.com>), баз данных NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov>) и Ensembl (<https://www.ensembl.org>).

Статистический анализ

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась с использованием пакета для статистического анализа R v.3.0.1. Для проверки статистических гипотез о виде распределения количественных величин применяли *W*-критерий Шапиро—Уилка. Во всех случаях распределение признаков не соответствовало закону нормального распределения.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Ген	Мутация	Участок отжига праймеров	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер ПЦР-продукта, п. н.	Источник
DNMT3A	R882	Экзон 23	F: TCCTGCTGTGTGGTTAGACG	546	[61]
		Экзон 23	R: ACAGAAAACCCCTCTGAAAAG		
IDH1	R132	Экзон 4	F: CTGTGTTTAGGGTGTGCCAG	573	[27]
		Экзон 4	R: AATTCATACCTTGCTTAATGGG		
IDH2	R140, R172	Экзон 4	F: CCACTATTATCTCTGTCCTC	250	[22]
		Экзон 4	R: GCTAGGCGAGGAGCTCCAGT		
ASXL1	Гетерогенные мутации	Экзон 12, фрагмент 1	F: AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT	561	[62]
		Экзон 12, фрагмент 2	R: TAGCCCATCTGTGAGTCCAACCTGT		
			F: AGAGGACCTGCCTTCTCTGAGAAA	558	
			R: TTCGATGGGATGGGTATCCAATGC		

Для сравнения долей использовали критерии χ^2 Пирсона и χ^2 Пирсона с моделированием значений p методом Монте-Карло. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основе результатов кариотипирования все пациенты были разделены на три прогностические группы: 14 — группа благоприятного прогноза, 14 — группа промежуточного риска, 28 — группа неблагоприятного прогноза. При этом нормальный кариотип был выявлен у 20 пациентов (табл. 2).

Для изучения возможного сочетания мутаций в генах эпигенетической регуляции с нарушениями в прогностически значимых генах ОМЛ определяли мутационный статус генов *FLT3*, *NPM1*, *RUNX1-RUNX1T1*. В ходе молекулярно-генетического анализа мутации в гене *FLT3* выявлены в 17 случаях: у 4 пациентов — мутация в тирозинкиназном домене D885, в 14 случаях — тандемная дупликация ITD, при этом один из пациентов был носителем обоих типов мутаций *FLT3*. Транскрипция химерного гена *RUNX1-RUNX1T1* обнаружена в 8 пробах. Мутации в гене *NPM1* были диагностированы у 8 пациентов.

Мутации генов эпигенетической регуляции *DNMT3A* (R882), *IDH1* (R132), *IDH2* (R140, R172) и *ASXL1* выявлены у 14 (25 %) из 56 пациентов, при этом одиночные мутации в данных генах обнаружены у 11 пациентов, а различные их сочетания — у 3.

Таблица 2. Результаты кариотипирования пациентов с ОМЛ, включенных в исследование ($n = 56$)

Кариотип	Число пациентов
Нормальный	20 (40 %)
Патологический	30 (60 %)
t(8;21)(q22;q22)	7 (14 %)
inv(16)(p13;q22)	2 (4 %)
inv(3)(3q26)	1 (2 %)
t(5;12)(q31;12)	1 (2 %)
t(7;18)(p15;q23)	1 (2 %)
del(8q21.3)	1 (2 %)
del(17p)	1 (2 %)
47,XX, +8	1 (2 %)
del(11)(q23)	2 (4 %)
Комплексный	6 (12 %)
47,XY, +Y, der(14)	1 (2 %)
46,XY, del(6)(q24)[11]/46,XY, del(7)(q22)[7]/46,XY[5]	1 (2 %)
del(20)(q11)[20]	1 (2 %)
t(6;9)(p23;q34)	1 (2 %)
-7/7q-	3 (6 %)

Сочетания выявленных мутаций у пациентов с ОМЛ представлены графически на рис. 1. Обнаруженные мутации не были связаны с возрастом ($p = 0,87$) или полом ($p = 0,34$) пациентов. Распространенность мутаций не коррелировала с группами риска ($p = 0,07$).

Мутации IDH1/2 выявлены у 15,6 % пациентов. В этой группе определялась более высокая частота мутаций *NPM1* (57,1 vs 9,7 %; $p = 0,01$) в сравнении

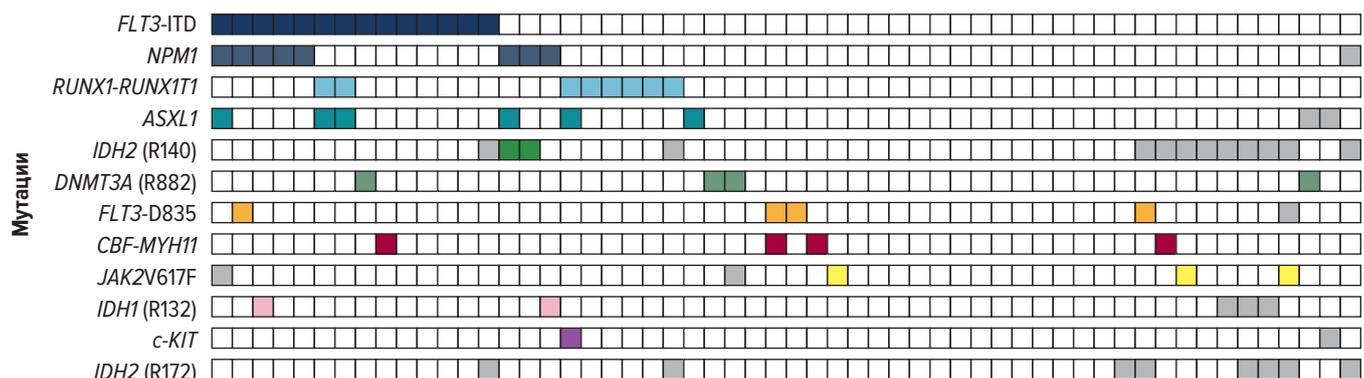


Рис. 1. Графическое представление сочетаний выявленных мутаций у пациентов с ОМЛ

Fig. 1. Graphic chart of mutations identified in AML patients

Таблица 3. Сочетание мутаций *IDH1/2* с мутантными вариантами *FLT3* и *NPM1*

Мутационный статус	Дикий тип <i>IDH1/2</i> (n = 41)	Мутация <i>IDH1/2</i> (n = 7)	p
<i>FLT3-ITD/D835</i>			0,47
Дикий тип (n = 32)	26 (63,4 %)	6 (85,7 %)	
Мутация (n = 17)	16 (36,6 %)	1 (14,3 %)	
<i>NPM1</i>			0,02
Дикий тип (n = 39)	36 (87,8 %)	3 (42,8 %)	
Мутация (n = 8)	4 (9,7 %)	4 (57,1 %)	

с пациентами с диким типом *IDH1/2* (табл. 3). Мутации в генах *IDH1/2* выявлялись чаще в группах промежуточного и низкого риска ($p = 0,045$).

У 6 из 7 пациентов с мутациями *IDH1/2* был определен нормальный кариотип, который встречался статистически значимо чаще, чем в группе без мутаций ($p = 0,002$). У 1 пациента по результатам FISH-исследования в 89 % проанализированных интерфазных ядер выявлен гиперплоидный клон с делецией локуса гена *EGR1/5q31.2* и 2 дополнительными копиями хромосомы 5. В 90–93 % клеток обнаружен клон с 1–2 дополнительными копиями хромосом 7 и 17, а также выявлена амплификация локусов генов *MLL/11q23*, *MEDCOM/3q26*.

Из 53 проанализированных образцов у 2 (3,8 %) пациентов обнаружена мутация *IDH1* (R132), при этом выявлено два варианта данной мутации: R132H и R132S, приводящих к замене аргинина на гистидин и серин соответственно. Мутация *IDH1* (R132) сочеталась с нормальным кариотипом и мутацией *NPM1A*.

Мутации *IDH2* (R140) выявлены в 5 (11,1 %) из 48 проанализированных случаев и представлены одним вариантом — R140Q. В 2 случаях мутация *IDH2* (R140) определялась вместе с мутацией *NPM1A*, при этом в 1 наблюдении сочетание *IDH2* (R140) и *NPM1A* сопровождалось мутациями *ASXL1*. Только у 1 пациента установлена одиночная мутация *IDH2* (R140), которая не сопровождалась молекулярно-генетическими изменениями в других проанализированных генах. В изученной выборке мутация *IDH2* (R172) не выявлена.

Мутация *DNMT3A* (R882) определена у 4 (7,1 %) из 56 пациентов анализируемой группы, при этом в половине случаев однонуклеотидная замена приводила к замене аргинина на цистеин в позиции 882 кодируемого белка (R882C), а в 2 других случаях она сопровождалась заменой аргинина на гистидин (R882H). У 1 пациента мутация R882 определена вместе с мутацией *FLT3-ITD*, у 2 — с *IDH2* (R140), однако данные наблюдения не были статистически значимыми. Распространенность мутации R882 не была связана с группами риска ($p = 0,45$).

В отличие от рассмотренных выше точечных мутаций в генах *IDH1/2*, *DNMT3A* мутации в гене *ASXL1* характеризуются высокой степенью гетерогенности. Из проанализированной выборки 54 пациентов мутации *ASXL1* были идентифицированы у 6 (11,1 %). Все обнаруженные мутации описаны в базах данных (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), среди них 2 нонсенс-мутации и 1 миссенс-мутация. К выявленным нонсенс-мутациям относились p.Q748* (с.2242C>T)

(1/6), p.Q768* (с.2302C>T) (1/6), представляющие собой однонуклеотидные замены, приводящие к замене глутамина на стоп-кодон. Обнаруженная миссенс-мутация p.G652S (с.1954G>A) с заменой глицина на серин в позиции 652 присутствовала в 4 случаях. Наиболее частыми сочетаниями в данной группе (3/6) были *ASXL1* + *RUNX1-RUNX1T1* и *ASXL1* + *FLT3-ITD*. Комбинация *ASXL1* + *RUNX1-RUNX1T1* выявлялась статистически значимо чаще в сравнении с пациентами с диким типом *ASXL1* ($p = 0,038$). Кроме того, в 1 случае сочетание с *RUNX1-RUNX1T1* сопровождалось мутацией *c-KIT*. Мутации *ASXL1* статистически значимо чаще встречались в группе пациентов с низким риском ($p = 0,042$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на значительный прорыв в понимании роли молекулярно-генетических факторов в патогенезе ОМЛ и успехи, достигнутые в терапии, отмечается явный недостаток данных для понимания сложной природы этого заболевания. Некоторые молекулярно-генетические детерминанты требуют более детального изучения. В частности, к ним относятся факторы эпигенетической регуляции генома, такие как *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1*. В представленной выборке пациентов с ОМЛ мы проанализировали мутации генов эпигенетических модификаторов (*IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1*), а также их сочетание с нарушениями в таких важных генах, как *NPM1*, *FLT3*, *RUNX1*.

IDH1/2

В проведенном нами исследовании частота мутаций *IDH1* (R132) составляла 3,8 %, в то время как мутации *IDH2* были выявлены у 11,1 % пациентов. Литературные данные указывают на различную частоту этих мутаций: 6–15 % для *IDH1*, 3–19 % для *IDH2*. При этом в одних работах чаще выявлялись мутации *IDH1* (R132), а в других — *IDH2* (R140) [14, 32, 40, 63].

Согласно нашим данным, у пациентов с мутацией *IDH1* наиболее часто диагностируются варианты R132H и R132S, а в случае нарушений в гене *IDH2* — вариант R140Q, что согласуется с результатами предыдущих публикаций [29, 47].

Как правило, молекулярные нарушения в генах *IDH1/2* связаны с нормальным кариотипом [63], что также демонстрируют представленные нами результаты.

В отношении сочетания мутаций *IDH1/2* наши данные указывают на совместное выявление нарушений в гене *IDH1/2* с мутантным вариантом *NPM1*, что согласуется с ранее опубликованными исследованиями [14, 40, 64]. Несмотря на то что отсутствие кооперации между мутациями *IDH1/2* и *FLT3-ITD*, наблюдаемое в нашей выборке, отмечено в ряде публикаций [14, 65], известны работы, подтверждающие данную ассоциацию [66, 67].

DNMT3A

К настоящему времени описано несколько вариантов мутации R882: R882H, R882C, R882P и R882S, среди которых наиболее часто обнаруживается

мутация R882H [45]. В исследованной нами выборке пациентов выявлено два варианта мутации R882: R882H, R882C. Частота мутации R882 составила 7,1 %. Согласно литературным данным, на долю всех мутаций *DNMT3A* (R882 и прочие мутации) приходится 18–22 % [45, 68].

Согласно результатам нашего исследования, одновременное обнаружение мутации R882 с *FLT3-ITD* и *IDH2* (R140) имело место в единичных случаях и не было статистически значимым. Известно, что мутации в гене *DNMT3A* зачастую выявляются вместе с мутациями в генах *NPM1*, *FLT3*, *IDH1/2*, *TET2* [1, 46, 64]. Учитывая низкую частоту мутации R882 среди изученных нами образцов, отсутствие сочетания с *FLT3*, *IDH1/2* и *NPM1*, вероятно, объясняется небольшим размером выборки пациентов.

ASXL1

При молекулярно-генетическом анализе последнего экзона гена *ASXL1* мы выявили 2 нонсенс-мутации (p.Q748*, p.Q768*) и 1 миссенс-мутацию (p.G652S). Нонсенс-мутации — одни из наиболее часто определяемых нарушений *ASXL1*. Предполагается, что нонсенс-мутации с образованием стоп-кодона ранней терминации трансляции кодируемого пептида приводят к появлению укороченной формы белка, который утрачивает свою функцию [69]. Однако последние публикации указывают на то, что укороченный белок сохраняет свою активность и взаимодействует с другими белками за счет приобретения новой функции [70]. В отличие от нонсенс-мутаций влияние миссенс-мутаций на функционирование белка *ASXL1* неясно [71].

В проанализированной нами выборке пациентов частота мутаций *ASXL1* составила 11,1 %, что согласуется с предыдущими исследованиями [58]. Согласно литературным источникам, молекулярные нарушения в гене *ASXL1* чаще выявляются у мужчин, связаны со старшим возрастом, незрелым фенотипом клеток и aberrантным кариотипом [71]. В проведенном нами исследовании мы не наблюдали подобных закономерностей.

В нашем исследовании мутации *ASXL1* чаще присутствовали совместно с *RUNX1-RUNX1T1*, что подтверждает ранее опубликованные результаты [71, 72]. Помимо *RUNX1* в литературе описано одновременное выявление нарушений в генах *ASXL1* и *IDH2* [72]. В проанализированных нами образцах мы обнаружили 1 случай сочетания мутаций *ASXL1* и *IDH2* (R140), однако данное наблюдение было случайным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутации генов эпигенетической регуляции часто обнаруживаются у пациентов с ОМЛ и могут сочетаться с нарушениями в генах *NPM1*, *FLT3* и *RUNX1*. Несмотря на доказанную роль эпигенетических факторов в патогенезе ОМЛ, данные о влиянии мутаций этих генов на прогноз ОМЛ противоречивы. Не исключено, что комплексный подход к изучению мутационного статуса *IDH1/2*, *DNMT3A*, *ASXL1* с учетом нарушений в других значимых генах при ОМЛ позволит в будущем

выработать единую согласованную концепцию о прогностическом значении данных генов.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-75-20128, гранта РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-51035.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Л.Л. Гиршова, А.Ю. Зарицкий.

Сбор и обработка данных: Е.К. Зайкова, Е.В. Белоцерковская, И.Г. Будаева, Д.В. Зайцев, А.А. Шатилова.

Предоставление материалов исследования: Л.Л. Гиршова, Е.К. Зайкова, К.В. Богданов, Ю.В. Миролюбова, Т.С. Никулина.

Анализ и интерпретация данных: Е.В. Белоцерковская, Л.Л. Гиршова, Ю.Д. Роговая, О.Н. Демидов.

Подготовка рукописи: Е.В. Белоцерковская, К.А. Левчук, Л.Л. Гиршова.

Окончательное одобрение рукописи: А.В. Петухов, Л.Л. Гиршова, А.Ю. Зарицкий.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wang M, Yang C, Zang L, et al. Molecular mutations and their cooccurrences in cytogenetically normal Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1–11. doi: 10.1155/2017/6962379.
2. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129(4):424–47. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196.
3. Gambacorta V, Gnani D, Vago L, et al. Epigenetic Therapies for Acute Myeloid Leukemia and Their Immune-Related Effects. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:207. doi: 10.3389/fcell.2019.00207.
4. Santini V. Hypomethylating agents in the treatment of acute myeloid leukemia: A guide to optimal use. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;140:1–7. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.05.013.
5. Kim ES. Enasidenib: First Global Approval. *Drugs.* 2017;77(15):1705–11. doi: 10.1007/s40265-017-0813-2.
6. Liu X, Gong Y. Isocitrate dehydrogenase inhibitors in acute myeloid leukemia. *Biomark Res.* 2019;7(1):22. doi: 10.1186/s40364-019-0173-z.
7. Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Semin Hematol.* 2018;56(2):84–9. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.001.
8. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2015;126(1):9–16. doi: 10.1182/blood-2015-03-631747.
9. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477. doi: 10.1056/nejmoa1409405.
10. Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell.* 2018;22(2):157–70. doi: 10.1016/j.stem.2018.01.011.
11. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal hematopoiesis and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017;377(2):111–21. doi: 10.1056/nejmoa1701719.
12. Buscariet M, Provost S, Zada YF, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood.* 2017;130(6):753–62. doi: 10.1182/blood-2017-04-777029.
13. Yuan X, Peng L, Zeng W, et al. DNMT3A R882 Mutations Predict a Poor Prognosis in AML. *Medicine.* 2016;95(18):e3519. doi: 10.1097/md.0000000000003519.
14. Marcucci G, Maharry K, Wu Y, et al. IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets Within De Novo Cytogenetically Normal

Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2348–55. doi: 10.1200/JCO.2009.27.3730.

15. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. ASXL1 exon 12 mutations frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013;27(11):82–91. doi: 10.1038/leu.2012.262.

16. Pratorcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012;97(3):388. doi: 10.3324/haematol.2011.051532.

17. Wagner K, Damm F, Gohring G, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2356–64. doi: 10.1200/jco.2009.27.6899.

18. Dinardo CD, Ravandi F, Agresta S, et al. Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *Am J Hematol*. 2015;90(8):732–6. doi: 10.1002/ajh.24072.

19. Brunetti L, Gundry MC, Goodell MA. DNMT3A in Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(2):a030320. doi: 10.1101/cshperspect.a030320.

20. Park SH, Choi JC, Kim SY, et al. Incidence and Prognostic Impact of DNMT3A Mutations in Korean Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia Patients. *BioMed Res Int*. 2015;2015:1–11. doi: 10.1155/2015/723682.

21. Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, et al. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):5. doi: 10.1186/1756-8722-5-5.

22. Petrova L, Vrbacky F, Lanska M, et al. IDH1 and IDH2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: Suitable targets for minimal residual disease monitoring? *Clin Biochem*. 2018;61:34–9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.08.012.

23. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Biological Role and Therapeutic Potential of IDH Mutations in Cancer. *Cancer Cell*. 2018;34(2):186–95. doi: 10.1016/j.ccell.2018.04.011.

24. Clark O, Yen K, Mellinghoff IK. Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1837–42. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1333.

25. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* 2009;360(8):765–73. doi: 10.1056/NEJMoa0808710.

26. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807–12. doi: 10.1126/science.1164382.

27. Whitehall VLJ, Dumenil TD, McKeone DM, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 R132C mutation occurs exclusively in microsatellite stable colorectal cancers with the CpG island methylator phenotype. *Epigenetics*. 2014;9(11):1454–60. doi: 10.4161/15592294.2014.971624.

28. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia Genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058–66. doi: 10.1056/NEJMoa0903840.

29. Green CL, Evans CM, Zhao L, et al. The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. *Blood*. 2011;118(2):409–12. doi: 10.1182/blood-2010-12-322479.

30. Berenstein R, Blau IW, Kar A, et al. Comparative examination of various PCR-based methods for DNMT3A and IDH1/2 mutations identification in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014;33(1):44. doi: 10.1186/1756-9966-33-44.

31. Mizuta S, Yamane N, Komai T, et al. Investigation of screening method for DNMT3A mutations by high-resolution melting analysis in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2019;41(5):593–600. doi: 10.1111/ijlh.13056.

32. Мотыко Е.В., Блау О.В., Полушкина Л.Б. и др. Прогностическое значение генетических мутаций у больных острыми миелоидными лейкозами: результаты совместного исследования гематологических клиник Санкт-Петербурга (Россия) и клиники Шарите (Германия). *Клиническая онкогематология*. 2019;12(2):211–9. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-2-211-219.

[Motyko EV, Blau OV, Polushkina LB, et al. Prognostic Value of Genetic Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemias: Results of a Cooperative Study of Hematology Clinics of Saint Petersburg (Russia) and Charite Clinic (Germany). *Clinical oncohematology*. 2019;12(2):211–9. doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-2-211-219. (In Russ)]

33. ElNahass YH, Badawy RH, ElRefaey FA, et al. IDH Mutations in AML Patients; A higher Association with Intermediate Risk Cytogenetics. *Asian Pacif J Cancer Prev*. 2020;21(3):721–5. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.3.721.

34. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, et al. Clinical Relevance Of IDH1/2 Mutant Allele Burden During Follow-Up In Acute Myeloid Leukemia. A Study By The French ALFA Group. *Haematologica*. 2018;103(5):822–9. doi: 10.3324/haematol.2017183525.

35. Brambati C, Galbiati S, Xue E, et al. 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. *Haematologica*. 2016;101(4):e157–e161. doi: 10.3324/haematol.2015.135467.

36. Patel KP, Ravandi F, Ma D, et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(1):35–45. doi: 10.1309/AJCPD7NR2RMNQDVF.

37. Zou Y, Bai HX, Wang Z, Yang L. Comparison of immunohistochemistry and DNA sequencing for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2015;17(3):477–8. doi: 10.1093/neuonc/nou351.

38. Petiti J, Rosso V, Croce E, et al. Highly Sensitive Detection of IDH2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2020;9(1):271. doi: 10.3390/jcm9010271.

39. Aref S, Kamel AS, Abdel AMF, et al. Prevalence and clinical effect of IDH1 and IDH2 mutations among cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients. *Clin Lymphoma Myel Leuk*. 2015;15(9):550–5. doi: 10.1016/j.clml.2015.05.009.

40. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, et al. Prognostic Impact of Isocitrate Dehydrogenase Enzyme Isoforms 1 and 2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2010;28(23):3717–23. doi: 10.1200/jco.2010.28.2285.

41. Xu Q, Li Y, Lv N, et al. Correlation between isocitrate dehydrogenase gene aberrations and prognosis of patients with acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2017;23(15):4511–22. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-16-2628.

42. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncol*. 2018;10(14):979–93. doi: 10.2217/fon-2017-0523.

43. Amatangelo MD, Quek L, Shih A, et al. Enasidenib induces acute myeloid leukemia cell differentiation to promote clinical response. *Blood*. 2017;130(6):732–42. doi: 10.1182/blood-2017-04-779447.

44. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*. 1998;19(3):219–20. doi: 10.1038/890.

45. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424–33. doi: 10.1056/NEJMoa1005143.

46. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059–74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689.

47. Блау О.В. Мутации генов при острых миелоидных лейкозах. *Клиническая онкогематология*. 2016;9(3):245–56. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-245-256.

[Blau OV. Genetic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical oncohematology*. 2016;9(3):245–56. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-245-256. (In Russ)]

48. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, et al. DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. *Nat Med*. 2016;22(12):1488–95. doi: 10.1038/nm.4210.

49. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012;119(2):559–68. doi: 10.1182/blood-2011-07-369934.

50. Ploen GG, Nederby L, Guldberg P, et al. Persistence of DNMT3A mutations at long-term remission in adult patients with AML. *Br J Haematol*. 2014;167(4):478–86. doi: 10.1111/bjh.13062.

51. Rothenberg-Thurley M, Amler S, Goerlich D, et al. Persistence of pre-leukemic clones during first remission and risk of relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2018;32(7):1598–608. doi: 10.1038/s41375-018-0034-z.

52. Gale RE, Lamb K, Allen C, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015;33(18):2072–83. doi: 10.1200/jco.2014.59.2022.

53. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: Results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood*. 2013;121(23):4769–77. doi: 10.1182/blood-2012-10-461624.

54. Elsayed GM, Fahmi AEA, Shafiket NF, et al. Study of DNA methyl transferase 3A mutation in acute myeloid leukemic patients. *Egypt J Med Hum Genet*. 2018;19(4):315–9. doi: 10.1016/j.ejmhg.2018.05.005.

55. Berenstein R, Blau IW, Suckert N, et al. Quantitative detection of DNMT3A R882H mutation in acute myeloid leukemia. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34(1):55. doi: 10.1186/s13046-015-0173-2.

56. Young AL, Challen GA, Birmann BM, et al. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun*. 2016;7(1):12484. doi: 10.1038/ncomms12484.

57. Asada S, Fujino T, Goyama S, et al. The role of ASXL1 in hematopoiesis and myeloid malignancies. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(13):2511–23. doi: 10.1007/s00018-019-03084-7.

58. Chou WC, Huang HH, Hou HA, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2010;116(20):4086–94. doi: 10.1182/blood-2010-05-283291.

59. Molenaar RJ, Thota S, Nagata Y, et al. Clinical and biological implications of ancestral and non-ancestral IDH1 and IDH2 mutations in myeloid neoplasms. *Leukemia*. 2015;29(11):2134–42. doi: 10.1038/leu.2015.91.

60. Asada S, Kitamura T. Aberrant histone modifications induced by mutant ASXL1 in myeloid neoplasms. *Int J Hematol*. 2019;110(2):179–86. doi: 10.1007/s12185-018-2563-7.

61. Shivarov V, Ivanova M, Naumova E. Rapid Detection of DNMT3A R882 Mutations in Hematologic Malignancies Using a Novel Bead-Based Suspension Assay with BNA(NC) Probes. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e99769. doi: 10.1371/journal.pone.0099769.

62. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(6):788–800. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x.

63. Abbas S, Lugthart S, Kavelaars F, et al. Acquired mutations in the genes encoding IDH1 and IDH2 both are recurrent aberrations in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Blood*. 2010;116(12):2122–6. doi: 10.1182/blood-2009-11-250878.

64. Dunlap JB, Leonard J, Rosenberg M, et al. The combination of NPM1, DNMT3A, and IDH1/2 mutations leads to inferior overall survival in AML. *Am J Hematol*. 2019;94(8):913–20. doi: 10.1002/ajh.25517.

- 65.** Virijevic M, Karan-Djurasevic T, Marjanovic I, et al. Somatic mutations of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 are prognostic and follow-up markers in patients with acute myeloid leukaemia with normal karyotype. *Radiol Oncol.* 2016;50(4):385–93. doi: 10.1515/raon-2016-0044.
- 66.** Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209–21. doi: 10.1056/NEJMoa1516192.
- 67.** Boddu P, Takahashi K, Pemmaraju N, et al. Influence of IDH on FLT3ITD status in newly diagnosed AML. *Leukemia.* 2017;31(11):2526–9. doi: 10.1038/leu.2017.244.
- 68.** Yan X-J, Xu J, Gu Z-H, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011;43(4):309–15. doi: 10.1038/ng.788.
- 69.** Abdel-Wahab O, Adli M, Saunders L, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation Through Inhibition of PRC2-Mediated Gene Repression. *Blood.* 2011;118(21):405. doi: 10.1182/blood.v118.21.405.405.
- 70.** Inoue D, Matsumoto M, Nagase R. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Exp Hematol.* 2016;44(3):172–6.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.011.
- 71.** Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, et al. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol.* 2012;5(1):12. doi: 10.1186/1756-8722-5-12.
- 72.** Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica.* 2015;100(3):324–30. doi: 10.3324/haematol.2014.114157.
-