

ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИНГИБИТОРАМИ ТИРОЗИНКИНАЗ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ МЕТОДОМ ПОЛНОЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Search of new prognostic markers of efficacy of therapy with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients using exome sequencing

Адилгереева Э. П.¹, Лавров А. В.^{1, 2}, Смирнихина С. А.¹, Чельшева Е. Ю.³, Шухов О. А.³, Цаур Г. А.^{4, 5, 6}, Кочергин-Никитский К. С.¹, Якушина В. Д.¹, Морданов С. В.⁷, Туркина А. Г.³, Куцев С. И.^{1, 2}

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» Министерства здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург, Российская Федерация

⁵ ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», г. Екатеринбург, Российская Федерация

⁶ ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург, Российская Федерация

⁷ ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Adilgereeva E. P.¹, Lavrov A. V.^{1, 2}, Smirnikhina S. A.¹, Chelysheva E. Y.³, Shukhov O. A.³, Tsaur G. A.^{4, 5, 6}, Kochergin-Nikitsky K. S.¹, Yakushina V. D.¹, Mordanov S. V.⁷, Turkina A. G.³, Kutsev S. I.^{1, 2}

¹ Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russian Federation

² Department of Molecular and Cellular Genetics, State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov» of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

³ Scientific and Advisory Department of Chemotherapy of Myeloproliferative Disorders, Federal State-Funded Institution National Research Center for Hematology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

⁴ Regional Children Hospital 1, Ekaterinburg, Russian Federation

⁵ Research Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russian Federation

⁶ Urals State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

⁷ The Rostov State Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov, Russian Federation

РЕЗЮМЕ

Введение. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — частое миелопролиферативное заболевание, характеризующееся патогенной активностью химерной тирозинкиназы *BCR/ABL*, которая стимулирует неконтролируемую пролиферацию клеток и нестабильность ДНК. Первичная резистентность или неоптимальный ответ на терапию ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) регистрируется примерно у 20% пациентов с ХМЛ.

Цель работы: обнаружение экзомных вариантов, связанных с неоптимальным ответом больных ХМЛ на таргетную терапию ИТК.

Материалы и методы. В исследование были включены восемь пациентов с Ph⁺ ХМЛ в хронической фазе.

ABSTRACT

Background. Chronic myeloid leukemia (CML) is a common myeloproliferative disease characterized by pathologic activity of the fusion gene *BCR/ABL*, which encodes a tyrosine kinase that stimulates uncontrolled cell proliferation and DNA instability. Up to 20% of CML patients demonstrate primary resistance or non-optimal response to targeted tyrosine-kinase inhibitors (TKI) therapy.

Objective. To find new potential genetic markers of TKI resistance by whole exome sequencing.

Materials and methods. The study included eight patients with Ph⁺ CML in the chronic phase (CF). After 6 months of follow-up period patients were divided into two groups: four with an optimal response to TKI therapy and four with a non-

Через 6 мес наблюдения пациенты были разделены на две группы: четыре человека с оптимальным ответом на терапию ИТК и четыре человека с неоптимальным ответом. В группу валидации вошли 62 пациента (32 — с оптимальным и 30 — с неоптимальным ответом на терапию). Экзомное секвенирование проводили на платформе Ion Torrent PGM. Выравнивание проводили на геном человека (GRCh37). Секвенирование по Сэнгеру проводили на приборе ABI PRISM 3500xl. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ MS Office Excel, SPSS21.

Результаты и заключение. По результатам экзомного секвенирования выделено семь вариантов, ассоциированных с ответом на терапию: ANKRD35-rs11579366, DNAH9-rs1990236, MAGEC1-rs176037, TOX3-rs10653661, THSD1-rs3803264, MORN2-rs3099950, PTCRA-rs9471966. Валидация этих вариантов на дополнительной выборке больных ($n = 62$) и поиск ассоциаций различных сочетаний генотипов и гаплотипов с ответом на терапию не позволил однозначно выделить варианты, ассоциированные с неоптимальным ответом на терапию ИТК. Кроме того, были исследованы варианты в 9000 генах, в результате чего удалось обнаружить 75 генов, достоверно различающихся по количеству вариантов между группами. Анализ обогащения показал, что выявленные гены участвуют в регуляции клеточной адгезии, межклеточных контактов, антигенной активации Т-лимфоцитов, опосредованном ингибировании α ИФН сигнального пути, отвечающего за антипролиферативный эффект. Также была выявлена связь многих из этих генов с развитием различных злокачественных новообразований (рак почки, легкого и молочной железы). Многофакторная природа ответа на терапию, безусловно, осложняет поиск прогностических факторов.

Ключевые слова: хронический миелоидный лейкоз, ингибиторы тирозинкиназ, экзомное секвенирование, резистентность к ингибиторам тирозинкиназ

Для цитирования: Адильгереева Э. П., Лавров А. В., Смирнихина С. А., Челышева Е. Ю., Шухов О. А., Цаур Г. А., Кочергин-Никитский К. С., Якушина В. Д., Морданов С. В., Туркина А. Г., Куцев С. И. Поиск новых маркеров эффективности терапии ингибиторами тирозинкиназ при хроническом миелоидном лейкозе методом полноэкзомного секвенирования. Гематология и трансфузиология. 2018; 63(2):134–143

doi: 10.25837/HAT.2018.61..2..004

Для корреспонденции: Лавров Александр Вячеславович, к. м. н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия. Электронная почта: avlavrov@yandex.ru

optimal response. The validation group included 62 patients (32 with optimal and 30 with non-optimal response to therapy). Exome sequencing was performed using the Ion Torrent PGM platform. Alignment was performed on the human genome (GRCh37). Sanger sequencing was conducted on an ABI PRISM 3500xl. Statistical processing of the results was carried out using MS Office Excel and SPSS21.

Results and conclusion. Exome sequencing revealed seven single-nucleotide variants (SNVs) associated with therapy outcomes: ANKRD35-rs11579366, DNAH9-rs1990236, MAGEC1-rs176037, TOX3-rs10653661, THSD1-rs3803264, MORN2-rs3099950, and PTCRA-rs9471966. Validation of these variants in 62 patients did not confirm prognostic role of any of the individual SNVs or their combinations. An additional analysis of the number of SNVs in 9000 genes revealed 75 genes with significant differences in the number of SNVs. Enrichment analysis showed that these genes are involved in cell adhesion, cell contacts, T-cell antigen activation, and inhibition of IFN α -mediated antiproliferative signaling. Many of these genes are also associated with a variety of cancers (renal, lung and breast cancer). Possible multifactorial nature of the efficacy of therapy complicates the search of new prognostic markers.

Keywords: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, exome sequencing, TKI resistance

For citation: Adilgereeva E. P., Lavrov A. V., Smirnikhina S. A., Chelysheva E. Y., Shukhov O. A., Tsaur G. A., Kochergin-Nikitsky K. S., Yakushina V. D., Mordanov S. V., Turkina A. G., Kutsev S. I. Search of new prognostic markers of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia patients using exome sequencing. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2018; 63(2):134–143 (in Russian)
doi: 10.25837/HAT.2018.61..2..004

For correspondence: Alexander V. Lavrov, Laboratory of Mutagenesis, Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moskvorechie, 1, Moscow, 115478, Russian Federation, Associate Professor of the Department of Molecular and Cell Genetics, The Russian National Research Medical University Named after N. I. Pirogov. Postal address: 117997, Moscow, Russian Federation, +7-499-324-3579, avlavrov@yandex.ru

Information about authors:

Adilgereeva E. P., <https://orcid.org/0000-0002-6440-0500>;
Lavrov A. V., <https://orcid.org/0000-0003-4962-6947>;
Smirnikhina S. A., <https://orcid.org/0000-0002-1558-3048>;
Chelysheva E. Y., <https://orcid.org/0000-0001-6423-1789>;
Shukhov O. A., <https://orcid.org/0000-0001-5393-0816>;
Tsaur G. A., <https://orcid.org/0000-0002-9881-6221>;
Kochergin-Nikitsky K. S., <https://orcid.org/0000-0002-0096-4542>;
Yakushina V. D., <https://orcid.org/0000-0001-5236-9297>;
Mordanov S. V., <https://orcid.org/0000-0001-7924-4945>;
Turkina A. G., <https://orcid.org/0000-0001-9947-2371>;
Kutsev S. I. <https://orcid.org/0000-0002-3133-8018>.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 8113 от 28.08.2012).

Конфликт интересов. Смирнихина С. А. получала финансирование для участия в конференциях от Биолайн и Новартис Фарма. Лавров А. В. получил финансирование от компании Thermo Fisher Scientific Corporation. Чельшева Е. Ю. была консультантом Новартис Фарма, участвовала в заседании экспертов Новартис Фарма, Bristol-Myers Squibb. Туркина А. Г. была консультантом, участвовала в заседании экспертов и получала финансирование от Bristol-Myers Squibb, Новартис и Pfizer. Куцев С. И. участвовал в заседании экспертов Новартис Фарма и Pfizer.

Все остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 22.06.2018

Принята к печати 15.10.2018

Financial disclosure. This work was partly supported by the Russian Ministry of Education and Science (grant #8113 from 28.08.2012).

Conflict of interests. Svetlana A Smirnikhina received funding of travel, accommodations, or expenses from Bioline and Novartis Farma. Alexander V. Lavrov received funding of travel from Thermo Fisher Scientific Corporation. Ekaterina Y. Chelysheva served as a consultant for Novartis, participated on the Speakers' bureau of Novartis, Bristol-Myers Squibb. Anna G. Turkina served as a consultant/advisor, participated on the Speakers' bureau, and received honoraria from Bristol-Myers Squibb, Novartis and Pfizer. Sergey I. Kutsev participated on the Speakers' bureau of Novartis and Pfizer.

Other authors reported no conflicts of interests.

Received 22 Jun 2018

Accepted 15 Oct 2018

Введение

Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — клональное миелопролиферативное заболевание, характеризующееся появлением в гемопоэтической стволовой клетке специфического цитогенетического маркера — так называемой филадельфийской (Ph') хромосомы. Ph'-хромосома возникает в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22, вследствие чего образуется химерный ген *BCR/ABL1*, кодирующий химерный белок с тирозинкиназной активностью. ХМЛ составляет 15—20% всех выявленных впервые случаев лейкозов у взрослых. По данным популяционного исследования в 6 регионах Российской Федерации, заболеваемость ХМЛ составляет 0,7 на 100 000 взрослого населения [1]. Соотношение заболевших мужчин и женщин — 1,16:1 [2]. Открытие *BCR/ABL1* сыграло важную роль в понимании патогенеза ХМЛ, что привело к разработке новых таргетных препаратов для лечения заболевания. На сегодняшний день существуют три поколения ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), используемых для лечения ХМЛ: ИТК 1-го поколения — иматиниб, ИТК 2-го поколения — нилотиниб, бозутиниб, дазатиниб, ИТК 3-го поколения — понатиниб [3]. Несмотря на значительный успех в лечении больных ХМЛ [4], у некоторых пациентов может отмечаться как первичная резистентность к терапии ИТК, которая проявляется в отсутствии достижения полного гематологического ответа (ПГО), полного цитогенетического ответа (ПЦО), большого молекулярного ответа (БМО), так и вторичная резистентность, характеризующаяся потерей уже достигнутого ранее ответа на лечение [5]. Существуют две группы механизмов резистентности к терапии ИТК: *BCR/ABL1*-зависимые механизмы (амплификация *BCR/ABL*, мутации киназного домена) [6] и *BCR-ABL1*-независимые механизмы [7]. *BCR/ABL1*-зависимые механизмы приводят обычно к вторичной резистентности, развивающейся при утрате первоначально успешного ответа на терапию. Для определения причин вторичной резистентности используют моле-

кулярно-генетические методы диагностики, включая определение мутаций *BCR/ABL1*. Однако до сих пор не известны причины первичной резистентности и, соответственно, не существует методов прогнозирования неоптимального ответа на терапию ИТК. Широко используемые шкалы Sokal и EUTOS, на основании которых формируются группы риска пациентов с ожидаемо худшим клиническим исходом, основаны на оценке только клиническо-демографических данных. В шкалу Sokal, которая впервые была предложена еще до применения ИТК, в качестве прогностически неблагоприятного фактора включен возраст пациентов. В настоящее время прогностическая ценность этих шкал подвергается сомнениям [8, 9]. Ранее неоднократно предпринимались попытки определения причин первичной резистентности, поиск молекулярных маркеров эффективности терапии или прогрессии заболевания, а также стабильности ремиссии [10—17]. В качестве маркеров рассматривали уровни экспрессии генов *pSyk348*, *IL1RAP* [18—21], однонуклеотидные варианты (ОНВ) в гене *FAS* [22], *микроРНК-150* и *микроРНК-29A/B* [23], *TGF-α*, *IL-6* [24] и др. Однако пока не удалось выявить маркеры, которые обладали бы высокой чувствительностью и специфичностью в прогностической оценке эффективности терапии и глубины ответа. Поиск факторов, раннее обнаружение которых оказало бы значительное влияние на прогноз развития заболевания и терапию ХМЛ, остается актуальной задачей. Цель настоящего исследования — выявить с помощью полноэкзомного секвенирования у пациентов с впервые выявленным ХМЛ потенциальные прогностические маркеры и проверить их прогностическую ценность на выборках больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК.

Материалы и методы

В проспективное исследование по экзомному секвенированию (Протокол заседания этического комитета

ФГБНУ Медико-генетический научный центр № 6 от 2 июля 2012 г.) были включены 8 пациентов с установленным диагнозом Ph+ ХМЛ в хронической фазе (ХФ). Периферическую кровь забирали в пробирки с ЭДТА в момент установления диагноза до начала терапии ИТК. Через 6 мес наблюдения в соответствии с рекомендациями European Leukemia Net (ELN) 2013 г. [25] пациенты были разделены на две группы: 4 человека с оптимальным ответом на терапию ИТК и 4 человека с неоптимальным ответом (в группу с неоптимальным ответом вошли пациенты группы «предупреждение» и группы «неудача терапии», согласно критериям ELN). Оптимальному ответу на терапию соответствуют показатели молекулярного ответа *BCR-ABL1* < 1% и полного цитогенетического ответа (Ph+ 0%). Неоптимальному ответу — *BCR-ABL1* > 1% и/или цитогенетический ответ Ph+ > 10%. Пациентам, не имеющим оптимального ответа на терапию, было выполнено секвенирование гена *BCR/ABL1*, подтвердившее отсутствие мутаций киназного домена. В обеих группах число мужчин и женщин было равным, медиана возраста составила 45,5 года в группе пациентов с оптимальным ответом и 47,2 года в группе пациентов с неоптимальным ответом соответственно. Подробная характеристика пациентов представлена.

Для валидации находок при экзомном секвенировании была сформирована выборка пациентов с использованием тех же критериев включения. В группу валидации вошли 62 пациента с впервые выявленным ХМЛ (32 — с оптимальным и 30 — с неоптимальным ответом на терапию).

От всех пациентов было получено информированное согласие на включение их в исследование.

Экзомное секвенирование

ДНК выделяли из периферической крови с помощью набора Quick-gDNA™ Blood Mini Prep (Zymo Research) по протоколу производителя. Экзомное секвенирование проводили на платформе Ion Torrent Personal Genome Machine с использованием наборов Life Technologies Ion Target Seq™ ExomeKits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США), Exome Enrichment Kit (Life Technologies, США), Ion PGM™ 200 Sequencing Kit. Среднее покрытие каждого нуклеотида — 20. Равномерность покрытия — 92%.

Биоинформатический анализ

Выравнивание проводили на геном человека (GRCh37 <http://updates.iontorrent.com/reference/hg19>) с использованием программного обеспечения Torrent Suite (TS) v. 3.6.2, BAM-файлы проанализированы при помощи плагина Variant Caller v 5.0.3.5. Найденные варианты (однонуклеотидные варианты, вставки и делеции от одного до нескольких нуклеотидов) были аннотированы при помощи программ ANNOVAR, Partek Genomics Suite (Partek, St. Louis, Missouri, USA) и Variant Effect

Predictor tool. Partek Genomics Suite и MS Office Excel были использованы для отбора вариантов. Процесс выбора вариантов был подробно описан ранее [26, 27].

Секвенирование по Сэнгеру

Праймеры для секвенирования по Сэнгеру подбирали при помощи программы Primer Designer™ Tool (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Для амплификации и секвенирования использовали одни и те же праймеры. Секвенирование образцов для подтверждения находок полноэкзомного секвенирования проводили с прямого и обратного праймеров на приборе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems). Последовательности праймеров указаны в табл. 1. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch™ Bio-Rad (США) по следующему протоколу: 95 °C 5 мин, [95 °C 5 с, 65 °C 10 с, 72 °C 20 с] × 39 циклов. Секвенирование в группе пациентов для валидации проводили с одного праймера.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ MS Office Excel, SPSS21. Использовали методы χ^2 и критерий Манна—Уитни. Методом χ^2 проводили сравнение частот генотипов и аллелей, найденных вариантов в группах больных ХМЛ с оптимальным ответом на терапию и неоптимальным ответом на терапию ИТК в валидационной выборке пациентов. Критерий Манна—Уитни использовали для обнаружения генов, различающихся по числу вариантов между группами. Анализ гаплотипов был выполнен с помощью пакета R Haplo.stats (version 1.7.7) [28], построена бинарная логистическая регрессия и посчитано отношение шансов для оценки связи гаплотипов и ответа на терапию.

Результаты

Экзомное секвенирование

По результатам экзомного секвенирования выявили от 33 657 до 38 636 гомо- и гетерозиготных вариантов, в том числе однонуклеотидные варианты (ОНВ), небольшие вставки и делеции (инделлы). Около 5300 вариантов были уникальными для каждого образца. Варианты были найдены в 17 741 гене. В каждом гене мы обнаружили от одного до 345 вариантов (*MUC16*). Полный список генов с числом найденных вариантов и процесс выбора вариантов детально описаны ранее [26, 27]. В результате фильтрации обнаруженных вариантов было отобрано семь, которые могут являться прогностическими маркерами неоптимального ответа на терапию ИТК. Пять из них (*ANKRD35*-rs11579366, *DNAH9*-rs1990236, *MAGEC1*-rs176037, *TOX3*-rs10653661, *THSD1*-rs3803264) были выявлены в группе пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК и не встретились у пациентов с неоптимальным ответом и два (*MORN2*-rs3099950, *PTCRA*-rs9471966), напро-

Таблица 1. Последовательность праймеров для секвенирования по Сэнгеру
Table 1. Primers' sequence for Sanger sequencing

Гены Genes	Размер ампликона Amplicon size	Нуклеотидная последовательность праймеров Sequence of primers	Каталожные номера Life Technologies Catalogue numbers of Life Technologies
ANKRD35F	507	GCAACAGTAACTTGCTGGAGGAGTT	Hs00399911_CE
ANKRD35R		CTTCCCCAGGTCTTGCTCCAGA	
DNAH9 F	511	ATAACTCTTGCTGCCTGGGTGC	Hs00162006_CE
DNAH9 R		ATTCCAAGCTTTACCTGTGTGTCCCA	
MAGEC1F	492	TTCTCCTGAGAGCGACGACAC	Hs00488640_CE
MAGEC1 R		CGGCTCACAGGAATCTGGAGT	
TOX3 F	512	TTCAGATGTGGTGTGCCTTTTAAAT	Hs00155834_CE
TOX3 R		GCTATCTGAACTCCTGAAGCCCTAA	
THSD1F	508	TGGCACCATCACCAGTTTGTATCC	Hs00132739_CE
THSD1R		CAACCAGTCCCAGGGAACACTA	
MORN2 F	544	AAAGCAAAGCTTGAAAGTAGAGGAT	Hs00193190_CE
MORN2 R		GGACACACAAGCACAACTAGAAA	
PTCRA F	509	GAACCCTAGCCTACAACACAATGCT	Hs00274873_CE
PTCRA R		TGGACACCCTTCATGCCTTTGTG	

тив, были характерны для группы пациентов с неоптимальным ответом.

Верификация полученных результатов

Результаты секвенирования по Сэнгеру подтвердили данные, полученные с помощью экзомного секвенирования. Только в одном образце больного с неоптимальным ответом на терапию по данным секвенирования по Сэнгеру был обнаружен вариант rs10653661 в гене *TOX3* в гетерозиготном состоянии, тогда как при экзомном анализе альтернативный аллель обнаружен не был из-за плохого прочтения (покрытия) данного региона в образце.

Валидация полученных результатов

Для проверки прогностической ценности отобранных вариантов были сформированы две группы пациентов с ХМЛ: с оптимальным ответом ($n = 32$) и с неоптимальным ответом ($n = 30$). Оценку ответа на терапию ИТК проводили на сроке 6 мес от момента начала терапии, в соответствии с рекомендациями ELN 2013. Генотипирование по 7 отобранным генетическим вариантам проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру (табл. 2). Как видно из таблицы, частоты генотипов и аллелей по изучаемым локусам не различаются между группами пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК. Для генов *ANKRD35* ($p = 0,16$), *MORN2* ($p = 0,48$) и *PTCRA* ($p = 0,88$) частота генотипа (аллеля), предположительно связан-

ного с ответом на терапию, выше в группе пациентов с оптимальным ответом, а для генов *DNAH9* ($p = 0,33$), *MAGEC1* ($p = 0,68$), *TOX3* ($p = 0,87$), *THSD1* ($p = 0,38$), наоборот, аллель, предположительно связанный с реагированием на терапию, представлен чаще в группе пациентов с неоптимальным ответом.

Анализ ассоциаций комбинаций генотипов и гаплотипов с ответом на терапию ИТК

С целью проверки возможного наличия связи между ответом на терапию и комбинациями генотипов в нескольких генах была проведена оценка ассоциации специфических сочетаний генотипов по выбранным генам с ответом на терапию ИТК. Всего было выявлено 30 комбинаций генотипов среди 62 обследованных пациентов. В группе с оптимальным ответом на терапию было обнаружено 17 различных сочетаний, тогда как в группе с неоптимальным ответом — 21; 8 из них были общими и встречались в обеих группах. В связи с тем, что число комбинаций генотипов сопоставимо с числом пациентов в группах, поиск ассоциаций невозможен.

Следующим этапом был анализ ассоциации ответа на терапию с гаплотипами (различными сочетаниями аллелей в выбранных генах). С помощью пакета R Haplo.stats была построена бинарная логистическая регрессия и посчитано отношение шансов для оценки связи гаплотипов и ответа на терапию. Поскольку истинное сцепление аллелей разных генов неизвестно, то гаплотипы были оценены косвенным образом.

Таблица 2. Сравнение частот генотипов и аллелей ANKRD35 (rs11579366), DNAN9 (rs1990236), MAGEC1 (rs176037), TOX3 (rs10653661), THSD1 (rs3803264), MORN2 (rs3099950), PTCRA (rs9471966) в группах больных ХМЛ с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК

Table 2. Comparison of genotypes and alleles frequencies ANKRD35 (rs11579366), DNAN9 (rs1990236), MAGEC1 (rs176037), TOX3 (rs10653661), THSD1 (rs3803264), MORN2 (rs3099950), PTCRA (rs9471966) in CML patients with optimal and non-optimal response to TKI therapy

Хромосома: позиция Chromosome: position	Ген Gene	№dbSNP141	Реф. аллель Reference allele	Альт. аллель Alter- native allele	Группа пациентов с оптимальным ответом (n = 32) Group of patients with optimal response (n = 32)				Группа пациентов с неоптимальным ответом (n = 30) Group of patients with non- optimal response (n = 30)				p	Группа пациентов с оптимальным ответом (n = 32) Group of patients with optimal response (n = 32)		Группа пациентов с неоптимальным ответом (n = 30) Group of patients with non-optimal response (n = 30)	
					Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %		Генотип, % geno- types, %			Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %		
					Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Генотип, % geno- types, %	Аллель, % Allele, %	Аллель, % Allele, %					
1:145562293	ANKRD35	rs11579366	G	C	G/G, 9	G/C, 50	C/C, 41	G/G, 29	G/C, 39	C/C, 32	C/C, 32	0,16	G, 34	C, 66	G, 48	C, 52	
17:11865462	DNAN9	rs1990236	G	A	G/G, 72	G/A, 22	A/A, 6	G/G, 57	G/A, 39	A/A, 4	A/A, 4	0,33	G, 83	A, 17	G, 77	A, 23	
X:140993642	MAGEC1	rs176037	C	T	C/C, 53	C/T, 20	T/T, 27	C/C, 41	C/T, 32	T/T, 27	T/T, 27	0,68	C, 63	T, 37	C, 57	T, 43	
16:52472421	TOX3	rs10653661	A	ATTCT	A/A, 22	A/ ATTCT, 56	ATTCT/ ATTCT, 22	A/A, 23	A/ ATTCT, 50	ATTCT/ ATTCT, 27	ATTCT/ ATTCT, 27	0,87	A, 50	ATTCT, 50	A, 48	ATTCT, 52	
13:52971893	THSD1	rs3803264	G	A	G/G, 6	G/A, 44	A/A, 50	G/G, 11,5	G/A, 27	A/A, 61	A/A, 61	0,38	G, 28	A, 72	G, 25	A, 75	
2:39109558	MORN2	rs3099950	G	A	G/G, 69	G/A, 31	A/A, 0	G/G, 77	G/A, 23	A/A, 0	A/A, 0	0,48	G, 84	A, 16	G, 77	A, 23	
6:42891022	PTCRA	rs9471966	G	A	G/G, 56	G/A, 38	A/A, 6	G/G, 50	G/A, 43	A/A, 7	A/A, 7	0,88	G, 75	A, 25	G, 72	A, 28	
	Генотип или аллель соответствует генотипу пациентов с неоптимальным ответом на терапию ИТК The genotype or allele corresponds to the genotype of patients with a non-optimal response to TKI therapy																
	Генотип или аллель соответствует генотипу пациентов с оптимальным ответом на терапию ИТК The genotype or allele corresponds to the genotype of patients with the optimal response to TKI therapy																
	Генотип с неопределенным значением The genotype with undetermined value																

В анализ были взяты только те гаплотипы, которые встретились 3 раза и более. Таким образом, общее число анализируемых гаплотипов составило 26. В результате анализа не удалось обнаружить достоверной ассоциации какого-либо из представленных гаплотипов с ответом на терапию ($p = 0,94$). Учет поправки на пол и возраст также не изменил результата ($p = 0,97$). Анализ отношения шансов не позволил выявить достоверной ассоциации гаплотипов и ответа на терапию ($p = 0,87$). Однако было выявлено сочетание генотипов, встречающееся у четверых пациентов из группы с оптимальным ответом на терапию и ни разу не встретившееся в группе пациентов с неоптимальным ответом: *ANKRD35*(C/C) *DNAH9*(G/G) *TOX3*(A/ATTTCT) *THSD1*(A/G) *MORN2*(G/A) *PTCRA*(G/A), также был обнаружен один гаплотип, встретившийся только в группе с оптимальным ответом *ANKRD35*(C) *DNAH9*(A) *TOX3*(A) *THSD1*(A) *MORN2*(G) *PTCRA*(A).

Анализ ассоциации между количеством генетических вариантов и ответом на терапию ИТК

Для поиска у пациентов с разным ответом на терапию ИТК возможных неспецифических различий, проявляющихся в различном числе мутаций в разных генах, был проведен полноэкзомный анализ ассоциации числа генных вариантов с ответом на терапию ИТК. Было проанализировано количество вариантов во всех генах у 4 пациентов с оптимальным ответом на терапию и 4 пациентов с неоптимальным ответом. Из анализа были исключены делеции и вставки в гомополимерных районах в связи с высокой частотой ложных находок, что является ограничением технологии полупроводникового высокопроизводительного секвенирования. Также не учитывали варианты в высокогомологичных участках, например в псевдогенах, так как для таких областей характерны ошибки картирования. Варианты, зарегистрированные в таких областях, требуют исключительно индивидуальной ручной проверки и не могут быть корректно учтены при анализе больших объемов данных. Для каждого гена были подсчитаны суммарные количества вариантов для пациентов, ответивших на лечение и не достигших оптимального ответа. Всего таким образом проанализировано 9000 генов, 75 из которых имели статистически достоверное различие в количестве вариантов, у пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом ($p < 0,05$). В большинстве генов (49) число вариантов преобладало в группе оптимально ответивших на терапию. Анализ обогащения данными генами с помощью Enrichr [29, 30] показал их вовлеченность в сигнальный путь RAS. Кроме того, многие из этих генов связаны с развитием рака почки, рака легкого и молочной железы [31].

Обсуждение

На сегодняшний день опубликовано несколько работ разных научных коллективов, описывающих попытки

обнаружения генетических вариантов, отвечающих за прогрессию и возникновение ХМЛ, при помощи массового параллельного секвенирования. У. Huang и соавт. была проведена работа по поиску вариантов, отвечающих за прогрессию заболевания. В исследовании приведены результаты полноэкзомного секвенирования одного пациента на разных стадиях заболевания: в фазе акселерации и в фазе бластного криза. По результатам секвенирования было выявлено 9 вариантов в 9 генах: *ENOI*, *COL3A1*, *AFP*, *SERPINA1*, *MGAT5B*, *ZNF208*, *ANO5*, *GATA2* и *MAX*, которые, по мнению авторов, могут играть важную роль в процессе прогрессии ХМЛ от фазы акселерации до бластного криза, а также помогут улучшить понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе прогрессии заболевания, и облегчить обнаружение потенциальных мишеней для лекарственных средств [32]. В исследовании S. Sabri и соавт. по обнаружению специфических для ХМЛ генетических изменений на молекулярном уровне было проведено экзомное секвенирование 4 пациентов с ХМЛ, однако не удалось выявить вариантов, ответственных за возникновение и развитие заболевания. Авторы указывают на две вероятные причины: патогенез заболевания и технические ограничения метода [33]. Ни в одной из этих работ не приводятся результаты верификации найденных вариантов.

Для поиска новых прогностических маркеров эффективности терапии ХМЛ ИТК в настоящей работе проведено полноэкзомное секвенирование пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК. Поиск возможных маркеров проводили, проверяя две гипотезы: наличие сильно ассоциированных, патогенетически связанных с развитием ХМЛ, вариантов и генов с этими вариантами, а также наличие генов с большим количеством функциональных вариантов в одной из групп больных ХМЛ. Первая гипотеза предполагает значительный генетический компонент в развитии ответа на терапию ИТК и функциональную связь между эффективностью и потенциальными маркерами, поэтому поиск таких маркеров строили на предположении, что искомый вариант должен встречаться у всех (или почти всех) пациентов одной группы и отсутствовать у пациентов другой, обладать возможностью менять функцию гена, а сам ген (или искомый вариант) должен быть связан с патогенезом опухолей. Исходя из этих предположений и с учетом данных dbSNP, Gene Cards, OMIM для дальнейшего исследования возможной предиктивной значимости были выбраны 7 вариантов в 7 генах (*ANKRD35*-rs11579366, *DNAH9*-rs1990236, *MAGEC1*-rs176037, *TOX3*-rs10653661, *THSD1*-rs3803264, *MORN2*-rs3099950, *PTCRA*-rs9471966). Гены *ANKRD35*, *DNAH9*, *MAGEC1*, *TOX3* ассоциированы с онкологическими заболеваниями; гены *THSD1*, *MORN2*, *PTCRA* участвуют в сигнальных путях при онкологических заболеваниях. Более подробно процедура выбора и функции генов описаны ранее [26].

Верификация отобранных вариантов секвенированием по Сэнгеру показала высокую точность метода полноэкзомного секвенирования — 98,2%. Единственное расхождение обусловлено биоинформатическими особенностями анализа больших объемов данных и может быть легко скорректировано изменением настроек автоматического распознавания генотипов и введением дополнительной проверки на качество покрытия каждого нуклеотида. Тем не менее секвенирование по Сэнгеру рекомендуется проводить как независимый и точный метод проверки находок высокопроизводительного секвенирования. На сегодняшний день секвенирование по Сэнгеру является «золотым стандартом» верификации данных, полученных методом секвенирования следующего поколения.

Несмотря на то что поиск возможных прогностических факторов был основан на функциональном анализе потенциальных кандидатов, прогностическую ценность отобранных вариантов необходимо было проверить на независимой выборке больных ХМЛ. Валидацию провели на 2 выборках пациентов, отобранных по тем же критериям, что и пациенты для экзомного анализа: больные ХМЛ с оптимальным ($n = 32$) и неоптимальным ответом на терапию ($n = 30$). Результаты валидации показали, что частоты генотипов и аллелей по изучаемым локусам не имеют статистически достоверных различий между группами пациентов с оптимальным и неоптимальным ответом на терапию ИТК: *ANKRD35*-rs11579366 ($p = 0,16$), *DNAH9*-rs1990236 ($p = 0,33$), *MAGEC1*-rs176037 ($p = 0,68$), *TOX3*-rs10653661 ($p = 0,87$), *THSD1*-rs3803264 ($p = 0,38$), *MORN2*-rs3099950 ($p = 0,48$), *PTCRA*-rs9471966 ($p = 0,88$). Однако, как было показано выше, частоты генотипов и аллелей, предположительно связанных с ответом на терапию, для генов *ANRRD35*, *MORN2* и *PTCRA* действительно выше в группе пациентов с оптимальным ответом, а для генов *DNAH9*, *MAGEC1*, *TOX3*, *THSD1*, наоборот, аллель, предположительно связанный с реагированием на терапию, представлен выше в группе пациентов с неоптимальным ответом, хотя внутригрупповое распределение частот аллелей по выбранным генам не различается между группами.

Нами было исследовано наличие возможных ассоциаций каких-либо комбинаций генотипов по исследованным вариантам с ответом на терапию. В результате проведенного анализа удалось выявить одно сочетание генотипов, которое встречалось у четверых пациентов с оптимальным ответом и не встречалось у пациентов с неоптимальным ответом. Несмотря на то что случайное обогащение группы одним из сочетаний генотипов маловероятно (общее число комбинаций 32), подтвердить или опровергнуть роль данной комбинации не представляется возможным на имеющейся группе пациентов. Также был выявлен гаплотип, характерный только для группы оптимального ответа. Не удалось обнаружить статистически достоверных ассоциаций различных сочетаний генотипов и гаплотипов с эф-

фективностью терапии ИТК ($p = 0,93647$). По всей видимости, размер доступных для анализа выборок не позволяет сделать заключение о наличии ассоциации каких-либо сочетаний генотипов или гаплотипов с ответом на терапию.

Отрицательные результаты, по-видимому, объясняются тем, что при полноэкзомном исследовании в каждом образце обнаруживают десятки тысяч вариантов, и даже после фильтрации по функциональным критериям их остается достаточно много для исключения возможности обнаружения случайных различий между тестируемыми выборками. По этой причине такие находки должны быть проверены на независимых выборках.

Варианты, которые могут влиять на различную эффективность терапии ИТК при ХМЛ, могут быть нейтральными и не приводить к развитию какого бы то ни было патологического процесса в организме у людей, не страдающих ХМЛ. Общепопуляционная частота этих вариантов может быть достаточно высокой, что, конечно, затрудняет поиски и определение их значимости в развитии резистентности к терапии.

Вторая гипотеза при поиске прогностических маркеров эффективности терапии ИТК основана, напротив, на идее сложного полигенного характера причин различий в ответе на терапию. Мы предположили, что пациенты с разной эффективностью ответа могут отличаться совокупной вариативностью генов, вовлеченных в патогенез ХМЛ и механизмы терапевтического действия ИТК. То есть различное количество вариантов, достоверно различающееся между группами в отдельных генах, может оказывать совокупный эффект на развитие или отсутствие оптимального ответа на терапию. При этом полностью эти механизмы остаются не изученными и сам перечень генов неизвестен. Для проверки этой гипотезы был проведен подсчет общего числа вариантов в каждом гене. Нами были проанализированы 9000 генов, среди которых 75 генов имеют статистически достоверные различия в количестве вариантов между группами ($p < 0,05$). Анализ обогащения, выполненный для 49 генов, число вариантов в которых было больше среди оптимально ответивших на терапию, показал их связь с RAS сигнальным путем. RAS является ГТФ-азой, вовлеченной в регуляцию клеточной адгезии и межклеточных контактов. Интересно отметить, что среди эффекторов RAS известны RAS и KRAS, участвующие в антигенной активации Т-лимфоцитов и обеспечении их адгезионной функции [34]. Кроме того, именно белки семейства KRAS вовлечены в BCR-ABL-опосредованное ингибирование JAK сигнального пути, отвечающего за антипролиферативный эффект [35]. Все это в совокупности является косвенным указанием на роль иммунной системы в ответе больных ХМЛ на таргетную терапию. А выявление связи многих из этих генов с развитием других злокачественных новообразований (рак почки, легкого и молочной железы) указывает на возможность существования BCR-ABL-независимых

факторов, влияющих на патогенез ХМЛ. При этом избытие патогенетических путей, генов и возможных полиморфизмов в них указывает на многофакторную природу ответа на терапию, что, безусловно, осложняет поиск прогностических факторов и требует развития персонализированных терапевтических подходов.

В настоящее время проведено множество исследований, в которых изучается проблема резистентности к терапии ИТК и прогрессии ХМЛ, однако, по нашим данным, исследований по оценке глубины ответа и различной эффективности терапии ИТК у больных ХМЛ при помощи полноэкзомного анализа в мире ранее никем не проводилось. В результате выполненного анализа удалось выявить ОНВ в генах, участвующих в различных онкологических процессах, в том числе гемобластозах. Однако при проверке данных находок на группах пациентов ассоциации вариантов с глубиной ответа на терапию выявлено не было.

Поиск отдельных вариантов, ответственных за возникновение, развитие резистентности и прогрессию заболевания, — очень сложная задача. К решению этих проблем стоит подходить с использованием комплекса современных технологий, таких как полноэкзомное и полногеномное секвенирование, хромосомный микроматричный анализ, исследование транскриптома и микроРНК. Подобные исследования следует проводить на больших выборках пациентов. Такой подход может дать более полную и ясную картину развития патологического процесса в организме людей, страдающих ХМЛ.

Информация об авторах

Адилгереева Эльмира Пайзутдиновна (Adilgerееva E. P.), научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, elmira5376@gmail.com

Лавров Александр Вячеславович (Lavrov A. V.), к. м. н., заведующий лабораторией мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, доцент кафедры молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, avlavrov@yandex.ru

Смирнихина Светлана Анатольевна (Smirnikhina S. A.), к. м. н., ведущий научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, smirnikhinas@gmail.com

Челышева Екатерина Юрьевна (Chelysheva E. Y.), к. м. н., врач-гематолог, старший научный сотрудник отделения химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, denve@bk.ru

Шухов Олег Александрович (Shukhov O. A.), к. м. н., врач-гематолог, научный сотрудник отделения химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, shuhov@list.ru

Цаур Григорий Анатольевич (Tsaur G. A.), д. м. н., заведующий лабораторией молекулярной биологии, иммунофенотипирования и патоморфологии отдела детской онкологии и гематологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1» Министерства здравоохранения Свердловской области, 620149, г. Екатеринбург, Россия, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия, врач клинической лабораторной диагностики лаборатории терапии онко-гематологических заболеваний ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», 620026, Екатеринбург, Россия, tsaur@mail.ru

Кочергин-Никитский Константин Сергеевич (Kochergin-Nikitsky K. S.), к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, KochNik.KS@gmail.com

Якушина Валентина Дмитриевна (Yakushina V. D.), к. м. н., старший научный сотрудник лаборатории мутагенеза ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115522, Москва, Россия, vdyakushina@gmail.com

Морданов Сергей Викторович (Mordanov S. V.), к. м. н., заведующий лабораторией медицинской генетики, ассистент кафедры по курсу генетики и лабораторной генетики, ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, 344022, г. Ростов-на-Дону, Россия, labmed@mail.ru

Туркина Анна Григорьевна (Turkina A. G.), д. м. н., профессор, врач-гематолог, заведующая научно-консультативным отделением химиотерапии миело-пролиферативных заболеваний ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия, turkianna@yandex.ru

Куцев Сергей Иванович (Kutsev S. I.), д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН, директор ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, Россия, зав. кафедрой молекулярной и клеточной генетики ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия, kutsev@mail.ru

Литература

- Куликов С. М., Виноградова О. Ю., Челышева Е. Ю. и др. Заболеваемость хроническим миелолейкозом в 6 регионах России по данным популяционного исследования 2009–2012 гг. Терапевтический архив 2014; 86(7):24–30.
 - Волкова С. А., Самойлова О. С., Самарина И. Н. и др. Эффективность иматиниба и прогностическая значимость неудачи лечения по критериям ELN после 18 месяцев амбулаторной терапии хронического миелолейкоза. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2011; 4(2):146–151.
 - Куцев С. И. Эволюция мониторинга лечения хронического миелоидного лейкоза. Гематология и трансфузиология 2009; 54(4):36–44.
- Остальные источники см. в References.

References

- Kulikov S. M., Vinogradova O. Iu., Chelysheva E. Iu. et al. Incidence of chronic myeloid leukemia in 6 regions of Russia according to the data

- of the 2009–2012 population-based study. *Terapevticheskiy arkhiv* 2014; 86(7):24–30 (in Russian).
2. 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):1336–1343.
3. Jabbour E., Kantarjian H., Cortes J. Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: an evolving treatment paradigm. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2015; 15(6):323–334.
4. Volkova S. A., Samojlova O. S., Samarina I. N. et al. Efficiency of imatinib and the prognostic importance of treatment failure according to ELN criteria after 18 months in out-patient therapy of chronic myeloid leukemia. *Klinicheskaja onkogematologija. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaja praktika* 2011; 4(2):146–151 (in Russian).
5. Bixby D., Talpaz M. Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2011; 25(1):7–22.
6. Kutsev S. I., Evolution of therapy monitoring of chronic myeloid leukemia. *Gematologija i transfuziologija* 2009; 54(4):36–44 (in Russian).
7. Hamad A., Sahli Z., E Sabban M. et al. Emerging therapeutic strategies for targeting chronic myeloid leukemia stem cells. *Stem Cells International* 2013; 2013:724360. doi: 10.1155/2013/724360.
8. Marin D., Ibrahim A. R., Goldman J. M. European Treatment and Outcome Study (EUTOS) score for chronic myeloid leukemia still requires more confirmation. *Clin Oncol* 2011; 29(29):3944–3945.
9. Yamamoto E., Fujisawa S., Hagihara M. et al. European Treatment and Outcome Study score does not predict imatinib treatment response and outcome in chronic myeloid leukemia patients. *Cancer Sci* 2014; 105(1):105–109.
10. Gromicho M., Magalhães M., Torres F. et al. Instability of mRNA expression signatures of drug transporters in chronic myeloid leukemia patients resistant to imatinib. *Oncology Reports* 2013; 29(2):741–750.
11. de Lima L. T., Vivona D., Bueno C. T. et al. Reduced ABCG2 and increased SLC22A1 mRNA expression are associated with imatinib response in chronic myeloid leukemia. *Med Oncol*. 2014; 31(3):851.
12. Šmahelová J., Kaštánková I., Poláková K. M. et al. Expression of genes encoding centrosomal proteins and the humoral response against these proteins in chronic myeloid leukemia. *Oncology Reports* 2017; 37(1):547–554.
13. Ben Hassine I., Gharbi H., Soltani I. et al. hOCT1 gene expression predict for optimal response to imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 2017; 79(4):737–745.
14. Harrach S., Schmidt-Lauber C., Pap T. et al. MATE1 regulates cellular uptake and sensitivity to imatinib in CML patients. *Blood Cancer J.* 2016; 6(9):e470.
15. Frank O., Brors B., Fabarius A. et al. Gene expression signature of primary imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 2006; 20(8):1400–1407.
16. San Jose-Eneriz E., Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A. et al. Micro RNA expression profiling in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients without clinically significant ABL1-mutations. *Mol Cancer*. 2009; 8:69.
17. Angelini S., Soverini S., Ravegnini G. et al. Association between imatinib transporters and metabolizing enzymes genotype and response in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients receiving imatinib therapy. *Haematologica* 2013; 98(2):193–200.
18. Bourgne C., Janel A., Berger J. et al. Phosphorylation of spleen tyrosine kinase at tyrosine 348 (pSyk³⁴⁸) may be a marker of advanced phase of Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Leukemia Research* 2015; 39(3):329–334.
19. Barreiro L., Will B., Bartholdy B. et al. Overexpression of IL-1 receptor accessory protein in stem and progenitor cells and outcome correlation in AML and MDS. *Blood* 2012; 120(6):1290–1298.
20. Pellicano F., Sinclair A., Holyoake T. L. In search of CML stem cells' deadly weakness. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2011; 6(2):82–87.
21. Zhao K., Yin L. L., Zhao D. M. et al. IL1RAP as a surface marker for leukemia stem cells is related to clinical phase of chronic myeloid leukemia patients. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12):4787–4798.
22. Zheng Q., Cao J., Hamad N. et al. Single nucleotide polymorphisms in apoptosis pathway are associated with response to imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14:82; doi: 10.1186/s12967-016-0837-5.
23. Kotagama K., Chang Y., Mangone M. miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug Development Research* 2015; 76(6):278–285.
24. Nievergall E., Reynolds J., Kok C. H. et al. TGF- α and IL-6 plasma levels selectively identify CML patients who fail to achieve an early molecular response or progress in the first year of therapy. *Leukemia* 2016; 30(6):1263–1272.
25. Baccarani M., Deininger M. W., Rost G. et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013; 122(6):872–884.
26. Lavrov A. V., Chelysheva E. Y., Smirnikhina S. A. et al. Frequent variations in cancer-related genes may play prognostic role in treatment of patients with chronic myeloid leukemia. *BMC Genetics* 2016; 17(1):14. doi: 10.1186/s12863-015-0308-7.
27. Smirnikhina S. A., Lavrov A. V., Chelysheva E. Y. et al. Whole-exome sequencing reveals potential molecular predictors of relapse after discontinuation of the targeted therapy in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia Lymphoma* 2016; 57(7):1669–1676.
28. Lake S. L., Lyon H., Tantisira K. et al. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Hum Hered* 2003; 55(1):56–65.
29. Chen E. Y., Tan C. M., Kou Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 2013; 14:128; doi: 10.1186/1471-2105-14-12.
30. Kuleshov M. V., Jones M. R., Rouillard A. D. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* 2016; 44(W1):W90-7; doi: 10.1093/nar/gkw377.
31. Pletscher-Frankild S., Pallegà A., Tsafou K. et al. DISEASES: Text mining and data integration of disease–gene associations. *Methods* 2015; 74:83–89; doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.020.
32. Huang Y., Zheng J., Hu J. D. et al. Discovery of somatic mutations in the progression of chronic myeloid leukemia by whole-exome sequencing. *Genetics and Molecular Research* 2014; 13(1):945–953.
33. Sabri S., Keyhani M., Akbari M.T. Whole exome sequencing of chronic myeloid leukemia patients. *Iran J Public Health*. 2016; 45(3):346–352.
34. Raaijmakers J. H., Bos J. L. Specificity in Ras and Rap signaling. *J Biol Chem*. 2009; 284(17):10995–10999.
35. Bhattacharya S., Zheng H., Tzimas C. et al. Bcr-abl signals to desensitize chronic myeloid leukemia cells to IFN α via accelerating the degradation of its receptor. *Blood* 2011; 118(15):4179–4187.