

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## CLINICAL TRIALS

### Прогностическое значение соматических мутаций в генах эпигенетической регуляции при острых миелоидных лейкозах в реальной клинической практике: результаты наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования

### The Prognostic Value of Somatic Mutations of Epigenetic Regulation Genes in Acute Myeloid Leukemias in Real-World Clinical Practice: Results of an Observational Non-Interventional Prospective Interregional Study

А.А. Шатилова<sup>1</sup>, И.Г. Будаева<sup>1</sup>, А.В. Петухов<sup>1</sup>, С.А. Силонов<sup>1</sup>, А.Е. Ершова<sup>1</sup>, Т.С. Никулина<sup>1</sup>, Ю.Д. Матвиенко<sup>1</sup>, Ю.В. Миролубова<sup>1</sup>, К.В. Богданов<sup>1</sup>, Л.В. Анчукова<sup>2</sup>, Ю.С. Нередько<sup>3</sup>, С.Ю. Тяско<sup>3</sup>, О.Е. Очирова<sup>4</sup>, А.Г. Карпова<sup>4</sup>, Э.Р. Васильева<sup>5</sup>, О.Д. Сердюк<sup>6</sup>, Д.А. Яскульский<sup>6</sup>, Д.В. Букин<sup>7</sup>, Ю.А. Алексеева<sup>1</sup>, Е.Г. Ломаиа<sup>1</sup>, Л.Л. Гиршова<sup>1</sup>

AA Shatilova<sup>1</sup>, IG Budaeva<sup>1</sup>, AV Petukhov<sup>1</sup>, SA Silonov<sup>1</sup>, AE Ershova<sup>1</sup>, TS Nikulina<sup>1</sup>, YuD Matvienko<sup>1</sup>, YuV Mirolyubova<sup>1</sup>, KV Bogdanov<sup>1</sup>, LV Anchukova<sup>2</sup>, YuS Neredko<sup>3</sup>, SYu Tyasko<sup>3</sup>, OE Ochirova<sup>4</sup>, AG Karpova<sup>4</sup>, ER Vasil'eva<sup>5</sup>, OD Serdyuk<sup>6</sup>, DA Yaskulskii<sup>6</sup>, DV Bukin<sup>7</sup>, YuA Alekseeva<sup>1</sup>, EG Lomaia<sup>1</sup>, LL Girshova<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup> VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

<sup>2</sup> БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница», ул. Лечебная, д. 17, Вологда, Российская Федерация, 160002

<sup>2</sup> Vologda Regional Clinical Hospital, 17 Lechebnaya ul., Vologda, Russian Federation, 160002

<sup>3</sup> ГБУЗ «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер», ул. Октябрьская, д. 182а, Ставрополь, Российская Федерация, 355001

<sup>3</sup> Stavropol Krai Clinical Oncology Dispensary, 182a Oktyabrskaya ul., Stavropol, Russian Federation, 355001

<sup>4</sup> ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко», ул. Павлова, д. 12, Улан-Удэ, Российская Федерация, 670031

<sup>4</sup> NA Semashko Republican Clinical Hospital, 12 Pavlova ul., Ulan-Ude, Russian Federation, 670031

<sup>5</sup> ГБУЗ «Пермская краевая клиническая больница», ул. Пушкина, д. 85, Пермь, Российская Федерация, 614990

<sup>5</sup> Perm Krai Clinical Hospital, 85 Pushkina ul., Perm, Russian Federation, 614990

<sup>6</sup> ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1», ул. Димитрова, д. 146, Краснодар, Российская Федерация, 350040

<sup>6</sup> Clinical Oncology Dispensary No. 1, 146 Dimitrova ul., Krasnodar, Russian Federation, 350040

<sup>7</sup> ГБУЗ «Областная клиническая больница», Петербургское ш., д. 105, Тверь, Российская Федерация, 170036

<sup>7</sup> Regional Clinical Hospital, 105 Peterburgskoe sh., Tver, Russian Federation, 170036

## РЕФЕРАТ

## ABSTRACT

**Цель.** Оценить частоту и влияние на прогноз мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *ASXL1* в изолированном варианте и в сочетании с известными хромосомными aberrациями и генными мутациями у пациентов с впервые диагностированным острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) из отдельных регионов Российской Федерации.

**Aim.** To assess the rate of *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, and *ASXL1* gene mutations and their effect on the prognosis both as isolated findings and in combination with well-known chromosomal aberrations and gene mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) patients from some regions of the Russian Federation.

**Материалы и методы.** В исследование включено 83 пациента с впервые выявленным ОМЛ из 22 регионов Российской Федерации, которым проведено молекулярно-генетическое исследование с целью выявить мутации в генах *IDH1* (R132), *IDH2* (R140), *ASXL1* и *DNMT3A* методами цифровой капельной ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

**Materials & Methods.** The study enrolled 83 patients with newly diagnosed AML from 22 regions of the Russian Federation, who underwent molecular genetic examination for detecting *IDH1* (R132), *IDH2* (R140), *ASXL1*, and *DNMT3A* gene mutations with droplet digital PCR and Sanger sequencing methods.

**Результаты.** Частота определения мутаций в гене *DNMT3A* составила 16,7 %, в гене *IDH1* (R132) — 6 %, *IDH2*

**Results.** The mutation rate in *DNMT3A* was 16.7 %, in *IDH1* (R132) it was 6 %, in *IDH2* (R140) it was 9.6 %, and in *ASXL1*

(R140) — 9,6 % и *ASXL1* — 6 %. Мутация R140 в гене *IDH2* коррелировала с более старшим возрастом пациентов. Выявлена статистически значимая связь мутаций в генах *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *DNMT3A* с мутантным типом гена *NPM1*. Мутации в генах *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) значимо чаще определялись у пациентов с нормальным кариотипом. Отмечается благоприятное влияние на прогноз при ОМЛ мутаций *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140), вероятнее всего связанное с высокой частотой сочетаемости с мутацией *NPM1*. Мутантный тип гена *DNMT3A* негативно влиял на показатели общей выживаемости у пациентов с мутацией в гене *NPM1*. Мутация в гене *ASXL1* также служит неблагоприятным прогностическим фактором, ухудшающим показатели общей выживаемости у пациентов с диким типом гена *NPM1*.

**Заключение.** С учетом широкой распространенности мутаций в генах эпигенетической регуляции, а также их потенциального вклада в прогноз при ОМЛ определение мутационного статуса генов *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *ASXL1* на этапе первичной диагностики представляется обоснованным и необходимым в реальной клинической практике.

**Ключевые слова:** острые миелоидные лейкозы, *IDH*, *DNMT3A*, *ASXL1*, гены эпигенетической регуляции.

**Получено:** 25 сентября 2022 г.

**Принято в печать:** 1 марта 2023 г.

*Для переписки:* Алексина Алексеевна Шатилова, ул. Акkuratова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341; тел.: +7(911)476-35-58; e-mail: alexina-96@list.ru

*Для цитирования:* Шатилова А.А., Будаева И.Г., Петухов А.В. и др. Прогностическое значение соматических мутаций в генах эпигенетической регуляции при острых миелоидных лейкозах в реальной клинической практике: результаты наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования. Клиническая онкогематология. 2023;16(2):174–85.

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-174-185

it was 6 %. The R140 mutation in *IDH2* correlated with the older age of patients. The mutations in *IDH1* (R132), *IDH2* (R140), and *DNMT3A* showed a significant association with mutated *NPM1*. The mutations in *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) were reported to occur significantly more often in patients with normal karyotype. The *IDH1* (R132) and *IDH2* (R140) mutations appeared to have a favorable effect on AML prognosis, which is most likely to be associated with a high rate of their compatibility with *NPM1* mutation. The mutated type of *DNMT3A* had a negative effect on overall survival of patients with *NPM1* mutation. The mutation in *ASXL1* also appeared to be an unfavorable prognostic factor for overall survival of patients with wild type *NPM1*.

**Conclusion.** A high rate of mutation occurrence in epigenetic regulation genes as well as the prognostic potential of these mutations in AML necessitate the need for determining the mutation status of *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, and *ASXL1* in the context of primary diagnosis in real-world clinical practice.

**Keywords:** acute myeloid leukemias, *IDH*, *DNMT3A*, *ASXL1*, epigenetic regulation genes.

**Received:** September 25, 2022

**Accepted:** March 1, 2023

*For correspondence:* Aleksina Alekseevna Shatilova, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341; Tel.: +7(911)476-35-58; e-mail: alexina-96@list.ru

*For citation:* Shatilova AA, Budaeva IG, Petukhov AV, et al. The Prognostic Value of Somatic Mutations of Epigenetic Regulation Genes in Acute Myeloid Leukemias in Real-World Clinical Practice: Results of an Observational Non-Interventional Prospective Interregional Study. Clinical oncohematology. 2023;16(2):174–85. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-174-185

## ВВЕДЕНИЕ

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — гетерогенная группа злокачественных новообразований, характеризующихся бесконтрольной пролиферацией и аномальной дифференцировкой клональных миелоидных клеток-предшественниц гемопоэза [1]. За последние десятилетия благодаря появлению новых технологий, в т. ч. секвенирования нового поколения, наше понимание молекулярного патогенеза этой группы заболеваний значительно расширилось. Комплексный геномный анализ с использованием цитогенетических и молекулярно-генетических методов исследования, выполненный в дебюте заболевания, позволяет определить прогноз и открывает возможности для риск-адаптированной терапии. Те или иные хромосомные и молекулярно-генетические аберрации идентифицируются более чем

в 97 % случаев ОМЛ [2]. Наиболее часто встречающиеся аберрации легли в основу современной стратификации ОМЛ по группам генетического риска [3]. У пациентов с благоприятным генетическим профилем (наличием  $t(8;21)(q22;q22.1)$ ,  $inv(16)(p13.1q22)/t(16;16)(p13.1;q22)$ , мутации в гене *NPM1* без сопутствующей мутации *FLT3-ITD* и др.) можно достичь удовлетворительных результатов с использованием только стандартных режимов полихимиотерапии. В то же время пациенты, отнесенные к неблагоприятной группе генетического риска (комплексный/моносомный кариотип,  $inv(3)(q21.3q26.2)/t(3;3)(q21.3;q26.2)$  и др.), нуждаются в трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток в первой полной ремиссии (ПР) заболевания [3–5]. Однако остается довольно обширная когорта пациентов (в т. ч. с нормальным кариотипом), стратифицируемых в группу промежуточного риска. Оптимальная тактика ведения этой

категории больных ОМЛ до сих пор не разработана. Таким образом, идентификация новых биомаркеров для оптимизации существующей прогностической шкалы является крайне актуальной задачей.

Лейкозогенез представляет собой многоэтапный процесс, в основе которого лежит комплекс молекулярных событий, ведущих к активации сигнальных пролиферативных путей (мутациям в генах *FLT3*, *KRAS/NRAS*, *TP53*, *KIT* и др.) и нарушению нормальной гемопоэтической дифференцировки (*NPM1*, *CEBPA* и т. д.) [6]. Альтерации в генах, участвующих в эпигенетической регуляции (таких, как *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*), в настоящее время идентифицируются как ранние события канцерогенеза и часто выявляются у пациентов с нормальным кариотипом [7]. Аберрантное метилирование ДНК и нарушение посттрансляционной модификации гистонов приводят к инактивации генов, участвующих в дифференцировке клеток, репарации ДНК и апоптозе. Они являются ведущим патогенетическим фактором в развитии миелодиспластического синдрома (МДС) и трансформации МДС в ОМЛ [8]. Помимо потребности в уточнении прогностического значения изучение мутаций в генах эпигенетической регуляции представляет интерес также в аспекте развития таргетной противоопухолевой терапии, в т. ч. для преодоления химиорезистентности и достижения длительной ремиссии.

**Цель настоящей работы** — оценить частоту и влияние на прогноз мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1* в изолированном варианте и в сочетании с известными хромосомными и генными абберациями у пациентов с впервые выявленным ОМЛ из отдельных регионов Российской Федерации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 83 пациента (44,6 % (37/83) мужчин и 55,4 % (46/83) женщин) с впервые выявленным ОМЛ, проходивших первичный этап диагностики в гематологических отделениях республиканских, краевых, городских и районных лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ) РФ в период с 2018 по 2021 г. Медиана возраста составила 53 года (диапазон 20–76 лет). Данная работа осуществлялась в рамках наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования «Скрининг мутаций *IDH1/IDH2* и сопутствующих мутаций у пациентов с впервые диагностированным острым миелобластным лейкозом», получившего одобрение этического комитета ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России № 19072019 от 08.07.2019 г. Проведение полноценной оценки основных эпидемиологических характеристик ОМЛ в различных регионах РФ было затруднено с учетом логистических и организационных сложностей на фоне пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19.

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.

Список участвующих в исследовании ЛПУ с основными характеристиками пациентов и вариантами индукционной терапии представлен в табл. 1.

Верификация диагноза ОМЛ проводилась согласно критериям классификации ВОЗ 2016 г. с использованием морфологических (анализ мазка периферической крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, миелограмма, цитохимические исследования), цитофлюориметрических (иммунофенотипирование клеток крови или костного мозга для идентификации лейкоз-ассоциированного аберрантного иммунофенотипа), цитогенетических (стандартное кариотипирование, флюоресцентная гибридизация *in situ* [FISH]) и молекулярно-биологических (полимеразная цепная реакция [ПЦР], секвенирование по Сэнгеру) методов исследования. Молекулярно-генетические исследования с целью выявить мутации в генах *FLT3* (ITD/TKD), *DNMT3A*, *IDH1/2* и *ASXL1* выполнялись централизованно в лаборатории генной инженерии и клеточной терапии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, остальные исследования — в лабораториях региональных центров.

Цитогенетические исследования (стандартное кариотипирование, FISH) проводились на образцах костного мозга или периферической крови (при числе бластных клеток > 30 %). Для молекулярно-биологического исследования (ПЦР, секвенирование по Сэнгеру) выделялась ДНК с использованием коммерческого набора ExtractDNA Blood (№ VM011, «Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Источником тотальной ДНК служили замороженные биообразцы костного мозга или периферической крови (при числе бластных клеток > 20 %). Качество и количество выделенной ДНК оценивали на приборе Implen NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия).

Стратификация группы генетического риска проводилась согласно критериям ELN 2017 г. Определить группу риска оказалось возможным у 75 % (62/83) пациентов, которым в дебюте заболевания был выполнен необходимый объем цитогенетических и молекулярно-генетических исследований. К прогностически благоприятной генетической группе риска отнесено 16 % (10/62) пациентов, к промежуточной — 39 % (24/62), к неблагоприятной — 45 % (28/62). Стандартное кариотипирование было информативным в 64 % (53/83) случаев. Спектр выявленных хромосомных аббераций представлен на рис. 1. Комплексный кариотип обнаружен у 13,5 % (7/52) пациентов, а у 54 % (28/52) больных никаких хромосомных альтераций не идентифицировано.

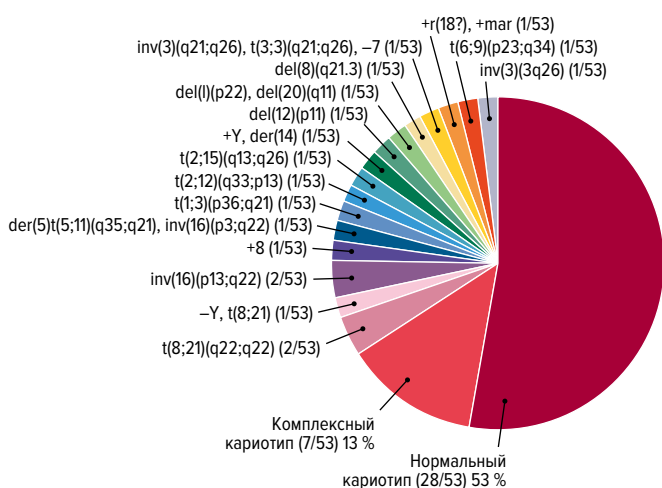
Молекулярно-генетическое исследование с целью определить мутации *FLT3-ITD/TKD* проведено всем пациентам методом ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, подобранных с помощью программного обеспечения Primer-BLAST (комплементарных к области экзона 14 и 15 гена *FLT3* для диагностики мутации *FLT3-ITD* и к области участка гена *FLT3*, включающего экзон 20 для диагностики мутации D835 в гене *FLT3-TKD*) с дальнейшей ам-

**Таблица 1.** Возрастные, половые характеристики пациентов с ОМЛ и варианты индукционной терапии (распределение по регионам)

Лечебно-профилактическое учреждение	Доля пациентов	Возраст, лет	Пол	Вариант индукционной терапии
ГБУЗ «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер», г. Ставрополь	22,9 % (19/83)	51 (20–76)*	М 26,3 % (5/19) Ж 73,7 % (14/19)	НР 37 % (7/19) «7+3» 58 % (11/19) ПТ 5 % (1/19)
ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1», г. Краснодар	18,1 % (15/83)	51 (24–73)*	М 53,3 % (8/15) Ж 46,7 % (7/15)	ГМА + Вен 6,7 % (1/15) «7+3» 86,6 % (13/15) ПТ 6,7 % (1/15)
БУЗ ВО «Вологодская областная клиническая больница», г. Вологда	16,9 % (14/83)	65 (33–74)*	М 57,1 % (8/14) Ж 42,9 % (6/14)	НР 7,1 % (1/14) «7+3» 71,5 % (10/14) ВДЦ 7,1 % (1/14) ПТ 14,3 % (2/14)
ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Н.А. Семашко», г. Улан-Удэ	10,8 % (9/83)	51 (26–66)*	М 22,2 % (2/9) Ж 77,8 % (7/9)	НР 22,2 % (2/9) «7+3» 55,6 % (5/9) ПТ 22,2 % (2/9)
ГБУЗ «Пермская краевая клиническая больница», г. Пермь	3,6 % (3/83)	57/61/75	М 33,3 % (1/3) Ж 66,7 % (2/3)	«7+3» 33 % (1/3) ПТ 33 % (1/3) НД 33 % (1/3)
ГБУЗ «Областная клиническая больница», г. Тверь	2,4 % (2/83)	31/53	М 100 % (2/2)	«7+3» 50 % (1/2) НД 50 % (1/2)
КБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Красноярск	2,4 % (2/83)	45/56	М 50 % (1/2) Ж 50 % (1/2)	«7+3» 50 % (1/2) НД 50 % (1/2)
Пациенты из других регионов РФ, проходившие обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова», г. Санкт-Петербург	22,9 % (19/83)	54 (24–69)*	М 52,6 % (10/19) Ж 47,4 % (9/19)	ГМА + Вен 21 % (4/19) «7+3» 73,7 % (14/19) ВДЦ 5,3 % (1/19)
<b>Итого, n</b>	<b>83</b>	<b>53 (20–76)*</b>	<b>М 44,6 % (37/83) Ж 55,4 % (46/83)</b>	<b>НР 12,1 % (10/83) ГМА + Вен 6 % (5/83) «7+3» 67,5 % (56/83) ВДЦ 2,4 % (2/83) ПТ 8,4 % (7/83) НД 3,6 % (3/83)</b>

ВДЦ — высокие дозы цитарабина; Вен — венетоклак; ГМА — гипометилирующий агент; НД — нет данных; НР — низкоинтенсивные режимы (монотерапия малыми дозами цитарабина, ГМА); ПТ — паллиативная терапия.

\* Медиана (диапазон) возраста.



**Рис. 1.** Хромосомные aberrации, выявленные методами стандартного кариотипирования и FISH

**Fig. 1.** Chromosomal aberrations detected by standard karyotyping and FISH

плификацией и электрофорезом продукта согласно локально апробированной методике [9].

Мутационный статус генов *IDH1* и *IDH2* анализировался с использованием методики цифровой капельной ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Определение мутаций в генах *IDH1* (R132C) и *IDH2* (R140Q) осуществлялось согласно рекомендациям производителя с помощью набора Bio-Rad (№ 1055255) для идентификации *IDH2* дикого типа и мутации R140Q, набора Bio-Rad (№ 1055257) для идентификации *IDH1* дикого типа и мутации R132C. Выявление мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* осуществлялось прибором QX200 Droplet Reader (№ 1864003, Bio-Rad, США). Примеры положительного и отрицательного результатов исследования на наличие мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) представлены на рис. 2. Горизонтальная черта розового цвета на рисунках является пороговым значением. Совокупность точек с зеленым (Hex) или синим (Fam) сигналом, расположенных выше порогового значения, соответствует положительному результату амплификации соответствующего варианта гена (дикий или мутантный тип).

Секвенирование по Сэнгеру проводилось с использованием олигонуклеотидов (табл. 2) и осуществ-



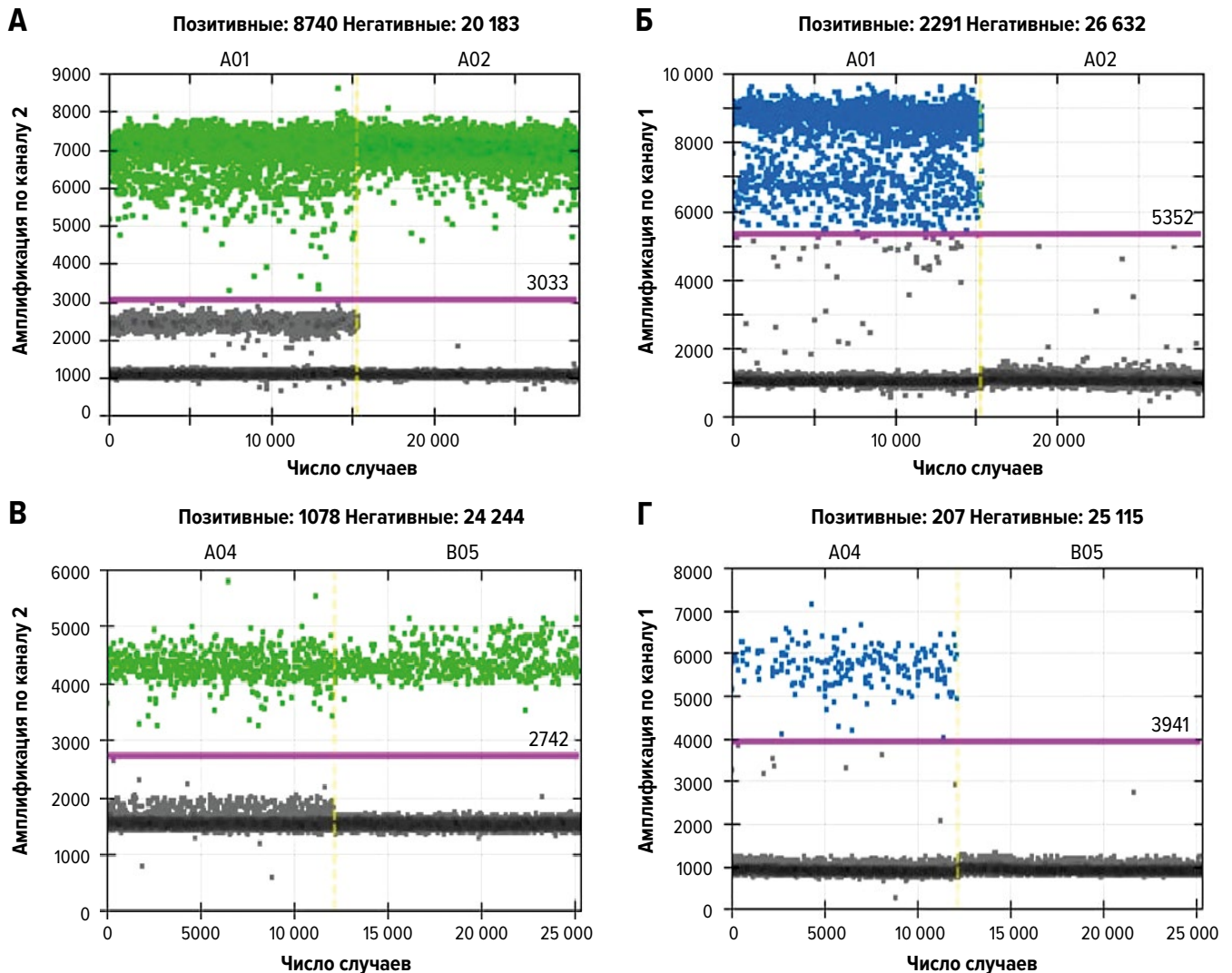


Рис. 2. Графики результатов амплификации:

А — гена *IDH1* дикого типа для образцов А01 (с мутацией R132), А02 (без мутации R132); Б — гена *IDH1* (R132C) для образцов А01 (с мутацией R132), А02 (без мутации R132); В — гена *IDH2* дикого типа для образцов А04 (с мутацией R140), В05 (без мутации R140); Г — гена *IDH2* (R140Q) для образцов А04 (с мутацией R140), В05 (без мутации R140)

Fig. 2. Amplification plots:

А — wild-type *IDH1* for samples А01 (with R132 mutation) and А02 (without R132 mutation); Б — *IDH1* (R132C) for samples А01 (with R132 mutation) and А02 (without R132 mutation); В — wild-type *IDH2* for samples А04 (with R140 mutation) and В05 (without R140 mutation); Г — *IDH2* (R140Q) for samples А04 (with R140 mutation) and В05 (without R140 mutation)

Таблица 2. Олигонуклеотиды для секвенирования по Сэнгеру с целью определить мутации в генах *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A*, *ASXL1*

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина ПЦР-фрагмента, пары оснований
<i>IDH1</i> [10]	5'-CTG TGT TTA GGG TGT GCC AG-3'	5'-AAT TTC ATA CCT TGC TTA ATG GG-3'	573
<i>IDH2</i> [11]	5'-GCT TGG GGT TCA AAT TCT GG-3'	5'-GAA AGG AAA GCC ACG AGA CAG-3'	534
<i>ASXL1</i> [12]	5'-AGG TCA GAT CAC CCA GTC AGT T-3'	5'-TAG CCC ATC TGT GAG TCC AAC TGT-3'	561
<i>ASXL1</i> [12]	5'-AGA GGA CCT GCC TTC TCT GAG AAA-3'	5'-TTC GAT GGG ATG GGT ATC CAA TGC-3'	558
<i>DNMT3A</i> [13]	5'-TCC TGC TGT GTG GTT AGA CG-3'	5'-ACA GAA AAC CCC TCT GAA AAG-3'	546

влялось компанией «Евроген» (Россия). Примеры результатов исследований на наличие мутаций в генах *IDH1* (R132), *IDH2* (R140), *ASXL1* и *DNMT3A* продемонстрированы на рис. 3.

#### Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ SPSS Statistics

v.26. Значимость различий между группами при анализе выживаемости оценивали с помощью логрангового теста. Для сравнения долей использовали критерии  $\chi^2$  Пирсона и  $\chi^2$  Пирсона с моделированием значений  $p$  методом Монте-Карло. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ . Настоящее клиническое исследование является эксплоративным.

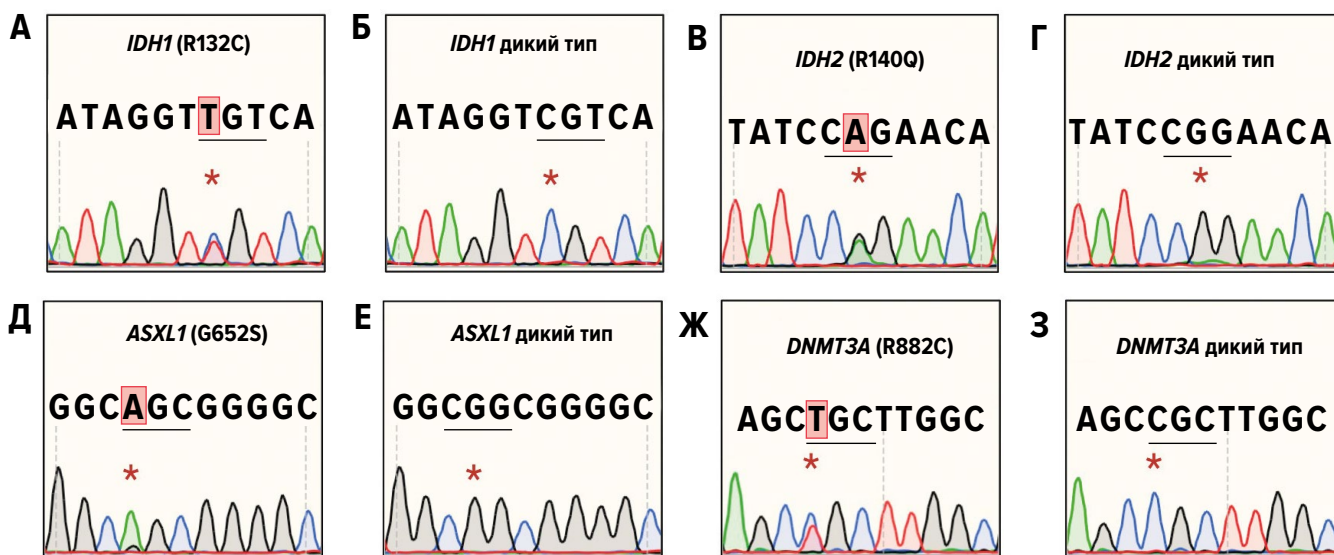


Рис. 3. Результаты секвенирования по Сэнгеру:

А — образец ДНК с мутацией R132C в гене *IDH1*; Б — образец ДНК дикого типа *IDH1*; В — образец ДНК с мутацией R140Q в гене *IDH2*; Г — образец ДНК дикого типа *IDH2*; Д — образец ДНК с мутацией G652S в гене *ASXL1*; Е — образец ДНК дикого типа *ASXL1*; Ж — образец ДНК с мутацией R882C в гене *DNMT3A*; З — образец ДНК дикого типа *DNMT3A*

Fig. 3. Sanger sequencing results:

А — DNA sample with R132C mutation in *IDH1*; Б — DNA sample with wild-type *IDH1*; В — DNA sample with R140Q mutation in *IDH2*; Г — DNA sample with wild-type *IDH2*; Д — DNA sample with G652S mutation in *ASXL1*; Е — DNA sample with wild-type *ASXL1*; Ж — DNA sample with R882C mutation in *DNMT3A*; З — DNA sample with wild-type *DNMT3A*

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Частота мутаций в генах эпигенетической регуляции

Общая частота мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *ASXL1* составила 36 % (30/83), при этом у 4 пациентов было выявлено сочетание нескольких мутаций в генах эпигенетической регуляции. Наиболее распространенной была мутация в гене *DNMT3A*, частота которой составила 16,7 % (14/83). Мутация R132 в гене *IDH1* обнаружена у 6 % (5/83) пациентов, *IDH2* (R140) — у 9,6 % (8/83) и *ASXL1* — у 6 % (5/83). Из общей когорты исследование мутационного статуса *IDH2* (R172) проведено у 29 пациентов, при этом все имели дикий тип *IDH2* (R172).

В общей когорте трансформация из предшествующего МДС или исход миелопролиферативного новообразования (МПН) в ОМЛ наблюдались у 15,65 % (13/83) пациентов. У 68,7 % (57/83) больных верифицирован первичный ОМЛ, у 15,65 % (13/83) — данные по анамнезу были недоступны. 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 ( $p > 0,05$ ).

Мутации в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132) и *ASXL1* встречались одинаково часто во всех возрастных группах ( $p > 0,05$ ). Отмечалась тенденция к выявлению мутации R140 в гене *IDH2* в более старшей возрастной категории ( $\geq 60$  лет), что было статистически значимо (28 vs 2 %;  $p = 0,004$ ). По данным ROC-анализа порогом отсечения служил возраст 60,5 года, старше которого пациенты имели бóльшую частоту мутации R140 в гене *IDH2* с высокой степенью чувствительности (87,5 %) и специфичности (70,3 %) при AUC = 0,813,

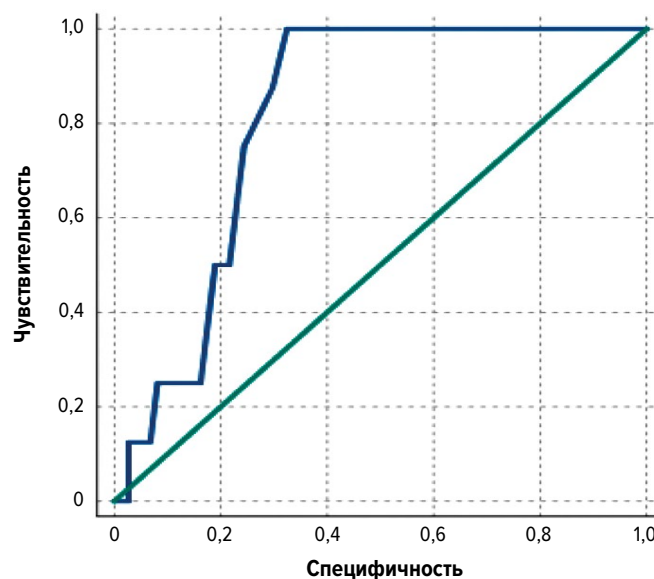
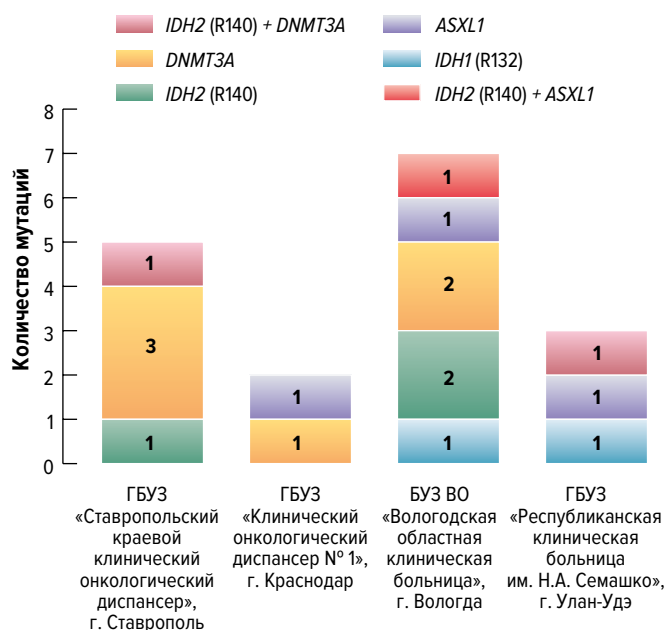


Рис. 4. ROC-кривая для модели прогнозирования наличия мутации R140 в гене *IDH2* у пациентов с ОМЛ разного возраста (AUC = 0,813)

Fig. 4. ROC curve for predictive model of R140 mutation in *IDH2* gene in AML patients of different ages (AUC = 0.813)

соответствующей очень хорошему качеству модели (рис. 4).

Оценка частоты мутаций в генах эпигенетической регуляции в отдельных субъектах РФ была проведена среди активно участвовавших в исследовании регионов, предоставивших наибольшее количество биообразцов для молекулярно-генетического анализа (Ставропольский край, Краснодарский край, Вологодская область и Республика Бурятия). Общее количе-



**Рис. 5.** Мутации в генах эпигенетической регуляции, выявленные у пациентов с ОМЛ в Ставропольском крае, Краснодарском крае, Вологодской области и Республике Бурятия

**Fig. 5.** Mutations in epigenetic regulation genes identified in AML patients in Stavropol Krai, Krasnodar Krai, Vologda Region, and Republic of Buryatia

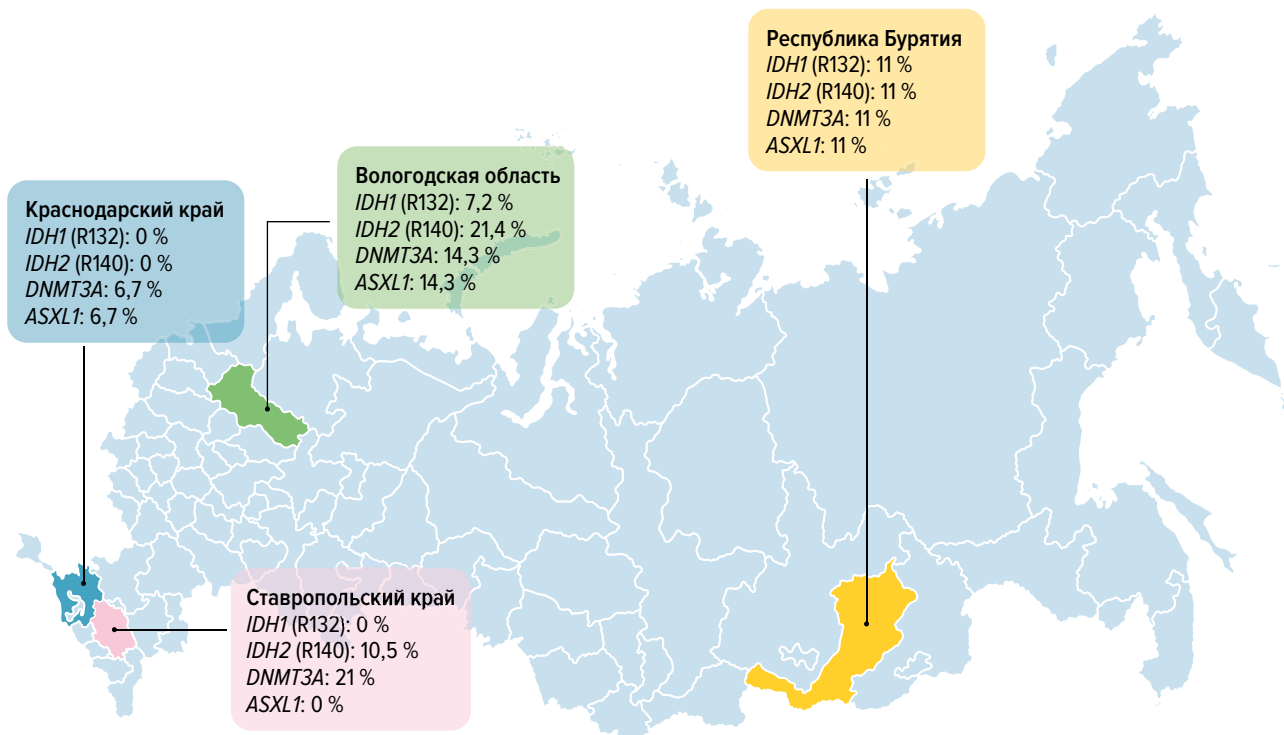
ство выявленных мутаций представлено на рис. 5. В различных регионах наблюдалась сопоставимая частота мутаций в генах эпигенетической регуляции. Мутация в гене *DNMT3A* чаще всего встречалась у пациентов Ставропольского края (21 %, 4/19), *ASXL1*

и *IDH2* (R140) — у пациентов Вологодской области (14,3 %, 2/14 и 21,4 %, 3/14 соответственно), *IDH1* (R132) — у пациентов Республики Бурятия (11 %, 1/9). Географическая иллюстрация частоты мутаций *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* и *ASXL1* представлена на рис. 6.

#### Сочетания мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140), *ASXL1* друг с другом и с иными цитогенетическими и генными aberrациями

При анализе частоты мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *ASXL1* в различных генетических группах риска статистически значимых различий не выявлено ( $p > 0,05$ ). Стандартное кариотипирование выполнено у 53 (64 %) пациентов. В данной группе удалось оценить взаимосвязь мутаций в генах эпигенетической регуляции с наличием или отсутствием хромосомных aberrаций (табл. 3). Обнаружена статистически значимая связь мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) с нормальным кариотипом (28,6 vs 4 %;  $p = 0,018$ ). Мутации в генах *DNMT3A* и *ASXL1* встречались одинаково часто у пациентов как с наличием, так и отсутствием хромосомных перестроек ( $p > 0,05$ ).

Основываясь на данных молекулярно-генетического исследования, была оценена взаимосвязь мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *ASXL1* с мутациями в генах *FLT3-ITD/TKD* и *NPM1* (табл. 4). Мутационный статус *FLT3-ITD/TKD* проанализирован у всех пациентов. Мутация *FLT3-ITD* выявлена у 21 (25,3 %) пациента, *FLT3-TKD* (D835) — у 3 (3,6 %). У 2 пациентов была комбинация мутации *FLT3-ITD* с мутацией *FLT3-TKD* (D835). Мутации в генах эпигенетической регуляции встречались одинаково



**Рис. 6.** Распространенность мутаций в генах эпигенетической регуляции у пациентов с впервые выявленным ОМЛ в Ставропольском крае, Краснодарском крае, Вологодской области и Республике Бурятия (контурная карта заимствована из <https://bongeo.ru/>)

**Fig. 6.** The incidence of mutations in epigenetic regulation genes identified in newly diagnosed AML patients in Stavropol Krai, Krasnodar Krai, Vologda Region, and Republic of Buryatia (the contour map borrowed from <https://bongeo.ru/>)



**Таблица 3.** Взаимосвязь мутаций в генах эпигенетической регуляции с данными стандартного цитогенетического исследования

Ген	Нормальный кариотип	Патологический кариотип	<i>p</i>
<b>IDH1 (R132) и IDH2 (R140)</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 9)	8 (28,6 %)	1 (4,0 %)	0,018
Дикий тип ( <i>n</i> = 44)	20 (71,4 %)	24 (96,0 %)	
<b>DNMT3A</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 12)	8 (28,6 %)	4 (16,0 %)	0,275
Дикий тип ( <i>n</i> = 41)	20 (71,4 %)	21 (84,0 %)	
<b>ASXL1</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 3)	0 (0 %)	3 (12,0 %)	0,06
Дикий тип ( <i>n</i> = 50)	28 (100 %)	22 (88,0 %)	

**Таблица 4.** Взаимосвязь мутаций в генах эпигенетической регуляции с мутациями *FLT3-ITD/TKD* и *NPM1*

Ген	<i>FLT3-ITD/TKD</i> мутантный тип	<i>FLT3-ITD/TKD</i> дикий тип	<i>p</i>
<b>IDH1 (R132) и IDH2 (R140)</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 13)	2 (7,7 %)	11 (19,3 %)	0,072
Дикий тип ( <i>n</i> = 70)	24 (92,3 %)	46 (80,7 %)	
<b>DNMT3A</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 14)	6 (23,1 %)	8 (14,0 %)	0,308
Дикий тип ( <i>n</i> = 69)	20 (76,9 %)	49 (86,0 %)	
<b>ASXL1</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 5)	0 (0 %)	5 (8,8 %)	0,12
Дикий тип ( <i>n</i> = 78)	26 (100 %)	52 (91,2 %)	
Ген	<i>NPM1</i> мутантный тип	<i>NPM1</i> дикий тип	<i>p</i>
<b>IDH1 (R132) и IDH2 (R140)</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 9)	7 (35,0 %)	2 (6,0 %)	0,007
Дикий тип ( <i>n</i> = 44)	13 (65,0 %)	31 (94,0 %)	
<b>DNMT3A</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 11)	8 (40,0 %)	3 (9,1 %)	0,008
Дикий тип ( <i>n</i> = 42)	12 (60,0 %)	30 (90,9 %)	
<b>ASXL1</b>			
Мутация ( <i>n</i> = 3)	1 (5,0 %)	2 (6,0 %)	0,872
Дикий тип ( <i>n</i> = 50)	19 (95,0 %)	31 (94,0 %)	

часто как у пациентов с наличием мутаций *FLT3-ITD/TKD*, так и при их отсутствии ( $p > 0,05$ ). Данные по мутационному статусу гена *NPM1* были доступны у 53 (63,9 %) пациентов, из которых у 37,7 % (20/53) мутация была выявлена. По сравнению с пациентами, имеющими дикий тип гена *NPM1*, в данной когорте статистически значимо чаще встречались мутации в генах *DNMT3A* (40 vs 9,1 %;  $p = 0,008$ ), *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) (35 vs 6 %;  $p = 0,007$ ).

Статистически значимой взаимосвязи мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *ASXL1* друг с другом не выявлено ( $p > 0,05$ ). Комбинация нескольких мутаций в генах эпигенетической регуляции установлена у 4 пациентов. Среди обнаруженных нами сочетаний наиболее частым оказалось одновременное присутствие мутаций в генах *DNMT3A* и *IDH2* (R140) ( $n = 3$ ). У 1 пациента обнаружена комбинация мутаций в генах *IDH2* (R140) и *ASXL1*.

### Прогностическое значение мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *ASXL1*

При оценке влияния мутаций в генах эпигенетической регуляции на прогноз в анализ включено 65 пациентов, получавших индукционную терапию стандартной («7+3»), высокой (HiDAC, FLAG ± Ida) и низкой интенсивности (монотерапия гипометилирующим агентом [ГМА], комбинация ГМА с ингибитором bcl-2 венетоклаксом, малые дозы цитарабина). С этой целью проводился анализ частоты достижения ПР, вероятности развития раннего (< 12 мес.) рецидива, общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) в общей когорте, в группе с нормальным кариотипом, с мутациями в генах *NPM1*, *FLT3-ITD* и в группе с диким типом *NPM1*, *FLT3-ITD*. Мутантный тип генов *DNMT3A*, *IDH1* (R132), *IDH2* (R140) и *ASXL1* не оказывал статистически значимого влияния на частоту достижения ПР в целом и после 1-го индукционного курса терапии, а также на вероятность развития раннего рецидива во всех исследуемых когортах ( $p > 0,05$ ).

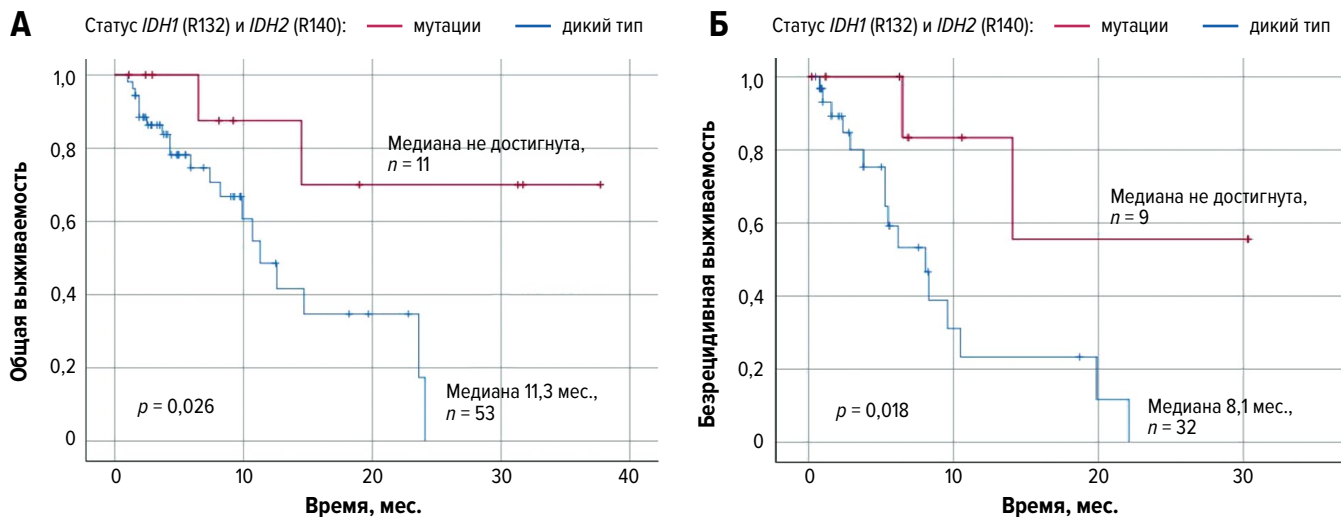
В общей когорте пациентов мутация в гене *DNMT3A* не влияла на ОВ и БРВ. Влияние мутаций в гене *ASXL1* на ОВ и БРВ в общей когорте не оценивалось ввиду малого числа пациентов с мутантным типом гена *ASXL1* и несопоставимостью выборки. Выявлено, что пациенты с наличием мутаций в генах *IDH1* и *IDH2* по сравнению с больными с диким типом генов имеют лучшие показатели как ОВ (медиана 11,3 мес. vs медиана не достигнута;  $p = 0,026$ ), так и БРВ (медиана 8,1 мес. vs медиана не достигнута;  $p = 0,018$ ) (рис. 7).

Следует отметить, что в группе пациентов с диким типом гена *NPM1* мутации в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) уже не демонстрировали своего прогностически благоприятного влияния на показатели выживаемости ( $p > 0,05$ ). Это косвенно свидетельствует о том, что улучшение показателей ОВ и БРВ связано не столько с мутационным статусом генов *IDH1* и *IDH2*, сколько с высокой частотой ассоциации этих мутаций с мутацией в гене *NPM1*, которая, как известно, имеет благоприятное прогностическое значение [3].

Хотя мутационный статус гена *DNMT3A* не влиял на прогноз в общей когорте, было продемонстрировано его отрицательное влияние на выживаемость пациентов с мутацией в гене *NPM1*. Частота неблагоприятных исходов в группе пациентов с двумя мутациями составила 40 % (2/5). Медиана времени до регистрации неблагоприятного исхода была 4,9 мес., в то время как в группе пациентов с мутацией в гене *NPM1* без мутации R882 в гене *DNMT3A* этот показатель был равен 15,8 мес. При использовании логрангового критерия различия между группами были статистически значимыми ( $p = 0,035$ ). При этом показатели БРВ у пациентов с мутациями в гене *NPM1* не зависели от мутационного статуса *DNMT3A* ( $p > 0,05$ ).

Отмечалась отрицательная тенденция влияния мутаций в гене *ASXL1* на ОВ пациентов с диким типом гена *NPM1*. У пациентов с отрицательным мутационным статусом гена *NPM1* (*FLT3-ITD*+/-) при наличии мутаций в гене *ASXL1* средний срок до регистрации неблагоприятного исхода составил 3 мес. (при общем количестве неблагоприятных исходов 2), а в случае без мутаций в гене *ASXL1* медиана времени до регистрации неблагоприятного исхода оказалась





**Рис. 7.** (А) Общая и (Б) безрецидивная выживаемость пациентов с ОМЛ (общая когорта) в группах с наличием или отсутствием мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*

**Fig. 7.** (A) Overall and (B) disease-free survivals of AML patients (total cohort) with and without *IDH1* and *IDH2* mutations

равной 14,8 мес. (при общем количестве неблагоприятных исходов 15;  $p = 0,007$ , логранговый критерий). Аналогичная тенденция обнаруживалась у пациентов с диким типом и *NPM1*, и *FLT3-ITD*. Средний срок до регистрации исхода у пациентов с мутантным типом гена *ASXL1* был равен 3 мес., а в группе с диким типом гена *ASXL1* медиана времени до регистрации неблагоприятного исхода составила 24,3 мес. (при общем количестве неблагоприятных исходов 10;  $p = 0,02$ , логранговый критерий).

#### Анализ режимов индукционной терапии

С целью оценить эффективность различных режимов индукционной терапии пациенты были разделены на две группы: первая — прошедшие лечение стандартной/высокой интенсивности (режимы «7+3», высокие дозы цитарабина), вторая — получавшие неинтенсивные режимы терапии (монотерапия малыми дозами цитарабина, ГМА). Пациенты, получавшие в качестве индукционного курса венетоклакс с ГМА, были исключены из анализа с учетом сопоставимой со стандартными режимами терапии эффективности [14, 15].

У пациентов, которым с целью индукции ремиссии назначались интенсивные режимы лечения, вероятность достижения ПР после 1-го курса была выше (62 vs 0 % при неинтенсивных режимах;  $p = 0,008$ ). Кроме того, отмечалась тенденция к улучшению показателей ОВ. Медиана времени до регистрации неблагоприятного исхода в данной когорте пациентов составила 12,6 мес. (общее количество исходов 15). В то же время в группе неинтенсивного лечения средний срок до регистрации неблагоприятного исхода был равен 4,3 мес. (общее количество исходов 3). Анализ с использованием логрангового критерия выявил статистически значимые различия между группами ( $p = 0,01$ ).

Мутации в генах эпигенетической регуляции не оказывали влияния на вероятность достижения ПР, на показатели ОВ и БРВ пациентов в разных группах

лечения. Кроме того, выбор режима индукционной терапии не влиял на прогноз у пациентов с мутациями в генах эпигенетической регуляции ( $p > 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Подобно другим злокачественным новообразованиям, в основе клональной пролиферации и неопластических изменений при ОМЛ лежит множество приобретенных мутаций, приводящих к нарушению функций ключевых генов дифференцировки клеток. Секвенирование генома опухолевых клеток при ОМЛ позволило определить ряд генов, регулирующих эпигенетические модификации, которые контролируют метилирование ДНК (такие, как *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) и посттрансляционную модификацию гистонов (такие, как *EZH2*, *ASXL1*, *H3F3A*). В работе проанализированы частота и влияние на такие показатели прогноза, как вероятность достижения ПР, развития раннего рецидива, ОВ и БРВ, мутаций в генах эпигенетической регуляции *IDH1*, *IDH2*, *DNMT3A* и *ASXL1* как в изолированном варианте, так и в различных комбинациях с другими известными хромосомными и генными нарушениями.

Мутации в генах *IDH1* и *IDH2* при ОМЛ встречаются со средней частотой 20 % и приводят к нарушению нормальной ферментативной активности цитозольной и митохондриальной форм изоцитратдегидрогеназ, накоплению онкометаболита 2-гидроксиглутарата (2-HG) [16]. В дальнейшем 2-HG вызывает ингибирование диоксигеназ, включая ферменты семейства ТЕТ и гистон-лизин-деметилазы (KDM), в результате чего происходит нарушение эпигенетической регуляции со сдвигом в сторону гиперметилирования ДНК и гистонов с последующим нарушением клеточной дифференцировки [17]. Общая частота выявления мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) в нашем исследовании составила 15,6 %. Среди характерных клинико-гематологических характеристик,

связанных с высокой частотой мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*, выделяют более старший возраст (медиана 67 лет, по сравнению с 61 годом в группе пациентов с диким типом *IDH1/2*), тенденцию к высокому уровню тромбоцитов и бластных клеток, а также частую нейтропению в дебюте заболевания [16, 18, 19]. Мы обнаружили, что мутация R140 в гене *IDH2* статистически значимо чаще встречается в возрастной категории старше 60 лет. Взаимосвязь с пожилым возрастом была также подтверждена методом ROC-анализа с порогом отсечения 60,5 года. Кроме того, известно, что мутации в генах *IDH1/2* более часто встречаются в группе промежуточного цитогенетического риска, с трисомией хромосомы 8 и у пациентов с нормальным кариотипом [16, 20]. В нашем исследовании не было выявлено связи мутационного статуса генов *IDH1/2* с цитогенетическими группами риска. Однако в группе пациентов с нормальным кариотипом мутации в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) встречались статистически значимо чаще.

Что касается сочетаний мутаций в генах *IDH1/2* с другими хромосомными и молекулярными альтерациями, в нашей работе продемонстрировано одновременное выявление мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) с мутантным типом *NPM1*. Эти результаты согласуются с данными других исследователей [16, 18–22]. Тем не менее описанной в ряде работ взаимосвязи с мутациями *FLT3-ITD* и *DNMT3A* [18, 19] мы не обнаружили, что, вероятно, обусловлено небольшим числом пациентов, включенных в исследование.

Прогностическое значение рассматриваемых мутаций все еще остается спорным. К настоящему времени имеются данные, демонстрирующие ухудшение показателей ОБ у пациентов с мутантным типом *IDH1/2* в группе промежуточного цитогенетического риска [23]. В других исследованиях отмечается худший прогноз у пациентов с мутацией в гене *IDH1*, в то время как мутационный статус *IDH2* или улучшал показатели ОБ, или не имел никакого прогностического значения [24, 25]. В нашем исследовании продемонстрировано улучшение показателей ОБ и БРВ в группе пациентов с мутантным статусом генов *IDH1/2*. Однако такое влияние отсутствовало в когорте пациентов без мутаций в гене *NPM1*. С учетом высокой степени корреляции мутаций в генах *IDH1* (R132) и *IDH2* (R140) с мутацией *NPM1*, которая, как известно, связана с благоприятным прогнозом [3, 5], заключить о независимом влиянии мутационного статуса *IDH1/2* на ОБ и БРВ не представляется возможным.

В результате мутации R882H в гене *DNMT3A* происходит нарушение образования гомотетрамеров ДНК-метилтрансферазы 3А дикого типа, что приводит к aberrантному метилированию и, как следствие, изменению экспрессии генов, участвующих в ключевых сигнальных путях, включая апоптоз и самообновление гемопоэтических стволовых клеток [26]. Мутация *DNMT3A* обнаруживается в 19,7–26,0 % случаев ОМЛ, при этом частота возрастает в группе пациентов с нормальным кариотипом, связана с мутациями в генах *NPM1*, *FLT3-ITD* и с возрастом [2, 27–31]. В настоящем исследовании продемонстрирована сопоставимая распространенность мутаций в гене *DNMT3A* в группе с впервые выявленным ОМЛ. Анало-

гично с имеющимися литературными данными была выявлена статистически значимая связь с мутацией *NPM1*. Отсутствие корреляции с мутацией *FLT3-ITD*, нормальным кариотипом и более старшим возрастом, вероятнее всего, также обусловлено необходимостью увеличения выборки исследуемых пациентов.

Влияние мутации в гене *DNMT3A* на долгосрочный прогноз у пациентов с ОМЛ изучалось различными исследовательскими группами. В исследовании D.J. Park и соавт. продемонстрированы худшие показатели ОБ и бессобытийной выживаемости (БСВ) как в общей когорте пациентов, так и в группе с нормальным кариотипом [27]. В работе F. Ostronoff и соавт. продемонстрировано ухудшение показателей БСВ в группе с мутантным типом *DNMT3A*, без влияния на ОБ и БРВ [30]. В нескольких других исследованиях показано отсутствие каких-либо различий в прогнозе для пациентов с мутацией *DNMT3A* [31, 32]. В нашей работе были получены аналогичные результаты. Мы не выявили статистически значимых различий в частоте достижения ПР, развития раннего рецидива, а также в показателях ОБ и БРВ в общей группе пациентов в зависимости от мутационного статуса гена *DNMT3A*. Тем не менее мы обнаружили негативное влияние мутации *DNMT3A* на показатели ОБ в группе пациентов с сопутствующей мутацией *NPM1*. Выводы о неблагоприятном значении одновременного выявления мутаций в генах *DNMT3A* и *NPM1* были сформулированы в нескольких более ранних исследованиях. R. Kihara и соавт. выявили неблагоприятное прогностическое влияние мутации *DNMT3A* в группе пациентов с нормальным кариотипом и сопутствующими мутациями *NPM1* или *CEBPA* без мутации *FLT3-ITD* [33]. J.B. Dunlap и соавт. в своем исследовании продемонстрировали, что группа пациентов с тройным мутационным статусом (*NPM1* + *DNMT3A* + *IDH1/2*) имеет худшие показатели ОБ [34]. Таким образом, нами были получены данные, сопоставимые с имеющимися в литературе.

Белок, кодируемый геном *ASXL1*, участвует в процессах посттрансляционной модификации гистонов (таких, как H3K27me3, H2AK119Ub и H3K4me3). Белок *ASXL1* регулирует эпигенетические процессы посредством взаимодействия с белками комплекса Polycomb, различными активаторами и супрессорами транскрипции [35]. Воздействие на H2AK119Ub приводит к ингибированию его генов-мишеней, включая гены *HOXA* и *IRF8*, и, как следствие, к лейкозной трансформации в связи с нарушениями дифференцировки миелоидных клеток [36]. Общая частота мутаций в гене *ASXL1* в нашем исследовании совпадает с имеющимися в литературе данными [7] и составляет 6 % в общей когорте пациентов. Мутация в гене *ASXL1* часто сочетается с мутациями в генах, кодирующих факторы сплайсинга (*SRSF2*, *U2AF1*), сигнальной трансдукции (*NRAS*, *JAK2*, *NF1*) и транскрипции (*RUNX1*) [37]. Кроме того, известна ассоциация мутации в гене *ASXL1* с мутацией в гене *IDH2* [24]. В нашем исследовании взаимосвязи мутации в гене *ASXL1* с другими генетическими aberrациями не выявлено, вероятнее всего, ввиду малого числа пациентов с мутантным типом *ASXL1*.

В настоящее время установлено, что мутация в гене *ASXL1* ассоциируется с плохим прогнозом у пациентов с ОМЛ, в связи с чем она была включена в

стратификацию цитогенетического риска [3, 38]. В настоящей работе мы подтвердили негативное влияние мутационного статуса гена *ASXL1* на показатели ОБ в группе пациентов с отсутствием мутации *NPM1*.

Изучение мутаций в генах эпигенетической регуляции также представляет интерес в качестве поиска потенциальных мишеней ввиду активного развития таргетной эпигенетической терапии. ГМА (5-азацитидин и децитабин) в настоящее время широко применяются в терапии ОМЛ [3, 5, 39, 40]. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) одобрило таргетные ингибиторы для приема внутрь энасидениб (AG-221, Agios Pharmaceuticals, Inc.) при наличии мутаций в гене *IDH2* и ивосидениб (AG-120, Celgene) — в гене *IDH1* в августе 2017 г. и июле 2018 г. соответственно [41]. Национальная всеобщая онкологическая сеть США (NCCN) рекомендует их применение при рецидивах и рефрактерном течении ОМЛ, а также в терапии первой линии у пациентов, не являющихся кандидатами на проведение интенсивной полихимиотерапии [40]. Что касается стандартных режимов терапии ОМЛ, мы не выявили различий в ОБ и БРВ среди пациентов с мутациями в генах эпигенетической регуляции при использовании интенсивных или неинтенсивных вариантов индукционной полихимиотерапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мутации в генах эпигенетической регуляции распространены при ОМЛ и нередко сочетаются с другими хромосомными и молекулярными нарушениями. Несомненным является взаимодополнение генетических изменений и эпигенетических событий, ведущее к формированию злокачественного опухолевого фенотипа.

В нашей работе подтверждена высокая частота выявления мутаций в генах эпигенетической регуляции при ОМЛ, связь мутаций в генах *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* с мутацией *NPM1*, мутаций *IDH1/2* с нормальным кариотипом. Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствующие о неблагоприятном влиянии на прогноз мутантного типа *DNMT3A* при наличии мутаций в гене *NPM1*, а также мутаций в гене *ASXL1*, подчеркивают важность и обоснованность их определения в рамках первичного обследования пациентов с ОМЛ.

Тем не менее вопрос о прогностическом значении мутаций в генах *IDH1/2* и *DNMT3A* в изолированном варианте и в сочетании с другими генетическими aberrациями все еще остается актуальной проблемой. Для получения ответа на вопрос об оптимальной тактике ведения пациентов из промежуточной группы генетического риска с мутантным типом этих генов необходимо продолжать подобные исследования. Изучение эпигенетического ландшафта открывает потенциальные перспективы к усовершенствованию текущей прогностической панели и идентификации новых мишеней для таргетного воздействия.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках наблюдательного неинтервенционного проспективного межрегионального исследования № Z-0419 «Скрининг мутаций *IDH1/IDH2* и сопутствующих мутаций у пациентов с впервые диагностированным острым миелобластным лейкозом» при финансовой поддержке компании Celgene.

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** А.А. Шатилова, Л.Л. Гиршова, Е.Г. Ломаиа.

**Сбор данных:** А.А. Шатилова, И.Г. Будаева, Л.В. Анчукова, Ю.С. Нередько, С.Ю. Тяско, О.Е. Очирова, А.Г. Карпова, Э.Р. Васильева, О.Д. Сердюк, Д.А. Яскульский, Д.В. Букин.

**Анализ и интерпретация данных:** А.А. Шатилова, Л.Л. Гиршова, Ю.Д. Матвиенко.

**Подготовка рукописи:** А.А. Шатилова, А.Е. Ершова.

**Проведение и предоставление результатов исследований:** Ю.В. Миролюбова, К.В. Богданов, Т.С. Никулина, А.В. Петухов, С.А. Силонов, А.Е. Ершова.

**Окончательное одобрение рукописи:** Л.Л. Гиршова, Е.Г. Ломаиа.

**Административная поддержка:** Ю.А. Алексева.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441. doi: 10.1038/bcj.2016.50.
- Cancer Genome Atlas Research Network; Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059–74. doi: 10.1056/NEJMoa1301689.
- 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.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*. 2002;100(13):4325–36. doi: 10.1182/blood-2002-03-0772.
- Острые миелоидные лейкозы. Клинические рекомендации. Под ред. А.Д. Каприна. М.: Ассоциация онкологов России, 2020. [AD Kaprin, ed. Ostrye mieloidnye leukozy. Klinicheskie rekomendatsii. (Acute myeloid leukemias. Clinical guidelines.) Moscow: Assotsiatsiya Onkologov Rossii Publ.; 2020. (In Russ)]
- Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2011;4:36. doi: 10.1186/1756-8722-4-36.
- Kishtagari A, Levine RL. The Role of Somatic Mutations in Acute Myeloid Leukemia Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2021;11(4):a034975. doi: 10.1101/cshperspect.a034975.
- Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009;113(6):1315–25. doi: 10.1182/blood-2008-06-163246.
- Зайкова Е.К., Белоцерковская Е.В., Зайцев Д.В. и др. Молекулярная диагностика мутаций гена *FLT3* у пациентов с острыми миелоидными лейкозами. *Клиническая онкогематология*. 2020;13(2):150–60. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-150-160. [Zaikova EK, Belotserkovskaya EV, Zaytsev DV, et al. Molecular Diagnosis of FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clinical oncohematology*. 2020;13(2):150–60. doi: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-150-160. (In Russ)]
- Whitehall VL, 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.
- Berenshtein 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: 10.1186/1756-9966-33-4.
- 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.

13. 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.
14. Maiti A, Qiao W, Sasaki K, et al. Venetoclax with decitabine vs intensive chemotherapy in acute myeloid leukemia: A propensity score matched analysis stratified by risk of treatment-related mortality. *Am J Hematol*. 2021;96(3):282–91. doi: 10.1002/ajh.26061.
15. Cherry EM, Abbott D, Amaya M, et al. Venetoclax and azacitidine compared with induction chemotherapy for newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. 2021;5(24):5565–73. doi: 10.1182/bloodadvances.2021005538.
16. Montalban-Bravo G, DiNardo CD. The role of IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Future Oncol*. 2018;14(10):979–93. doi: 10.2217/fon-2017-0523.
17. Kishitagari A, Levine RL. The Role of Somatic Mutations in Acute Myeloid Leukemia Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2021;11(4):a034975. doi: 10.1101/cshperspect.a034975.
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):732–36. doi: 10.1002/ajh.24072.
19. Zarnegar-Lumley S, Alonzo TA, Othus M, et al. Characteristics and prognostic effects of IDH mutations across the age spectrum in AML: a collaborative analysis from COG, SWOG, and ECOG. *Blood*. 2020;136(Suppl 1):31–2. doi: 10.1182/blood-2020-134211.
20. Aref S, Kamel Areida el S, Abdel Aaal MF, et al. Prevalence and Clinical Effect of IDH1 and IDH2 Mutations Among Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015;15(9):550–5. doi: 10.1016/j.clml.2015.05.009.
21. Marcucci G, Mahary K, Wu YZ, 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.
22. 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. doi: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21.
- [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. doi: 10.21320/2500-2139-2021-14-1-13-21. (In Russ)]
23. ElNahass YH, Badawy RH, ElRefaey FA, et al. IDH Mutations in AML Patients; A higher Association with Intermediate Risk Cytogenetics. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(3):721–5. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.3.721.
24. 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.
25. 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.
26. Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. *Semin Hematol*. 2019;56(2):84–9. doi: 10.1053/j.seminhematol.2018.08.001.
27. Park DJ, Kwon A, Cho BS, et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *Blood Res*. 2020;55(1):17–26. doi: 10.5045/br.2020.55.17.
28. 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.
29. Wang M, Yang C, Zhang L, Schaar DG. Molecular Mutations and Their Cooccurrences in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6962379. doi: 10.1155/2017/6962379.
30. Ostronoff F, Othus M, Ho PA, et al. Mutations in the DNMT3A exon 23 independently predict poor outcome in older patients with acute myeloid leukemia: a SWOG report. *Leukemia*. 2013;27(1):238–41. doi: 10.1038/leu.2012.168.
31. 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.
32. Roller A, Grossmann V, Bacher U, et al. Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. 2013;27(7):1573–8. doi: 10.1038/leu.2013.65.
33. Kihara R, Nagata Y, Kiyoi H, et al. Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2014;28(8):1586–95. doi: 10.1038/leu.2014.55.
34. 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.
35. 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.
36. Asada S, Fujino T, Goyama S, Kitamura T. 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.
37. 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.
38. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012;97(3):388–92. doi: 10.3324/haematol.2011.051532.
39. Bohl SR, Bullinger L, Rucker FG. Epigenetic therapy: azacitidine and decitabine in acute myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2018;11(5):361–71. doi: 10.1080/17474086.2018.1453802.
40. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Acute Myeloid Leukemia*. Version 1.2022. (Internet) Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/aml\\_blocks.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/aml_blocks.pdf). (accessed 20.05.2022).
41. Carter JL, Hege K, Yang J, et al. Targeting multiple signaling pathways: the new approach to acute myeloid leukemia therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):288. doi: 10.1038/s41392-020-00361-x.