

Полушкина Любовь Борисовна

**АССОЦИИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНОМАЛИЙ С КЛИНИЧЕСКИМИ
ОСОБЕННОСТЯМИ И ПРОГНОЗОМ ТЕЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОГО
МИЕЛОФИБРОЗА**

14.01.21 – гематология и переливание крови

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России)

Научные руководители:

Чечеткин Александр Викторович, доктор медицинских наук, профессор

Мартынкевич Ирина Степановна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Зубаровская Людмила Степановна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела детской онкологии, гематологии и трансплантологии научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Куцев Сергей Иванович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр», заведующий кафедрой молекулярной генетики медико-биологического факультета федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, главный внештатный специалист по медицинской генетике Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2017 г. в _____ часов
на заседании диссертационного Совета Д 208.074.01 при ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» по адресу:
191024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д.16

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России (www.bloodscience.ru)

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Глазанова Татьяна Валентиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Среди классических Ph-негативных миелопролиферативных новообразований первичный миелофиброз (ПМФ) – наиболее серьезная патология, приводящая к значительному снижению качества и продолжительности жизни пациентов. Выживаемость при данном заболевании существенно ниже, чем в популяции, но может колебаться от нескольких месяцев до многих лет. Степень выраженности клинических проявлений также варьирует от бессимптомного течения до тяжелой опухолевой интоксикации с глубокой цитопенией и массивной спленомегалией. Причинами смерти больных могут быть лейкоемическая трансформация, прогрессирующая цитопения и обусловленные ею тромбозы, кровотечения, инфекции.

Для определения прогноза течения заболевания в настоящее время пользуются стратификационными шкалами, базирующимися на результатах клинико-лабораторных исследований, но лишь система DIPSS+ учитывает биологические особенности клеток патологического клона, принимая во внимание данные кариотипирования. Недавно предложенная Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS), включающая оценку молекулярно-генетических особенностей опухолевых клеток без учета кариотипа, пока не получила широкого распространения. При этом ПМФ является биологически гетерогенным заболеванием, генетическую природу которого нельзя игнорировать.

К настоящему времени показано, что выявление различных драйверных мутаций – в генах *JAK2* (V617F), *MPL* (мутации 515 кодона), *CALR* (инсерции и делеции 9 экзона) – или их отсутствие (тройной негативный статус) ассоциировано с различным прогнозом течения ПМФ. Наиболее благоприятным фактором считают обнаружение мутаций в гене *CALR*. Однако и внутри данной группы пациентов течение заболевания может быть весьма агрессивным. То есть тип драйверной мутации – не единственный детерминанта свойств опухолевых клеток при ПМФ. Выявление других значимых молекулярно-генетических характеристик патологического клона является первостепенной задачей для дальнейшего анализа их совместного воздействия на свойства новообразования и прогноз заболевания.

Кроме мутаций в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR*, приводящих к усиленной пролиферации, большая доля пациентов с ПМФ имеет также дефекты генов эпигенетических регуляторов, которые являются причиной нарушений дифференцировки клеток и, как следствие, диспластических изменений. По данным зарубежных авторов, обнаружение ряда мутаций генов эпигенетической регуляции транскрипции (например, в генах *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*) ассоциировано со снижением общей выживаемости независимо от других факторов, в том числе типа драйверной мутации.

Исследования показали, что мутации генов эпигенетических регуляторов могут нивелировать благоприятный эффект мутаций в гене *CALR*, а также служить предиктором короткой выживаемости у *CALR*-отрицательных пациентов. Данное наблюдение требует дальнейшего изучения в группах пациентов с другими драйверными мутациями и тройных негативных для определения стратегии лечения при различных вариантах сочетанного генотипа «драйверная мутация/эпигенетический регулятор».

Актуальным является исследование мутационного статуса генов эпигенетической регуляции и кариотипа у тройных негативных пациентов, необходимое для получения новых данных о природе клонального миелопоэза и факторах прогноза в этой, в целом неблагоприятной, группе больных.

Сообщения об ассоциации хромосомных aberrаций при ПМФ с рядом генных мутаций говорят о взаимосвязи цитогенетических и молекулярно-генетических особенностей опухолевых клеток. При несомненной синергичности действия аномалий генома в формировании свойств патологического клона, практически отсутствуют данные

о комплексном влиянии различных генетических повреждений на течение и прогноз заболевания. Это указывает на актуальность именно сочетанного исследования цитогенетического и молекулярно-генетического профиля больных ПМФ.

Степень разработанности темы

В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении патогенетических механизмов развития Ph-негативных миелопролиферативных новообразований: определены «пусковые» и «неспецифические» генетические дефекты, характерные аномалии кариотипа, исследована их взаимосвязь с фенотипом и показателями выживаемости пациентов. Вместе с тем, несмотря на наличие достаточной информации о распространенности и роли геномных повреждений при первичном миелофиброзе, практически отсутствуют данные о комплексном влиянии перечисленных факторов на течение и прогноз заболевания.

Цель исследования

Оценить распространенность драйверных мутаций, дефектов генов эпигенетической регуляции транскрипции и аномалий кариотипа у больных с первичным миелофиброзом и определить их взаимосвязь с клиническими проявлениями и прогнозом течения заболевания.

Задачи исследования

1. Исследовать частоту встречаемости мутаций в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* у пациентов с первичным миелофиброзом.
2. Изучить спектр хромосомных аномалий у больных с первичным миелофиброзом и различным молекулярно-генетическим статусом.
3. Выявить взаимосвязь драйверных мутаций, мутационного статуса генов эпигенетических регуляторов, хромосомных аномалий и комбинации данных показателей с клиническими характеристиками и исходами заболевания.
4. Оптимизировать алгоритм диагностики и определения прогноза течения заболевания у пациентов с первичным миелофиброзом на основе результатов цитогенетического и молекулярно-генетического исследований.

Научная новизна исследования

В настоящем исследовании впервые:

- получены новые данные о частоте встречаемости мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* у пациентов с первичным миелофиброзом; выявлены особенности распределения мутаций генов эпигенетической регуляции транскрипции в зависимости от наличия и типа драйверной мутации;
- получены новые данные о частоте, типе и распределении хромосомных aberrаций у пациентов с первичным миелофиброзом в зависимости от наличия и типа драйверной мутации и мутационного статуса генов эпигенетической регуляции;
- выявлены клинико-гематологические особенности первичного миелофиброза у пациентов с драйверными мутациями и без таковых, а также с различным мутационным статусом гена *ASXL1*;
- получены новые данные о показателях общей выживаемости у пациентов с различными генетическими маркерами; определены прогностически значимые комбинации цитогенетических и молекулярно-генетических характеристик опухолевых клеток при первичном миелофиброзе;
- разработан алгоритм оценки прогноза течения заболевания у пациентов с первичным миелофиброзом на основе результатов цитогенетического и молекулярно-генетического исследований при первичной диагностике.

Практическая значимость исследования

Определена взаимосвязь генетических характеристик опухоли с общей выживаемостью больных первичным миелофиброзом. Разработан алгоритм, позволяющий стратифицировать пациентов на группы риска в соответствии с результатами цитогенетического и молекулярно-генетического исследований. Установлено

прогностическое значение сочетаний генетических факторов, что может служить существенным дополнением к имеющимся критериям выбора терапии первичного миелофиброза и определения показаний для аллогенной трансплантации костного мозга.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинические, морфологические, гистологические, цитогенетические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации в генах *JAK2* (50%), *CALR* (25%), *MPL* (7%) обнаруживаются у подавляющего большинства пациентов с первичным миелофиброзом. Мутации в гене эпигенетической регуляции *ASXL1* часто (20,4%) встречаются при первичном миелофиброзе независимо от наличия или отсутствия драйверной мутации.

2. Хромосомные aberrации одинаково часто выявляются у пациентов с различным молекулярно-генетическим статусом (среди *JAK2*⁺больных – 35,0%, *CALR*⁺ – 21,4%, *MPL*⁺ – 33,3%, тройных негативных – 45,6%; у пациентов с мутациями в генах эпигенетической регуляции – 26,7%, без таковых – 37,5%).

3. Тройной негативный статус, наличие мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *ASXL1* коррелируют с клинико-гематологическими проявлениями первичного миелофиброза. Аномалии кариотипа (+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, i(17q), -5/5q-, inv(3), перестройки 11q и 12p, моносомии, 2 и более хромосомные aberrации), тройной негативный статус и наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* ассоциированы со снижением общей выживаемости пациентов с первичным миелофиброзом. Наиболее значимыми для общей выживаемости являются сочетания генетических факторов: *CALR/ASXL1* статус, наличие драйверной мутации/*ASXL1* статус, кариотип/*ASXL1* статус.

4. Использование при диагностике совокупной характеристики «наличие драйверной мутации/*ASXL1* статус» позволяет оптимизировать алгоритм определения прогноза течения первичного миелофиброза с выделением групп благоприятного (медиана 13,8 года), промежуточного (медиана не достигнута при времени наблюдения 10,3 года), неблагоприятного (медиана 3,6 года) и крайне неблагоприятного (медиана 0,9 года) прогноза. На основании характеристики «кариотип/*ASXL1* статус» пациенты могут быть разделены на группы высокого (медиана 1,5 года) и низкого (медиана 6,4 года) генетического риска.

Внедрение результатов исследования в практику

Молекулярно-генетические методы определения мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* внедрены и используются в практической и научно-исследовательской деятельности лаборатории молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства». Результаты исследования применяются в лечебно-диагностической работе гематологических отделений Санкт-Петербургского ГБУЗ «Городская больница № 15», ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница».

Личный вклад соискателя в выполнение работы

Автором лично выполнялись: планирование исследований; оптимизация условий реакций и проведение скрининга мутационного статуса генов *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* с использованием различных молекулярно-генетических методов исследования; ведение первичной документации и сбор информации из историй болезни; анализ полученных данных, статистическая обработка и обобщение результатов.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности обусловлена проведением молекулярно-генетических исследований у большой группы больных (110 пациентов с первичным миелофиброзом), использованием достоверных методов исследования, качеством проведения лабораторных анализов и статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертации представлены на 19th Congress of the European Hematology Association (EHA) (Милан, 2014), 20th EHA Congress (Вена, 2015), 21th EHA Congress (Копенгаген, 2016), 22th EHA Congress (Мадрид, 2017), 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting (Сан-Франциско, 2014), 58th ASH Annual Meeting (Сан-Диего, 2016), на Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая лабораторная диагностика в гематологии и службе крови» (Санкт-Петербург, 2014), II Конгрессе гематологов России (Москва, 2014), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы» (Санкт-Петербург, 2017), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», посвященной 85-летию Российского научно-исследовательского института гематологии и трансфузиологии (Санкт-Петербург, 2017).

По теме диссертации опубликованы 18 печатных работ, из них – 3 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который включает 142 источника. Работа содержит 41 рисунок и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект, материалы и методы исследования

Объект исследования

В исследование были включены 110 пациентов с гистологически верифицированным диагнозом ПМФ, проходивших лечение в гематологической клинике ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА» и других гематологических отделений лечебных учреждений Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Возраст больных составил от 16 до 82 лет (медиана 59 лет). Среди них было 38 (34,5%) мужчин и 72 (65,5%) женщины (соотношение по полу 1:2). Медиана наблюдения составила 2,59 года (0,14-22,97 лет). Распределение пациентов в соответствии с системой стратификации IPSS было следующим: к группе низкого риска были отнесены 26 (23,6%) человек, промежуточного-1 – 34 (30,9%), промежуточного-2 – 17 (15,5%), высокого – 24 (21,8%). С учетом оценок по шкале DIPSS группу низкого риска составили 26 (23,6%) пациентов, промежуточного-1 – 43 (39,1%), промежуточного-2 – 28 (25,5%) и высокого – 4 (3,6%).

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга проведено 48 пациентам: 32 – в дебюте заболевания, 6 – при констатации прогрессии, 10 – в бластной фазе. Нормальный кариотип выявлен у 32 (66,7%) человек, благоприятные хромосомные aberrации – у 3 (6,3%), промежуточного прогноза – у 4 (8,3%), неблагоприятные – у 9 (18,7%).

Материалы исследования

Образцы ДНК из лейкоцитов периферической крови, препараты костного мозга.

Метод цитогенетического анализа

Костный мозг в объеме 2-3 мл забирали в стандартную пробирку, содержащую 100-500 ед. гепарина, перемешивали. В 15 мл пробирке смешивали: 4,0 мл среды RPMI (с антибиотиком и глутамином), 1 мл сыворотки, костный мозг (выдерживая оптимальную концентрацию 2×10^9 клеток на 1 мл среды RPMI), колцемид (в концентрации, рекомендованной производителем). Культивировали 24 часа при температуре +37°C в термостате. Далее осаждали клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут, супернатант удаляли пипеткой, оставляя 0,3-0,5 мл жидкости над осадком. Осадок разбивали энергичным встряхиванием и добавляли 8-10 мл гипотонического раствора

(0,55% раствор KCl), перемешивали пипетированием и инкубировали 30 мин при +37°C. Для последующей фиксации осаждали клетки с помощью центрифугирования (10 мин, 1000 об/мин). Осадок тщательно разбивали встряхиванием в 0,5 мл надосадочной жидкости. К осадку добавляли 5 капель 5% уксусной кислоты, перемешивали, центрифугировали 10 минут. Затем струйно приливали 8-10 мл холодного свежеприготовленного фиксатора (метанол + ледяная уксусная кислота в соотношении 3:1) и перемешивали пипетированием. Фиксатор меняли 2-3 раза, добавляя порции по 5-7 мл.

Раскапывание полученной суспензии клеток проводили на обезжиренные предметные стекла, охлажденные в морозильной камере или в холодной воде, нанося на препарат с высоты 30-50 см по 30-50 мкл суспензии. Стекла обжигали над пламенем спиртовки и высушивали при комнатной температуре. Далее проводили окраску с применением трипсина (GTG-техника). Обработывали стекло в 0,25% растворе трипсина (время подбиралось эмпирически в интервале 10-60 сек.). Окрашивали 1 минуту в растворе красителя Гимза, разведенном на фосфатном буфере (pH=6,8). Смывали краситель проточной водой и высушивали.

В каждом исследовании анализировали не менее 20 метафазных пластин. Интерпретацию патологии кариотипа производили в соответствии с Международной номенклатурой дифференциально сегментированных хромосом (ISCN, 2013). Для цитогенетического анализа и архивирования полученных данных использовали компьютерную систему анализа изображений «ВидеоТест».

Методы анализа мутационного статуса генов *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2*

Выделение геномной ДНК из периферической крови проводили с помощью метода хлороформной экстракции. Для гемолиза эритроцитов добавляли к 3 мл крови (1 мл костного мозга) 12 мл NH₄Cl (pH 6,97, 0,83%) и инкубировали 20 минут при +4°C. Осаждали лейкоциты, отбирали 10-20 мкл и ресуспензировали в 400 мкл лизирующего буфера, инкубировали 10 минут при +65°C. Добавляли 600 мкл хлороформа, после центрифугирования переносили фазу, содержащую ДНК, в преципитирующий буфер, осаждали и растворяли в 1,2 М NaCl. Осаждали ДНК в 96% C₂H₅OH при -20°C и отмывали в 70% C₂H₅OH, высушивали и растворяли в 100 мкл H₂O.

Для амплификации всех фрагментов генов использовали набор реагентов «ПЦР Микс» («Синтол», Россия). В реакционную смесь добавляли по 10 пмоль прямого и обратного праймера, 20-100 нг геномной ДНК. Реакцию проводили в приборе «Терцик» («ДНК-технология», Россия).

Замену V617F в гене *JAK2* и мутации 515 кодона гена *MPL* анализировали методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с визуализацией продуктов ферментативного гидролиза в 6% полиакриламидном геле. Наличие инсерций/делеций 9 экзона гена *CALR* проводили методом полиморфизма длин амплифицированных фрагментов с визуализацией продуктов амплификации в 6% полиакриламидном геле. Тип мутации уточняли методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Анализ мутационного статуса генов *ASXL1* и *IDH1/2* проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Предварительную оценку мутационного статуса гена *EZH2* проводили методом плавления высокого разрешения на приборе CFX96 (BioRad, США) с использованием программного обеспечения Bio-Rad Precision Melt Analysis. В качестве флуоресцентного красителя использовали 20-кратный водный раствор EvaGreen (Biotium, США). Образцы, кривые плавления которых отличались от таковой для контрольной пробы, секвенировали по Сэнгеру.

Секвенирование образцов проводили на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Великобритания) с использованием набора реагентов DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (GE Healthcare, Великобритания).

Подбор праймеров и анализ результатов секвенирования проводили с помощью программ VECTOR NTI и Sequence Scanner 2.0.

Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ STATISTICA 10.0 (StatSoft), Excel 2016 с надстройкой XLSTAT 2016 (Microsoft). Анализ общей выживаемости и выживаемости без бластной трансформации проводили с использованием метода Каплана-Майера, с применением лог-рангового теста для оценки достоверности различий. В качестве точки отсчета для вычисления общей выживаемости и выживаемости без бластной трансформации выбирали дату постановки диагноза ПМФ. Для расчета кумулятивной частоты летальных исходов от ПМФ использовали метод кумулятивной частоты событий с учетом конкурирующих факторов (конкурирующий фактор – смерть, обусловленная другими событиями). Сравнительный анализ частоты событий проводили методом Грея. Регрессионный анализ проводили при помощи метода Кокса.

При сравнении двоичных данных применяли точный тест Фишера и хи-квадрат Пирсона. Для анализа различий в непрерывных данных в трех и более группах использовали критерий Краскела-Уоллиса, в двух группах – непараметрический U-тест Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты молекулярно-генетического и цитогенетического исследования пациентов с ПМФ.

Из 110 обследованных пациентов драйверные мутации (ДМ) обнаружены у 90 (81,8%), из них *JAK2*-положительными (*JAK2*⁺) были 55 (50%), *CALR*-положительными (*CALR*⁺) – 28 (25,5%) (16 (14,5%) человек с мутациями типа 1 и им подобными, 12 (10,9%) – с мутациями типа 2 и им подобными), *MPL*-положительными (*MPL*⁺) – 7 (6,4%) больных. У 20 (18,2%) человек ДМ не выявлены, данные пациенты были отнесены в группу тройных негативных (ТН).

Молекулярные aberrации генов эпигенетической регуляции (ЭГР) транскрипции обнаружены у 23 (21,7%) человек: 19 случаев – мутация в гене *ASXL1*, 2 случая – сочетание мутаций в генах *ASXL1* и *EZH2*, 1 случай – сочетание мутаций в генах *ASXL1* и *IDH2*, 1 случай – мутация в гене *IDH1*. Всего выявлено 26 мутаций (87% всех мутаций в генах ЭГР) в гене *ASXL1* у 22 (20,4%) человек: в образцах ДНК 4 пациентов детектированы сразу 2 мутации. Перечень обнаруженных мутаций приведен в таблице 1. Встречаемость мутаций в генах *EZH2* и *IDH1/2* в исследованной выборке оказалась довольно низкой (по 1,9%), что согласуется с мировыми данными для хронической фазы ПМФ.

Чаще всего мутации генов ЭГР детектировали у *CALR*⁺ (9/28 (32,1%)) и ТН (6/20 (30%)) пациентов. В *JAK2*⁺ группе выявлено 6/51 (11,8%) случаев носительства мутации в гене *ASXL1*, что было значимо меньше, чем в *CALR*⁺ группе ($p=0,037$). При сравнении *JAK2*⁺ и ТН групп уровень значимости отличий несколько превышал пороговое значение: $p=0,084$. Среди *MPL*⁺ пациентов мутации гена *ASXL1* обнаружены у 2/7 (28,6%) больных.

По данным кариологического исследования, в хронической фазе заболевания обнаруживали только одиночные хромосомные aberrации (ХА), тогда как для прогрессии и бластной фазы были характерны поломки с вовлечением 2 и более хромосом, включавшие трисомии, потери части или целой хромосомы, сбалансированные транслокации (таблица 2). Частота ХА в дебюте заболевания составила 21,9% (7/32). При прогрессии и в бластной фазе ХА обнаружены у 11/16 пациентов (68,7%). Частота НК была значимо выше в дебюте заболевания: 78,1% (25/32) против 31,3% (5/16), $p=0,004$. На поздних стадиях чаще выявляли повреждения с вовлечением 2 и более хромосом (3,1% против 56,3%, $p < 0,001$) (рисунок 1).

Таблица 1 – Перечень обнаруженных мутаций в гене *ASXL1*

Пациент	Пол	Возраст, лет	Драйверная мутация	Мутация	Тип	Идентификац. номер (ID)	Срок наблюдения, годы	Статус
1	М	61	ТН	Q623X	Н	COSM133571	0,7	Умер
2	Ж	47	ТН	G646WfsX12	СР	COSM914346	2,9	Умер
3	Ж	45	<i>JAK2</i>	G1397S	М	COSM133033	18,1	Умер
4	М	74	ТН	G646WfsX12	СР	COSM914346	0,9	Умер
5	М	57	<i>JAK2</i>	G642X	Н	COSM110710	1,5	Умер
6	М	57	ТН	Q708X	Н	COSM1234988	0,8	Умер
7	М	63	ТН	P873LfsX2	СР	Нет данных	2,5	Умер
8	Ж	52	<i>CALR</i>	E865K	М	COSM1025730	5,7	Жив
9	Ж	51	<i>MPL</i>	N986S	М	COSM1716555	3,1	Жив
10	Ж	56	<i>JAK2</i>	G646WfsX12	СР	COSM914346	3,0	Жив
11	Ж	63	<i>CALR</i>	G646WfsX12, Q695X	СР+Н	COSM914346 Нет данных	3,7	Жив
12	Ж	53	<i>CALR</i>	G646WfsX12, R693X	СР+Н	COSM914346 COSM51388	1,8	Жив
13	Ж	47	<i>CALR</i>	L691PfsX25	СР	Нет данных	2,5	Жив
14	М	54	<i>CALR</i>	C605X	Н	COSM1155717	1,3	Жив
15	Ж	28	<i>CALR</i>	G1397S	М	COSM133033	1,9	Жив
16	М	45	ТН	Q708X G652S	Н+М	COSM1234988 COSM1716555	0,8	Жив
17	М	55	<i>JAK2</i>	R693X	Н	COSM51388	1,1	Жив
18	М	51	<i>MPL</i>	V751LfsX21, N986S	СР+М	COSM238866 COSM96383	1,4	Жив
19	М	60	<i>CALR</i>	Y591X	Н	rs762036456	6,6	Жив
20	Ж	53	<i>CALR</i>	G646WfsX12	СР	COSM914346	2,8	Жив
21	Ж	64	<i>JAK2</i>	N986S	М	COSM96383	1,2	Жив
22	Ж	62	<i>JAK2</i>	E635RfsX15	СР	COSM303941	1,1	Умер

Обозначения: М – миссенс, Н – нонсенс, СР – сдвиг рамки считывания.

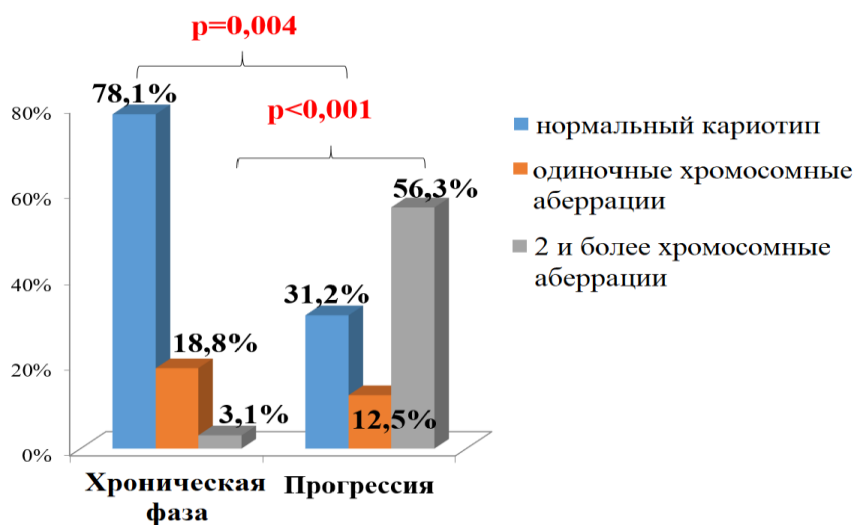


Рисунок 1 – Распределение частот встречаемости нормального кариотипа и хромосомных aberrаций у пациентов с различными фазами ПМФ

Таблица 2 – Перечень aberrантных кариотипов в исследованной группе

Пациент	Фаза заболевания	Драйверная мутация	Мутации генов ЭГР	Кариотип
С.В.Б.	БТ	ТН	<i>ASXLI</i> ⁺ <i>EZH2</i> ⁺	48,XY,+8,+21[2]/47,XY,+8[11]/46,XY[7]
П.Д.В.	ХФ, дебют	ТН	Нет	46,XY,del(6)(q15)[20]
Г.Ф.М.	БТ	<i>JAK2</i>	Нет	46,XX,der(13),t(1;3)(q11;p13)[18]/46,XX[1]
Г.С.Н.	ХФ, дебют	ТН	Нет	47,XY,add(12)(p13)[20],+mar[3]
А.В.И.	ХФ, дебют	<i>JAK2</i>	Нет	46,XY,del(13)(q12q14)[20]
П.В.А.	ХФ, дебют	<i>JAK2</i>	Нет	46,XX,del(20)(q12)[15]/46,XX [1]
К.М.В.	БТ	ТН	<i>ASXLI</i> ⁺	47,XX,+7[6]/46,XX[14]
К.Б.И.	ХФ, прогр.	<i>JAK2</i>	Нет	45,XY, del(5)(q13q33),7,del(12)(p12)[8]/ 46,XY,idem,+r(?)[10]/46,XY,t(12;13)(q24;q21)[2]
Ж.А.	ХФ, дебют	ТН	Нет	46,XX,del(13)(q12q14)[20]
А.А.В.	ХФ, прогр.	<i>CALR</i>	<i>ASXLI</i> ⁺	46,XY,add(6)(p25)[20]
Г.М.М.	ХФ, дебют	<i>JAK2</i>	Нет	46,X,t(X;7)(p21;q11)[9]/46,XX[11]
Л.А.А.	БТ	<i>JAK2</i>	Нет	48,XX,+1,i(1)(q10),+8,del(13)(q22)[13]/ 49,XX,idem,+19[7]
Г.П.О.	БТ	<i>MPL</i>	Нет	34-45, X,-Y,-15,-19,-20,t(9;11)(p24;p12) с вариациями [20]
М.Ф.Ф.	ХФ, прогр.	<i>JAK2</i>	Нет	47,XY,+9[12]/46,XY, del(5)(q13;q33),der(5)[3]/46,XY[5]
Г.М.И.	БТ	<i>CALR</i>	Нет	46,XY,ins(3;?)(q23;?),t(7;8)(q21;p12),-12,-18, +2mar[14]/46,XY[6]
П.Н.В.	ХФ, прогр.	<i>CALR</i>	<i>ASXLI</i> ⁺	46,XY,del(7)(q22;q34),del(20)(q12)[8]/46,XY, del(20)(q12)[5]/46,XY[7]
Ш.А.И.	БТ	<i>JAK2</i>	Нет	46, XY,del(5)(q23;q35),+8,t(9;13)(p24;q14), t(11;16)(p15;q13),-12[16]/46,XY[4]
К.Т.А.	ХФ, дебют	<i>JAK2</i>	Нет	46,X,del(X)(q22)[20]

Обозначения: БТ – бластная трансформация, ХФ – хроническая фаза

При анализе распределения частоты ХА в зависимости от ДМ оказалось, что в дебюте заболевания аномалии кариотипа чаще обнаруживали у *JAK2*⁺ (4/15 (26,7%)) и ТН (3/9 (33,3%)) пациентов по сравнению с *CALR*⁺, среди которых не выявлено каких-либо ХА (0/10 (0%)) (p=0,124 и p=0,087, соответственно). При учете результатов кариотипирования на всех этапах заболевания ХА определялись со следующей частотой: 35% (7/20) в *JAK2*⁺, 21,4% (3/14) в *CALR*⁺, 33,3% (1/3) в *MPL*⁺, 45,6% (5/11) в ТН группах (p=0,649).

В группах с учетом мутационного статуса генов ЭГР частота ХА в дебюте заболевания была несколько выше среди пациентов без дефектов в генах *ASXLI*, *EZH2*,

IDH1/2 (ЭГР⁻): 36,8% (7/19) против 0% (0/6) в ЭГР⁺ группе ($p=0,195$). Не отмечено статистически значимых отличий по частоте ХА в ЭГР⁺ и ЭГР⁻ группах при анализе всех полученных кариотипов: 26,7% (4/15) и 37,5% (12/32), соответственно ($p=0,465$) (рисунок 2).

Можно заключить, что ХА присутствуют у пациентов с различными молекулярно-генетическими аномалиями. Частота сочетанных цитогенетических поломок ожидаемо возрастает при трансформации заболевания.

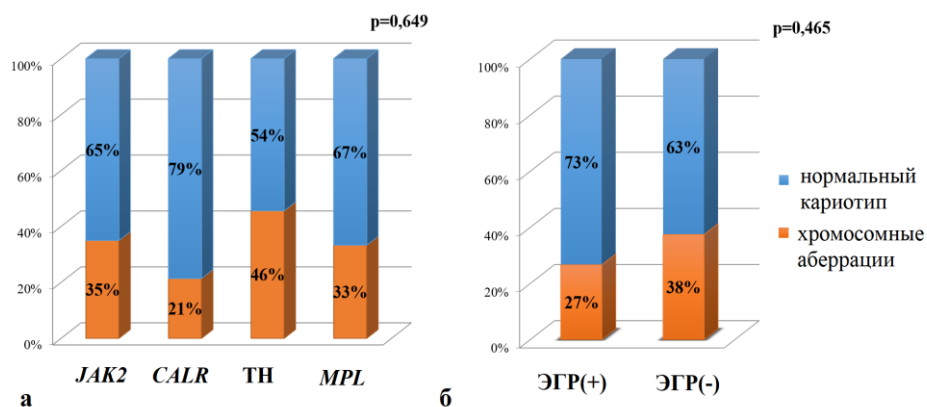


Рисунок 2 – Распределение хромосомных aberrаций в группах с различными молекулярно-генетическими дефектами: а – у пациентов с различными драйверными мутациями, б – у пациентов с различным мутационным статусом генов эпигенетической регуляции

Сравнительный анализ групп пациентов в зависимости от наличия и типа драйверной мутации

Анализ клиничко-лабораторных данных пациентов в соответствии с наличием и типом драйверной мутации выявил ряд особенностей (таблица 3). Пациенты с мутацией в гене *CALR* были моложе *TN* и *JAK2*⁺ больных, хотя отличия статистической значимости не достигали ($p=0,558$ и $p=0,081$, соответственно). Медиана возраста в *MPL*⁺ группе была наименьшей (51 год), но разница не была значимой при сравнении с другими группами.

Таблица 3 – Сравнение клиничко-гематологических показателей в зависимости от типа/наличия драйверной мутации

Исследуемый показатель	<i>JAK2</i>	<i>CALR</i>	<i>MPL</i>	<i>TN</i>	p
Возраст, лет медиана/диапазон	61 (18-79)	53,5 (28-82)	51 (40-71)	59 (25-74)	0,320
Гемоглобин, г/л медиана/диапазон	129 (65-201)	117,5 (42-165)	108,5 (77-122)	101 (56-141)	0,013
Лейкоциты, 10 ⁹ /л медиана/диапазон	12,7 (2,2-59,2)	10,5 (3,5-66,6)	8,0 (5,1-13,9)	26,9 (4,5-90,0)	0,002
Тромбоциты, 10 ⁹ /л медиана/диапазон	502 (44-1465)	734 (21-2237)	359 (134-1202)	266 (58-1494)	0,125
IPSS «высокий риск», случаев (%)	10/50 (20,0%)	4/23 (17,4%)	1/6 (16,7%)	9/15 (60,0%)	0,011
Спленомегалия, случаев (%)	36/50 (72,0%)	17/23 (73,9%)	3/6 (50%)	10/15 (66,7%)	0,685
Конституциональные симптомы, случаев (%)	15/50 (30,0%)	7/23 (31,8%)	3/6 (50,0%)	10/15 (66,7%)	0,062
Бласты $\geq 1\%$, случаев (%)	10/50 (20,0%)	14/23 (58,3%)	1/6 (16,7%)	9/15 (60,0%)	0,001

Уровень гемоглобина у $JAK2^+$ пациентов был значимо выше по сравнению с другими больными ($p=0,021$). Хотя медиана уровня тромбоцитов была наибольшей у $CALR^+$ пациентов ($734 \times 10^9/\text{л}$), различия достигали статистической значимости только при сравнении с ТН группой ($p=0,022$). ТН пациенты демонстрировали значимо более низкие уровни гемоглобина ($p=0,006$), тромбоцитов ($p=0,041$) и высокие – лейкоцитов ($p=0,001$) по сравнению с больными, у которых обнаруживали ДМ. Медиана уровня лейкоцитов у MPL^+ пациентов была значимо ниже, чем в $JAK2^+$ ($p=0,023$), но не в $CALR^+$ группе ($p=0,213$). У $CALR^+$ и ТН больных чаще выявляли бластемию $\geq 1\%$ по сравнению с $JAK2^+$ больными ($p=0,001$ и $p=0,003$, соответственно). ТН пациенты чаще отмечали симптомы опухолевой интоксикации по сравнению с $CALR^+$ и $JAK2^+$ больными ($p=0,022$ и $p=0,012$, соответственно). При анализе распределения пациентов с различными ДМ и без таковых по группам в соответствии с IPSS стратификацией «высокий риск» значимо чаще определяли у ТН пациентов ($p=0,011$). Таким образом, наличие и тип ДМ коррелируют с клинико-гематологическими проявлениями ПМФ.

Сравнительный анализ групп пациентов в зависимости от $ASXL1$ статуса

Мутации в гене $ASXL1$ были ассоциированы с более низким уровнем тромбоцитов ($p=0,016$), лейкоцитозом более $25 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,046$), пальпируемой спленомегалией ($p=0,050$) и бластемией $\geq 1\%$ ($p<0,001$) (таблица 4).

Таблица 3 – Сравнение клинико-гематологических показателей в зависимости от мутационного статуса гена $ASXL1$

Исследуемый показатель	$ASXL1^-$	$ASXL1^+$ все мутации	p	$ASXL1^+$ терминирующие мутации	p
Возраст, лет медиана/диапазон	61 (18-82)	56 (28-74)	0,162	57 (45-74)	0,163
Гемоглобин, г/л медиана/диапазон	121 (42-201)	114 (65-185)	0,454	109 (65-144)	0,097
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ медиана/диапазон	12,6 (2,2-66,6)	12,1 (3,5-90,0)	0,862	12,1 (3,5-90,0)	0,835
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$ медиана/диапазон	530 (21-2237)	250 (68-1465)	0,052	184 (68-1231)	0,016
Лейкоцитоз более $25 \times 10^9/\text{л}$, случаев (%)	11/69 (15,9%)	7/21 (33,3%)	0,046	6/15 (40,0%)	0,030
Спленомегалия, случаев (%)	47/69 (68,1%)	17/21 (80,9%)	0,279	14/15 (93,3%)	0,050
Конституциональные симптомы, случаев (%)	23/69 (33,3%)	10/21 (47,6%)	0,256	8/15 (53,3%)	0,160
Бласты $\geq 1\%$, случаев (%)	18/69 (26,9%)	14/21 (66,7%)	0,001	13/15 (86,7%)	<0,001

Нонсенс и мутации сдвига рамки считывания гена $ASXL1$ значимо чаще обнаруживали в группах «высокого» и «промежуточного-2 риска» по шкале IPSS по сравнению с группами «низкого» и «промежуточного-1 риска» (30,8% против 8,0%, соответственно, $p=0,010$). В группе «низкого риска» случаи обнаружения мутаций не зафиксированы.

Можно заключить, что наличие мутации в гене $ASXL1$ связано с прогностически неблагоприятными клинико-гематологическими проявлениями ПМФ.

Генетические факторы прогноза у пациентов с ПМФ

По данным однопараметрического регрессионного анализа на общую выживаемость (ОВ) оказывали негативное влияние: мутации преждевременной терминации трансляции (нонсенс и сдвига рамки считывания) в гене $ASXL1$ (OR=2,952,

95% ДИ 1,203-7,244, $p=0,018$), наличие в кариотипе хромосомных аномалий высокого риса (+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, перестройки 11q и 12p, моносомии, 2 и более ХА) (ОР=8,218, 95% ДИ 2,478-27,253, $p=0,001$) и тройной негативный статус (ОР=8,090, 95% ДИ 3,234-20,233, $p<0,0001$). Мутации в гене *CALR* коррелировали с более длительной выживаемостью при пограничном уровне значимости (ОР=0,301, 95% ДИ 0,089-1,010, $p=0,052$). Мутации в генах *JAK2* (ОР=0,732, 95% ДИ 0,333-1,611, $p=0,438$) и *MPL* (ОР=0,842, 95% ДИ 0,194-3,645, $p=0,817$) не оказывали статистически значимого влияния на выживаемость и были исключены из дальнейшего анализа.

Первоначально при оценке влияния мутаций в гене *ASXL1* на ОВ в исследование были включены все случаи обнаружения дефектов гена без учета их типа. Уровень значимости при этом составил $p=0,189$ (ОР=1,752, 95% ДИ 0,758-4,067), т.е. достоверного влияния на выживаемость факт наличия мутации не оказывал. Тогда было принято решение разделить мутации по типам – терминирующие (нонсенс и сдвига рамки считывания) и миссенс мутации – исходя из представлений о роли данных нарушений для синтеза полноценного белкового продукта. Оказалось, что миссенс мутации не оказывали значимого влияния на выживаемость (ОР=0,649, 95% ДИ 0,249-1,697, $p=0,378$), тогда как наличие терминирующей мутации существенно ее уменьшало (ОР=2,952, 95% ДИ 1,203-7,244, $p=0,018$).

Оценка показателей выживаемости у пациентов в зависимости от наличия и типа драйверной мутации, *ASXL1* статуса и кариотипа

Наиболее короткую выживаемость имели пациенты без ДМ: 5-летняя ОВ в данной группе составила лишь 21,8%, а медиана – 3,4 года ($p=0,003$) (рисунок 3а). Несмотря на то, что медиана ОВ в *JAK2*⁺ группе была больше таковой в *CALR*⁺ (13,8 и 10,3 лет, соответственно), 5-летняя выживаемость была выше среди *CALR*⁺ пациентов: 95,6% против 81,6%. Вместе с тем, данные отличия не имели статистической значимости ($p=0,266$).

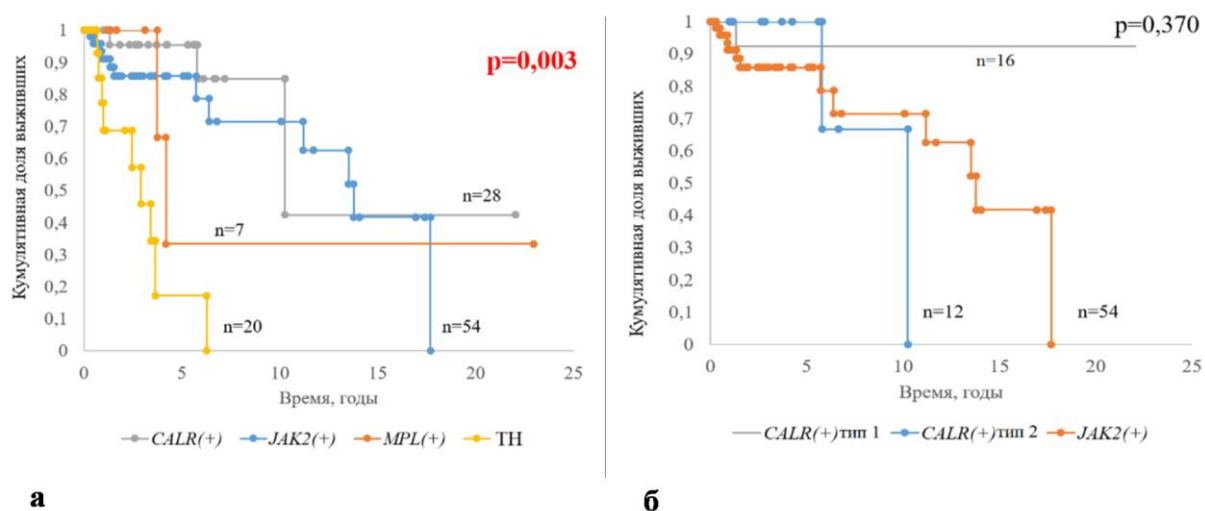


Рисунок 3 – Сравнение общей выживаемости пациентов в зависимости от наличия и типа драйверной мутации

Разница ОВ между *CALR*⁺ и *JAK2*⁺ пациентами была более выраженной при учете типа мутации в гене *CALR*⁺. Среднее время жизни пациентов с мутациями типа 2 составило 8,8 лет (95% ДИ 5,4-12,1 лет, медиана 10,3 года), а типа 1 – 20,5 лет (95% ДИ 17,5-23,5 лет, медиана не достигнута) ($p=0,370$) (рисунок 3б). При сравнении с *JAK2*⁺ больными наблюдали статистическую тенденцию к увеличению выживаемости у *CALR*⁺ пациентов с мутациями типа 1 ($p=0,138$), но не с мутациями типа 2 ($p=0,938$).

Медиана ОБ MPL^+ пациентов составила всего 4,2 года, однако при сравнении с любой другой группой отличия статистической значимости не достигали.

Пятилетняя выживаемость без бластной трансформации в ТН, $CALR^+$, $JAK2^+$ группах составила 56,8, 82,0 и 90,4%, соответственно ($p=0,002$). Пятилетняя кумулятивная доля смертей от ПМФ значимо отличалась в группах пациентов: среди ТН больных – 83%, $CALR^+$ – 4,5%, $JAK2^+$ – 7,2% ($p<0,0001$) (рисунок 4).

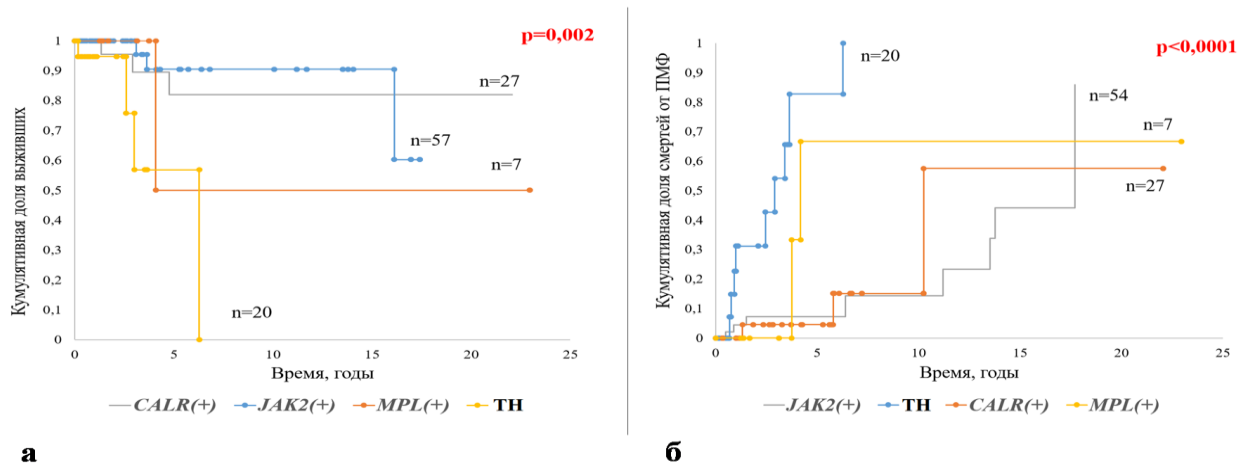


Рисунок 4 – Выживаемость без бластной (а) трансформации и кумулятивная доля смертей (б) среди пациентов с ПМФ в зависимости от наличия и типа драйверной мутации

Таким образом, ТН статус ассоциирован с короткой общей выживаемостью и выживаемостью без бластной трансформации. При обнаружении ДМ более длительная выживаемость характерна для пациентов с мутациями типа 1 в гене $CALR$.

Различия ОБ $ASXL1^+$ и $ASXL1^-$ пациентов при учете всех типов мутаций данного гена значимости не достигали ($p=0,256$). При исключении миссенс-мутаций медиана ОБ $ASXL1^+$ пациентов оказалась значимо меньше таковой у $ASXL1^-$ больных: 5,8 года против 13,5 лет ($p=0,023$) (рисунок 5). Не отмечено статистически значимой разницы ОБ среди пациентов с миссенс мутациями и $ASXL1^-$ ($p=0,206$).

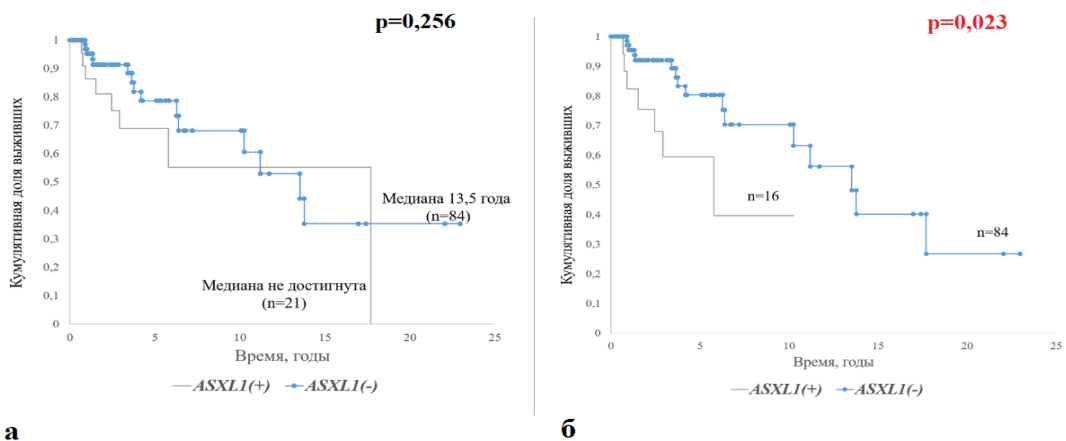
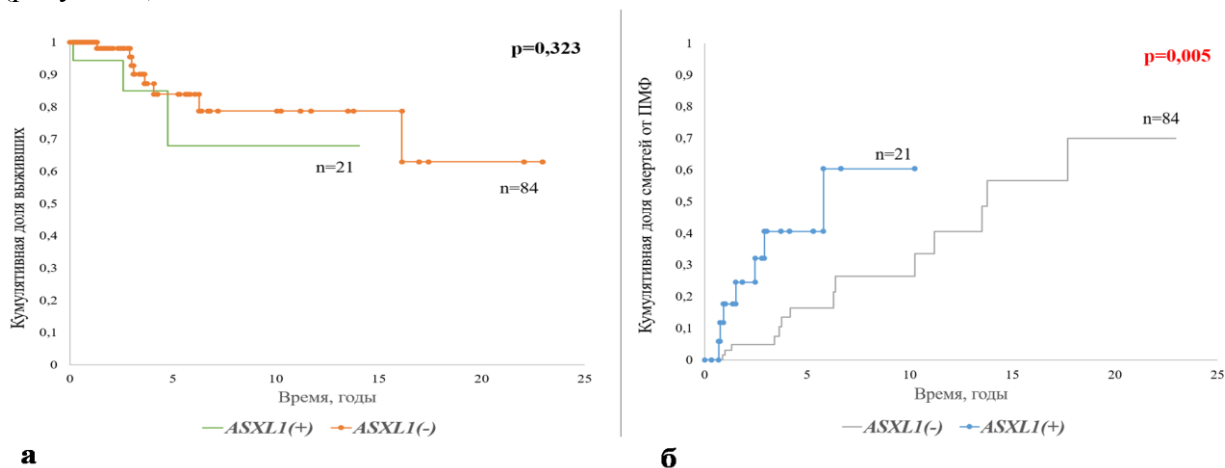


Рисунок 5 – Сравнение общей выживаемости $ASXL1^+$ и $ASXL1^-$ пациентов с ПМФ: а – без учета типа мутации; б – с терминирующей мутацией в гене $ASXL1$ и без таковых

Пятилетняя выживаемость без трансформации в бластную фазу в группе пациентов с мутациями гена $ASXL1$ составила 68%, а без таковых – 84% ($p=0,323$). Сделать

однозначный вывод о влиянии *ASXL1* статуса на выживаемость без бластной трансформации по данным нашего исследования не представляется возможным, т.к. число случаев бластной трансформации в *ASXL1*⁺ группе было невелико (у 3 пациентов с терминирующими и 1 – с миссенс мутациями). Пятилетняя кумулятивная доля смертей от ПМФ среди *ASXL1*⁺ пациентов с мутациями нонсенс и сдвига рамки считывания была значимо выше, чем среди *ASXL1*⁻: 40,6% против 16,4%, соответственно ($p=0,005$) (рисунок 6).



а

б

Рисунок 6 – Выживаемость без бластной трансформации (а) и кумулятивная доля смертей (б) среди пациентов с ПМФ в зависимости от мутационного статуса гена *ASXL1* по терминирующим мутациям

Таким образом, для прогноза течения ПМФ имеет значение тип мутации в гене *ASXL1*: по нашим данным, только терминирующие мутации влияют на ОВ больных. Это согласуется с представлениями о функциональной организации белка *ASXL1*, который утрачивает при данных мутациях домен связывания с комплексами молекул, модифицирующих хроматин.

При попарном сравнении ОВ в группах с различными вариантами кариотипа не обнаружено статистически значимых отличий среди пациентов с нормальным кариотипом ($n=32$) и благоприятными ХА (одиночные $\text{del}(13)(q22)$, $\text{del}(20)(q12)$) ($n=3$) (медиана выживаемости пациентов с НК составила 6 лет, не достигнута у больных с благоприятными ХА, $p=0,264$), а также среди больных с промежуточными (одиночные $\text{del}(6)(q15)$, $\text{add}(6)(p25)$, $\text{del}(X)(q22)$, $t(X;7)(p21;q11)$) ($n=4$) и неблагоприятными ХА (+8, +21, +7, +19, 7q-, 5q-, перестройки 12p, моносомии, 2 и более ХА) ($n=9$) ($p=0,459$, медиана выживаемости при неблагоприятном кариотипе была равна 1,5 года, максимальное время наблюдения в группе с ХА промежуточного прогноза составило 1,4 года и соответствовало единственному летальному исходу среди 4 наблюдений). Таким образом, было принято решение выделить лишь две группы: низкого (НР) и высокого цитогенетического риска (ВР) – включающие пациентов с НК и благоприятными ХА или ХА промежуточного и неблагоприятного прогноза, соответственно. Данные группы статистически значимо отличались по ОВ: медиана ОВ в группе низкого риска составила 6,3 года, а высокого – 1,4 года ($p=0,009$) (рисунок 7).

Негативное влияние кариотипа высокого риска отчетливо прослеживалось в группе пациентов с ДМ (медиана ОВ у больных НР составила 6,2 года, ВР – 1,5 года, $p=0,024$), тогда как среди ТН пациентов медианы ОВ пациентов с кариотипами низкого и высокого риска были близки (2,9 и 2,3 года соответственно, $p=0,496$) (рисунок 8). Отсутствовали статистически значимые отличия между ОВ ТН пациентов с кариотипом низкого риска и пациентов с ДМ и кариотипом высокого риска ($p=0,219$). Отличия медиан ОВ пациентов с кариотипом низкого риска при наличии и отсутствии драйверной мутации статистической значимости не достигали ($p=0,386$). Таким образом, данные цитогенетического

исследования важны, в первую очередь, для оценки прогноза у пациентов с ДМ, тогда как в ТН группе наличие кариотипа низкого риска значимо не улучшает прогноз.

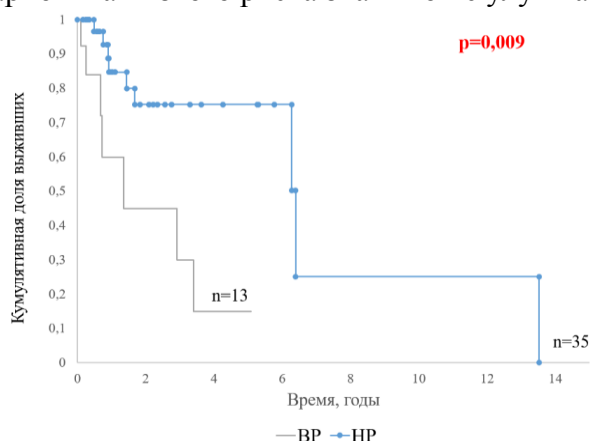


Рисунок 7 – Сравнение общей выживаемости пациентов с кариотипом низкого и высокого риска

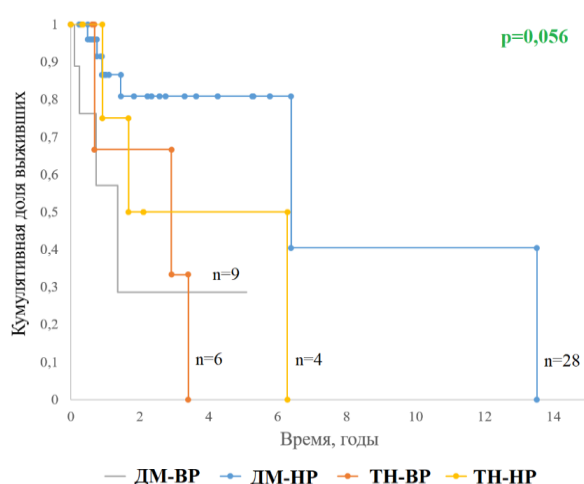


Рисунок 8 – Сравнение общей выживаемости у пациентов с драйверной мутацией и тройных негативных при различном варианте кариотипа

Комплексные генетические характеристики, определяющие прогноз ПМФ

По результатам многопараметрического регрессионного анализа, включавшего такие переменные, как тройной негативный статус, наличие мутации в гене *CALR*, терминирующей мутации в гене *ASXL1* и неблагоприятный кариотип, установлено, что ключевое негативное влияние на ОВ пациентов с ПМФ независимо друг от друга оказывают неблагоприятный кариотип (OR=7,392, 95% ДИ 2,303-23,730, $p=0,001$) и наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* (OR=2,765, 95% ДИ 1,151-6,596, $p=0,023$).

При оценке модели Кокса без учета кариотипа значимое влияние на ОВ оказывали отсутствие ДМ ($p=0,050$, OR=2,425, 95% ДИ 1,005-5,907) и *ASXL1*⁺-статус ($p=0,012$, OR=3,343, 95% ДИ 1,308-8,542), тогда как наличие мутаций в гене *CALR* несколько теряло свою значимость ($p=0,075$, OR=0,311, 95% ДИ 0,086-1,127). Тем не менее данный фактор был значим, когда в качестве ковариаты выступал только положительный *ASXL1*-статус ($p=0,015$, OR=0,215, 95% ДИ 0,062-0,743), который также сохранял свою значимость в данной модели ($p=0,004$, OR=3,951, 95% ДИ 1,562-9,994). В модели, включавшей тройной негативный статус и положительный *ASXL1*-статус, оба параметра значимо влияли на выживаемость ($p=0,003$, OR=3,564, 95% ДИ 1,542-8,236 – для ТН-статуса и $p=0,048$, OR=2,473, 95% ДИ 1,006-6,077 – для мутаций гена *ASXL1*).

Таким образом, были определены следующие комплексные генетические характеристики пациентов для оценки ОВ: *CALR/ASXL1* статус, наличие ДМ/*ASXL1*

статус, кариотип/*ASXL1* статус. (Здесь и далее «*ASXL1*⁺» обозначены пациенты с терминирующей мутацией).

Выделение подгрупп пациентов по данным совокупным признакам позволило обнаружить некоторые особенности распределения гематологических показателей. Стала статистически значимой разница медиан уровня тромбоцитов у *CALR*⁺ и *CALR*⁻ пациентов без мутаций в гене *ASXL1*: $799 \times 10^9/\text{л}$ против $510 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,046$). Также наблюдали различия уровня тромбоцитов у *CALR*⁺ пациентов по сравнению с *CALR*⁻ при положительном *ASXL1* статусе: $313 \times 10^9/\text{л}$ против $164 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,175$). Концентрация гемоглобина у ТН пациентов была значимо меньше, чем в ДМ⁺*ASXL1*⁻ группе, независимо от наличия мутации в гене *ASXL1* (101 г/л у ДМ⁻*ASXL1*⁻ и 100 г/л у ДМ⁻*ASXL1*⁺ против 124 г/л у ДМ⁺*ASXL1*⁻ больных, $p=0,050$ и $p=0,001$, соответственно). Максимальное значение медианы уровня лейкоцитов выявлено у ДМ⁻*ASXL1*⁺ пациентов ($51,1 \times 10^9/\text{л}$) и прослеживалась статистическая тенденция к его уменьшению при отсутствии мутации в ТН группе ($21,7 \times 10^9/\text{л}$, $p=0,155$). При одинаковом *ASXL1* статусе статистически значимо отличались медианы количества лейкоцитов у больных с ДМ и ТН: $7,7 \times 10^9/\text{л}$ и $51,1 \times 10^9/\text{л}$ при *ASXL1*⁺ ($p=0,050$) и $11,7 \times 10^9/\text{л}$ и $21,7 \times 10^9/\text{л}$ при *ASXL1*⁻ ($p=0,022$). Полученные различия демонстрируют взаимовлияние генетических дефектов в формировании гематологической картины ПМФ.

Оценка показателей выживаемости у пациентов с ПМФ в зависимости от комплексных генетических характеристик

Анализ общей выживаемости в группах с учетом *CALR/ASXL1* статуса показал, что наиболее короткую выживаемость демонстрировали *CALR*⁻*ASXL1*⁺ пациенты (медиана выживаемости 2,5 года, $p=0,021$) (рисунок 9).

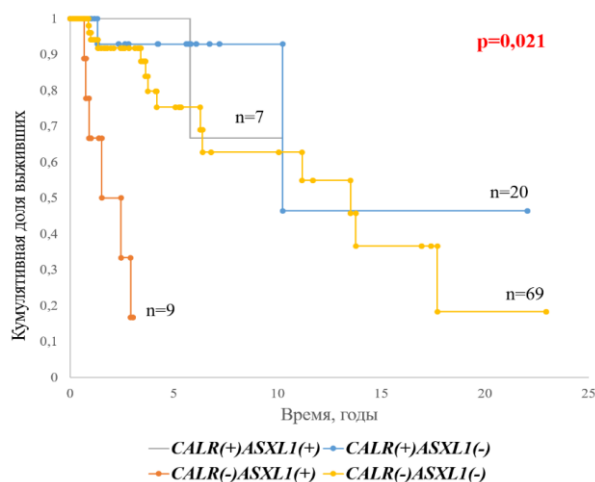


Рисунок 9 – Общая выживаемость пациентов с различной комбинацией генетических характеристик *CALR/ASXL1*

Пятилетняя выживаемость *CALR*⁺*ASXL1*⁻ больных была несколько выше, чем *CALR*⁻*ASXL1*⁻: 93% против 75%, $p=0,124$. Статистически значимых отличий ОБ между *CALR*⁺*ASXL1*⁺ (медиана не достигнута при времени наблюдения 10,1 года) и *CALR*⁺*ASXL1*⁻ (медиана 10,3 года) ($p=0,630$), *CALR*⁺*ASXL1*⁺ и *CALR*⁻*ASXL1*⁻ (медиана 13,5 года) ($p=0,480$) пациентами не выявлено. Главным недостатком характеристики «*CALR/ASXL1* статус» является отсутствие разграничения пациентов с ДМ и тройных негативных в *CALR*⁻*ASXL1*⁻ и *CALR*⁻*ASXL1*⁺ группах при доказанном неблагоприятном влиянии ТН статуса на ОБ.

Весьма существенные отличия были выявлены между группами при сравнении ОБ по совокупной характеристике «наличие ДМ/*ASXL1* статус» ($p<0,0001$). Так, медиана выживаемости ДМ⁺*ASXL1*⁺ (ТН *ASXL1*⁺) пациентов составила всего 0,9 года, а ДМ⁺*ASXL1*⁻ (ТН *ASXL1*⁻) – 3,6 года, тогда как для ДМ⁺*ASXL1*⁻ пациентов данный показатель составил

13,8 лет. В DM^+ASXL1^+ группе медиана выживаемости достигнута не была при времени наблюдения 10,3 года. (рисунок 10).

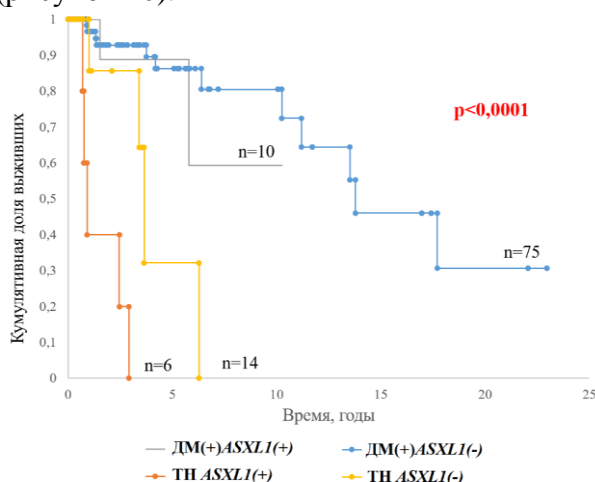


Рисунок 10 – Сравнение общей выживаемости пациентов в зависимости от наличия/отсутствия драйверной мутации и $ASXL1$ статуса

Попарный анализ выживаемости в группах показал, что обнаружение терминирующей мутации в гене $ASXL1$ значительно снижает выживаемость среди тройных негативных пациентов ($p=0,007$). Выживаемость DM^+ASXL1^+ пациентов была значительно больше DM^+ASXL1^- ($p=0,044$). Значимых отличий в выживаемости пациентов с ДМ, но различным $ASXL1$ -статусом, не выявлено ($p=0,788$). Вместе с тем, данные об уменьшении ОВ при наличии мутации не позволяют включить DM^+ASXL1^+ больных в группу благоприятного прогноза.

При учете данных анализа генов эпигенетической регуляции медиана ОВ $ASXL1^+$ пациентов с кариотипом низкого риска статистически значимо не отличалась от таковой среди $ASXL1^-$ пациентов высокого цитогенетического риска (1,6 и 1,4 года, соответственно, $p=0,291$). Значимых отличий не было обнаружено и среди $ASXL1^+$ пациентов с кариотипами низкого и высокого рисков (медиана ОВ 1,6 и 1,2 года, $p=0,610$). Медиана ОВ $ASXL1^-$ пациентов с кариотипом низкого риска была значительно больше, чем в других трех группах, и составила 6,4 года ($p=0,0005$) (рисунок 11).

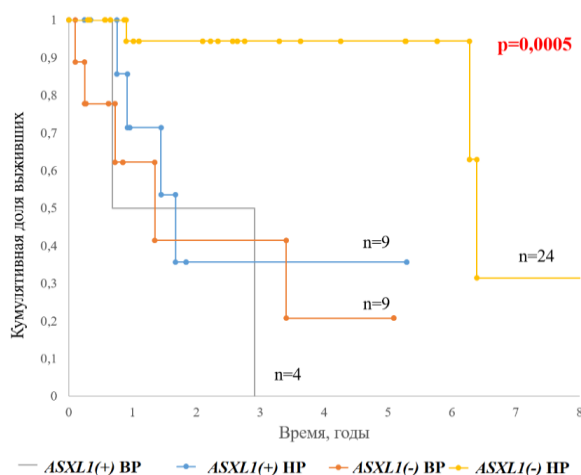


Рисунок 11 – Сравнение общей выживаемости у пациентов в зависимости от мутационного статуса гена $ASXL1$ и кариотипа

Поскольку значимые отличия общей выживаемости в группах пациентов с любой находкой – мутацией в гене $ASXL1$ и/или кариотипом высокого риска – отсутствовали, а

медианы ОВ были близки, больные были объединены в одну группу. Медиана ОВ в данной группе составила 1,5 года ($p=0,0003$ при сравнении с *ASXL1*⁻ пациентами без хромосомных аномалий высокого риска).

Алгоритм генетической диагностики пациентов с ПМФ

На основании полученных результатов предложен алгоритм диагностики и оценки прогноза у пациентов с ПМФ с использованием данных цитогенетического и молекулярно-генетического исследований (рисунок 12). Представленный алгоритм может быть использован в дополнение к стандартным методикам оценки риска при ПМФ, позволяя интерпретировать генетические характеристики опухоли в контексте влияния на прогноз.

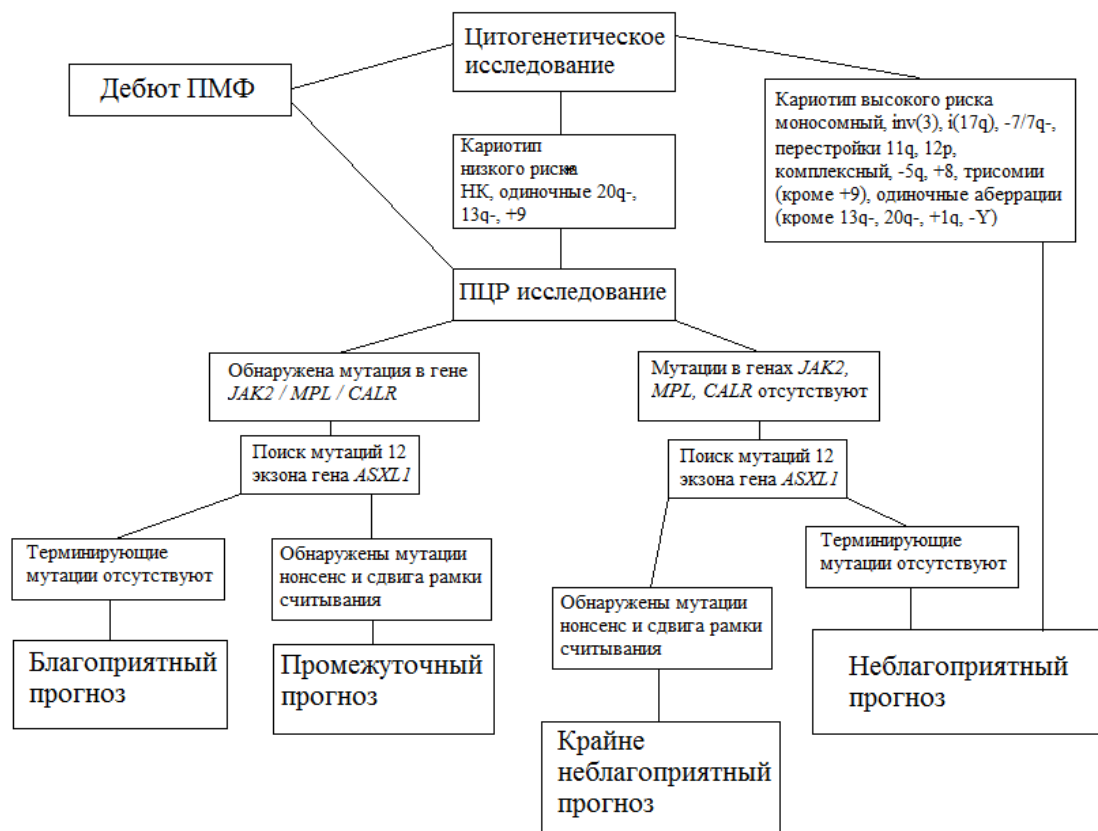


Рисунок 12 – Алгоритм генетической диагностики пациентов с ПМФ

ВЫВОДЫ

1. Драйверные мутации обнаруживаются у подавляющего большинства пациентов (81,8%) с первичным миелофиброзом (*JAK2* – 50%, *CALR* – 25%, *MPL* – 7%). У значительной части больных (21,7%) также выявляются мутации генов эпигенетической регуляции транскрипции. Среди них преобладают дефекты гена *ASXL1* (87%). Частота мутаций в генах *EZH2* и *IDH1/2* является довольно низкой (по 1,9%). Мутации гена *ASXL1* встречаются у пациентов с различными драйверными мутациями и без таковых, значимо преобладая в *CALR*⁺ группе по сравнению с *JAK2*⁺ ($p=0,037$).

2. Частота неблагоприятных хромосомных aberrаций, как и общая частота всех аномалий кариотипа, значимо не отличается в группах пациентов с различными драйверными мутациями и без таковых ($p=0,649$), а также в группах с различным мутационным статусом генов эпигенетической регуляции ($p=0,465$).

3. Для тройных негативных пациентов характерны более низкие уровни гемоглобина ($p=0,006$) и тромбоцитов ($p=0,041$) и более высокие – лейкоцитов ($p=0,001$) по сравнению с пациентами, у которых обнаружена драйверная мутация. Бластемия

статистически значимо чаще определяется у *CALR*⁺ и тройных негативных пациентов по сравнению с *JAK2*⁺ больными ($p=0,001$ и $p=0,003$, соответственно). Уровень гемоглобина достоверно выше у *JAK2*⁺ пациентов по сравнению с остальными больными ($p=0,021$). Наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* ассоциировано со спленомегалией ($p=0,050$), лейкоцитозом ($p=0,030$), тромбоцитопенией ($p=0,002$) и бластемией ($p<0,001$).

4. Аномалии кариотипа (+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, перестройки 11q и 12p, моносомии, 2 и более хромосомные aberrации) ($p=0,001$), тройной негативный статус ($p<0,0001$), наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* ($p=0,018$) статистически значимо ухудшают общую выживаемость пациентов с первичным миелофиброзом. Наименьшую выживаемость имеют *CALR*⁻*ASXL1*⁺ (медиана 2,5 года, $p=0,021$) и тройные негативные/*ASXL1*⁺ больные (медиана 0,9 года, $p<0,0001$). Среди пациентов с известным кариотипом наиболее длительная выживаемость характерна для *ASXL1*⁻ больных без неблагоприятных хромосомных aberrаций (медиана 6,4 года, $p=0,0005$).

5. Использование при диагностике совокупной характеристики «наличие драйверной мутации/*ASXL1* статус» позволяет оптимизировать алгоритм определения прогноза течения первичного миелофиброза с выделением групп риска: крайне неблагоприятной (отсутствие драйверной мутации и наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1*), неблагоприятной (отсутствие драйверной мутации и терминирующей мутации в гене *ASXL1*), промежуточной (наличие драйверной мутации в сочетании с терминирующей мутацией в гене *ASXL1*), благоприятной (наличие драйверной мутации и отсутствие терминирующей мутации в гене *ASXL1*). Одновременный учет кариотипа и *ASXL1* статуса позволяет отнести пациентов к группе высокого риска при наличии любой аномалии: неблагоприятного кариотипа или терминирующей мутации в гене *ASXL1*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для верификации диагноза и определения прогноза всем пациентам с первичным миелофиброзом следует обязательно выполнять молекулярно-генетическое исследование на наличие мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*.

2. Исследование кариотипа должно проводиться всем пациентам при диагностике первичного миелофиброза независимо от наличия и типа драйверной мутации или дефектов гена *ASXL1*.

3. При наличии в кариотипе aberrаций высокого риска (+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, перестройки 11q и 12p, моносомии, 2 и более хромосомные aberrации) больного следует относить к группе неблагоприятного прогноза течения заболевания.

4. По результатам молекулярно-генетического исследования больных первичным миелофиброзом необходимо разделять на группы риска: крайне неблагоприятную – при отсутствии драйверной мутации и наличии терминирующей мутации в гене *ASXL1*, неблагоприятную – при отсутствии как драйверной мутации, так и терминирующей мутации в гене *ASXL1*, промежуточную – при наличии драйверной мутации в сочетании с терминирующей мутацией в гене *ASXL1*, благоприятную – при наличии драйверной мутации и отсутствии терминирующей мутации в гене *ASXL1*.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Абдулкадыров, К.М. Первичный миелофиброз. – двадцатилетний опыт диагностики и лечения. / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, А.С. Абдулкадырова, В.Ю. Удальева, Р.А. Головченко, И.И. Зотова, Л.Б. Полушкина, М.С. Фоминых, А.А. Жернякова // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – Приложение 1. – С.32.
2. Мартынкевич, И.С. Хромосомные aberrации, выявляемые при различных вариантах Ph-негативных хронических миелопролиферативных неоплазий. / И.С. Мартынкевич,

- В.А. Шуваев, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, Е.В. Клейна, Л.Б. Полушкина, Е.В. Петрова, К.М. Абдулкадыров // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – Приложение 1. – С.21-22.
3. Полушкина, Л.Б. Выявляемость мутаций в гене *EZH2* при Ph-негативных миелопролиферативных неоплазиях. / Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, Е.В. Петрова, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, Е.С. Шабанова, В.А. Шуваев, К.М. Абдулкадыров // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – Приложение 1. – С.112.
 4. Абдулкадыров, К.М. Первичный миелофиброз – популяционный анализ диагностики и лечения. / К.М. Абдулкадыров, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, А.С. Абдулкадырова, В.Ю. Удальева, Р.А. Головченко, И.И. Зотова, Л.Б. Полушкина, М.С. Фоминых, А.А. Жернякова // Вестник гематологии. – 2014. – Т.10. – №2. – С.5-6.
 5. Полушкина, Л.Б. Молекулярно-генетические методы исследования в диагностике и определении прогностических особенностей течения Ph-отрицательных миелопролиферативных неоплазий. / Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, Е.В. Петрова, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, Е.В. Клейна, Е.С. Шабанова, Т.Б. Замотина, М.С. Фоминых, В.А. Шуваев, К.М. Абдулкадыров, С.С. Бессмельцев // Вестник гематологии. – 2014. – Т.10. – №2. – С.94-95.
 6. Polushkina, L. The frequency and prognostic of *EZH2* mutations in patients with BCR-ABL-negativemyeloproliferative neoplasms. / L. Polushkina, I.Martynkevich, E. Petrova, L. Martynenko, M. Ivanova, N. Cybakova, E. Shabanova, I. Zotova, T. Zamotina, M. Fominykh, V. Shuvaev, K. Abdulkadyrov // Haematologica. – 2014. – Vol.99. – Supplement 1. – P.660.
 7. Polushkina, L. Markers of clonal hematopoiesis in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. // L. Polushkina, I. Martynkevich, V. Shuvaev, E. Petrova, M. Fominykh, L. Martynenko, N. Cybakova, M. Ivanova, E. Shabanova, I. Zotova, T. Zamotina, A. Zhernyakova, K. Abdulkadyrov // Haematologica. – 2015. – Vol.100. – Supplement 1. – P.531.
 8. Polushkina, L. Genetic and epigenetic alterations of ph-negative myeloproliferative neoplasms. / L. Polushkina, I. Martynkevich, V. Shuvaev, E. Petrova, L. Martynenko, M. Ivanova, N. Cybakova, E. Kleina, E. Shabanova, D. Shikhbabaeva, T. Zamotina, M. Fominykh, K. Abdulkadyrov // Blood. – 2016. – Vol.124. – №21. – P.5549. – Режим доступа: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/5549>
 9. Полушкина, Л.Б. Молекулярно-генетические и цитогенетические особенности первичного миелофиброза. / Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, М.С. Фоминых, Карягина Е.В., Саврилова А.М., Абдулкадыров К.М. // Гены и клетки. – 2016. – Т.11. – №3. – С.113-122.
 10. Фоминых, М.С. Комбинированный режим терапии руксолитинибами малыми дозами цитозара или меркаптопурина у пациентов с бластным кризом миелофиброза. / М.С. Фоминых, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, Л.Б. Полушкина, В.Ю. Удальева, К.М. Абдулкадыров // Онкогематология. – 2016. – Т.11 – №2 – С.37-39.
 11. Fominykh, M. The combination treatment regimen of ruxolitinib with low-dose mercaptopurine or cytarabine in frail patients with blast-phase myelofibrosis. / M. Fominykh, V. Shuvaev, I. Martynkevich, L. Polushkina, V. Udalyeva, K. Abdulkadyrov // British Journal of Haematology. – 2016. – Vol.178. – №4. – P.645-646.
 12. Polushkina, L. Prognosis in primary myelofibrosis patients according to cytogenetic and molecular testing results. / L. Polushkina, I. Martynkevich, V. Shuvaev, M. Fominykh, D. Shikhbabaeva E. Motyko, L. Martynenko, M. Ivanova, N. Cybakova, E. Shabanova, A. Zhernyakova, A. Savrilova, K. Abdulkadyrov // Blood. – 2016. – Vol.128. – №22. – P.5467. – Режим доступа: <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/5467>
 13. Полушкина, Л.Б. Молекулярно-генетический профиль пациентов с первичным миелофиброзом. / Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, М.С. Фоминых, Д.И. Шихбабаева, Е.В. Петрова, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, Е.С. Шабанова, А.А. Жернякова, А.М. Саврилова, К.М. Абдулкадыров // Гематология и трансфузиология. – 2016. – Т.61. – Приложение №1. – С.63.
 14. Polushkina, L. Molecular and cytogenetic profile of patients with primary myelofibrosis. / L. Polushkina, I. Martynkevich, V. Shuvaev, E. Petrova, L. Martynenko, N. Cybakova, M. Ivanova, E. Shabanova, I. Zotova, T. Zamotina, A. Zhernyakova, A. Savrilova, D. Shikhbabaeva, M. Fominykh, K. Abdulkadyrov // Haematologica. – 2016. – Vol.101. – Supplement 1. – P.804.

15. Полушкина, Л.Б. Комплексная оценка молекулярно-генетических и цитогенетических маркеров прогноза у пациентов с первичным миелофиброзом. / Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, Е.В. Мотыко, М.С. Фоминых, Ю.А. Криволапов, З.П. Асауленко, Л.С. Мартыненко, М.П. Иванова, Н.Ю. Цыбакова, С.В. Волошин, С.С. Бессмельцев, А.В. Четкин // Вестник гематологии. – 2017. – Т.13. – №2 – С.69-70.
16. Панкрашкина, М.М. Собственный опыт применения руксолитиниба в рамках обычной клинической практики. / М.М. Панкрашкина, Е.В. Ефремова, О.Ю. Виноградова, М.С. Фоминых, В.А. Шуваев, Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, С.В. Волошин, В.В. Птушкин, А.В. Четкин // Вестник гематологии. – 2017. – Т.13. – №2 – С.66-67.
17. Polushkina, L. A comprehensive assessment of molecular and cytogenetic markers of prognosis in patients with primary myelofibrosis. // L. Polushkina, I. Martynkevich, V. Shuvaev, E. Motyko, M. Fominykh, I. Krivolapov, Z. Asaulenko, L. Martynenko, M. Ivanova, N. Sybacova, D. Shikhbabaeva, A. Zhernyakova, S. Voloshin, S. Bessmelcev, A. Chechetkin // Haematologica. – 2017. – Vol.102. – Supplement 2. – P.538-537.
18. **Виноградова, О.Ю. Таргетная терапия миелофиброза. / О.Ю. Виноградова, В.А. Шуваев, И.С. Мартынкевич, М.М. Панкрашкина, М.С. Фоминых, Е.В. Ефремова, К.Ю. Крутикова, Л.Б. Полушкина, Н.Н. Шаркунов, С.В. Волошин, А.В. Четкин // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т.10. – №4. – С.471-478.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БТ – бластная трансформация
 ВР – кариотип высокого риска
 ДМ – драйверная мутация
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 НК – нормальный кариотип
 НР – кариотип низкого риска
 ОВ – общая выживаемость
 ПМФ – первичный миелофиброз
 ТН – тройной негативный
 ХА – хромосомные aberrации
 ХФ – хроническая фаза
 ЭГР – эпигенетическая регуляция
ASXL1 – ген ядерного белка-регулятора additional sex combs like 1
CALR – ген кальретикулина
 DIPSS+ – Dynamic International Prognostic Scoring System Plus – динамическая международная прогностическая шкала плюс
EZH2 – ген H3K27 метилтрансферазы (Enhancer of zeste homolog 2)
IDH1/2 – ген изоцитратдегидрогеназы
 IPSS – International Prognostic Scoring System – международная прогностическая шкала
JAK2 – ген янускиназы 2
 MIPSS – Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System – мутационная международная прогностическая шкала
MPL – ген рецептора тромбопоэтина (myeloproliferative leukemia virus)