

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Прогностическое значение результатов секвенирования нового поколения у пациентов с миелодиспластическим синдромом

Prognostic Value of Next-Generation Sequencing Data in Patients with Myelodysplastic Syndrome

Н.Ю. Цветков¹, Е.В. Морозова¹, И.М. Бархатов¹, И.С. Моисеев¹, М.В. Барабанщикова¹, А.В. Тишков², Д.С. Буг², Н.В. Петухова², Е.А. Измайлова¹, С.Н. Бондаренко¹, Б.В. Афанасьев¹

NYu Tsvetkov¹, EV Morozova¹, IM Barkhatov¹, IS Moiseev¹, MV Barabanshchikova¹, AV Tishkov², DS Bug², NV Petukhova², EA Izmailova¹, SN Bondarenko¹, BV Afanasyev¹

¹НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

¹RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

²Центр биоинформатики научно-образовательного института биомедицины, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

²Research Center for Bioinformatics, Academic Institute of Biomedicine, IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

РЕФЕРАТ

Цель. Оценить прогностическое значение мутаций генов метилирования ДНК и генов *SF3B1*, *TP53* у пациентов с миелодиспластическим синдромом (МДС).

Материалы и методы. В исследование включено 35 пациентов с МДС: с мультилинейной дисплазией — 2, с избытком бластов-I — 13, с избытком бластов-II — 19, с 5q-синдромом — 1 (критерии ВОЗ 2016 г.). У 30 больных был первичный МДС, у 5 — после предшествующей химио- или лучевой терапии. Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) выполнена 25 пациентам. Согласно IPSS-R, 1 пациент соответствовал группе низкого риска, 5 — промежуточного, 17 — высокого, 12 — очень высокого. Лечение гипометилирующими препаратами получали 28 больных. Медиана возраста пациентов составила 49 лет (диапазон 18–80 лет). С помощью секвенирования нового поколения определяли соматические мутации в генах метилирования ДНК (*TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *DNMT3A*), а также в генах *SF3B1*, *TP53* и *RUNX1*. Время до прогрессирования (ВДП) рассчитывалось как время от постановки диагноза до трансформации в острый лейкоз. Конкурирующим риском считалась смерть по причинам, связанным с аллоТГСК или проводимой противоопухолевой терапией.

Результаты. У 37 % пациентов при анализе генов метилирования мутаций не выявлено, у 40 % пациентов обнаружена мутация только в 1 из генов, у 23 % — в 2 генах и более. Мутации *SF3B1* наблюдались у 23 % больных, *TP53* — у 11 %. Медиана времени наблюдения составила 25 мес. (диапазон 5–116 мес.). В однофакторном анализе не получено значимых различий в общей выживаемости в зависимости от мутационного статуса. Медиана ВДП

ABSTRACT

Aim. To assess the prognostic value of the mutation of DNA methylation genes, *SF3B1*, and *TP53* in patients with myelodysplastic syndrome (MDS).

Materials & Methods. Out of 35 MDS patients included into the trial 2 had multilineage dysplasia, 13 with excess blasts-I, 19 with excess blasts-II, and 1 had 5q-syndrome (criteria WHO 2016). In 30 patients primary MDS was identified, in 5 patients it was detected after prior chemo- or radiotherapy. 25 patients received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). According to IPSS-R there were 1 low-risk, 5 intermediate risk, 17 high-risk, and 12 very high-risk patients. Hypomethylating agents were administered to 28 patients. Median age of patients was 49 years (range 18–80 years). Next-generation sequencing was applied for identifying somatic mutations in DNA methylation genes (*TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, and *DNMT3A*) as well as in *SF3B1*, *TP53*, and *RUNX1*. Time to progression (TTP) was defined as the time from the initial diagnosis to the date of acute leukemia diagnosis. Allo-HSCT- or antitumor therapy-associated death was considered as competing risk.

Results. Methylation gene analysis showed no mutation in 37 % of patients, in 40 % mutation was detected only in one of the genes, in 23 % mutation was identified in ≥ 2 genes. *SF3B1* mutations were reported in 23 % and *TP53* in 11 % of patients. Median follow-up was 25 months (range 5–116 months). Univariate analysis showed no considerable differences in overall survival depending on mutation status. Median TTP in the group with allo-HSCT was not achieved, in the group without allo-HSCT it was 6 months ($p = 0.0001$). In patients with no *SF3B1* mutation median TTP was 35 months, in patients with this mutation it was not achieved ($p = 0.043$).

в группе с аллоТГСК не достигнута, а без аллоТГСК она составила 6 мес. ($p = 0,0001$). Этот же показатель при отсутствии мутации в гене *SF3B1* равен 35 мес., при ее наличии медиана ВДП не достигнута ($p = 0,043$). При наличии ≥ 2 мутаций в генах метилирования медиана ВДП была 12 мес., в других случаях она не достигнута ($p = 0,024$). При наличии мутации в гене *TP53* медиана ВДП составила 6 мес., при ее отсутствии — 43 мес. ($p = 0,023$). В многофакторном анализе наличие мутации в гене *TP53* или ≥ 2 мутаций в генах метилирования сохранило свое неблагоприятное прогностическое значение в отношении ВДП вне зависимости от проведенного лекарственного лечения или аллоТГСК (отношение рисков 7,1; 95%-й доверительный интервал 2,6–19,6; $p = 0,0001$).

Заключение. Изучение молекулярных маркеров позволяет получить дополнительную информацию о прогнозе при МДС. Требуются дальнейшие исследования для определения прогностической роли молекулярных маркеров в клинической практике, что даст возможность индивидуализировать подходы к терапии МДС.

Ключевые слова: миелодиспластический синдром, молекулярные маркеры, мутации, секвенирование нового поколения, прогноз.

Получено: 27 декабря 2019 г.

Принято в печать: 25 марта 2020 г.

Для переписки: Николай Юрьевич Цветков, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; тел.: +7(911)233-48-77, +7(812)338-62-27; e-mail: nikolai.tcvetkov@yandex.ru

Для цитирования: Цветков Н.Ю., Морозова Е.В., Бархатов И.М. и др. Прогностическое значение результатов секвенирования нового поколения у пациентов с миелодиспластическим синдромом. Клиническая онкогематология. 2020;13(2):170–5.

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-170-175

With ≥ 2 mutations in methylation genes median TTP was 12 months, in other cases it was not achieved ($p = 0.024$). In cases of *TP53* mutation median TTP was 6 months, in cases without this mutation it was 43 months ($p = 0.023$). Multivariate analysis confirmed unfavorable prognostic value of *TP53* mutation or ≥ 2 mutations in methylation genes in terms of TTP regardless of the drug treatment or allo-HSCT performed (hazard ratio 7.1; 95% confidence interval 2.6–19.6; $p = 0.0001$).

Conclusion. The analysis of molecular markers yields additional data concerning the MDS prognosis. Further research is required to determine the prognostic value of molecular markers in clinical practice which will enable to individualize approaches to MDS treatment.

Keywords: myelodysplastic syndrome, molecular markers, mutations, next-generation sequencing, prognosis.

Received: December 27, 2019

Accepted: March 25, 2020

For correspondence: Nikolai Yur'evich Tsvetkov, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; Tel.: +7(911)233-48-77, +7(812)338-62-27; e-mail: nikolai.tcvetkov@yandex.ru

For citation: Tsvetkov NYu, Morozova EV, Barkhatov IM, et al. Prognostic Value of Next-Generation Sequencing Data in Patients with Myelodysplastic Syndrome. Clinical oncohematology. 2020;13(2):170–5 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2020-13-2-170-175

ВВЕДЕНИЕ

Миелодиспластический синдром (МДС) — гетерогенная группа клональных заболеваний с поражением гемопоэтической стволовой клетки крови, в основе которых лежат соматические мутации различных генов и/или эпигенетическая регуляция, индуцированная изменениями в микроокружении, а также нарушения в иммунной системе противоопухолевого надзора. У многих пациентов развитию МДС предшествует период неклональных или клональных цитопений неясного значения, что обусловлено появлением соматических мутаций, связанных с возрастом и повышенной вероятностью развития лейкоза. Результатом этого является увеличение пролиферации, нарастание неэффективности клонального и угнетение нормального гемопоэза и, на конечных этапах, нарушение дифференцировки, что приводит к накоплению бластных клеток и риску трансформации в острый лейкоз.

Более чем в половине наблюдений возраст на момент постановки диагноза МДС превышает 70 лет [1]. При этом проявления заболевания варьируют от случайно выявленной бессимптомной цитопении

в клиническом анализе крови до быстро прогрессирующего состояния с тяжелым соматическим статусом и высоким числом бластных клеток в периферической крови и костном мозге. Отдельную группу составляют пациенты с МДС, связанным с врожденными состояниями недостаточности костного мозга, при которых дебют заболевания развивается в значительно более раннем возрасте. В соответствии с этим варианты лечения МДС варьируют от динамического наблюдения до системной противоопухолевой терапии с ранним рассмотрением вопроса о возможности выполнения трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК). На данный момент для определения группы риска пациента и выбора наиболее подходящего варианта лечения разработаны прогностические шкалы IPSS [2], WPSS [3], IPSS-R [4] и др. Большинство из них интегрирует информацию о степени выраженности цитопении, уровне бластных клеток и выявленных цитогенетических аномалиях с последующим выделением групп низкого, промежуточного и высокого риска. Несмотря на значительную помощь в клинической практике, предсказательная сила существующих прогностических шкал весьма ограничена. Особенно это актуально в группе па-

циентов с промежуточным риском и с нормальным кариотипом, доля которых составляет до 50 % общей популяции больных МДС [5]. В связи с этим необходим поиск других факторов прогноза, позволяющих не только дополнить, но и, по возможности, модифицировать шкалы, используемые в настоящее время, с целью более персонализированной терапии гетерогенной популяции пациентов с МДС.

В последнее время при МДС описано более 40 генов, в которых потенциально могут возникать соматические мутации в процессе клональной эволюции. При этом более 80 % пациентов с МДС имеют хотя бы одну такую мутацию [6]. Большая часть выявленных мутаций оказалась прогностически значимой, что может помочь в разработке новых инструментов определения прогноза. Для ранних этапов развития МДС характерно наличие мутаций в генах эпигеномной регуляции (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2* и др.) и сплайсинга (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2* и др.), в то время как по мере накопления бластных клеток и прогрессирования увеличивается частота возникновения мутаций в генах протеинкиназ и системах внутриклеточного сигналинга (*FLT3*, *RAS* и др.), а также нарушения апоптоза (*TP53*) [7]. На данный момент происходит накопление информации о прогностической роли различных мутаций, что пока не привело к разработке рабочих вариантов систем определения прогноза, превосходящих существующие.

Цель настоящей работы — одноцентровой ретроспективный анализ частоты возникновения и прогностического значения мутаций генов *TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *TP53* у пациентов с МДС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 35 пациентов, которые проходили лечение в НИИДОГиТ им. Р.М. Горбачевой (табл. 1). МДС с мультилинейной дисплазией наблюдался у 2 пациентов, с избытком бластов-I — у 13, с избытком бластов-II — у 19, с 5q-синдромом — у 1. У 30 пациентов был первичный МДС, у 5 — после предшествующей химио- или лучевой терапии. При стратификации риска по Международной прогностической шкале IPSS-R 1 пациент соответствовал группе низкого риска, 5 — промежуточного, 17 — высокого, 12 — очень высокого.

Медиана возраста пациентов составила 49 лет (диапазон 18–80 лет). 14 больных относились к группе низкого цитогенетического риска по IPSS-R, 3 — промежуточного, 6 — высокого, 10 — очень высокого. АллоТГСК выполнена 25 больным. Лечение гипометилирующими препаратами получали 28 пациентов. В качестве профилактики реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) у 14 пациентов в ранний посттрансплантационный период применялся циклофосфамид 50 мг/кг в Д+3 и Д+4, такролимус 0,03 мг/кг, микофенолата мофетил 30 мг/кг; 11 пациентов получали антитимоцитарный глобулин 60 мг/кг ($n = 7$) или тимоглобулин 5 мг/кг ($n = 4$). У 19 пациентов применялся режим кондиционирования со сниженной интенсивностью доз (флударабин 180 мг/м², бусульфид 8–10 мг/кг), у 6 — миелоаблативный режим. У 21 больного аллоТГСК выполнена от неродственного

Таблица 1. Характеристика пациентов

Показатель	Значение
Медиана (диапазон) возраста, лет	49 (18–80)
Пол, М/Ж	21/14
Диагноз	
МДС с мультилинейной дисплазией	2 (5,7 %)
МДС с изолированной делецией 5q	1 (2,9 %)
МДС с избытком бластов-I	13 (37,1 %)
МДС с избытком бластов-II	19 (54,3 %)
Группа риска по IPSS-R	
Очень низкий	0 (0 %)
Низкий	1 (2,9 %)
Промежуточный	5 (14,3 %)
Высокий	17 (48,5 %)
Очень высокий	12 (34,3 %)
Число пациентов с аллоТГСК	25 (71,4 %)
Вторичный МДС	5 (14,3 %)
Варианты лекарственной терапии	
Малые дозы цитарабина	6 (17,1 %)
Гипометилирующие препараты	28 (80,0 %)
Деферазирокс	2 (5,7 %)
Эритропоэз-стимулирующие агенты	1 (2,9 %)

IPSS-R — Международная прогностическая шкала; аллоТГСК — трансплантация аллогенных гемопоэтических клеток; МДС — миелодиспластический синдром.

донора, у 3 — от родственного HLA-совместимого донора, у 1 — от гаплоидентичного. У 17 пациентов в качестве источника трансплантата применялись стволовые клетки периферической крови, у 8 — костный мозг. Медиана клеток CD34+ на 1 кг массы тела реципиента составила $4,39 \times 10^6$ (диапазон $1,4\text{--}8,5 \times 10^6$).

У 35 пациентов выполнялся забор костного мозга до выполнения аллоТГСК. Пациенты были осведомлены, что их материал может быть использован в научных целях. В дальнейшем выделяли общую ДНК, пробы замораживали и хранили при температуре -80°C . Далее с помощью секвенирования нового поколения определяли наличие патогенных мутаций в генах, участвующих в регуляции метилирования ДНК (*TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *DNMT3A*), а также в генах *SF3B1* и *TP53*.

Время до прогрессирования (ВДП) рассчитывалось как время от постановки диагноза до трансформации в острый миелобластный лейкоз, конкурирующим риском считалась смерть по причинам, связанным с аллоТГСК или проводимой противоопухолевой терапией. Расчет ВДП и многофакторный анализ выполнялись с помощью теста Грея. Периодом наблюдения при расчете общей выживаемости (ОВ) считалось время от момента постановки диагноза до смерти пациента или до даты последнего контакта. Построение кривых ОВ выполнялось с помощью метода Каплана—Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе количества мутаций в генах метилирования обнаружено, что у 37 % пациентов не было ни одной мутации, у 40 % больных мутация выявлена только в 1 из генов, у 23 % — в 2 генах и более.

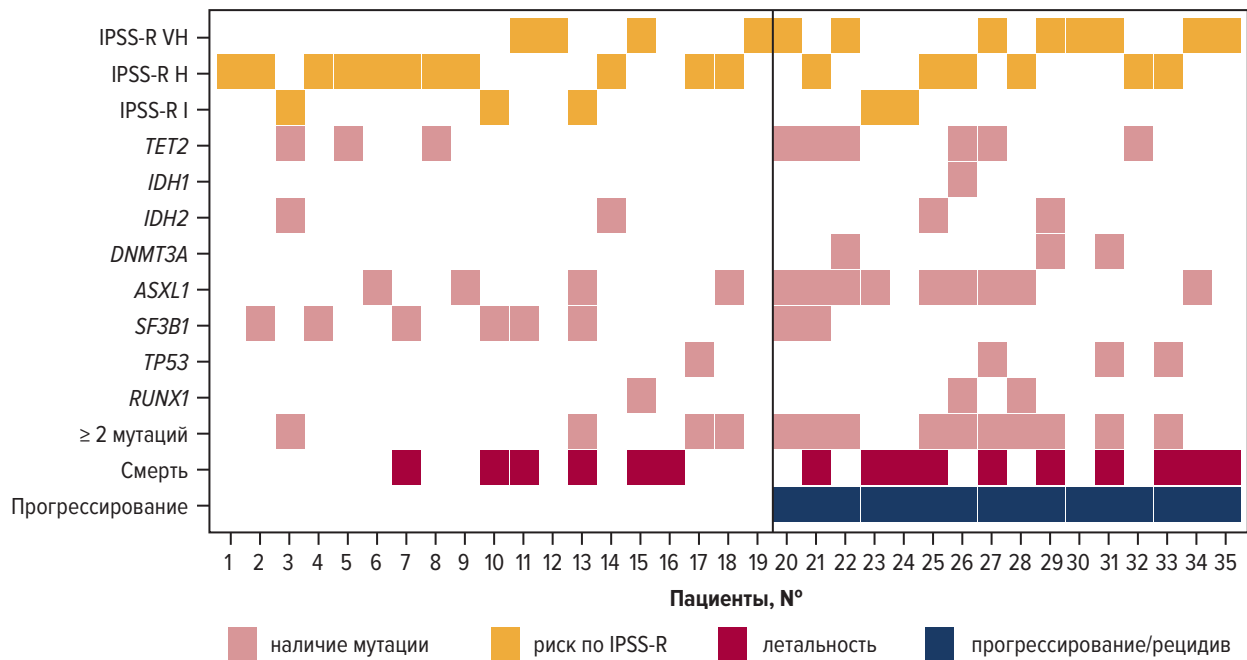


Рис. 1. Патогенные мутации у отдельных пациентов. Левая панель — пациенты без прогрессирования или рецидива, правая панель — пациенты с прогрессированием или рецидивом заболевания

VH — очень высокий, H — высокий и I — промежуточный риск по прогностической шкале IPSS-R.

Fig. 1. Pathogenic mutation in some patients. On the left — progression- and relapse-free patients, on the right — patients with progression and relapsed disease

VH — very high, H — high, and I — intermediate risks according to IPSS-R.

Мутации гена *SF3B1* наблюдались у 23 % больных, гена *TP53* — у 11 %.

Медиана времени наблюдения составила 27 мес. (диапазон 5–116 мес.). 3-летняя ОВ составила 58 %. В группе саллотГГСК приживление трансплантата было достигнуто у 86 % ($n = 21$) пациентов, при этом в 28 % ($n = 7$) случаев произошел летальный исход, связанный с инфекционными осложнениями в ранний и поздний посттрансплантационные периоды. В однофакторном анализе не было получено статистически значимых различий ОВ в зависимости от мутационного статуса (рис. 1). Так, 3-летняя ОВ в группе пациентов с 2 мутациями и более в генах метилирования или мутацией в гене *TP53* составила 55 %, при отсутствии мутаций — 66 % ($p = 0,3$). 3-летняя ОВ была статистически значимо выше в группе пациентов, которым выполнялась аллотГГСК, — 72 и 31 % соответственно ($p = 0,0001$). Медиана ВДП в случае проведения аллотГГСК не достигнута, без аллотГГСК она равнялась 6 мес. ($p = 0,0001$). Медиана ВДП при отсутствии мутаций в гене *SF3B1* составила 35 мес., при наличии мутации в гене *SF3B1* медиана ВДП не достигнута ($p = 0,043$). При наличии 2 мутаций и более в генах метилирования медиана ВДП была 12 мес., в других случаях она не достигнута ($p = 0,024$). При наличии мутации в гене *TP53* медиана ВДП составила 6 мес., при ее отсутствии — 43 мес. ($p = 0,023$).

В многофакторном анализе наличие мутации в гене *TP53* или не менее 2 мутаций в генах метилирования (*TET2*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *DNMT3A*) сохранило свое неблагоприятное значение в отношении ВДП вне зависимости от проведенного лекарственного лечения или аллотГГСК (отношение рисков 7,1; 95%-й доверительный интервал 2,6–19,6; $p = 0,0001$) (рис. 2).

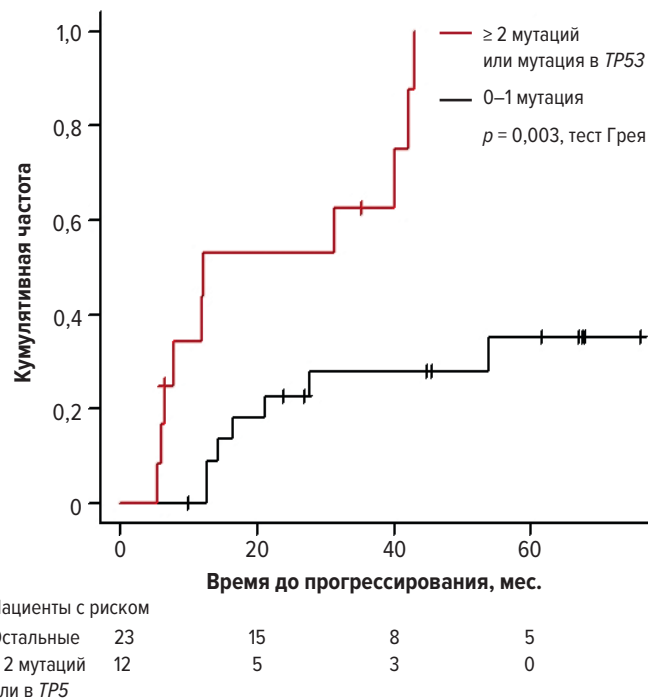


Рис. 2. Время до прогрессирования в зависимости от мутационного статуса

Fig. 2. Time to progression depending on mutation status

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании мы проанализировали влияние молекулярных маркеров на прогноз у пациентов с МДС в условиях различных лечебных подходов: лекарственной терапии и аллотГГСК.

В настоящее время активно изучается роль мутаций в генах, отвечающих за эпигенетические механизмы регуляции, осуществление сплайсинга [8]. Некоторые из них, например мутации в гене *SF3B1*, характерны для определенных нозологических форм МДС и используются в диагностике МДС с кольцевыми сидеробластами (критерии ВОЗ 2016 г. [9]). Большинство эпигенетических мутаций не имеет диагностического значения и присутствуют при различных других миелоидных опухолях. Кроме того, они встречаются при отсутствии клинических и лабораторных признаков заболевания, частота обнаружения этих мутаций увеличивается с возрастом и характерна для клонального гемопоэза неизвестного значения [10]. По данным нескольких исследований, некоторые из них связаны с риском развития миелоидных опухолей [11, 12].

Для МДС характерно нарушение процессов метилирования ДНК, как было показано в нескольких работах [13, 14]. Гипометилирующие агенты наряду с иммуномодулятором леналидомидом к настоящему времени остаются единственными таргетными препаратами, одобренными для лечения 5q-синдрома при МДС [15–17]. Однако ответ на терапию составляет всего 40–50 %. В дальнейшем, через несколько лет, пациенты теряют ответ на лечение, что требует смены терапии [18, 19].

Хотя существующие прогностические модели позволяют эффективно выделить группы с благоприятным и менее благоприятным прогнозом только на основании клинических признаков и цитогенетических данных, включение молекулярных маркеров в стандартные прогностические шкалы потенциально позволит увеличить их предсказательную силу, как это уже произошло при модификации прогностических шкал у пациентов с первичным миелофиброзом [20].

Включение молекулярных маркеров в прогностические модели, вероятно, позволит выделить группу пациентов с наиболее неблагоприятным прогнозом, у которых даже выполнение аллотГСК может сопровождаться неудачей. Так, например, наиболее неблагоприятным прогнозом обладает как мутация в гене *TP53* [21], так и наличие нескольких мутаций [22]. Согласно рекомендациям Европейской сети по изучению лейкозов (ELN) и Европейского общества по трансплантации костного мозга (EBMT), выживаемость пациентов в группе высокого и очень высокого риска является крайне низкой [23], поэтому проведение аллотГСК со стандартными режимами кондиционирования и профилактикой РТПХ не рекомендовано [24]. Таким образом, заболевание у этой категории пациентов нечувствительно к иммунотерапии и выполнение аллотГСК может быть не вполне оправданным, т. к. 5-летняя ОВ в этой группе пациентов не превышает 30 %.

В заключение отметим, что именно группа пациентов с МДС высокого риска требует поиска новых терапевтических решений, включая более эффективные прогностические шкалы. Одним из решений данной проблемы является детальное описание характера и прогностического значения различных соматических мутаций, что может не только обеспечить более персонализированный подход к выбору лечения, но и

помочь в поиске точек приложения для новых препаратов, а также определить вероятность ответа на существующие методы терапии [25, 26]. Данные нашего небольшого исследования подчеркивают значимость дальнейшей работы в этом направлении.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнялось в рамках гранта РФФ № 17-75-20145.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.С. Моисеев, Е.В. Морозова, Б.В. Афанасьев.

Сбор и обработка данных: Н.Ю. Цветков, М.В. Барабанщикова, И.С. Моисеев.

Анализ и интерпретация данных: Д.С. Буг, Н.В. Петухова, А.В. Тишков.

Подготовка рукописи: Н.Ю. Цветков, М.В. Барабанщикова, И.С. Моисеев.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ma X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *Am J Med.* 2012;125(7):S2–S5. doi: 10.1016/j.amjmed.2012.04.014.
2. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 1997;89(6):2079–88. doi: 10.1182/blood.v89.6.2079.
3. Alessandrino EP, Della Porta MG, Bacigalupo A, et al. WHO classification and WPSS predict posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome: a study from the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). *Blood.* 2008;112(3):895–902. doi: 10.1182/blood-2008-03-143735.
4. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* 2012;120(12):2454–65. doi: 10.1182/blood-2012-03-420489.
5. Montalban-Bravo G, Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2018;93(1):129–47. doi: 10.1002/ajh.24930.
6. Bejar R, Stevenson KE, Caughey B, et al. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2014;32(25):2691–8. doi: 10.1200/jco.2013.52.3381.
7. Bains A, Luthra R, Medeiros LJ, et al. FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(1):62–9. doi: 10.1309/ajcpeixu8pybcio.
8. Della Porta MG, Galli A, Bacigalupo A, et al. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J Clin Oncol.* 2016;34(30):3627–37. doi: 10.1200/jco.2016.67.3616.
9. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
10. Bejar R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. *Leukemia.* 2017;31(9):1869–71. doi: 10.1038/leu.2017.181.
11. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2477–87. doi: 10.1056/nejmoa1409405.
12. Young AL, Tong RS, Birmann BM, et al. Clonal hematopoiesis and risk of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2019;104(12):2410–7. doi: 10.3324/haematol.2018.215269.
13. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood.* 2009;114(16):3448–58. doi: 10.1182/blood-2009-01-200519.

14. Reilly B, Tanaka TN, Diep D, et al. DNA methylation identifies genetically and prognostically distinct subtypes of myelodysplastic syndromes. *Blood Adv*. 2019;3(19):2845–58. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000192.
15. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002;20(10):2429–40. doi: 10.1200/jco.2002.04.117.
16. Kantarjian H, Issa J-PJ, Rosenfeld CS, et al. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006;106(8):1794–803. doi: 10.1002/cncr.21792.
17. Stahl M, Zeidan AM. Lenalidomide use in myelodysplastic syndromes: Insights into the biologic mechanisms and clinical applications. *Cancer*. 2017;123(10):1703–13. doi: 10.1002/cncr.30585.
18. Duong VH, Lin K, Reljic T, et al. Poor outcome of patients with myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Clin Lymphoma Myel Leuk*. 2013;13(6):711–5. doi: 10.1016/j.clml.2013.07.007.
19. Prebet T, Cluzeau T, Park S, et al. Outcome of patients treated for myelodysplastic syndromes with 5q deletion after failure of lenalidomide therapy. *Oncotarget*. 2017;8(23):81926–35. doi: 10.18632/oncotarget.15200.
20. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(17):1769–70. doi: 10.1200/jco.2018.78.9867.
21. Haase D, Stevenson KE, Neuberg D, et al. TP53 mutation status divides myelodysplastic syndromes with complex karyotypes into distinct prognostic subgroups. *Leukemia*. 2019;33(7):1747–58. doi: 10.1038/s41375-018-0351-2.
22. Montalban-Bravo G, Takahashi K, Patel K, et al. Impact of the number of mutations in survival and response outcomes to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes or myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Oncotarget*. 2018;9(11):9714–27. doi: 10.18632/oncotarget.23882.
23. van Gelder M, de Wreede LC, Schetelig J, et al. Monosomal karyotype predicts poor survival after allogeneic stem cell transplantation in chromosome 7 abnormal myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013;27(4):879–88. doi: 10.1038/leu.2012.297.
24. de Witte T, Bowen D, Robin M, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for MDS and CMML: recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(13):1753–62. doi: 10.1182/blood-2016-06-724500.
25. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147–52. doi: 10.1038/leu.2011.71.
26. Welch JS, Pettit AA, Miller CA, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med*. 2016;375(21):2023–36. doi: 10.1056/nejmoa1605949.

