

На правах рукописи

Жернякова Анастасия Андреевна

**ОСОБЕННОСТИ ДИАГНОСТИКИ, КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ И
ПРОГНОЗА У БОЛЬНЫХ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ТРОМБОЦИТЕМИЕЙ**

14.01.21. - гематология и переливание крови

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2017

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

Научные руководители:

Абдулкадыров Кудрат Мугутдинович

Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор

Мартынкевич Ирина Степановна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Виноградова Ольга Юрьевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры онкологии, гематологии и лучевой терапии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мамаев Николай Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «___» _____ 2017 года в ___ часов
на заседании диссертационного совета Д 208.074.01 при ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России 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 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Татьяна Валентиновна Глазанова

Актуальность исследования

Эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) – миелопролиферативное заболевание с повышенной продукцией мегакариоцитов в костном мозге и тромбоцитозом в периферической крови. Относится к группе миелопролиферативных новообразований (МПН), является редким (орфанным) заболеванием с частотой выявляемости от 1,5 до 2,5 случаев на 100 000 населения в год [Абдулкадыров К.М. и соавт., 2016, Меликян А.Л. и соавт., 2014].

Ключевым звеном патогенеза ЭТ является неконтролируемая активация клеточного сигнального пути JAK-STAT. В настоящее время достоверно установлена центральная роль соматической точечной мутации гена, кодирующего тирозинкиназу *JAK2* (*JAK2V617F*), в активации JAK-STAT-пути. Детекция мутации в 2005 году [Baxter F. et al., 2005] и последующее изучение ее роли в патогенезе ЭТ кардинально изменили существующие представления о возникновении и развитии заболевания, что способствовало включению мутации в диагностический алгоритм ЭТ. Однако наличие *JAK2V617F* только у 50-60% пациентов выявило необходимость поиска других генетических перестроек, участвующих в развитии клонального миелопролиферативного процесса у *JAK2V617F*-негативных пациентов.

В результате поиска иных молекулярно-генетических маркеров клональности были выявлены два типа соматических мутаций, также участвующих в активации JAK-STAT-пути. В 2006 году были описаны соматические мутации гена рецептора тромбопоэтина – *MPL* [Pardanani AD et al., 2006, Pikman Y. et al., 2006], а в 2013 году мутации гена, кодирующего белок кальретикулин, – *CALR* [Klampfl T. Et al., 2013, Nangalia J. Et al., 2014]. Исследование влияния мутаций *MPL* и *CALR* на патогенез ЭТ в настоящее время продолжается.

Кроме трех соматических мутаций (*JAK2V617F*, *MPL* и *CALR*), активирующих JAK-STAT-путь, при ЭТ выявлен спектр различных эпигенетических перестроек: *TET2*, *EZH2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH*, *IKZF1*, *LNK*, *IDH1/IDH2* [Tefferi A. Et al., 2010]. Отсутствие убедительных данных в пользу специфичности таких мутаций для ЭТ, их детекция при других заболеваниях системы крови, органов лимфоидной и кроветворной тканей: миелодиспластический синдром (МДС), острый лейкоз (ОЛ), лимфопролиферативные заболевания (лимфомы) не позволяет говорить о патогенетической роли данных перестроек и об их включении в диагностический алгоритм ЭТ в качестве высокоспецифичных молекулярно-генетических маркеров клональности. Тем не менее, вклад эпигенетических мутаций в возникновение и развитие ЭТ требует дальнейшего изучения.

На современном этапе остается открытым вопрос о возможном влиянии соматических мутаций генов *JAK2*, *MPL* и *CALR* на особенности клинического течения и прогноз ЭТ. Опубликованные в различных литературных источниках данные не позволяют составить полную и систематизированную характеристику развития, клинического течения и прогноза ЭТ при носительстве различных генетических перестроек [Asp J. et al., 2016, Pietra D. et al, 2016]. Кроме того, возможные сочетания соматических мутаций с эпигенетическими перестройками и хромосомными aberrациями, их влияние на течение, риски осложнений и модифицирование прогноза заболевания требуют изучения.

Таким образом, актуальность данной темы для исследования обусловлена важностью проведения анализа встречаемости основных, описанных на данном этапе, молекулярно-генетических маркеров клональности. Представляется целесообразным изучение вопроса о влиянии генетических перестроек на особенности клинического течения, возможное потенцирование рисков развития осложнений и в целом прогноз ЭТ.

Полученные в ходе выполнения работы данные позволят улучшить оценку клинко-прогностической значимости носительства молекулярно-генетических перестроек при ЭТ и будут способствовать обновлению терапевтических подходов и алгоритмов, что позволит оптимизировать проводимое лечение и персонализировать тактику терапии заболевания.

Итогом данного исследования должно явиться формирование риск-адаптированного алгоритма, направленного на выявление групп пациентов с различными рисками неблагоприятного развития заболевания, учитывающего клинко-лабораторные и молекулярно-

генетические данные, что позволит индивидуализировать и оптимизировать выбор терапевтической тактики.

Степень разработанности темы

Значительное количество работ последнего десятилетия посвящено исследованию молекулярно-генетических аномалий у пациентов с ЭТ. Тем не менее, в настоящее время не сформировано однозначного представления об ЭТ при носительстве различных патогенетически значимых мутаций. Сохраняются противоречивые данные о клиническом течении, рисках развития осложнений и прогнозе у пациентов с различным мутационным статусом. Недостаточная изученность возможных ассоциаций между молекулярно-генетическим фенотипом и клинико-прогностическим вариантом ЭТ свидетельствует о необходимости проведения дополнительных исследований.

Цель исследования

Определить роль клинических, молекулярно-генетических и других лабораторных изменений в диагностике, течении и прогнозе эссенциальной тромбоцитемии.

Задачи исследования

1. Определить взаимосвязь клинико-лабораторных показателей и генетических аномалий при эссенциальной тромбоцитемии.
2. Изучить особенности клинического течения заболевания в зависимости от мутационного статуса у больных эссенциальной тромбоцитемией.
3. Установить прогностическое значение клинических, лабораторных параметров и генетических нарушений в развитии тромботических и геморрагических осложнений у больных эссенциальной тромбоцитемией.
4. Разработать алгоритм прогнозирования риска неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии, основанный на клинико-лабораторных и молекулярно-генетических характеристиках заболевания.

Научная новизна исследования

В ходе выполнения исследования впервые показано, что:

- более выраженный тромбоцитоз характерен для пациентов с мутациями в гене *CALR* в сравнении с другими группами больных; уровень гемоглобина выше у больных с наличием мутации *JAK2V617F* в сравнении с пациентами, имеющими тройной негативный статус;
- индолентное течение заболевания характерно для *CALR*-положительного статуса и наиболее благоприятно при мутациях 1 типа гена *CALR*; общая выживаемость снижена при наличии мутации *JAK2V617F* и тройном негативном статусе эссенциальной тромбоцитемии;
- наличие мутации *JAK2V617F* является фактором, увеличивающим риск тромботических осложнений; частота геморрагических осложнений выше при мутациях в гене *CALR* по сравнению с другими генетическими вариантами патологии;
- возраст старше 60 лет, симптомы нарушения микроциркуляции, уровень тромбоцитов выше $1000 \times 10^9/\text{л}$, детекция мутации *JAK2V617F*, тройной негативный статус определяют высокий риск неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии.

Практическая значимость работы

Установлена необходимость определения мутационного статуса у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией для прогнозирования течения заболевания, частоты тромбозов и рисков геморрагических осложнений. Мутации гена *CALR* обуславливают более выраженный тромбоцитоз, но индолентное течение эссенциальной тромбоцитемии. Общая выживаемость при эссенциальной тромбоцитемии снижена при наличии мутации *JAK2V617F* и тройном

негативном статусе. Клинико-лабораторные и молекулярно-генетические факторы позволяют стратифицировать пациентов на группы риска и оптимизировать тактику терапии эссенциальной тромбоцитемии. Неблагоприятное течение заболевания прогнозируется при наличии следующих признаков: возраст старше 60 лет, симптомы нарушения микроциркуляции, уровень тромбоцитов выше $1000 \times 10^9/\text{л}$, наличие мутации *JAK2V617F*, тройной негативный статус.

Методология и методы исследования

В работе использованы клинико-лабораторные, морфологические, цитогенетические, молекулярно-генетические и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Более высокий уровень тромбоцитов наблюдается у пациентов с мутациями гена *CALR* по сравнению с другими группами пациентов с эссенциальной тромбоцитемией. Уровень гемоглобина при эссенциальной тромбоцитемии выше у больных с мутацией *JAK2V617F* в сравнении с тройным негативным статусом.

2. Индолентное течение эссенциальной тромбоцитемии характерно для больных с мутациями гена *CALR*, при этом наиболее благоприятным молекулярно-генетическим маркером являются мутации 1 типа. Общая выживаемость снижена при наличии мутации *JAK2V617F* и тройном негативном статусе.

3. Риск тромботических осложнений увеличен у пациентов с мутацией *JAK2V617F* (частота тромбозов – 24,2%), тогда как частота тромботических осложнений при тройном негативном статусе составила 15,4%, при мутациях гена *CALR* 1 типа – 7,7%, при мутациях гена *CALR* 2 типа и *MPL*-положительном статусе тромбозы не наблюдались. Наличие мутаций в гене *CALR* обуславливает более высокую частоту геморрагических осложнений по сравнению с пациентами с мутацией *JAK2V617F* и тройным негативным статусом.

4. Разработанный алгоритм оценки неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии позволяет отнести пациента к группе высокого риска при выявлении хотя бы одного из критериев (возраст старше 60 лет, наличие симптомов нарушения микроциркуляции, уровень тромбоцитов выше $1000 \times 10^9/\text{л}$, наличие мутации *JAK2V617F*, тройной негативный статус) и индивидуализировать терапевтическую тактику.

Степень достоверности, публикации и апробация диссертации

Степень достоверности обусловлена проведением молекулярно-генетических исследований у большой группы больных (240 пациентов с ЭТ), использованием достоверных методов исследования, качеством проведения лабораторных анализов и статистической обработкой полученных результатов.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них – 2 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для опубликования научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук.

Материалы диссертации представлены на 20-м Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (20th Congress of European Hematology Association, Вена, Австрия, 2015), 21-м Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (21th Congress of European Hematology Association, Копенгаген, Дания, 2016), III Конгрессе гематологов (Москва, 2016), Мемориальной конференции памяти К.М. Абдулкадырова «Миелопролиферативные новообразования» (Санкт-Петербург, сентябрь 2016 года), Юбилейной конференции Военно-медицинской академии «Кафедра факультетской терапии: Сохраняя традиции Боткинской школы» (Санкт-Петербург, октябрь 2016 года), XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, март 2017 года), III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Генетика опухолей кроветворной системы» (Санкт-Петербург, апрель 2017 года), XX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей

«Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, апрель 2017 года), 22-м Конгрессе Европейской Гематологической Ассоциации (22th Congress of European Hematology Association, Мадрид, Испания, 2017).

Личный вклад автора

Автором лично выполнялись: планирование исследования; обследование, диагностика и последующее динамическое наблюдение за пациентами, выполнение плановых процедур скрининга течения ЭТ; ведение первичной документации и сбор информации из амбулаторных карт и историй болезни; проведение анализа результатов скрининга мутационного статуса генов *JAK2V617F*, *MPL*, *CALR*, *EZH2*, и *ASXL1*, с использованием молекулярно-генетических методов исследования; анализ полученных данных, статистическая обработка и обобщение результатов.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 121 странице машинописного текста и состоит из введения, глав обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования, обсуждения, практических рекомендаций и библиографии. Список литературы включает 153 источника литературы на русском и иностранном языках. Работа содержит 19 рисунков и 18 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования и характеристика пациентов

Характеристика исследуемой группы пациентов

Исходно была определена выборка пациентов с диагнозом ЭТ (240 пациентов): мужчин 62 (25,8%) и женщин 178 (74,2%). Медиана возраста пациентов 58,7 лет (мин – макс, 20 лет – 91 год). Медиана периода наблюдения составила 37 месяцев (мин – макс, 6 – 270 месяцев). Верификация диагноза проводилась согласно критериям ВОЗ 2008 года.

В дебюте заболевания были зарегистрированы следующие клинические симптомы: слабость – 57 (23,7%), спленомегалия – 35 (14,6%), эпизоды головных болей и головокружений – 29 (12,1%), наличие болей в суставах – 23 (9,6%), проявления эритромелалгий – 15 (6,3%), появление кожного зуда – 8 (3,8%). У 114 (47,5%) пациентов в дебюте заболевания не регистрировались клинические проявления.

Показатели клинического анализа крови (уровни гемоглобина, лейкоцитов и тромбоцитов) на этапе верификации диагноза представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели клинического анализа крови на этапе диагностики эссенциальной тромбоцитемии

Показатели клинического анализа крови	Среднее значение (95% д.и.)
Гемоглобин, г/л	140 (138-142)
	мужчины: 149 (143-151)
	женщины: 137 (132-142)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,8 (9,4-10,3)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	879 (836-921)

Среди 240 пациентов у 183 (76,3%) не было выявлено ни тромботических ни геморрагических осложнений, у 57 пациентов (23,7%) такие осложнения (артериальные и венозные тромбозы, ОИМ, ОНМК и эпизоды кровотечений различной локализации) были

зарегистрированы. Было получено следующее распределение пациентов по молекулярно-генетическому фенотипу: *JAK2V617F* (*JAK2+*) – 182/240 (75,9%); *CALR*-мутации (*CALR+*) – 30/240 (12,5%): тип 1 (*CALR1+*) – 13/30 (43,3%) и тип 2 (*CALR2+*) – 17/30 (56,7%); *MPL*-мутации (*MPL+*) – 2/240 (0,8%); тройные негативные (ТН) – 26/240 (10,8%) (рисунок 1).

Мутации в гене *ASXL1* выявлены у 10 пациентов: у одного *CALR1+*, двух *CALR2+*, трех ТН и четырех *JAK2+* пациентов; *EZH2*-мутации – у 6 пациентов: у одного *CALR1+*, одного *CALR2+*, трех ТН и одного *JAK2+* пациентов; сочетание *ASXL1* и *EZH2* – у двух *JAK2+* пациентов.

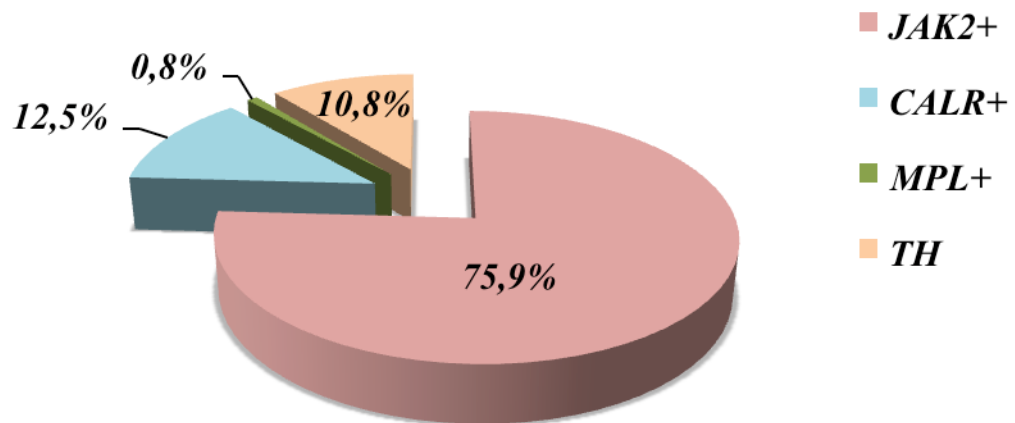


Рисунок 1 – Частота выявления маркеров клональности у больных ЭТ (n=240)

У всех обследованных пациентов был определен нормальный кариотип на этапе первичной диагностики при верификации диагноза. В дальнейшем, только у одной *JAK2+* пациентки (2,3%) были выявлены комплексные изменения кариотипа (45XXdel(5)(q13;q33),del(7)(q11;q22),-17[20]) при повторном исследовании при прогрессировании заболевания. У данной пациентки также определялся нормальный кариотип на этапе верификации диагноза ЭТ, а клональная хромосомная эволюция наблюдалась только при прогрессировании заболевания.

Для решения задач исследования было запланировано выполнение четырех этапов.

На первом этапе в группах пациентов, разделенных по молекулярно-генетическому профилю, проводился анализ показателей клинического анализа крови (уровни гемоглобина, лейкоцитов и тромбоцитов), наличия клинической симптоматики (спленомегалия, головные боли и головокружения, кожный зуд, слабость, эритромелалгии и боли в суставах).

На втором этапе были проанализированы характеристики клинического течения ЭТ: частота тромботических и/или геморрагических осложнений, изменение показателей общей выживаемости и частота неблагоприятных исходов (трансформация в МФ, развитие БК, летальный исход) в группах пациентов с различным молекулярно-генетическим профилем.

На третьем этапе исследуемая группа пациентов была разделена на подгруппы по наличию тромботических или геморрагических осложнений, а также выделена подгруппа без осложнений. В полученных подгруппах были проанализированы клинические и молекулярно-генетические показатели, выполнен анализ влияния наличия различных факторов на риск развития тромботических или геморрагических осложнений при ЭТ.

На четвертом этапе выполнено обобщение полученных результатов. Были выделены клиничко-лабораторные и молекулярно-генетические факторы, влияющие на неблагоприятное течение и риск тромботических осложнений при ЭТ. Исследованы пороговые уровни статистически значимых показателей. Разработан алгоритм определения риска

неблагоприятного клинического течения и тромботических осложнений при ЭТ, основанный на клинических, лабораторных и молекулярно-генетических характеристиках заболевания.

Методы исследования

Первоначально проводился физикальный осмотр пациентов, сбор жалоб, осуществлялся анализ медицинской документации. Всем пациентам выполнялся клинический анализ крови с подсчетом уровня тромбоцитов при помощи микроскопии по методу Фонио, осуществлялись морфологические исследования пунктата и биоптата костного мозга, цитогенетическое исследование костного мозга.

Использовались следующие молекулярно-генетические методы исследования:

- метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) для определения мутации *JAK2V617F*
- ПЦР-ПДРФ с целью выявления мутаций гена *MPL*
- прямое секвенирование для детекции мутации гена *CALR* и *ASXL1*

Выполнен анализ и последующая статистическая обработка полученных данных.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных в ходе выполнения работы данных проводился с использованием программ STATISTICA (StatSoft) версия 10.0 для Windows, Microsoft Excel 2016 для MacOS и XLSTAT 2017 (Addinsoft). Сопоставление частотных характеристик (пол, симптомы заболевания, наличие/отсутствие тромбозов или геморрагий, трансформация заболевания в МФ, развитие БК, летальные исходы) качественных показателей проводилось с помощью комплекса непараметрических методов χ^2 , χ^2 с поправкой Йетса (для малых групп), критерия Фишера. С целью сравнения количественных параметров (возраст, период наблюдения, показатели клинического анализа крови, временной интервал от верификации диагноза до развития БК, трансформации в МФ или летального исхода,) в анализируемых группах были использованы критерий Манн-Уитни, тест хи-квадрат и модуль ANOVA. Доверительные интервалы исследуемых показателей рассчитывались с использованием углового преобразования Фишера. Пороговые значения показателей исследовались с помощью ROC-анализа. Анализ ОБ пациентов различных групп проводился с использованием метода Каплан-Мейер. В качестве точки отсчета для определения ОБ выбрали дату постановки диагноза ЭТ. В дальнейшем для сравнения полученных результатов применялся Log-rank анализ, позволяющий сделать заключение о наличии/отсутствии статистически значимых различий между анализируемыми группами. Визуализация структуры исходных данных и полученных результатов их анализа была выполнена с использованием графических возможностей системы Statistica для Windows и Excel 2016 для MacOS. Статистически достоверными считали различия при общепринятом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

Клинико-лабораторные характеристики пациентов с различным молекулярно-генетическим фенотипом

На начальном этапе проводилось сопоставление и сравнение демографических и клинико-лабораторных показателей у пациентов-носителей различных генетических перестроек. Наибольшие различия были выявлены между *JAK2+* и *CALR+* пациентами. Пациенты с наличием мутации в гене *CALR* были достоверно моложе, медиана возраста в дебюте заболевания составила 51 год при 1 типе мутации и 49 лет при 2 типе. Медиана возраста в *JAK2+* группе достигала 59 лет, что явилось статистически значимым ($p=0,04$ и $p=0,05$ соответственно). Каких-либо гендерных различий в анализируемой нами группе пациентов отмечено не было ($p=0,23$).

На следующем этапе нами были проанализировали средние значения показателей клинического анализа крови в группах пациентов с различным мутационным статусом с целью выявления возможных различий (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели клинического анализа крови у пациентов

Исследуемый показатель, среднее значение (95% д.и.)	<i>JAK2+</i> (n=182)	<i>CALR1+</i> (n=13)	<i>CALR2+</i> (n=17)	<i>MPL+</i> (n=2)	ТН (n=26)
Гемоглобин, г/л мужчины/женщины	145/140 (142-148/ 139-145)	149/128 (145-154/ 124-141)	148/134 (144-151/ 127-145)	-/114 (-/105-123*)	135/133 (129-140/ 127-139)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,8 (9,3-10,4)	9,5 (6,9-12,1)	8,9 (7,1-10,8)	10,1 (7,1-13,1*)	10,8 (9,1-12,6)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	841 (798-884)	1063 (809-1318)	1251 (1044-1458)	1314 (550-2079*)	774 (679-869)

* Указан диапазон значений (n=2)

При сравнении показателей клинического анализа крови пациентов было установлено наличие статистически значимых различий по уровню тромбоцитов ($p=0,0001$). Для *CALR1+* и *CALR2+* пациентов был характерен достоверно более высокий уровень тромбоцитов: $1063 \times 10^9/\text{л}$ и $1251 \times 10^9/\text{л}$ соответственно, в сравнении с пациентами *JAK2+* группы ($841 \times 10^9/\text{л}$). Также при 2 типе мутации гена *CALR* уровень тромбоцитов в исследуемых группах был выше в отличие от 1 типа. Однако, данное различие не было статистически значимым ($p=0,30$).

Было выявлено наличие статистически значимых различий по уровню гемоглобина между всеми группами ($p=0,006$) и между группами *JAK2+* и ТН ($p=0,005$). Уровень гемоглобина в группе *JAK2+* был достоверно выше: 145 г/л у мужчин и 140 г/л у женщин при *JAK2+* статусе против 135 г/л у мужчин и 130 г/л у женщин в группе ТН. Для *CALR+* пациентов достоверного снижения уровня лейкоцитов в сравнении с показателями пациентов групп с иным мутационным статусом ($p=0,43$).

В исследуемой нами группе пациентов оценивалось наличие у пациентов таких симптомов, как слабость, наличие спленомегалии, появление эпизодов головных болей и/или головокружений, наличие болей в суставах, проявлений эритромелалгий и кожного зуда. Так, в *JAK2+* группе чаще регистрировались симптомы нарушения микроциркуляции: головные боли и головокружения ($p=0,0015$) и слабость ($p=0,002$), несмотря на то, что при сравнении всех групп (*JAK2+*, *MPL+*, *CALR1+*, *CALR2+* и ТН) статистически значимых различий между группами по частоте регистрируемых симптомов не было выявлено ($p>0,05$) (таблица 3). Вместе с тем, значительная доля больных не отмечала никаких симптомов заболевания при первичном обращении к врачу: в группе ТН 13 из 26 (50,0%), в группе *CALR1+* 6 из 13 (46,2%), в группе *JAK2+* 88 из 182 (48,4%) и 7 из 17 пациентов (41,2%) *CALR2+* группы.

Таблица 3 – Клинические симптомы заболевания у пациентов с различными молекулярно-генетическими маркерами (*JAK2+*, *CALR1+*, *CALR2+*, *MPL+* и ТН)

Симптом заболевания, пациенты (%)	<i>JAK2+</i> (n=182)	<i>CALR1+</i> (n=13)	<i>CALR2+</i> (n=17)	<i>MPL+</i> (n=2)	ТН (n=26)
Спленомегалия	27 (14,8)	3 (23,1)	2 (11,7)	1 (50,0)	2 (7,7)
Головные боли/ головокружения	24 (13,2)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	3 (11,5)
Эритромелалгии	10 (5,5)	0 (0)	2 (11,7)	0 (0)	3 (11,5)
Слабость	46 (25,3)	2 (15,4)	5 (29,4)	1 (50,0)	3 (11,5)
Боли в суставах	20 (10,9)	2 (15,4)	0 (0)	0 (0)	1 (3,8)
Кожный зуд	6 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (7,7)

Особенности клинического течения в зависимости от мутационного статуса у больных эссенциальной тромбоцитемией

Были проанализированы показатели ОВ и частоты неблагоприятных исходов заболевания (развитие БК, трансформация в МФ, летальный исход).

Тромботические осложнения выявлялись достоверно чаще в группе *JAK2+* – у 44 из 182 (24,2%), в ТН – у 4 из 26 (15,4%), в *CALR1+* – у 1 из 13 (7,7%) пациентов и ни одного случая не было отмечено в группах *CALR2+* и *MPL+* ($p=0,01$).

Все случаи тромбозов, ОИМ, ОНМК и кровотечений у пациентов исследуемых групп были зарегистрированы до верификации диагноза ЭТ. Только у двух *JAK2+*-пациентов (1,1%) были отмечены в одном случае – повторный ОИМ после установления диагноза ЭТ, во втором – ОНМК (в анамнезе имел место венозный тромбоз).

Геморрагические осложнения наиболее часто отмечались у носителей мутаций в гене *CALR*: при первом типе мутации – 15,4%, при втором – 5,9% случаев, тогда как в группах *JAK2+* и ТН их частота была равной и составила 3,8%. В группе *MPL+* геморрагические осложнения не были выявлены ($p=0,01$).

Таким образом, *JAK2+* статус ассоциирован с достоверным увеличением риска и частоты тромбозов, тогда как для *CALR+* (тип 1 и тип 2 мутации) пациентов была характерна склонность к повышенной кровоточивости.

Среди неблагоприятных вариантов развития ЭТ были рассмотрены: развитие БК заболевания, трансформация в МФ и летальный исход в результате прогрессирования или осложнений заболевания. При исследовании возможных неблагоприятных исходов ЭТ у пациентов с различным мутационным статусом были получены следующие результаты (таблица 4).

Таблица 4 – Неблагоприятные исходы ЭТ у пациентов с различным мутационным статусом

Исследуемый показатель n (%)	<i>JAK2+</i> (n=182)	<i>CALR1+</i> (n=13)	<i>CALR2+</i> (n=17)	<i>MPL+</i> (n=2)	ТН (n=26)
Трансформация в МФ	7/182 (3,8)	0/13 (0)	0/17 (0)	1/2 (50,0)	0/26 (0)
Развитие БК	1/182 (0,5)	0/13 (0)	1/17 (5,9)	0/2 (0)	0/26 (0)
Летальный исход	4/182 (2,2)	0/13 (0)	0/17 (0)	0/2 (0)	4/26 (15,4)

При *CALR1+* статусе отсутствовали неблагоприятные исходы заболевания. При носительстве 2 типа *CALR* мутации был выявлен один случай трансформации ЭТ в МФ, тогда как при *JAK2+* статусе с разной частотой выявлялись все варианты неблагоприятного развития заболевания ($p=0,004$). БК заболевания отмечался только у пациентов групп *CALR2+* и *JAK2+*, летальные исходы были зарегистрированы в группах *JAK2+* и ТН ($p=0,22$).

На следующем этапе была проведена оценка влияния мутационного статуса на показатели ОБ у пациентов-носителей различных генетических перестроек, точкой отсчета являлась дата постановки диагноза ЭТ. При проведении анализа использовался метод Каплан-Мейера (Kaplan-Meier) с последующей визуализацией данных в виде кривых ОБ.

Медиана ОБ была достигнута только при ТН статусе и составила 8 лет, в других группах медиана не достигнута. Показатели 5-ти летней ОБ в исследуемых группах составили:

- при *CALR1+* – 100%,
- при *JAK2+* – 98%,
- при *CALR2+* – 93%,
- при ТН – 85%.

Проведение анализа для *MPL+* группы вызывает сложности в связи с ее малочисленностью.

Согласно полученным данным ТН статус можно охарактеризовать как прогностически наименее благоприятный. Не влияет на ОБ носительство 1 типа мутации в гене *CALR* (*CALR1+*). Полученные результаты явились статистически значимыми, что было подтверждено лог-ранговым критерием, позволяющим выявлять статистически значимые различия по ОБ между анализируемыми группами ($p=0,015$) (рисунок 2).

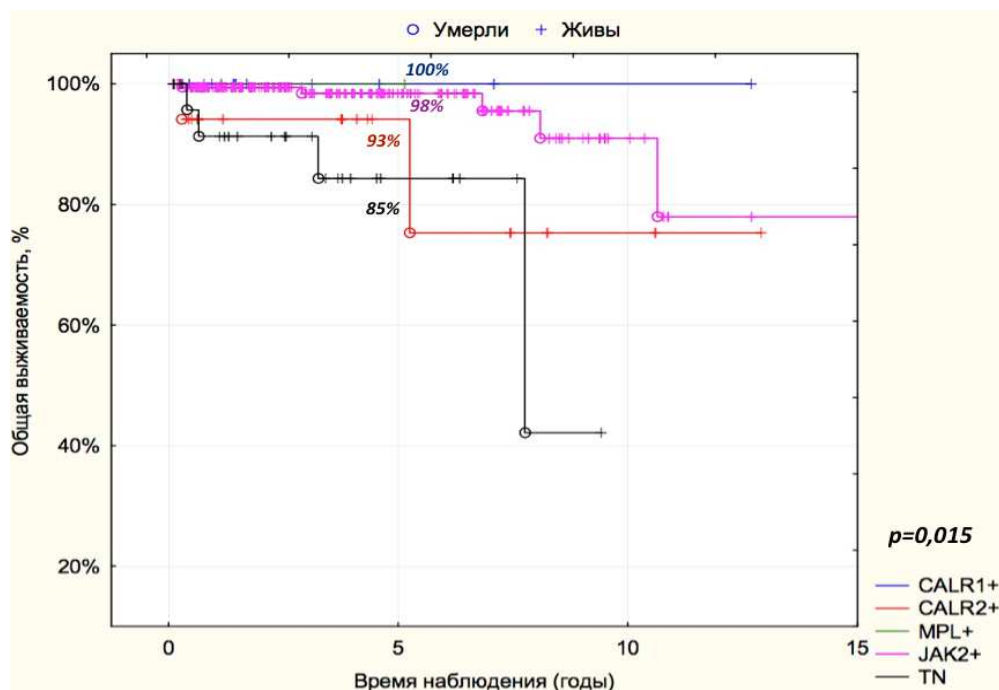


Рисунок 2 – Общая выживаемость пациентов с различным мутационным статусом

Прогностическое значение клинико-лабораторных параметров и генетических нарушений в развитии тромботических и геморрагических осложнений

Исследуемая группа пациентов была разделена на следующие подгруппы: пациенты с тромбозами (тромбозы+), пациенты с геморрагиями (геморрагии+) и пациенты без осложнений (без осложнений). Среди 240 пациентов у 183 (76,3%) не было отмечено ни тромботических, ни геморрагических осложнений (без осложнений). У 57 пациентов (23,7%) такие осложнения были зарегистрированы, у 49 из 57 (85,9%) пациентов выявлены эпизоды артериальных и/или венозных тромбозов, ОНМК и/или ОИМ (тромбозы+). Геморрагические проявления (геморрагии+) были отмечены у 11 из 57 пациентов (19,3%).

В подгруппе тромбозы+ у 21 из 49 (42,9%) пациентов были выявлены артериальные тромбозы, при этом у каждого пациента данной категории имело место сочетание артериального тромбоза с иным видом осложнения (венозный тромбоз, ОИМ или ОНМК). У 12 из 49 (24,5%) пациентов отмечались только венозные тромбозы и у 27 из 49 (55,1%) – ОИМ и/или ОНМК (при этом, у 16 из 27 пациентов (59,3%) отмечено сочетание ОИМ или ОНМК и тромбозов периферических сосудов).

Обращает на себя внимание, что абсолютное большинство пациентов с тромбозами являлись *JAK2*-положительными (89,8%), тогда как доля *CALR*-положительных составила только 2%. Вместе с тем, более четверти пациентов с геморрагическими осложнениями в анамнезе (27,3%) были *CALR*-положительными, а *JAK2*-положительными были 63,6% пациентов. Доля ТН пациентов в группах пациентов с тромбозами и геморрагическими проявлениями была практически равной и составила 8,4% и 9,1% соответственно.

Согласно полученным в ходе выполнения настоящего исследования результатам, частота тромботических осложнений у *JAK2*+ пациентов была достоверно выше (24,2%) в сравнении с пациентами групп *CALR1*+ (7,7%) и *CALR2*+ (0%), ($p=0,01$). Полученные нами результаты подтверждают наличие тромбогенного потенциала мутации *JAK2V617F*.

Таблица 5 – Клинико-лабораторная характеристика пациентов с наличием и без осложнений

Исследуемый показатель, среднее значение (95% д.и.)	Без осложнений (n=193)	Тромбозы+ (n=49)	Геморрагии+ (n=11)
Возраст, лет	56 (54-59)	61 (58-65)	54 (44-64)
Мужчины/женщины, число пациентов (%)	44/149 (23/77)	14/35 (29/71)	5/6 (46/54)
Гемоглобин, г/л мужчины/женщины	149/136 (144-153/ 144-153)	145/140 (132-158/ 1134-145)	146/139 (129-162/ 1131-148)
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	9,9 (9,4-10,6)	9,3 (8,5-10,2)	8,6 (7,0-10,1)
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	893 (846-940)	741 (671-812)	936 (557-1316)

Различия по полу и возрасту в исследуемых группах отсутствовали ($p=0,22$ и $p=0,12$ соответственно). При анализе показателей клинического анализа крови в дебюте заболевания было выявлено наличие статистически значимых различий по уровню тромбоцитов между пациентами групп тромбозы+ и геморрагии+: $741 \times 10^9/\text{л}$ и $936 \times 10^9/\text{л}$ соответственно ($p=0,01$). Различий по уровню гемоглобина и лейкоцитов не отмечено ($p=0,75$ и $p=0,47$).

При проведении оценки влияния наличия тромботических и геморрагических осложнений на показатели ОВ в исследуемых группах был проведен анализ ОВ, по результатам которого не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами ($p=0,21$) (рисунок 3).

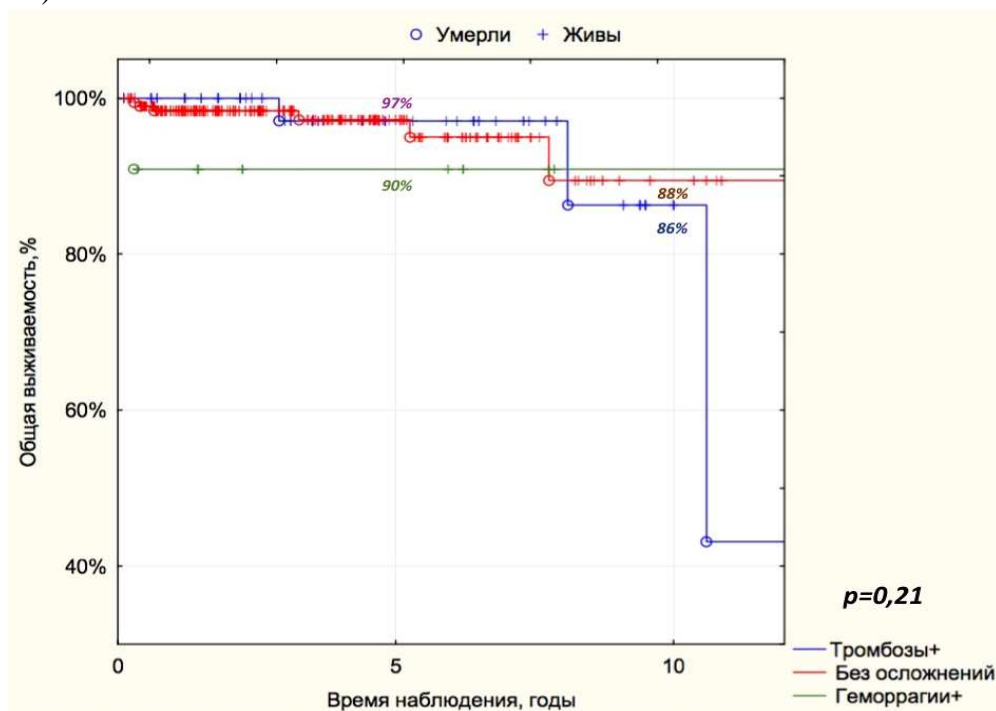


Рисунок 3 – Общая выживаемость пациентов без и с тромботическими/геморрагическими осложнениями

В группе геморрагии+ было отмечено, что уровни пятилетней и десятилетней ОВ были равными и составили 90%, тогда как в группе тромбозы они равнялись 97% и 88% соответственно.

Медиана ОВ была достигнута только в группе тромбозы+ и составила 12 лет.

По выявленным факторам риска тромбозов, включенным в шкалу ВОЗ IPSET-thrombosis все пациенты были отнесены к соответствующим группам (таблица 6).

Таблица 6 – Распределение пациентов с наличием и без осложнений согласно группам шкалы IPSET-thrombosis

Группа риска IPSET-thrombosis	Без осложнений (n=193)	Тромбозы+ (n=49)	Геморрагии+ (n=11)
Низкий, n (%)	44/193 (22,8)	0/49 (0)	1/11 (9,1)
Промежуточный, n (%)	66/193 (34,2)	3/49 (6,1)	4/11 (36,4)
Высокий, n (%)	83/193 (43,0)	46/49 (93,9)	6/11 (54,5)

Были отмечены следующие различия: в группе без осложнений распределение пациентов по группам риска в целом равномерное, тогда как в тромбозы+ подавляющее большинство пациентов высокого риска – 93,9%, а в геморрагии+ более половины пациентов (54,5%) высокого и 36,4% – промежуточного рисков ($p<0,001$).

При последующем анализе ОВ у пациентов различных групп риска тромбозов по IPSET-thrombosis (рисунок 4) было выявлено, что ни одной из групп не было достигнуто медианы ОВ. Для группы низкого риска прогноз можно охарактеризовать как наиболее благоприятный, уровни пятилетней и десятилетней выживаемости были равными и составили 98%, группу промежуточного риска также следует рассматривать как в целом благоприятную, пятилетняя ОВ составила 97%, а десятилетняя – 91%. Группа высокого риска характеризуется наименее благоприятным прогнозом, пятилетняя ОВ – 90%, а десятилетняя – только 61%. Тем не менее полученные различия не являлись статистически значимыми ($p=0,068$).

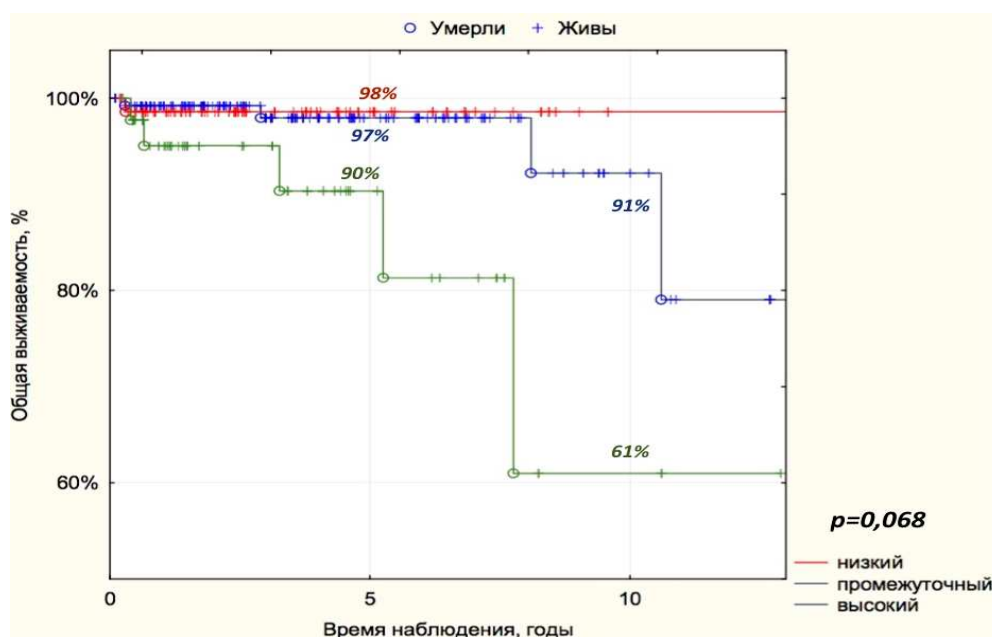


Рисунок 4 – Общая выживаемость пациентов различных групп риска (IPSET-thrombosis)

В анализируемой группе среди пациентов с тромбозами в анамнезе доля больных старше 60 лет была достоверно больше, чем среди пациентов с геморрагическими осложнениями ($p<0,001$), как и число пациентов с наличием сердечно-сосудистых факторов риска в анамнезе ($p<0,001$). Согласно результатам проведенного ROC-анализа, в качестве порогового значения тромбоцитов, при котором можно говорить о неблагоприятном развитии заболевания, является уровень более $1000 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,002$) (таблица 7).

Таблица 7 – Факторы риска развития тромбозов у пациентов с наличием и без осложнений

Исследуемый показатель, n (%)	Без осложнений (n=193)	Тромбозы+ (n=49)	Геморрагии+ (n=11)
Возраст старше 60 лет	93 (51)	29 (59)	4 (36)
Наличие как минимум одного сердечно-сосудистого фактора риска	47 (24)	34 (69)	14 (36)
Лейкоциты $>11 \times 10^9/\text{л}$	51 (28)	13 (27)	3 (27)
Тромбоциты $>1000 \times 10^9/\text{л}$	47 (26)	7 (14)	2 (18)

Таким образом, *CALR1+* и *CALR2+* статусы – наиболее благоприятные с позиции риска развития тромботических осложнений. У больных с носительством данных мутаций частота тромботических осложнений была статистически значимо ниже в сравнении с пациентами других групп ($p=0,01$). Вместе с тем, при *CALR+*, вне зависимости от типа мутации, частота возникновения геморрагических осложнений достоверно выше ($p=0,01$) в сравнении с носительством иных мутаций.

По частоте геморрагических осложнений в анализируемой группе *CALR+*, вне зависимости от типа мутации, данный вид осложнений регистрировался чаще: 21,3% против 3,8% при *JAK2+* ($p=0,01$). Ассоциация *CALR+* с более выраженным тромбоцитозом и достоверным повышением риска и частоты развития геморрагических проявлений, отсутствие влияния на частоту тромбозов при ЭТ требует дальнейшего изучения.

В рамках определения прогноза течения ЭТ традиционно оценивается частота неблагоприятных исходов заболевания: трансформация ЭТ в МФ или развитие БК, летальный исход. В исследуемой группе пациентов нами было отмечено отсутствие неблагоприятных исходов заболевания при *CALR1+* статусе, тогда как при *JAK2+* с различной частотой выявлялись все варианты неблагоприятных исходов ЭТ, что являлось статистически значимым ($p=0,004$).

Определение риска неблагоприятного клинического течения и тромботических осложнений эссенциальной тромбоцитемии

По итогам полученных в ходе исследования результатов нами был предложен алгоритм для стратификации пациентов по группам риска тромботических осложнений, включающий клинические, лабораторные и молекулярно-генетические критерии стратификации. На основании сформированного алгоритма предложено выделять три группы пациентов: высокого, промежуточного и низкого риска неблагоприятного развития ЭТ и тромботических осложнений. Такой комплексный подход к стратификации пациентов позволяет проводить

выбор терапии, применительно к индивидуальным характеристикам, с учетом всех особенностей ЭТ у данного пациента (рисунок 5).

Алгоритм оценки неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии



Рисунок 5 – Алгоритм оценки неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии

Выводы

1. Для пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и мутациями в гене *CALR* характерен достоверно более высокий уровень тромбоцитов: средний показатель при мутациях гена *CALR* составил $1170 \times 10^9/\text{л}$, тогда как при наличии мутации *JAK2V617F* – $841 \times 10^9/\text{л}$, при тройном негативном статусе – $774 \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,0001$). Показатели уровня гемоглобина у больных с эссенциальной тромбоцитемией при наличии мутации *JAK2V617F* статистически значимо выше (149 г/л у мужчин и 140 г/л у женщин) в сравнении с тройным негативным статусом (135 г/л у мужчин и 133 г/л у женщин) ($p=0,005$).

2. Общая выживаемость у больных с эссенциальной тромбоцитемией статистически значимо различается в зависимости от типа генетических нарушений ($p=0,015$). Наилучшая общая выживаемость наблюдается при мутациях в гене *CALR* 1 типа (пятилетняя общая выживаемость составила 100%), у пациентов с мутацией *JAK2V617F* пятилетняя общая выживаемость равнялась 98% и наименьшая общая выживаемость отмечена у пациентов с тройным негативным статусом (пятилетняя общая выживаемость составила 85%).

3. Наличие мутации *JAK2V617F* у больных с эссенциальной тромбоцитемией увеличивает риск тромботических осложнений ($p=0,001$). Частота тромбозов при мутации *JAK2V617F* составила 24,2%, при тройном негативном статусе – 15,4%, при мутациях гена *CALR* 1 типа – 7,7%, тогда как при мутациях гена *CALR* 2 типа и *MPL*-положительном статусе тромботические осложнения не наблюдались. Мутации в гене *CALR* 1 типа ассоциированы с более высокой частотой геморрагических осложнений (15,4%), тогда как при мутациях гена *CALR* 2 типа геморрагический синдром был отмечен в 5,9% случаев, при наличии мутации *JAK2V617F* – 3,8% и при тройном негативном статусе – 3,8% ($p=0,01$).

4. Разработанный алгоритм оценки неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии позволяет отнести пациента к группе высокого риска при выявлении хотя бы одного из критериев: возраст старше 60 лет, наличие симптомов нарушения микроциркуляции и

уровень тромбоцитов выше $1000 \times 10^9/\text{л}$, детекция мутации *JAK2V617F*, тройной негативный статус.

Практические рекомендации

1. При первичной диагностике эссенциальной тромбоцитемии необходимо выполнять молекулярно-генетические исследования для детекции маркеров клональности (*JAK2V617F*, *MPL*, *CALR*), что имеет значение для определения дальнейшего прогноза заболевания.

2. Наличие мутации *JAK2V617F* или тройного негативного статуса является признаком неблагоприятного течения заболевания с уменьшением общей выживаемости, тогда как наличие мутаций 1 типа в гене *CALR* позволяет отнести пациента к благоприятной прогностической группе.

3. У пациентов с мутацией *JAK2V617F* риск тромботических осложнений необходимо расценивать как наиболее высокий. Наличие мутаций в гене *CALR* свидетельствует о повышении риска геморрагических осложнений в сравнении с другими генетическими вариантами эссенциальной тромбоцитемии.

4. Для оптимизации выбора терапевтической тактики при ведении пациентов целесообразно использовать разработанный алгоритм оценки неблагоприятного течения эссенциальной тромбоцитемии, включающий следующие критерии: возраст старше 60 лет, наличие симптомов нарушения микроциркуляции и уровень тромбоцитов выше $1000 \times 10^9/\text{л}$, детекция мутации *JAK2V617F*, тройной негативный статус.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Shuvaev, V.A. Essential thrombocythemia - population analysis, a single center 10-years' experience // V.A.Shuvaev, A.S.Abdulkadyrova, I.S.Martynkevich, V.Y.Udaleva, I.I.Zotova, R.A.Golovchenko, M.S. Fominykh, A.A. Zherniakova, L.S.Martynenko, E.V.Petrova, M.A. Kozlovskaya, M.P.Ivanova, N.Y.Cybakova, K.M.Abdulkadyrov // ELN Frontiers Meeting «New Frontiers of Myeloid Neoplasias» 11-13 October, 2013, Prague, Czech Republic// ELN Information letter October 2013. – p.21
2. Жернякова, А.А. Молекулярно-генетический фенотип и особенности течения эссенциальной тромбоцитемии // А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, Л.Б. Полушкина и др. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – №1. С.32.
3. Полушкина, Л.Б. Молекулярно-генетический профиль пациентов с первичным миелофиброзом. // Л.Б. Полушкина, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев А.А. Жернякова и др. // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59. – №1. С.52.
4. Zherniakova, A. Clinical Differences in Essential Thrombocythemia Patients with and without Thrombotic Complications // A.Zherniakova, I.Martynkevich, V.Shuvaev et al. // 20th Congress of European Hematology Association, 11-14 June 2015, Vienna, Austria, E1348. Haematologica. – Vol. 100 (s1) – June 2015. – P. 540.
5. Polushkina, L. Markers of Clonal Hematopoiesis in Ph-negative Myeloproliferative Neoplasms. // L.Polushkina, I.Martynkevich, V.Shuvaev, E.Petrova, A. Zherniakova et al. // 20th Congress of European Hematology Association, 11-14 June 2015, Vienna, Austria, E1326. Haematologica. – Vol. 100(s1) – June 2015. – P. 531.
6. Zherniakova, A. Clinical Features and Molecular Markers in Essential Thrombocythemia. // A.Zherniakova, I.Martynkevich, V.Shuvaev et al. // 21th Congress of European Hematology Association, 9-12 June 2016, Copenhagen, Denmark, PB2032. Haematologica. – Vol. 101 (s1) – June 2016. – P.812-813.
7. Polushkina, L. Molecular and Cytogenetic Profile of Patients with Primary Myelofibrosis. // L.Polushkina, I.Martynkevich, V.Shuvaev, A. Zherniakova et al. // 21th Congress of European Hematology Association, 9-12 June 2016, Copenhagen, Denmark, PB2008. Haematologica. – Vol. 101 (s1) – June 2016. – P.804.

8. Жернякова, А.А. Молекулярно-генетический фенотип и особенности течения эссенциальной тромбоцитемии. // А.А. Жернякова, М.С. Фоминых, Д.И. Шихбабаева и др. // XII Международная (XXI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, март 2017 года), Сборник тезисов, М. – 2017. С. 92.
9. Жернякова, А.А. Молекулярно-генетические маркеры и особенности течения эссенциальной тромбоцитемии. // А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев и др. // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика» – 2017. – Т. 10, №3. – С. 402-408.
10. Жернякова, А.А. Факторы риска развития тромботических и геморрагических осложнений при эссенциальной тромбоцитемии. // А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев и др. // Онкогематология. – 2017. – Т. 12, №2. С. 30-38.
11. Жернякова, А.А. Особенности течения эссенциальной тромбоцитемии у пациентов с различными молекулярно-генетическими маркерами клональности. // А.А. Жернякова, И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев и др. // Вестник гематологии. – 2017. – Т.13, № 2. – С. 50-51.
12. Жернякова, А.А. Факторы риска развития тромботических и геморрагических осложнений при эссенциальной тромбоцитемии. // А.А. Жернякова, М.С. Фоминых, Д.И. Шихбабаева и др. // XX Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, апрель 2017 года), Сборник тезисов, СПб. – 2017. С. 120-121.

Список сокращений и условных обозначений

БК	бластный криз
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ИП	истинная полицитемия
МДС	миелодиспластический синдром
МПН	миелопролиферативные новообразования
МФ	миелофиброз
ОВ	общая выживаемость
ОИМ	острый инфаркт миокарда
ОМЛ	острый миелоидный лейкоз
ОНМК	острое нарушение мозгового кровообращения
ПДРФ	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
ПМФ	первичный миелофиброз
ТН	тройные негативные
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз
ХММЛ	хронический миеломоноцитарный лейкоз
ЭТ	эссенциальная тромбоцитемия
<i>CALR</i>	ген, кодирующий белок кальретикулин
IPSET-thrombosis	International Prognostic Score for ET (WHO-ET) (Международная шкала оценки риска тромбозов ВОЗ-ЭТ)
<i>JAK2</i>	янускиназа
<i>JAK2V617F</i>	мутация в гене янускиназы рецепторов цитокинов
<i>MPL</i>	ген рецептора к тромбопоэтину