

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-150-163>

Результаты определения соматических мутаций в различных генах у больных хроническим миелолейкозом

Е.А. Кузьмина¹, Е.Ю. Челышева¹, Б.В. Бидерман¹, О.А. Шухов¹, Е.А. Степанова¹, Э.П. Гаджиева², А.Н. Петрова¹, И.С. Немченко¹, А.В. Быкова¹, М.А. Гурьянова¹, А.В. Кохно¹, А.Г. Туркина¹, А.Б. Судариков¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Елена Андреевна Кузьмина 1110ekuzmina@gmail.com

Введение. Соматические мутации в различных генах у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) рассматриваются как возможные факторы неудачи терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК), поэтому изучение их особенностей представляет интерес.

Цель исследования – оценить молекулярно-генетический профиль клеток крови у больных ХМЛ, используя метод высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Ретроспективное исследование проводилось в 2 группах пациентов: группа 1 с неудачей терапии ИТК ($n = 29$) и группа 2 с оптимальным ответом на лечение ИТК ($n = 29$). Таргетная панель для высокопроизводительного секвенирования включала 19 генов: *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF2*, *KIT*, *WT1*, *CEBPA*, *ZRSR2*, *JAK2*, *GATA2*, *ABL1*. Для оценки динамики клонов исследовали дополнительные биообразцы в ретроспективной точке, в наиболее приближенное к этапу первичной диагностики ХМЛ время.

Результаты. В группе 1 у 19/29 (66 %) пациентов выявлены мутации в 8 генах (включая *ABL1*). Исключая *ABL1*, мутации обнаружены у 15 (52 %) пациентов. У 9 (31 %) пациентов выявлялось >1 мутации (от 2 до 4). Частота встречаемости мутаций в генах в группе 1: *ABL1* – у 11 (38 %) пациентов, *ASXL1* – у 9 (31 %), *DNMT3A* – у 3 (10 %), *RUNX1*, *CEBPA* – по 2 (7 %) пациента, *WT1*, *NPM1*, *TET2* – по 1 (3,5 %) пациенту. У 7 (24 %) пациентов встречалось сочетание мутаций в гене *ABL1* и в другом гене; наиболее частое сочетание мутаций в генах: *ABL1* + *ASXL1* – у 4 (14 %) пациентов. Динамика мутантных клонов в группе 1 оценена у 21/29 (72 %) пациентов. У 10/21 (48 %) больных соматические мутации в генах появлялись на фоне лечения ХМЛ, у 14/21 (67 %) ранее выявленные мутации сохранялись, у 1 (5 %) отмечено исчезновение мутации. В группе 2 соматические мутации выявлены у 2/29 (7 %) пациентов: в генах *DNMT3A* (аллельная нагрузка клона (Variant Allele Frequency, VAF) 5 %) и *TP53* (VAF 9 %) на этапе диагностики ХМЛ эти мутации не выявлялись. У 1 пациента мутация в гене *ASXL1* (VAF 5 %) выявлена только в ретроспективной точке, на этапе диагностики, и не определялась в последующем, при оптимальном ответе на терапию.

Заключение. Наличие соматических мутаций ассоциировано с резистентным течением ХМЛ: соматические мутации в различных генах, помимо *ABL1*, чаще встречались у больных ХМЛ с неудачей терапии ИТК, чем у больных с оптимальным ответом: 52 % против 7 % ($p \leq 0,05$). Наиболее часто выявлялись мутации в генах *ASXL1* (31 %) и *DNMT3A* (10 %). Частота сочетания мутаций *ABL1* и *ASXL1* составила 14 %. При наблюдении в динамике соматические мутации преимущественно персистировали или появлялись со временем у больных ХМЛ с резистентностью к терапии ИТК.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, соматическая мутация, резистентность, неудача терапии, высокопроизводительное секвенирование

Для цитирования: Кузьмина Е.А., Челышева Е.Ю., Бидерман Б.В. и др. Результаты определения соматических мутаций в различных генах у больных хроническим миелолейкозом. Онкогематология 2024;19(4):150–63.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-150-163>

Results of various somatic mutations detection in patients with chronic myeloid leukemia

E.A. Kuzmina¹, E. Yu. Chelysheva¹, B. V. Biderman¹, O. A. Shukhov¹, E. A. Stepanova¹, E. P. Gadzhieva², A. N. Petrova¹, I. S. Nemchenko¹, A. V. Bykova¹, M. A. Guryanova¹, A. V. Kokhno¹, A. G. Turkina¹, A. B. Sudarikov¹

¹National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

²Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia

Contacts: Elena Andreevna Kuzmina 1110ekuzmina@gmail.com

Background. Somatic mutations in chronic myeloid leukemia (CML) patients are considered as possible factors for the failure of tyrosine kinase inhibitor (TKI) therapy, and the study of their characteristics is of interest.

Aim. To evaluate the genetic profile of blood cells in CML patients using next-generation sequencing.

Materials and methods. Retrospective study was conducted in two groups of patients: group 1 with TKI therapy failure ($n = 29$) and group 2 with optimal response to TKI therapy ($n = 29$). The target panel for next-generation sequencing included 19 genes: *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF2*, *KIT*, *WT1*, *CEBPA*, *ZRSR2*, *JAK2*, *GATA2*, *ABL1*. In order to assess clonal evolution, additional samples were examined at a retrospective point in time closest to the primary CML diagnosis.

Results. In group 1, mutations in 8 genes (including *ABL1*) were identified in 19/29 (66 %) patients. Excluding *ABL1*, mutations were identified in 15 (52 %) patients. In 9 (31 %) patients, >1 mutation (2 to 4) was detected. Frequency of genes mutations in group 1: *ABL1* in 11 (38 %) patients, *ASXL1* in 9 (31 %) patients, *DNMT3A* in 3 (10 %) patients, *RUNX1*, *CEBPA* in 2 patients (7 %), *WT1*, *NPM1*, *TET2* in 1 patient (3.5 %). In 7 (24 %) patients there was a combination of mutations in *ABL1* gene and in another gene; the most frequent combination of mutations in genes: *ABL1* + *ASXL1* – in 4 patients (14 %). The dynamics of mutant clones in group 1 was evaluated in 21/29 (72 %) patients. In 10/21 (48 %) patients somatic mutations in genes appeared during CML treatment, in 14/21 (67 %) patients previously detected mutations persisted, in 1 (5 %) the mutation disappeared. In group 2, somatic mutations were detected in 2/29 (7 %) patients: in *DNMT3A* (Variant Allele Frequency (VAF) 5 %) and *TP53* (VAF 9 %) genes – these mutations were not detected at the diagnosis of CML. In one patient *ASXL1* mutation (VAF 5 %) was detected only at diagnosis, and was not detected subsequently with optimal response to therapy.

Conclusion. The presence of somatic gene mutations is associated with a resistant CML course: somatic mutations in genes other than *ABL1* were more common in CML patients with TKI therapy failure than in those with optimal response: 52 % vs. 7 % ($p \leq 0.05$). Mutations in *ASXL1* (31 %) and *DNMT3A* (10 %) were the most frequently detected. The frequency of *ABL1* and *ASXL1* mutations combination amounted to 14 %. During follow-up, somatic mutations predominantly persisted or appeared over time in CML patients with TKI therapy resistance.

Keywords: chronic myeloid leukemia, somatic mutation, resistance, therapy failure, next-generation sequencing

For citation: Kuzmina E.A., Chelysheva E.Yu., Biderman B.V. et al. Results of various somatic mutations detection in patients with chronic myeloid leukemia. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2024;19(4):150–63. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2024-19-4-150-163>

Введение

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) развивается в результате появления филадельфийской (Ph) хромосомы и слитного гена *BCR::ABL1*. Образующийся при этом онкопротеин обладает аномальной тирозинкиназной активностью, которая приводит к гиперплазии миелоидной ткани в относительно благоприятной хронической фазе (ХФ) заболевания. Дополнительные генетические аномалии могут приводить к трансформации в острую фазу — бластный криз (БК), который неизбежно наступает при отсутствии лечения [1, 2]. Терапия ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) позволяет достичь оптимального ответа у большинства пациентов и предотвратить неблагоприятный исход. Однако у 10–20 % пациентов возникает устойчивость к терапии ИТК, что стимулирует поиск новых терапевтических опций и изучение возможных причин неудачи терапии [3–6]. Наиболее известной причиной устойчивости к терапии ИТК является появление точечных мутаций в гене *BCR::ABL1*, которые выявляются при резистентности у 30 % больных с ХФ и 60 % больных в фазе акселерации (ФА) или БК [7, 8]. Чувствительность мутантной тирозинкиназы к разным препаратам определяет выбор конкретного ИТК [9, 10]. Кроме того, дополнительные хромосомные aberrации (ДХА) являются маркером неблагоприятного прогноза [11, 12].

Мониторинг молекулярных и цитогенетических маркеров позволяет своевременно констатировать неудачу терапии и выбрать оптимальную тактику лечения.

Использование метода высокопроизводительного секвенирования (ВПС) позволило обнаружить гетерогенность молекулярно-генетического профиля клеток крови у больных ХМЛ. Отмечено, что у них выявляются мутации тех же генов, которые встречаются при других миелоидных/лимфоидных новообразованиях [13]. Некоторые из мутаций также характерны для клонального кроветворения неясного потенциала [14]. По данным метаанализа разных исследований, соматические мутации генов определялись приблизительно у 15–25 % пациентов с ХМЛ на этапе первичной диагностики, что в некоторых случаях было ассоциировано с развитием неудачи терапии ИТК [15]. Наиболее часто при диагностике ХМЛ в ХФ встречались мутации в гене *ASXL1* с частотой примерно 9 %, также относительно часто обнаруживались делеции экзонов *IKZF1*, мутации в генах *RUNX1*, *SETD1B*, *DNMT3A*, *TET2* [13]. Некоторые авторы продемонстрировали, что у больных с наличием соматических мутаций в генах (в частности, *ASXL1*) статистически значимо чаще отмечалась неудача терапии иматинибом, в то же время терапия ИТК 2-го поколения в 1-й линии оказывалась эффективной [16].

Показано, что намного чаще соматические мутации встречаются у больных ХМЛ в продвинутых фазах заболевания, чем в ХФ [13, 17]. Так, у 95 % больных ХМЛ в БК при анализе экзона и транскриптома клеток крови выявлены те или иные генетические аномалии [18]. Наиболее часто у больных в ФА и БК встречались мутации в генах *RUNX1* (18 %), *ASXL1* (15 %), *IKZF1* (делеции экзонов; 16 %), *BCORL1* (8,6 %), *GATA2* (8,4 %) [13]. При этом в некоторых работах частота встречаемости соматических мутаций в других генах была сопоставима или выше частоты встречаемости мутаций киназного домена *BCR::ABL1*. Продемонстрированы различия в спектре выявляемых соматических мутаций генов у больных с разными фенотипами БК. Например, у больных с миелоидным БК чаще выявлялись мутации *ASXL1*, *WT1* и *GATA2*, а у пациентов с лимфоидным БК — делеции экзонов *IKZF1* [18–21].

Динамику клонов с соматическими мутациями у больных ХМЛ на фоне лечения ИТК изучали лишь в немногих работах. При этом было отмечено, что со временем спектр мутаций и аллельная нагрузка мутантных клонов могут претерпевать значительные изменения. При элиминации опухолевого клона на фоне терапии соматические мутации в генах могли также исчезать, в других случаях они персистировали и аллельная нагрузка клона (Variant Allele Frequency, VAF) становилась выше. На основании этих данных высказаны предположения о возможном нахождении дополнительных мутаций в Ph-положительном или Ph-отрицательном клоне [22, 23]. Также было отмечено, что клональная эволюция происходит при неудаче терапии ИТК и персистировании опухолевого клона [19]. В некоторых работах описано, что появление новых соматических мутаций — делеций экзонов *IKZF1*, мутаций в генах *RUNX1*, *ASXL1*, *BCORL1*, *IDH1* и др. — ассоциировалось с прогрессированием заболевания в БК [18].

Предполагается, что при сочетании мутаций *BCR::ABL1* с соматическими мутациями в других генах чувствительность опухолевых клеток к действию препаратов ИТК может изменяться [15, 24]. Кроме этого, по накопленным на настоящий момент в литературе данным представляется вероятным, что число выявленных мутаций может быть связано с устойчивостью к терапии: чем больше мутаций у больного, тем выше риск неудачи терапии. Более подробное изучение роли соматических мутаций в различных генах могло бы улучшить понимание биологических аспектов резистентности и факторов риска неудачи терапии у больных ХМЛ.

Цель исследования — оценить связь наличия соматических мутаций в генах *ASXL1*, *DNMT3A*, *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *TET2*, *TP53*, *U2AF2*, *KIT*, *WT1*, *CEBPA*, *ZRSR2*, *JAK2*, *GATA2*, *ABL1* с неудачей терапии ИТК у больных ХМЛ.

Задачи исследования:

1) определить спектр мутаций в генах и сравнить частоту их встречаемости в группах больных ХМЛ

с неудачей терапии ИТК и больных ХМЛ с оптимальным ответом, используя метод ВПС;

2) оценить изменение мутационного статуса в динамике у больных ХМЛ.

Материалы и методы

Дизайн исследования и критерии включения больных в группы

Общий дизайн исследования представлен на рис. 1. В исследование по типу «случай — контроль» были включены 2 группы больных.

Группа 1 («случай», неудача терапии; $n = 29$) представлена больными ХМЛ в ХФ с неудачей терапии ≥ 2 ИТК согласно критериям ELN 2013 (кроме критериев непереносимости препаратов) и больными с прогрессированием в ФА/БК на любой линии терапии.

Группа 2 («контроль», оптимальный ответ; $n = 29$) — пациенты с ХМЛ в ХФ, у которых ранее достигнут и сохранялся более 1 года глубокий молекулярный ответ МО4,5 ($BCR::ABL1 \leq 0,0032$ %), в том числе пациенты с попыткой отмены терапии.

Отбор больных в группы проводился из когорты проспективно наблюдаемых в НМИЦ гематологии пациентов ($n = 214$): 146 пациентов наблюдались от момента установления диагноза ХМЛ ХФ и получали лечение в соответствии с клиническими рекомендациями с 2013 по 2023 г.; в группу 1 также включались пациенты из числа 68 участников программы управляемого доступа по обеспечению препаратом асциминбом MAP (Managed Access Program) [25, 26].

Для оценки спектра и частоты встречаемости мутаций в основной точке анализа использовали последний доступный биообразец из биобанка на момент соответствия пациентов критериям включения в группы. В основной точке исследования ВПС выполнили всем больным групп 1 и 2. Для оценки динамики клонов части больных проводили ВПС в дополнительной ретроспективной точке, для которой брали биообразец, полученный на этапе первичной диагностики, или, при отсутствии диагностического образца, в наиболее приближенное к диагностике время, но на временном расстоянии не менее 1 года от основной точки. Образцы в ретроспективной точке были доступны для 21 из 29 больных группы 1 и для 14 из 29 больных группы 2.

Группы пациентов

Характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в табл. 1. В группу 2, «контроль», пациенты подбирались по методу подбора пар к «случаям» по параметрам пола, возраста и длительности лечения до анализа. Группы пациентов различались по ключевым характеристикам ответа на терапию на момент проведения молекулярно-генетического исследования в основной точке.

Больные группы 1 имели различные признаки резистентности. В ФА/БК находились 11 (38 %) больных.

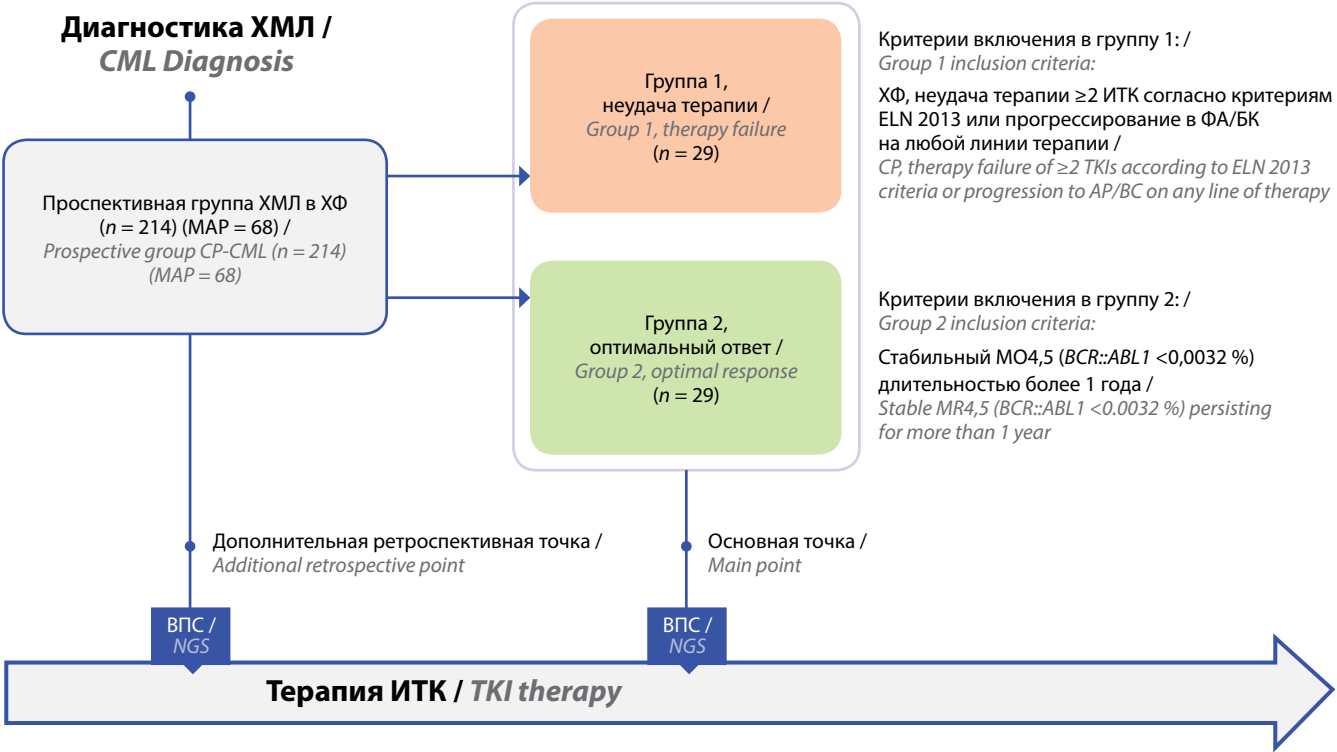


Рис. 1. Дизайн исследования. ХМЛ — хронический миелоидный лейкоз; ХФ — хроническая фаза; ФА — фаза акселерации; БК — бластный криз; МО4,5 — молекулярный ответ 4,5; ВПС — высокопроизводительное секвенирование; MAP — Managed Access Program; ИТК — ингибиторы тирозинкиназ
Fig. 1. Study design. CML — chronic myeloid leukemia; CP — chronic phase; AP — acceleration phase; BC — blast crisis; MR4,5 — molecular response 4,5; NGS — next generation sequencing; MAP — Managed Access Program; TKI — tyrosine kinase inhibitors

Таблица 1. Демографические и клиничко-лабораторные характеристики больных групп 1 и 2
Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of patients from group 1 and group 2

Показатель Parameter	Группа 1, неудача терапии (n = 29) Group 1, therapy failure (n = 29)	Группа 2, оптимальный ответ (n = 29) Group 2, optimal response (n = 29)	p
Пол, n (%): Gender, n (%): женский female мужской male	14 (48) 15 (52)	14 (48) 15 (52)	>0,05
Возраст на момент установления диагноза ХМЛ, Ме (мин–макс), лет Age at CML diagnosis, Me (min–max), years	46 (26–79)	47 (25–76)	>0,05
Длительность ХМЛ до анализа в основной точке, Ме (мин–макс), лет CML duration at the main point, Me (min–max), years	4,7 (0,6–22,3)	4,7 (1,1–9,6)	>0,05
Риск по ELTS, n (%): ELTS risk group, n (%): низкий low промежуточный intermediate высокий high нет данных no data	11 (38) 11 (38) 3 (10) 4 (14)	27 (93) 2 (7) 0 0	<0,001

Окончание табл. 1
End of table 1

Показатель Parameter	Группа 1, неудача терапии (n = 29) Group 1, therapy failure (n = 29)	Группа 2, оптимальный ответ (n = 29) Group 2, optimal response (n = 29)	p
Фаза на момент анализа в основной точке, n (%): CML phase at the time of main point analysis, n (%): хроническая фаза chronic phase фаза акселерации accelerated phase бластный криз blast crisis	18 (62) 6 (21) 5 (17)	29 (100) 0 0	0,002
Наилучший молекулярный ответ на предыдущих линиях терапии, n (%): Best molecular response on previous therapy line, n (%): BCR::ABL1 <1 % BCR::ABL1 ≥1 – <10 % BCR::ABL1 ≥10 %	13 (45) 4 (14) 12 (41)	29 (100) 0 0	<0,001
Уровень BCR::ABL1 на момент анализа в основной точке, n (%): BCR::ABL1 level at the time of main point analysis, n (%): BCR::ABL1 ≥10 % BCR::ABL1 ≥1 – <10 % BCR::ABL1 ≥0,1 – <1 % BCR::ABL1 ≥0,0032 – <0,1 % BCR::ABL1 <0,0032 %	22 (76) 4 (14) 3 (10) 0 0	0 0 1 (3,5) 3 (10) 25 (86)	<0,001
Число предшествующих линий ИТК, n (%): Number of previous TKIs lines, n (%): 1 2 3–7	3 (10) 6 (21) 20 (69)	24 (83) 5 (17) 0	<0,001
Мутации BCR::ABL1, n (%) BCR::ABL1 mutations, n (%)	8 (28)	0	0,003
ДХА в Ph+ клетках, n (%) ACA in Ph+ cells, n (%)	10 (35)	0	<0,001
Отсутствие ПГО на момент анализа в основной точке, n (%) No CHR at the time of main point analysis, n (%)	14 (48)	0	<0,001
Попытки стоп/деэскалации доз ИТК, n (%) Attempts to stop/de-escalate TKI doses, n (%)	0	23 (79)	<0,001
Наличие образцов у пациентов, n: Availability of patients samples, n: основная точка main point ретроспективная точка retrospective point	29 21	29 14	—
Группа для отбора больных, n: Patient selection group, n: проспективная группа prospective group MAP MAP	16* 13	29 0	—

*7 пациентов из проспективной группы также участвовали в MAP.

Примечание. ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; Me – медиана; ELTS – EUTOS long-term survival; ИТК – ингибиторы тирозинкиназ; ДХА – дополнительные хромосомные aberrации; ПГО – полный гематологический ответ; MAP – Managed Access Program.

*Seven patients from the prospective group also participated in the MAP.

Note. CML – chronic myeloid leukemia; Me – median; ELTS – EUTOS long-term survival; TKI – tyrosine kinase inhibitors; ACA – additional chromosomal abnormalities; CHR – complete hematologic response; MAP – Managed Access Program.

У 3 больных группы 1 развилась прогрессия до фазы БК на фоне 1-й линии ИТК. На момент анализа в основной точке мутации *BCR::ABL1* выявлялись у 8 (28 %) больных, ДХА — у 10 (35 %) пациентов; у 14 (48 %) больных отсутствовал полный гематологический ответ. У 3 больных группы 1 с уровнем *BCR::ABL1* <1 % неудача терапии констатирована на основании наличия резистентной к иматинибу и ИТК 2-го поколения мутации T315I.

Пациенты группы 1 были значительно предлече — ны — 20 (69 %) больных получили от 3 до 7 линий ИТК к моменту проведения анализа в основной точке. Напротив, все пациенты группы 2 находились в ХФ ХМЛ, при этом 27 (93 %) из них относились к группе низкого риска по ELTS (EUTOS long-term survival) на момент установления диагноза. У 23 (79 %) больных проводилась попытка стоп-терапии или деэскалации дозы ИТК в связи с наличием стабильного глубокого молекулярного ответа. У 4 пациентов группы 2 био-образец для анализа в основной точке взят во время попытки отмены терапии, в связи с чем на момент выполнения анализа отмечалось повышение уровня *BCR::ABL1* >0,0032 %. Большинство (24 (83 %)) пациентов в группе 2 получили 1 линию терапии; у 5 больных перевод на 2-ю линию терапии был связан с непереносимостью препарата 1-й линии, без наличия признаков резистентности.

Лабораторные и статистические методы

Таргетная панель для ВПС подобрана на основании данных литературы о мутациях в генах, наиболее часто встречающихся у пациентов с миелоидными новообразованиями, и включала 19 генов: *ASXL1* (ex12), *DNMT3A* (ex7-18, ex20-23), *FLT3* (ex13-16), *IDH1* (ex4), *IDH2* (ex4), *NPM1* (ex11), *RUNX1* (ex2-9), *SF3B1* (ex14-16), *SRSF2* (ex1-2), *TET2* (ex2-10), *TP53* (ex2-11), *U2AF2* (ex2,6), *KIT* (ex17), *WT1* (ex7-9), *CEBPA* (ex1), *ZRSR2* (ex1-11), *JAK2* (ex12, 14), *GATA2* (ex1-7), *ABL1* (ex4-9).

Для проведения ВПС использовалась геномная ДНК, выделенная из замороженных клеток крови с помощью модифицированного метода солевой экстракции [27]. Пробоподготовку материала проводили с применением модулей Prep&Seq™ U-target (PARSEQLAB, Россия) в соответствии с протоколом производителя. ВПС проводили на генетическом анализаторе MiSeq (Illumina, США). Среднее покрытие составляло 1000x. В качестве референсной применялась сборка генома GRCh38. При анализе учитывались однонуклеотидные замены, делеции, инсерции, дупликации в экзонах, приводящие к аминокислотным заменам, и мутации зоны сплайсинга, встречающиеся с частотой <1 % в популяции и имеющие VAF ≥5 %. При анализе не учитывались благоприятные генетические варианты по данным баз Franklin by Genoox, ClinVar, а также варианты неясного значения с VAF 47–52 %, которые расценивались как полиморфизмы.

Условно патогенные, патогенные и прочие варианты неясного значения были включены в анализ.

Валидация соматического происхождения генетических вариантов проводилась с учетом VAF. Больным, у которых во всех имеющихся образцах выявлена мутация с VAF, близкой к 50 % (40–55 %), для исключения или подтверждения ее герминального происхождения проводилось контрольное секвенирование методом Сэнгера гена в нелейкемических клетках (буккальный эпителий, образец крови в ремиссии). Контрольное секвенирование не проводилось в случае обнаружения мутаций *ABL1*, которые считались присутствующими в приобретенном химерном гене *BCR::ABL1*, а также при VAF мутации любого гена <40 % или ее отсутствии в парном образце при сохранной структуре хромосомы, на которой расположен ген, — вариант в этом случае считали соматическим.

При статистической обработке данных использованы методы описательной статистики, для сравнения бинарных данных применяли критерии Мак-Немара и χ^2 , для сравнения количественных данных — критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Соматические мутации в группе больных хроническим миелоидным лейкозом с неудачей терапии

В группе 1 в основной точке мутации в генах, включая *ABL1*, выявлены у 19 (66 %) из 29 пациентов. Соматические мутации в генах, отличных от *ABL1*, выявлены у 15 (52 %) из 29 больных. Частота встречаемости мутаций всех генов значимо не различалась в зависимости от фазы ХМЛ: в ХФ мутации выявлены у 11 (61 %) из 18 пациентов, в ФА/БК — у 8 (73 %) из 11 пациентов ($p = 0,5$). Без учета *ABL1* мутации определялись у 8/18 (44 %) больных в ХФ, у 4/6 (67 %) — в ФА и у 3/5 (60 %) — в БК ($p = 0,6$).

Всего в группе 1 в основной точке обнаружено 35 мутаций в 8 генах: мутации в гене *ABL1* определялись у 11 (38 %) пациентов, *ASXL1* — у 9 (31 %), *DNMT3A* — у 3 (10 %), *RUNX1*, *CEBPA* — по 2 (7 %) пациента, *WT1*, *NPM1*, *TET2* — по 1 (3,5 %) пациенту. Медиана VAF вариантов составила 27 (5–50) %.

У 9 (31 %) из 29 пациентов группы 1 в основной точке выявлялось более 1 соматической мутации (от 2 до 4), включая несколько мутаций в одном гене. У 3 (7 %) больных выявлено по 2 мутации, у 5 (10 %) — по 3 мутации, у 1 (3,5 %) пациента с БК обнаружено 4 мутации: 3 мутации в гене *ABL1* и 1 мутация в гене *CEBPA*. Наиболее часто встречалось сочетание мутаций в гене *ABL1* и в другом гене — у 7 (24 %) пациентов, а самой частой комбинацией мутаций генов были *ABL1* и *ASXL1* — у 4 (14 %) пациентов (рис. 2).

Проведено сравнение клинико-лабораторных характеристик пациентов с ХФ и ФА в группе 1 в зависимости от наличия мутаций в различных генах,

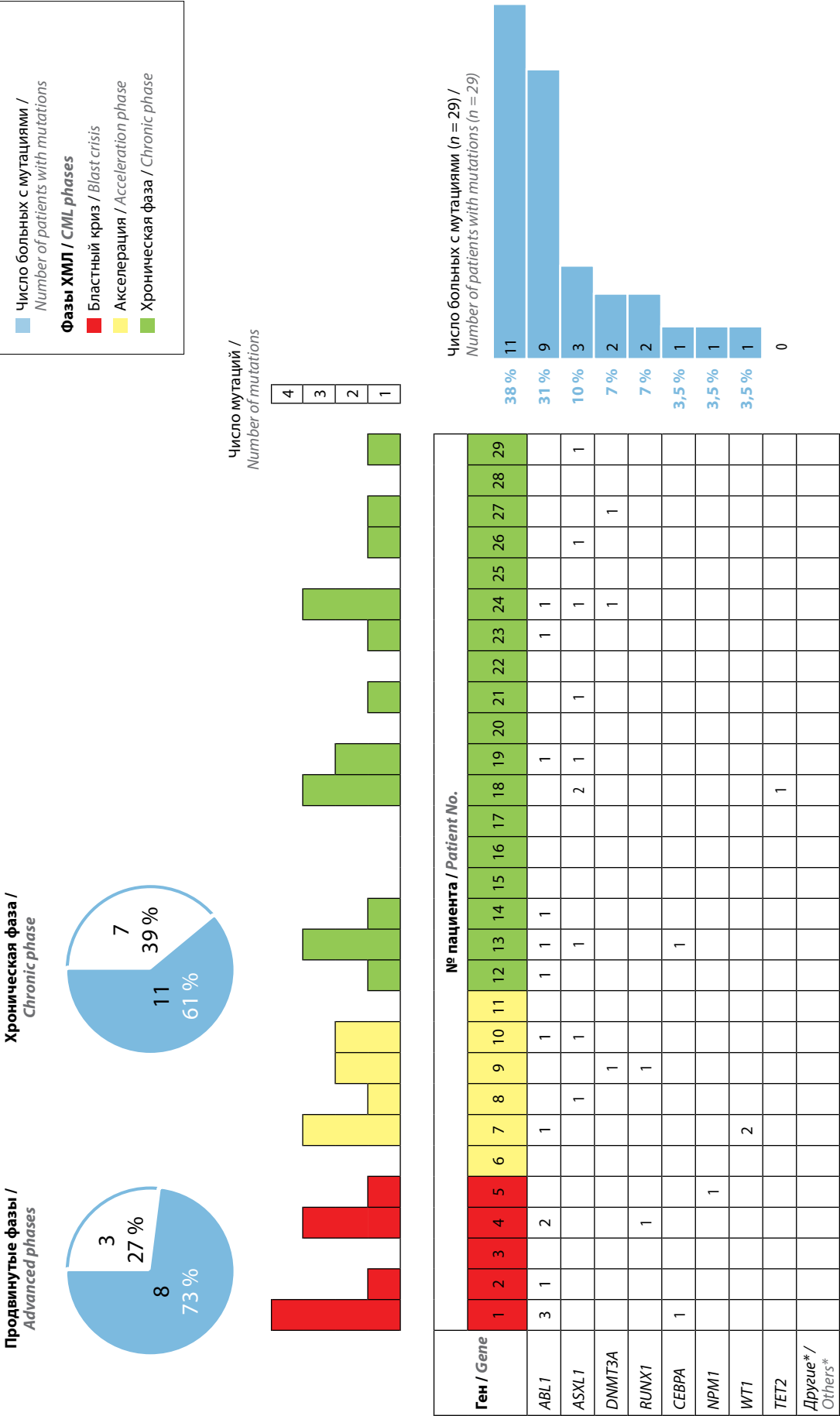


Таблица 2. Сравнение клинико-лабораторных параметров у больных хроническим миелоидным лейкозом в хронической фазе и фазе акселерации в зависимости от наличия или отсутствия мутаций в различных генах, помимо *ABL1* (*n* = 24)

Table 2. Comparison of clinical and laboratory parameters in CML patients with chronic and acceleration phase depending on the presence or absence of mutations in various genes other than *ABL1* (*n* = 24)

Параметр Parameter	Мутации не- <i>ABL1</i> выявлены (<i>n</i> = 12) Presence of non- <i>ABL1</i> mutations (<i>n</i> = 12)	Мутации не- <i>ABL1</i> не выявлены (<i>n</i> = 12) Absence of non- <i>ABL1</i> mutations (<i>n</i> = 12)	<i>p</i>
Наилучший молекулярный ответ на предыдущих линиях терапии, <i>n</i> (%): Best molecular response on previous therapy lines, <i>n</i> (%): <i>BCR::ABL1</i> <10 % <i>BCR::ABL1</i> ≥10 %	4/13 (31) 8/11 (73)	9 (69) 3 (27)	0,041
Мутации <i>BCR::ABL1</i> , <i>n</i> (%): <i>BCR::ABL1</i> mutations, <i>n</i> (%): есть yes нет no	5/8 (62) 7/16 (44)	3 (38) 9 (56)	0,4
ДХА в Ph+ клетках, <i>n</i> (%): ACA in Ph+ cells. <i>n</i> (%): есть yes нет no	8/15 (53) 4/9 (44)	7 (47) 5 (56)	0,7
Длительность ХМЛ до анализа в основной точке, Ме (мин–макс), лет CML duration at the main point, Me (min–max), years	7,8 (1,2–22,3)	6,1 (1,2–15,3)	0,75
Число предшествующих линий ИТК, <i>n</i> (%): Number of previous TKIs lines, <i>n</i> (%): ≤4 >4	7/17 (41) 5/7 (71)	10 (59) 2 (29)	0,2
Уровень <i>BCR::ABL1</i> на момент анализа в основной точке, Ме (мин–макс), % <i>BCR::ABL1</i> level at the time of main point analysis, Me (min–max), %	44 (13–150)	12 (0,6–66)	0,01

Примечание. ДХА – дополнительные хромосомные aberrации; Ме – медиана; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ИТК – ингибиторы тирозинкиназ.

Note. ACA – additional chromosomal abnormalities; Me – median; CML – chronic myeloid leukemia; TKI – tyrosine kinase inhibitors.

помимо *ABL1*. Подгруппы больных с мутациями и без них значимо различались по уровню *BCR::ABL1* на момент анализа и наилучшему уровню *BCR::ABL1* в анамнезе. Статистически значимо чаще соматические мутации выявлялись у больных с наилучшим уровнем *BCR::ABL1* в анамнезе ≥10 % (*p* = 0,041) и у больных с более высоким уровнем *BCR::ABL1* на момент анализа в основной точке (*p* = 0,01) (табл. 2).

Динамика мутантных клонов в группе больных хроническим миелоидным лейкозом с неудачей терапии

Биообразцы в дополнительной ретроспективной точке были доступны для 21 больного группы 1. Мутации выявлены у 10 (48 %) из 21 больного. Всего в ретроспективной точке выявлено 15 мутаций в 4 генах: *ASXL1* – у 7 (33 %), *DNMT3A* – у 4 (19 %), *ABL1* – у 2 (10 %), *TET2* – у 1 (5 %) пациента.

При сопоставлении мутационного профиля парных биообразцов в динамике отмечено несколько видов эволюции мутантных клонов:

- появление 19 мутаций у 10 больных с резистентным течением ХМЛ – мутации определялись в основной точке и отсутствовали в ретроспективной;
- персистенция 14 мутаций у 10 больных – мутации определялись в обеих точках;
- исчезновение 1 мутации *DNMT3A* у 1 больного – мутация выявлена только в ретроспективной точке (рис. 3).

Соматические мутации в группе больных с оптимальным ответом на терапию

В группе 2 в основной точке у 2 (7 %) из 29 пациентов обнаружены мутации в генах *DNMT3A* с VAF 5 % и *TP53* с VAF 9 %. В ретроспективной диагностической

№ пациента / Patient No.	Ген / Gene													
	ABL1		ASXL1		RUNX1		DNMT3A		CEBPA		WT1		TET2	
	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP	PT / RP	OT / MP
1		M244V, F359V, Q252H								1				
2		F486S												
4		Q252H, V379I				1								
7	T315I	T315I					1					2		
8			1	1										
9						1	1	1						
10		T315I	1	1										
13		T315I		1						1				
14		T315I												
19	T315I	T315I	1	1										
21			1	1										
23		T315I												
26			1	1										
27							1	1						
29				1										
18			2	2									1	1
24		F359V	1	1			1	1						

■ Число мутаций (вид мутаций ABL1) / Number of mutations (ABL1 mutation type)

Фазы ХМЛ / CML phases

- Бластный криз / Blast crisis
- Акселерация / Acceleration phase
- Хроническая фаза / Chronic phase

Рис. 3. Динамика клонов у больных хроническим миелоидным лейкозом группы 1, имеющих парные образцы (n = 21). PT – ретроспективная точка; OT – основная точка. Представлены данные 17 пациентов, имеющих мутации как минимум в одном из парных образцов
Fig. 3. Clone dynamics in chronic myeloid leukemia patients from group 1, having paired samples (n = 21). RP – retrospective point; MP – main point. Data from 17 patients with mutations in at least one of the paired samples are presented

точке у этих больных данные мутации не выявлены. У 1 (7 %) из 14 пациентов в ретроспективной точке (на этапе диагностики ХМЛ) обнаружена мутация в гене *ASXL1* с VAF 5 %, при этом в основной точке у пациента данная мутация не выявлялась. Таким образом, у 2 больных группы 2 мутации появились со временем на фоне оптимального ответа на терапию, у 1 больного мутация исчезла при достижении оптимального ответа.

Сравнение частоты встречаемости мутаций в 2 группах на момент анализа в основной точке и на этапе диагностики

При сравнении частоты встречаемости соматических мутаций в генах, исключая *ABL1*, в группах 1 и 2 получена статистически значимая разница: 52 % против 7 % ($p = 0,002$; отношение шансов 7,5).

У 10 из 21 пациента группы 1 биообразец для дополнительной ретроспективной точки взят на этапе первичной диагностики ХМЛ. При этом у 4/10 (40 %) боль-

ных на этапе диагностики выявлены мутации в генах *ASXL1* и *DNMT3A* (VAF 8–47 %), которые обнаруживались также основной точке.

В ранее выполненном исследовании, целью которого был поиск возможных маркеров, ассоциированных с неудачей терапии ИТК, с помощью полноэкзомного секвенирования (ПЭС), проведенного на этапе установления диагноза ХМЛ [28], участвовали пациенты из нашего исследования (3 больных группы 1, 7 больных группы 2). Оказалось, что у 2 из 3 указанных больных в группе 1 на этапе диагностики методом ПЭС выявлялись мутации в генах *ASXL1* и *DNMT3A*. При этом ни у кого из 7 больных группы 2 мутации генов, включенных в нашу таргетную панель, методом ПЭС на момент диагностики ХМЛ не выявлялись. Суммируя наши данные и описанные ранее результаты ПЭС, мы обнаружили, что частота встречаемости соматических мутаций генов на этапе диагностики оказалась значимо выше в группе 1 по сравнению с группой 2: 46 % (6 из 13 больных) против 5 % (1 из 21 больного) ($p = 0,004$) [28].

Таблица 3. Виды мутаций генов, выявленные при анализе групп 1 и 2 в обеих точках
Table 3. Types of gene mutations identified in patients from groups 1 and 2 at both points

Ген Gene	Миссенс Missense	Сдвиг рамки считывания Frameshift	Нонсенс Nonsense	Сайт сплайсинга Splice site
<i>ABL1</i>	✓			
<i>ASXL1</i>	✓	✓	✓	
<i>DNMT3A</i>	✓	✓		✓
<i>RUNX1</i>			✓	
<i>CEBPA</i>	✓			
<i>NPM1</i>		✓		
<i>WT1</i>		✓	✓	
<i>TET2</i>			✓	
<i>TP53</i>	✓			

Таблица 4. Аминокислотные замены, выявленные при анализе групп 1 и 2 в обеих точках
Table 4. Amino acid replacement identified in the analysis of groups 1 and 2 at both points

<i>ABL1</i>	<i>ASXL1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>RUNX1</i>	<i>CEBPA</i>	<i>NPM1</i>	<i>WT1</i>	<i>TET2</i>	<i>TP53</i>
T315I (n = 6)	G646Wfs*12 (n = 2)	K680Rfs*25	R201*	E316G	W288Cfs*12	C433*	R1216*	S371P
Q252H (n = 2)	R693* (n = 2)	S828Qfs*27	S362*	G104D		A387Hfs*67		
F359V (n = 2)	Q592*	Splice site						
M244V	I899L ¹	R326C						
G250E	S1275*	R729W						
F486S	E635Rfs*15							
V379I	E865*							
	V841*							
	L697Cfs*6							

¹Герминальная мутация.
Примечание. Мутации генов, выделенные жирным шрифтом, выявлены более чем у 1 пациента.
¹Germinal mutation.
Note. Gene mutations highlighted in bold were detected in more than one patient.

Характеристики обнаруженных мутаций генов

Виды мутаций генов, которые встречались в данном исследовании и могли приводить к нарушению функционирования генов, приведены в табл. 3.

Виды аминокислотных замен, которые встречались у всех пациентов в исследовании, представлены в табл. 4. Большинство мутаций были соматическими, только у 1 пациента подтверждено герминальное происхождение мутации I899L в гене *ASXL1* при контрольном исследовании соскоба буккального эпителия (пациент № 14, см. рис. 2). Данная мутация ранее не описана в базах данных COSMIC и dbSNP. Среди больных с мутациями в гене *ABL1* у 6 пациентов выявлена мутация T315I, у 2 — мутация Q252H, у 2 — мутация F359V, по 1 больному имели мутации M244V, G250E, F486S, V379I.

Обсуждение

Соматические мутации в опухолевых клетках рассматриваются как возможные факторы резистентности у больных ХМЛ [6, 14, 15, 19].

В нашем исследовании среди пациентов с неудачей терапии ИТК соматические мутации обнаружены в 8 из 19 генов, включенных в таргетную панель. Наиболее часто выявлялись мутации гена *ABL1*, в частности мутация T315I. Отчасти это обусловлено изначальной селекцией в исследование пациентов с клинически значимой резистентностью, так как клоны с мутацией T315I не чувствительны к воздействию ИТК 1-го и 2-го поколения, которые применяют в 1-й и 2-й линиях терапии ХМЛ. Эти серьезно предлеченные пациенты в настоящее время являются кандидатами для перевода на ИТК

нового поколения, включая аллостерический ИТК асциминиб, который эффективен по отношению к мутации T315I. В наше исследование включены 20 пациентов, участников программы MAP, мутационный статус которых в основной точке определяли перед переводом на терапию асциминибом.

Соматические мутации других генов, помимо *ABL1*, значимо чаще встречались у больных ХМЛ с неудачей терапии несколькими ИТК или с прогрессированием заболевания (52 %) по сравнению с группой больных ХМЛ с оптимальным ответом на терапию (7 %) ($p = 0,002$), что свидетельствует об их возможной вовлеченности в развитие устойчивости к терапии.

При исследовании биообразцов, полученных на этапе диагностики ХМЛ, у некоторых пациентов группы неудачи терапии определялись мутации генов *ASXL1* и *DNMT3A*. С учетом данных анализа, проведенного методом ВПС (таргетная панель), и результатов предыдущего исследования с использованием метода ПЭС [28] частота выявления мутации в генах *ASXL1* и *DNMT3A* на момент установления диагноза ХМЛ у пациентов группы неудачи терапии была значимо выше и составила 46 % (6 из 13 больных) против 5 % (1 из 21) в группе оптимального ответа ($p \leq 0,05$). Таким образом, уже на этапе диагностики ХМЛ могут определяться молекулярные маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития неудачи терапии ИТК и прогрессии.

Среди соматических мутаций, помимо *ABL1*, в группе больных с неудачей терапии наиболее часто определялись мутации в генах *ASXL1* (31 %), *DNMT3A* (10 %), что согласуется с данными других исследований, согласно которым мутации в гене *ASXL1* наиболее часто встречаются у больных ХМЛ [16, 18, 29–31]. Известно, что белок ASXL1 участвует в эпигенетической регуляции экспрессии генов, а мутации гена *ASXL1* могут приводить к развитию миелоидных неоплазий. Фермент DNMT3A участвует в метилировании ДНК *de novo*, а мутации гена *DNMT3A* приводят к снижению его активности и обнаруживаются у больных с миелоидными/лимфоидными новообразованиями. В то же время мутации обоих этих генов ассоциированы с клональным кроветворением неясного потенциала [32]. Следует отметить, что прогностическое значение наличия мутаций в гене *ASXL1* на этапе диагностики и на фоне лечения к настоящему времени окончательно не установлено. В некоторых работах наличие мутаций в гене *ASXL1* у больных на этапе первичной диагностики ХМЛ было ассоциировано со сниженной вероятностью достижения оптимального ответа на фоне терапии иматинибом [16, 28, 33]. В целях накопления данных о значении мутаций гена *ASXL1* у больных ХМЛ в обновленных лабораторных рекомендациях ELN 2023 рекомендуется включать этот ген в панели всех исследовательских протоколов [34].

По нашим данным, частота выявления соматических мутаций в небольшой группе больных в ФА/БК ($n = 11$) составила 73 % (включая *ABL1*) и оказалась

схожей с данными различных исследований с участием больных в БК (77–79 %) [15, 17, 18]. При этом спектр соматических мутаций в продвинутых фазах ХМЛ несколько отличался: только у этой категории больных выявлены мутации в генах *WT1*, *NPM1*, *RUNX1*, что соответствует данным литературы, согласно которым мутации в этих генах характерны именно для больных в продвинутых фазах ХМЛ и для больных острым миелоидным лейкозом [17, 35, 36].

У 9 (31 %) из 29 больных с неудачей терапии выявлено несколько мутаций: наиболее часто мутации в гене *ABL1* сочетались с мутациями в других генах — у 7 (24 %) пациентов. Отмечена высокая частота сочетания мутаций в генах *ABL1* и *ASXL1* — у 4 (14 %) больных, что сопоставимо с данными других авторов (10 %) [33]. Всего мутации киназного домена *ABL1* обнаружены у 6 пациентов с ХФ и у 5 пациентов с ФА/БК. Полученные результаты совпадали с анамнестическими данными о мутационном статусе *BCR::ABL1* для больных, у которых он был известен на момент исследования. У 2 пациентов с ХМЛ в БК выявлены по 2 и 3 мутации *ABL1*, у обоих в сочетании с другой соматической мутацией (*CEBPA/RUNX1*), что могло быть ассоциировано с агрессивным течением заболевания. Мутации в других генах таргетной панели (*RUNX1*, *CEBPA*, *NPM1*, *WT1*, *TET2*) встречались у единичных больных в нашем исследовании.

В группе больных с оптимальным ответом на терапию мутации в любой точке выявлены всего у 3 пациентов, отличительной чертой была низкая VAF (5–9 %). Примечательно, что у всех этих больных были попытки отмены терапии ИТК, которые привели к молекулярному рецидиву заболевания и возврату к терапии. В мире продолжают изучать молекулярно-генетические маркеры, которые могут быть предикторами молекулярного рецидива после отмены терапии у больных ХМЛ, однако в настоящий момент связь с наличием мутаций в различных генах не установлена [37]. Соматические мутации, выявленные у пациентов с оптимальным ответом на терапию, достигших глубокого молекулярного ответа или имеющих по крайней мере молекулярный ответ MO2 (*BCR::ABL1* < 1 %), по-видимому, находятся в Ph-отрицательном клоне и относятся к клональному кроветворению неясного потенциала. Влияние таких клонов на прогноз ХМЛ в настоящее время не установлено.

Мы наблюдали несколько моделей динамики клонов у больных с неудачей терапии:

- мутации появлялись на поздних сроках резистентного течения болезни и отсутствовали на ранних этапах терапии или при диагностике ХМЛ;
- мутации персистировали при резистентном течении заболевания и сохранении Ph-положительно-го клона;
- у 1 пациента произошла смена клонов: исчезла мутация *DNMT3A*, но при этом появились 2 мутации в гене *WT1* на фоне прогрессирования ХМЛ в ФА.

Полученные данные указывают на то, что у больных с неэффективностью проводимой терапии со временем возникают новые генетические события, которые способствуют трансформации заболевания в продвинутые фазы.

В нашем исследовании соматические мутации статистически значимо чаще выявлялись у больных с наилучшим уровнем *BCR::ABL1* в анамнезе $\geq 10\%$ ($p = 0,041$) и у больных с более высоким уровнем *BCR::ABL1* на момент анализа в основной точке ($p = 0,01$). По-видимому, с геномной нестабильностью Ph-положительного клона может быть ассоциировано появление новых мутаций не только в гене *BCR::ABL1*, но и в других генах. В связи с этим детекция соматических мутаций в различных генах может быть полезна как на этапе первичной диагностики, так и на фоне терапии у больных с отсутствием оптимального ответа. Своевременное выявление неблагоприятных молекулярных маркеров могло бы помочь выделить группу больных с высоким риском неудачи терапии.

Остается неизвестным, являются ли мутации в различных генах «свидетелями» или инициирующими событиями резистентности и трансформации ХМЛ на фоне терапии ИТК. Кроме этого, неизвестен срок от момента появления мутаций до прогрессирования заболевания. Возможное выделение группы неблагоприятного прогноза больных ХМЛ на ранних этапах терапии с учетом молекулярно-генетических маркеров может способствовать улучшению терапевтических подходов у таких больных. Кроме того, для пациентов

с отсутствием эффективных опций терапии ИТК может быть рассмотрена возможность применения новых агентов таргетной терапии, направленной на альтернативные генетические мишени.

Заключение

В результате проведенного исследования выявлена взаимосвязь между наличием соматических мутаций в генах *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *CEBPA*, *NPM1*, *WT1*, *TET2* и резистентным течением ХМЛ: частота мутаций генов выше в группе больных ХМЛ с неудачей терапии ИТК, чем в группе больных с оптимальным ответом на терапию: 52 % против 7 % ($p \leq 0,05$). Наиболее часто у больных с неудачей терапии выявлялись мутации в генах *ASXL1* (31 %) и *DNMT3A* (10 %). Одномоментно мутации в гене *ABL1* и в других генах определялись у 24 % больных, отмечена высокая частота сочетания мутаций в генах *ABL1* и *ASXL1* (14 %). Показано, что у больных с резистентным течением заболевания мутации персистируют, а также появляются новые, что может быть связано с трансформацией ХМЛ в продвинутые фазы.

Таким образом, использование метода ВПС может быть полезно для оценки закономерностей изменения мутационного профиля у больных ХМЛ. Для внедрения новых диагностических методов в клиническую практику необходимо продолжить изучение роли и клинической значимости соматических мутаций конкретных генов у больных ХМЛ в рамках проспективных исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005;5(3):172–83. DOI: 10.1038/nrc1567
- Quintá S-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113(8):1619–30. DOI: 10.1182/blood-2008-03-144790
- Hoffmann V.S., Baccarani M., Hasford J. et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* 2015;29(6):1336–43. DOI: 10.1038/leu.2015.73
- Hehlmann R. Chronic myeloid leukemia in 2020. *Hemasphere* 2020;4(5):E468. DOI: 10.1097/HS9.0000000000000468
- Александрова Т.Н., Мулина И.И., Лямкина А.С. и др. Цитокиновый профиль больных хроническим миелолейкозом. *Медицинская иммунология* 2024;26(2):329–36. DOI: 10.15789/1563-0625-CPO-2851
Aleksandrova T.N., Mulina I.I., Lyamkina A.S. et al. Cytokine profile in patients with chronic myeloid leukemia. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2024;26(2):329–36. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-CPO-2851
- Kustova D., Kirienko A., Motyko E. et al. P660: Next-generation sequencing (NGS) for detecting BCR::ABL-independent mutations in patients with chronic myeloid leukemia with resistance to tyrosine kinase inhibitor treatment. *Hemasphere* 2023;7(S3):e8616465. DOI: 10.1097/01.HS9.0000969544.86164.65
- Hochhaus A., Baccarani M., Silver R.T. et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34(4):966–84. DOI: 10.1038/s41375-020-0776-2
- Кутев С.И., Вельченко М.В. Значение анализа мутаций гена *BCR-ABL* в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза. *Клиническая онкогематология* 2008;1(3):190–9. Kutsev S.I., Velchenko M.V. Significance of analysis of *BCR-ABL* gene mutations in optimization of target therapy for chronic myeloid leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2008;1(3):190–9. (In Russ.).
- Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102(1):276–83. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2896
- Челышева Е.Ю., Шухов О.А., Лазарева О.В. и др. Мутации киназного домена гена *BCR-ABL* при хроническом миелолейкозе. *Клиническая онкогематология* 2012;5(1):13–21. Chelysheva E.Yu., Shukhov O.A., Lazareva O.V. et al. *BCR-ABL* kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2012;5(1):13–21. (In Russ.).

11. Cortes J.E., Talpaz M., Giles F. et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003;101(10):3794–800. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2790
12. Виноградова О.Ю., Асеева Е.А., Воронцова А.В. и др. Влияние различных хромосомных аномалий в Ph-позитивных клетках костного мозга на течение хронического миелолейкоза при терапии ингибиторами тирозинкиназ. *Онкогематология* 2012;7(4):24–34. DOI: 10.17650/1818-8346-2012-7-4-24-34
Vinogradova O.Yu., Aseeva E.A., Vorontsova A.V. et al. Influence of different chromosomal abnormalities in Ph-positive bone marrow cells on the chronic myeloid leukemia course during tyrosine kinase inhibitors therapy. *Oncohematology* 2012;7(4): 24–34. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2012-7-4-24-34
13. Branford S., Dong D., Kim H. et al. Laying the foundation for genomically-based risk assessment in chronic myeloid leukemia behalf of the International CML Foundation Genomics Alliance. *Leukemia* 2019;33:1835–50. DOI: 10.1038/s41375-019-0512-y
14. Sant'Antonio E., Camerini C., Rizzo V. et al. Genetic heterogeneity in chronic myeloid leukemia: how clonal hematopoiesis and clonal evolution may influence prognosis, treatment outcome, and risk of cardiovascular events. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021;21(9):573–9. DOI: 10.1016/j.clml.2021.04.014
15. Branford S., Fernandes A., Shahrin N.H. et al. Beyond BCR::ABL1—the role of genomic analyses in the management of CML. *J Natl Compr Canc Netw* 2024;22(1):e237335. DOI: 10.6004/jnccn.2023.7335
16. Shanmuganathan N., Yeung D.T., Wadham C. et al. Additional mutational events at diagnosis of CML confer inferior failure-free survival and molecular response for patients treated with frontline imatinib but not for patients treated with frontline second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2022;140(Suppl 1):805–6. DOI: 10.1182/blood-2022-158743
17. Grossmann V., Kohlmann A., Zenger M. et al. A deep-sequencing study of chronic myeloid leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9 % of cases. *Leukemia* 2011;25(3):557–60. DOI: 10.1038/leu.2010.298
18. Branford S., Wang P., Yeung D.T. et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood* 2018;132(9):948–61. DOI: 10.1182/blood-2018-02-832253
19. Awad S.A., Kankainen M., Ojala T. et al. Mutation accumulation in cancer genes relates to nonoptimal outcome in chronic myeloid leukemia. *Blood Adv* 2020;4(3):546. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000943
20. Mullighan C.G., Miller C.B., Radtke I. et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110–4. DOI: 10.1038/nature06866
21. Ochi Y., Yoshida K., Huang Y.J. et al. Clonal evolution and clinical implications of genetic abnormalities in blastic transformation of chronic myeloid leukaemia. *Nat Commun* 2021;12(1):2833. DOI: 10.1038/s41467-021-23097-w
22. Mitani K., Nagata Y., Sasaki K. et al. Somatic mosaicism in chronic myeloid leukemia in remission. *Blood* 2016;128(24):2863–6. DOI: 10.1182/blood-2016-06-723494
23. Schmidt M., Rinke J., Schäfer V. et al. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia* 2014;28(12):2292–9. DOI: 10.1038/leu.2014.272
24. Kim T.H., Tyndel M.S., Kim H.J. et al. Spectrum of somatic mutation dynamics in chronic myeloid leukemia following tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood* 2017;129(1):38–47. DOI: 10.1182/blood-2016-04-708560
25. Шухов О.А., Туркина А.Г., Чельшева Е.Ю. и др. Терапия хронического миелолейкоза согласно современным рекомендациям: результаты пилотного проспективного исследования «Ранняя индукционная терапия и мониторинг» (ПИТМ). *Клиническая онкогематология* 2019;12(2):194–201. DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-2-194-201
Shukhov O.A., Turkina A.G., Chelysheva E.Yu. et al. Treatment of chronic myeloid leukemia according to current guidelines: the results of the pilot prospective study “Early Induction Therapy and Monitoring” (ПИТМ). *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2019;12(2):194–201. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-2-194-201
26. Туркина А.Г., Кузьмина Е.А., Ломаиа Е.Г. и др. Асциминиб у больных хроническим миелолейкозом, не имеющих альтернативных методов лечения: результаты исследования в рамках программы расширенного доступа MAP (Managed Access Program, NCT04360005) в России. *Клиническая онкогематология* 2023;16(1):54–68. DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-1-54-68
Turkina A.G., Kuzmina E.A., Lomaia E.G. et al. Asciminib in chronic myeloid leukemia patients without therapeutic alternatives: results of the MAP (Managed Access Program, NCT04360005) trial in Russia. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2023;16(1):54–68. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-1-54-68
27. Barton D.E. DNA prep for eukaryotic cells (macrophages)? Available at: <http://www.bio.net/bionet/mmm/methods-and-reagents/1995-July/031231.html>
28. Адильгереева Э.П., Никитин А.Г., Жегло Д.Г. и др. Молекулярно-генетические предикторы первичной резистентности хронического миелоидного лейкоза к терапии ингибиторами тирозинкиназ. *Вестник гематологии* 2021;17(2):45–6. Adilgerееva E.P., Nikitin A.G., Zheglo D.G. et al. Molecular genetic predictors of chronic myeloid leukemia primary resistance to tyrosine kinase inhibitors therapy. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology* 2021;17(2):45–46. (In Russ.).
29. Roche-Lestienne C., Marceau A., Labis E. et al. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2011;25(10):1661–4. DOI: 10.1038/leu.2011.139
30. Ernst T., Busch M., Rinke J. et al. Frequent ASXL1 mutations in children and young adults with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2018;32(9):2046–9. DOI: 10.1038/s41375-018-0157-2
31. Schönfeld L., Rinke J., Hinze A. et al. ASXL1 mutations predict inferior molecular response to nilotinib treatment in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2022;36(9):2242. DOI: 10.1038/s41375-022-01648-4
32. Меликан А.Л., Суборцева И.Н. Биология миелопролиферативных новообразований. *Клиническая онкогематология* 2016;9(3):314–25. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-314-325
Melikyan A.L., Subortseva I.N. Biology of myeloproliferative malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2016;9(3):314–25. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-314-325
33. Branford S., Hochhaus A., Mauro M. et al. Impact of mutations in blood cancer-related genes on clinical outcomes in chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) after ≥2 tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in the ascembl trial. *Blood* 2023;142(Suppl 1):449. DOI: 10.1182/blood-2023-187636
34. Cross N.C.P., Ernst T., Branford S. et al. European LeukemiaNet laboratory recommendations for the diagnosis and management of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2023;37:2150. DOI: 10.1038/s41375-023-02048-y
35. Roehe-Lestienne C., Deluche L., Corm S. et al. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL + leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood* 2008;111(7):3735–41. DOI: 10.1182/blood-2007-07-102533
36. Döhner 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. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196
37. Смирнихина С.А., Чельшева Е.Ю., Лавров А.В. и др. Прогностические генетические маркеры рецидивов хронического миелолейкоза у пациентов после отмены ингибиторов тирозинкиназ. *Клиническая онкогематология* 2017;10(4):580–1. Smirnikhina S.A., Chelysheva E.Yu., Lavrov A.V. et al. Prognostic genetic markers of relapses in patients with chronic myeloid leukemia after withdrawal of tyrosine kinase inhibitors. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2017;10(4):580–1.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Национальному гематологическому обществу за помощь при подготовке статьи к публикации.
Acknowledgment. The authors are grateful to the National Society of Hematology for assistance in preparing the article for publication.

Вклад авторов

Е.А. Кузьмина: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;
Е.Ю. Чельшева: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, редактирование и подготовка статьи;
Б.В. Бидерман, Е.А. Степанова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
О.А. Шухов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
Э.П. Гаджиева, А.Н. Петрова, И.С. Немченко, А.В. Быкова, М.А. Гурьянова: получение данных для анализа, редактирование и подготовка статьи;
А.В. Кохно, А.Г. Туркина: разработка дизайна исследования, редактирование и подготовка статьи;
А.Б. Судариков: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, редактирование и подготовка статьи.

Authors' contributions

E.A. Kuzmina: review of publications on the article topic, obtaining data for analysis, analysis of data obtained, article writing;
E.Yu. Chelysheva: study design development, obtaining data for analysis, article writing and editing;
B.V. Biderman, E.A. Stepanova: obtaining data for analysis, analysis of data obtained;
O.A. Shukhov: study design development, analysis of data obtained;
E.P. Gadzhieva, A.N. Petrova, I.S. Nemchenko, A.V. Bykova, M.A. Guryanova: obtaining data for analysis, article writing and editing;
A.V. Kokhno, A.G. Turkina: study design development, article writing and editing;
A.B. Sudarikov: study design development, analysis of data obtained, article writing and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Кузьмина / E.A. Kuzmina: <https://orcid.org/0000-0002-9181-6050>
Е.Ю. Чельшева / E.Yu. Chelysheva: <https://orcid.org/0000-0001-6423-1789>
Б.В. Бидерман / B.V. Biderman: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>
О.А. Шухов / O.A. Shukhov: <https://orcid.org/0000-0001-5393-0816>
Е.А. Степанова / E.A. Stepanova: <https://orcid.org/0000-0002-8187-5639>
Э.П. Гаджиева / E.P. Gadzhieva: <https://orcid.org/0000-0002-6440-0500>
А.Н. Петрова / A.N. Petrova: <https://orcid.org/0000-0001-5730-2593>
И.С. Немченко / I.S. Nemchenko: <https://orcid.org/0000-0001-9178-1428>
А.В. Быкова / A.V. Bykova: <https://orcid.org/0000-0002-3123-8316>
М.А. Гурьянова / M.A. Guryanova: <https://orcid.org/0000-0001-9984-389X>
А.В. Кохно / A.V. Kokhno: <https://orcid.org/0000-0003-0261-5941>
А.Г. Туркина / A.G. Turkina: <https://orcid.org/0000-0001-9947-2371>
А.Б. Судариков / A.B. Sudarikov: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России. Протокол № 181 от 26.09.2024.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia. Protocol No. 181 dated 26.09.2024.