

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

MYELOID TUMORS

Современные генетические модели оценки прогноза при первичном миелофиброзе

Current Genetic Models for Prediction of Primary Myelofibrosis

Л.Б. Полушкина¹, В.А. Шуваев¹, М.С. Фоминых¹,
Ю.А. Криволапов², Е.А. Белякова², З.П. Асауленко²,
Е.В. Мотыко¹, Л.С. Мартыненко¹, М.П. Бакай¹,
Н.Ю. Цыбакова¹, С.В. Волошин^{1,3}, С.С. Бессмельцев¹,
А.В. Чечеткин¹, И.С. Мартынкевич¹

LB Polushkina¹, VA Shuvaev¹, MS Fominykh¹,
YuA Krivolapov², EA Belyakova², ZP Asaulenko²,
EV Motyko¹, LS Martynenko¹, MP Bakai¹, NYu Tsybakova¹,
SV Voloshin^{1,3}, SS Bessmeltsev¹, AV Chechetkin¹,
IS Martynkevich¹

¹ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191015

²II Mechnikov North-Western State Medical University, 41 Kirochnaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191015

³ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, ул. Академика Лебедева, д. 6, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194044

³SM Kirov Military Medical Academy, 6 Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russian Federation, 194044

РЕФЕРАТ

Цель. Изучить связь кариотипа, драйверной мутации в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и мутационного статуса гена *ASXL1* с особенностями течения и прогнозом первичного миелофиброза (ПМФ).

Материалы и методы. В исследование включено 110 пациентов с диагнозом ПМФ (38 мужчин, 72 женщины), медиана возраста составила 59 лет (диапазон 18–82 года) с медианой срока наблюдения после установления диагноза 2,6 года (диапазон 0,1–23 года). Пациенты обследованы на наличие мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и *ASXL1*. Замену V617F в гене *JAK2* и мутации кодона 515 в гене *MPL* анализировали методом полиморфизма длин рестриционных фрагментов. Исследование на наличие мутаций в генах *CALR* (экзон 9), *ASXL1* (экзон 12) проводили методом прямого секвенирования по Сэнгеру. У 48 (44 %) из 110 пациентов был определен кариотип клеток костного мозга. Проанализированы клинико-гематологические показатели и медианы общей выживаемости (ОВ) больных с учетом выявленных генетических aberrаций и их сочетаний.

Результаты. Мутации в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* обнаружены у 55 (50 %), 28 (25,5 %) и 7 (6,4 %) из 110 пациентов соответственно. Тройной негативный статус (ТНС) имели 20 (18,2 %) из 110 обследованных больных. Мутации в гене *ASXL1* выявлены у 22 (20 %) из 110 пациентов. Из 48 больных нормальный кариотип обнаружен у 32 (66,7 %), благоприятный — у 3 (6,3 %), промежуточного прогноза — у 4 (8,3 %), неблагоприятный — у 9 (18,7 %). При сравнении клинико-гематологических показателей выявлен ряд статистически значимых отличий. У *JAK2*-позитивных больных отмечался более высокий уровень

ABSTRACT

Aim. To study the relationship of karyotype, *JAK2*, *CALR*, and *MPL* driver mutations and *ASXL1* mutation status with the progression and prediction of primary myelofibrosis (PMF).

Materials & Methods. The trial included 110 PMF patients (38 men and 72 women), median age was 59 years (range 18–82) with median follow-up after diagnosis of 2.6 years (range 0.1–23). The patients were examined for *JAK2*, *CALR*, *MPL*, and *ASXL1* mutations. Restriction fragment length polymorphism technique was used for the analysis of V617F substitution in *JAK2* and 515 codon mutation in *MPL*. *CALR* (exon 9) and *ASXL1* (exon 12) mutation tests were performed using Sanger direct sequencing. In 48 (44 %) out of 110 patients bone marrow cell karyotype was determined. Clinical and hematological parameters and median overall survival (OS) of patients were analyzed with regard to detected genetic aberrations and combinations of them.

Results. *JAK2*, *CALR*, *MPL* mutations were detected in 55 (50 %), 28 (25.5 %), and 7 (6.4 %) out of 110 patients, respectively. Triple negative (TN) status was identified in 20 (18.2 %) out of 110 examined patients. *ASXL1* mutations were detected in 22 (20 %) out of 110 patients. Out of 48 patients in 32 (66.7 %) normal karyotype, in 3 (6.3 %) favorable karyotype, in 4 (8.3 %) intermediate-prognosis karyotype, and in 9 (18.7 %) unfavorable karyotype were detected. The comparison of clinical and hematological parameters showed a number of significant differences. *JAK2*-positive patients had a higher hemoglobin level (median 129 g/L; $p = 0.021$). TN was associated with a high IPSS risk ($p = 0.011$), low hemoglobin level (median 101 g/L; $p = 0.006$), drop in platelet count (median $266 \times 10^9/L$; $p = 0.041$), increased lymphocyte

гемоглобина (медиана 129 г/л; $p = 0,021$). ТНС был связан с высоким риском по IPSS ($p = 0,011$), низким уровнем гемоглобина (медиана 101 г/л; $p = 0,006$), снижением числа тромбоцитов (медиана 266×10^9 /л; $p = 0,041$), повышением числа лейкоцитов (медиана $26,9 \times 10^9$ /л; $p = 0,001$). Обнаружение терминирующих мутаций в гене *ASXL1* коррелировало с наличием пальпируемой увеличенной селезенки ($p = 0,050$), снижением числа тромбоцитов (медиана 184×10^9 /л; $p = 0,016$), числом лейкоцитов $> 25 \times 10^9$ /л ($p = 0,046$) и бластных клеток $\geq 1\%$ ($p < 0,001$). По данным однофакторного регрессионного анализа, прогностическое значение в отношении ОВ имели наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* (отношение рисков [ОР] 2,9; $p = 0,018$), неблагоприятный кариотип (ОР 8,2; $p < 0,001$) и ТНС (ОР 8,1; $p < 0,001$). Наличие мутации в гене *ASXL1* было связано со значимым ухудшением ОВ у больных с ТНС. Медиана ОВ в группе *ASXL1*-негативных пациентов без хромосомных aberrаций высокого риска была значимо больше, чем в группах пациентов, у которых обнаруживали кариотип высокого риска и/или мутацию гена *ASXL1*.

Заключение. Наличие ряда генетических дефектов в опухолевых клетках связано с фенотипическими проявлениями ПМФ. На основании результатов цитогенетического анализа и исследования мутационного статуса генов *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1* пациенты могут быть отнесены к различным группам «генетического» риска при постановке диагноза ПМФ.

Ключевые слова: первичный миелофиброз, мутации, кариотип, прогноз.

Получено: 8 апреля 2019 г.

Принято в печать: 1 сентября 2019 г.

Для переписки: Любовь Борисовна Полушкина, канд. биол. наук, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; e-mail: polushkina.lb@gmail.com

Для цитирования: Полушкина Л.Б., Шуваев В.А., Фоминых М.С. и др. Современные генетические модели оценки прогноза при первичном миелофиброзе. Клиническая онкогематология. 2019;12(4):391–7.

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-391-397

count (median 26.9×10^9 /L; $p = 0.001$). The detection of terminating mutations in *ASXL1* correlated with palpable enlarged spleen ($p = 0.050$), reduced platelet count (median 184×10^9 /L; $p = 0.016$), leukocyte count $> 25 \times 10^9$ /L ($p = 0.046$), and blast count $\geq 1\%$ ($p < 0.001$). Univariate regression analysis showed that terminating mutations in *ASXL1* (hazard ratio [HR] 2.9; $p = 0.018$), unfavorable karyotype (HR 8.2; $p < 0.001$), and TN (OR 8.1; $p < 0.001$) had prognostic value for OS. *ASXL1* mutation was associated with significantly worse OS in TN patients. Median OS of *ASXL1*-negative patients without high-risk chromosomal aberrations was significantly longer than in patients with high-risk karyotype and/or *ASXL1* mutation.

Conclusion. Several genetic defects in tumor cells are associated with phenotypic manifestations of PMF. Based on the results of cytogenetic analysis and mutation determination of *JAK2*, *CALR*, *MPL*, and *ASXL1*, patients can be classified in different “genetic” risk groups when PMF is diagnosed.

Keywords: primary myelofibrosis, mutations, karyotype, prediction.

Received: April 8, 2019

Accepted: September 1, 2019

For correspondence: Lyubov Borisovna Polushkina, PhD in Biology, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; e-mail: polushkina.lb@gmail.com

For citation: Polushkina LB, Shuvaev VA, Fominykh MS, et al. Current Genetic Models for Prediction of Primary Myelofibrosis. Clinical oncohematology. 2019;12(4):391–7 (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-391-397

ВВЕДЕНИЕ

Первичный миелофиброз (ПМФ) — миелопролиферативное новообразование (МПН), характеризующееся клональной пролиферацией трансформированной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) и сопровождающееся процессами фиброза, остеосклероза и ангиогенеза в костном мозге, а также формированием очагов экстрамедуллярного гемопоэза [1–4].

Хотя инициирующее событие в ГСК до настоящего времени достоверно не установлено, считают, что к формированию фенотипа («запуску») МПН у 90 % больных приводят повреждения одного из генов *JAK2*, *CALR* или *MPL*, продукты которых прямо или косвенно вовлечены в JAK-STAT-путь передачи сигнала [1, 5]. Пациенты с ПМФ без пусковых (драйверных) мутаций составляют группу с тройным негативным статусом

(ТНС). У некоторых из них могут выявляться нетипичные соматические или герминальные мутации гена *JAK2* или *MPL* [6].

Помимо драйверных мутаций (ДМ) у пациентов с МПН могут быть обнаружены неспецифические мутации, характерные и для других новообразований немиелоидного ряда. При ПМФ наиболее частыми являются мутации в генах *ASXL1* (13–22 %), *SRSF2* (9–17 %), *U2AF1* (~ 16 %), *TET2* (10–17 %) [7, 8].

Кроме моногенных мутаций у больных ПМФ выявляют аномалии кариотипа: в 35–60 % случаев при постановке диагноза и до 90 % — на терминальном этапе с исходом в острый лейкоз. Наиболее частыми цитогенетическими находками бывают del(20q) (10–36 %), del(13q) (14–25 %), +8 (8–16 %), +9 (3–14 %), дупликация 1q (3–22 %), которые могут быть представлены как отдельно, так и в сочетании с другими хромосомными aberrациями [9].

Обнаружение соматических мутаций и хромосомных перестроек при ПМФ служит не только для подтверждения клональной природы заболевания, но и для оценки прогноза. Хорошо известно неблагоприятное влияние на течение ПМФ таких аномалий кариотипа, как трисомия хромосомы 8, *i(17q)*, *inv(3)*, полная или частичная потеря хромосомы 5 или 7, перестройки 12p или 11q23, а также комплексных aberrаций [10]. Список генов, соматические мутации в которых связаны с ухудшением показателей общей выживаемости (ОВ) и/или риском бластной трансформации, включает *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *IDH1/2*, *EZH2*, *CBL*, *KIT*, *RUNX1*, *CEBPA*, *SH2B3* [8, 11]. Прогностически благоприятным признаком является обнаружение мутации в гене *CALR* типа 1 (L367fsX46 — делеция 52 п. н.) или подобной [12, 13].

Исследование кариотипа и анализ генов *JAK2*, *CALR*, *MPL* на наличие ДМ является неотъемлемой частью диагностических мероприятий для подтверждения ПМФ. Тестирование же всего массива генов с потенциальными мутациями представляется сложной, дорогостоящей и не всегда оправданной процедурой. Среди неспецифических для МПН мутаций, влияющих на прогноз, наиболее часто обнаруживают aberrации гена *ASXL1*. Неблагоприятное прогностическое значение мутаций *ASXL1* показано на различных выборках пациентов [14, 15]. Мутационный статус гена *ASXL1* может стать ценным прогностическим маркером, дополняющим перечень скрининговых исследований при ПМФ. Важно учитывать особенности влияния мутаций гена в группах пациентов с различными ДМ и кариотипом.

Цель работы — изучить связь кариотипа, ДМ в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и мутационного статуса гена *ASXL1* с особенностями течения и прогнозом при ПМФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 110 пациентов с гистологически (материал трепанобиопсии подвздошной кости) верифицированным диагнозом ПМФ. Среди них было 38 (34,5 %) мужчин, 72 (65,5 %) женщины (соотношение по полу 1:2) в возрасте 18–82 года (медиана 59 лет). Медиана наблюдения составила 2,6 года (диапазон 0,1–23 года). Больные в хронической фазе ПМФ получали стандартную циторедуктивную терапию. В фазе бластного криза лечение осуществлялось по программам терапии острых лейкозов. Распределение пациентов в соответствии с международными прогностическими системами стратификации IPSS и DIPSS приведено в табл. 1.

Цитогенетическое исследование клеток костного мозга проведено 48 пациентам: 32 — в дебюте заболевания, 6 — при прогрессировании, 10 — в фазе

бластного криза. Нормальный кариотип выявлен у 32 (66,7 %) из 48 человек, благоприятный [одиночные *del(13)(q22)*, *del(20)(q12)*] — у 3 (6,3 %), промежуточного прогноза [одиночные *del(6)(q15)*, *add(6)(p25)*, *del(X)(q22)*, *t(X;7)(p21;q11)*] — у 4 (8,3 %), неблагоприятный [+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, *i(17q)*, *inv(3)*, -5/5q-, перестройки 11q и 12p, моносомии, ≥ 2 хромосомных aberrаций] — у 9 (18,7 %).

У всех пациентов определяли *JAK2V617F*-статус и мутационный статус гена *ASXL1* (экзон 12). При отсутствии *JAK2V617F* проводили поиск мутаций в кодоне 515 гена *MPL* и мутаций экзона 9 гена *CALR*. Для анализа генов *JAK2* и *MPL* использовался метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Наличие инсерций/делеций экзона 9 гена *CALR* и мутаций гена *ASXL1* определяли методом прямого секвенирования по Сэнгеру на автоматической капиллярной системе MegaBACE 1000 DNA Analysis System (Amersham Biosciences, Великобритания).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ STATISTICA 10.0 (StatSoft), Excel 2016 с надстройкой XLSTAT 2016 (Microsoft). Для анализа ОВ использовали метод построения кривых Каплана—Мейера с применением лог-рангового теста для оценки статистической значимости различий. В качестве точки отсчета для вычисления ОВ выбрали дату постановки диагноза ПМФ. Регрессионный анализ проводили методом Кокса.

При сравнении качественных признаков применяли точный тест Фишера и χ^2 Пирсона. Для сравнения различий в непрерывных данных в трех и более группах использовали критерий Краскала—Уоллиса, в двух группах — непараметрический *U*-тест Манна—Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Мутации в гене *ASXL1* обнаружены у 22 (20 %) из 110 пациентов: у 13 (11,8 %) — нонсенс-мутации и сдвиг рамки считывания (мутации преждевременной терминации трансляции — *ASXL1term*), у 4 (3,6 %) — сочетание двух мутаций в гене *ASXL1*, у 5 (4,5 %) — миссенс-мутации (*ASXL1mis*).

Клинико-гематологические показатели у пациентов с различными типами ДМ, а также мутационным статусом гена *ASXL1* представлены в табл. 2 и 3 соответственно.

Уровень гемоглобина у *JAK2+* пациентов был значимо выше по сравнению с другими больными ($p = 0,021$). Хотя медиана количества тромбоцитов была наибольшей у *CALR+* пациентов ($734 \times 10^9/\text{л}$), раз-

Таблица 1. Стратификация пациентов по группам риска ($n = 110$)

Шкала	Группа риска			
	Низкий	Промежуточный-1	Промежуточный-2	Высокий
IPSS	27 (24,5 %)	38 (34,5 %)	21 (19,1 %)	24 (21,8 %)
DIPSS	27 (24,5 %)	46 (41,8 %)	31 (28,2 %)	6 (5,5 %)

Таблица 2. Клинико-гематологические показатели у пациентов с различными типами драйверной мутации

Показатель	JAK2	CALR	MPL	Тройной негативный статус	p
Медиана (диапазон) возраста, лет	61 (18–79)	53,5 (28–82)	51 (40–71)	59 (25–74)	0,320
Медиана (диапазон) гемоглобина, г/л	129 (65–201)	117,5 (42–165)	108,5 (77–122)	101 (56–141)	0,013
Медиана (диапазон) лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	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
Медиана (диапазон) тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	502 (44–1465)	734 (21–2237)	359 (134–1202)	266 (58–1494)	0,125
Высокий риск по IPSS, n/N (%)	10/50 (20,0)	4/23 (17,4)	1/6 (16,7)	9/15 (60,0)	0,011
Спленомегалия, n/N (%)	36/50 (72,0)	17/23 (73,9)	3/6 (50,0)	10/15 (66,7)	0,685
Симптомы опухолевой интоксикации, n/N (%)	15/50 (30,0)	7/23 (31,8)	3/6 (50,0)	10/15 (66,7)	0,062
Бластные клетки $\geq 1\%$, n/N (%)	10/50 (20,0)	14/23 (58,3)	1/6 (16,7)	9/15 (60,0)	0,001

Таблица 3. Клинико-гематологические показатели у пациентов с наличием или отсутствием мутаций в гене ASXL1

Показатель	ASXL1–	ASXL1term/mis+	p	ASXL1term+	p
Медиана (диапазон) возраста, лет	61 (18–82)	56 (28–74)	0,162	57 (45–74)	0,163
Медиана (диапазон) гемоглобина, г/л	121 (42–201)	114 (65–185)	0,454	109 (65–144)	0,097
Медиана (диапазон) лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	12,6 (2,2–66,6)	12,1 (3,5–90,0)	0,862	12,1 (3,5–90,0)	0,835
Медиана (диапазон) тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	530 (21–2237)	250 (68–1465)	0,052	184 (68–1231)	0,016
Лейкоцитоз $> 25 \times 10^9/\text{л}$, n/N (%)	11/69 (15,9)	7/21 (33,3)	0,046	6/15 (40,0)	0,030
Спленомегалия, n/N (%)	47/69 (68,1)	17/21 (80,9)	0,279	14/15 (93,3)	0,050
Симптомы опухолевой интоксикации, n/N (%)	23/69 (33,3)	10/21 (47,6)	0,256	8/15 (53,3)	0,160
Бластные клетки $\geq 1\%$, n/N (%)	18/69 (26,9)	14/21 (66,7)	0,001	13/15 (86,7)	< 0,001

личия достигали статистической значимости только при сравнении с группой ТНС ($p = 0,022$). У пациентов с ТНС выявлены значимо более низкий уровень гемоглобина ($p = 0,006$), меньшее число тромбоцитов ($p = 0,041$) и высокое — лейкоцитов ($p = 0,001$) по сравнению с больными, у которых обнаруживали ДМ. Медиана количества лейкоцитов у *MPL+* пациентов была значимо меньше, чем в группе *JAK2+* ($p = 0,023$), но не в группе *CALR+* ($p = 0,213$). У *CALR+* и больных с ТНС чаще обнаруживали $\geq 1\%$ бластных клеток в крови по сравнению с группой *JAK2+* ($p = 0,001$ и $p = 0,003$ соответственно). У пациентов с ТНС чаще отмечались симптомы опухолевой интоксикации по сравнению с группами *CALR+* и *JAK2+* ($p = 0,022$ и $p = 0,012$ соответственно). При анализе распределения пациентов с различными ДМ и без таковых по группам в соответствии со стратификацией по IPSS высокий риск значимо чаще определялся у пациентов с ТНС ($p = 0,011$).

Терминирующие мутации в гене *ASXL1* были связаны с наличием увеличенной пальпируемой селезенки ($p = 0,050$), меньшим количеством тромбоцитов ($p = 0,016$), с числом лейкоцитов более $25 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,030$) и бластных клеток в крови $\geq 1\%$ ($p < 0,001$). Мутации статистически значимо чаще обнаруживали в группах высокого и промежуточного-2 риска по шкале IPSS по сравнению с группами низкого и промежуточного-1 риска — 12/45 (26,7 %) vs 5/65 (7,7 %) соответственно ($p = 0,014$). В группе низкого риска случаи наличия мутаций не зафиксированы.

По данным однофакторного регрессионного анализа, значимое негативное влияние на ОВ оказывали мутации преждевременной терминации трансляции в гене *ASXL1*, кариотип высокого риска (+8 и другие трисомии (кроме +9), -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, перестройки 11q и 12p, моносомии, ≥ 2 хромосомных аберраций) и ТНС. Мутации в гене *CALR* коррелировали с более длительной выживаемостью при пограничном уровне значимости (табл. 4).

Таблица 4. Результаты однофакторного регрессионного анализа по выявлению факторов, влияющих на общую выживаемость пациентов с ПМФ

Фактор	ОР (95% ДИ)	p
JAK2V617F	0,732 (0,333–1,611)	0,438
CALR (мутации экзона 9)	0,301 (0,089–1,010)	0,052
MPL (мутации кодона 515)	0,842 (0,194–3,645)	0,817
ТНС	8,090 (3,234–20,233)	< 0,001
ASXL1mis	0,649 (0,249–1,697)	0,378
ASXL1term	2,952 (1,203–7,244)	0,018
Кариотип высокого риска	8,218 (2,478–27,253)	< 0,001

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; ОР — отношение рисков; ТНС — тройной негативный статус.

По результатам многофакторного регрессионного анализа, включавшего такие переменные, как ТНС, наличие мутации в гене *CALR*, терминирующей мутации в гене *ASXL1* и неблагоприятного кариотипа, установлено, что ключевое негативное влияние на ОВ пациентов с ПМФ независимо друг от друга оказывали неблагоприятный кариотип (отношение рисков [ОР] 7,392; 95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 2,303–23,730; $p = 0,001$) и наличие терминирующей мутации в гене *ASXL1* (ОР 2,765; 95% ДИ 1,151–6,596; $p = 0,023$).

При оценке модели Кокса без учета кариотипа значимое влияние на ОВ оказывали ТНС (ОР 2,425; 95% ДИ 1,005–5,907; $p = 0,050$) и положительный статус *ASXL1term* (ОР 3,343; 95% ДИ 1,308–8,542; $p = 0,012$), тогда как влияние наличия мутаций в гене *CALR* превышало порог статистической значимости (ОР 0,311; 95% ДИ 0,086–1,127; $p = 0,075$). Тем не менее данный фактор был значимым, когда в качестве ковариаты выступал только положительный статус *ASXL1term* (ОР 0,215; 95% ДИ 0,062–0,743; $p = 0,015$), который также сохранял свою значимость в данной модели (ОР 3,951; 95% ДИ 1,562–9,994; $p = 0,004$). В мо-

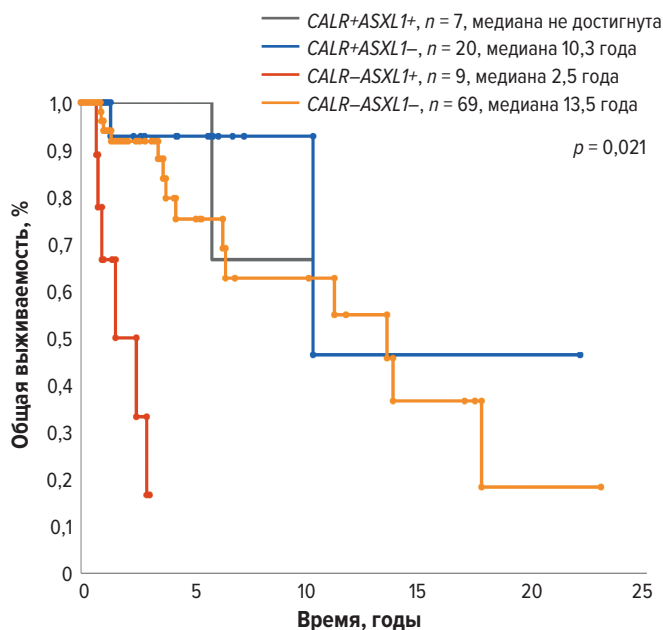


Рис. 1. Кривые общей выживаемости у пациентов с различной комбинацией генетических характеристик *CALR/ASXL1*

Fig. 1. Overall survival curves in patients with different combinations of *CALR/ASXL1* genetic characteristics

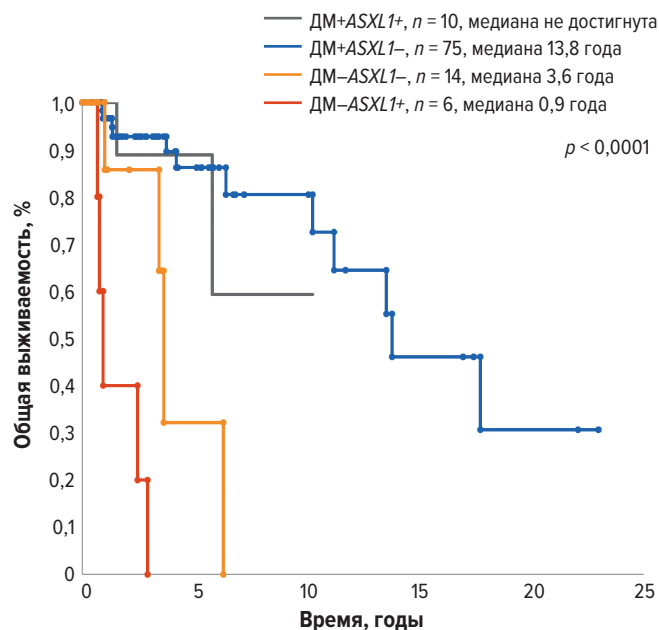


Рис. 2. Кривые общей выживаемости в группах пациентов с наличием или отсутствием драйверной мутации (ДМ) и различным мутационным статусом *ASXL1*

Fig. 2. Overall survival curves in patients with and without driver mutations (ДМ), and different *ASXL1* mutation statuses

дели, включавшей ТНС (ОР 3,564; 95% ДИ 1,542–8,236; $p = 0,003$) и положительный статус *ASXL1term* (ОР 2,473; 95% ДИ 1,006–6,077; $p = 0,048$), оба параметра статистически значимо влияли на показатели ОБ.

Таким образом, были определены следующие комплексные генетические характеристики пациентов для оценки прогноза ОБ: *CALR/ASXL1*-статус, наличие ДМ/*ASXL1*-статус, кариотип/*ASXL1*-статус.

Анализ выживаемости в группах с учетом *CALR/ASXL1*-статуса показал, что наименьшая медиана ОБ была у *CALR-ASXL1+* пациентов (рис. 1).

5-летняя ОБ в группах *CALR+ASXL1-* была несколько больше, чем в группах *CALR-ASXL1-*, и составила 93 vs 75 % соответственно ($p = 0,124$). Статистически значимых отличий ОБ у пациентов с *CALR+ASXL1+* и *CALR+ASXL1-* ($p = 0,630$), *CALR+ASXL1+* и *CALR-ASXL1-* ($p = 0,480$) не выявлено.

Весьма существенные отличия обнаружены между группами при сравнении ОБ по совокупному критерию «наличие ДМ/*ASXL1*-статус» ($p < 0,0001$) (рис. 2).

Попарный анализ ОБ в группах показал, что обнаружение терминирующей мутации в гене *ASXL1* значимо снижало показатели выживаемости у пациентов с ТНС ($p = 0,007$). Медиана ОБ у пациентов ДМ+*ASXL1+* была значимо больше по сравнению с группой ДМ-*ASXL1-* ($p = 0,044$). Статистически значимых отличий в ОБ пациентов с ДМ, но с различным *ASXL1*-статусом не выявлено ($p = 0,788$).

При анализе выживаемости в зависимости от кариотипа и мутационного статуса *ASXL1* наибольшая медиана ОБ (6,4 года) определена у *ASXL1-* пациентов без хромосомных aberrаций высокого риска. В других группах пациентов, у которых обнаруживали либо кариотип высокого риска, либо мутацию *ASXL1*, либо обе аномалии одновременно, медианы ОБ были

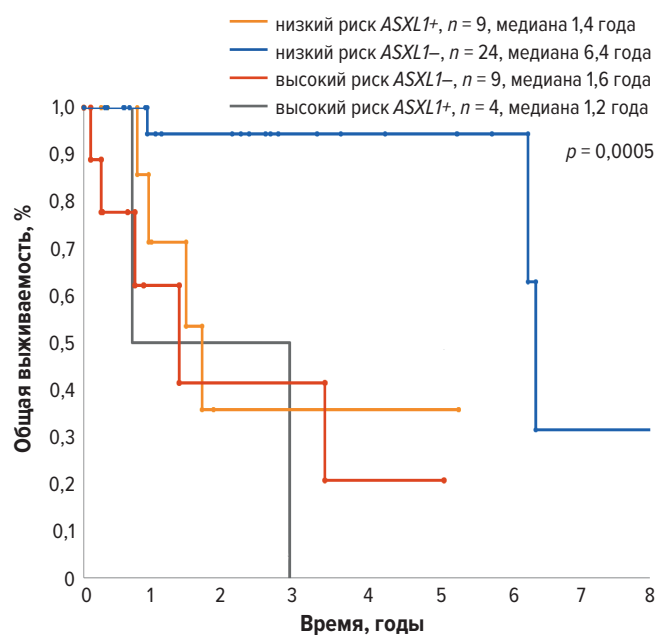


Рис. 3. Кривые общей выживаемости у пациентов с различными мутационным статусом гена *ASXL1* и кариотипом

Fig. 3. Overall survival curves in patients with different *ASXL1* mutation statuses, and karyotypes

значимо меньше и при попарном сравнении не отличались (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетические маркеры играют все более возрастающую роль в диагностике, прогнозировании и лечении опухолевых заболеваний, в т. ч. ПМФ. Согласно современной классификации ВОЗ,

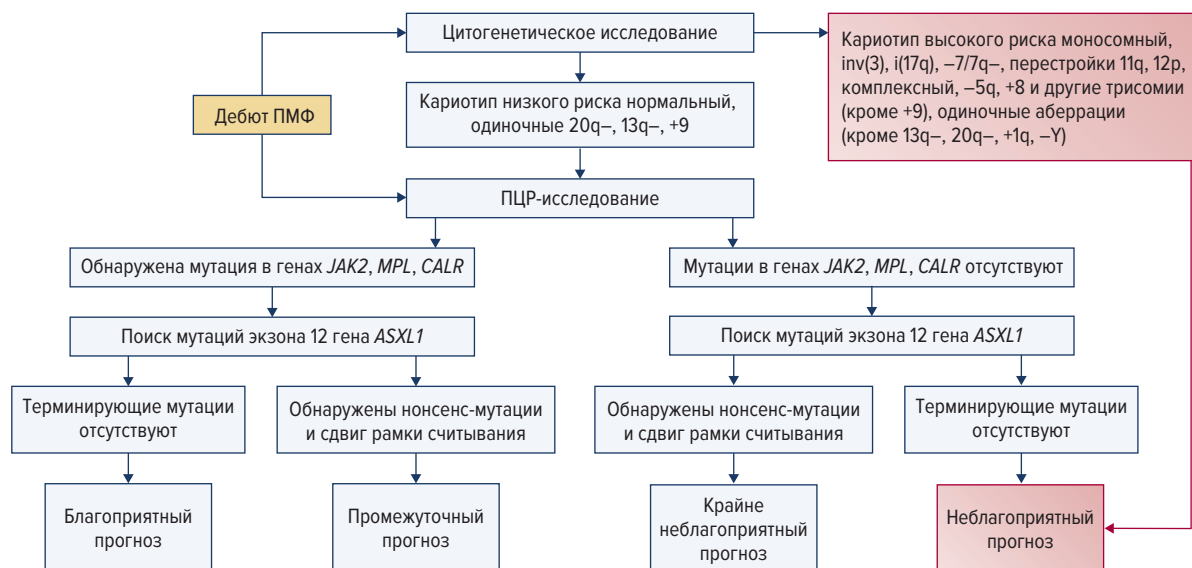


Рис. 4. Алгоритм генетической диагностики у пациентов с ПМФ
ПМФ — первичный миелофиброз; ПЦР — полимеразная цепная реакция.

Fig. 4. Genetic diagnostic algorithm for PMF patients
ПМФ — primary myelofibrosis; ПЦР — polymerase chain reaction.

одним из диагностических критериев ПМФ является обнаружение ДМ в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*. В случае их отсутствия исследуются другие маркеры клональности, в качестве которых могут выступать мутации в генах *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SF3B1* и др. [16]. Для ряда генов показаны ассоциации их мутационного статуса с фенотипическими проявлениями ПМФ, что может в некоторой степени упростить диагностический поиск у пациентов с характерными клиничко-гематологическими проявлениями. Мы продемонстрировали, что для *JAK2*⁺ больных характерен более высокий уровень гемоглобина, у пациентов без ДМ чаще отмечают анемию и лейкоцитоз, а наличие терминирующих мутаций в гене *ASXL1* связано со спленомегалией, лейкоцитозом ($> 25 \times 10^9/\text{л}$) и присутствием $\geq 1\%$ бластных клеток в крови.

По результатам ряда исследований предложены новые системы оценки прогноза MIPSS70 и MIPSS70+2.0, учитывающие мутационный статус генов *CALR*, *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2*, *IDH1/2* в дополнение к клиническим и цитогенетическим данным, а также система GIPSS, базирующаяся только на результатах кариотипирования и исследования генов *CALR*, *ASXL1*, *SRSF2*, *U2AF1* [17–19]. Применение данных систем ограничено необходимостью проведения большого количества дорогостоящих молекулярно-генетических исследований. Вместе с тем адекватная терапия ПМФ сегодня требует учета доказанных факторов риска — неблагоприятных хромосомных aberrаций и соматических мутаций. Компромиссным вариантом могут стать комплексные генетические характеристики, учитывающие данные кариотипирования, наличия и типа ДМ и мутационного статуса гена *ASXL1* как наиболее часто встречающегося неблагоприятного прогностического фактора при ПМФ.

По нашим данным, наиболее мощным прогностическим потенциалом обладали совокупные критерии «наличие ДМ/*ASXL1*-статус» и «кариотип/

ASXL1-статус». Мы обнаружили, что наличие мутации в гене *ASXL1* существенно ухудшает показатели ОБ у больных с ТНС, а продолжительность жизни у пациентов с ДМ больше, чем у больных с ТНС, даже при положительном статусе *ASXL1*. ОБ пациентов с наличием любого из параметров — кариотипа высокого риска или мутации в гене *ASXL1* — значительно хуже, чем у *ASXL1*-негативных пациентов без хромосомных aberrаций высокого риска.

На основании полученных результатов мы разработали алгоритм генетической диагностики у пациентов с ПМФ. В дебюте ПМФ пациенту рекомендовано проведение цитогенетического анализа клеток костного мозга и исследование генов *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1* с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). При наличии в кариотипе aberrаций высокого риска больного относят к группе неблагоприятного прогноза независимо от результатов ПЦР-исследования. В случае, когда определен нормальный кариотип или выявлены хромосомные aberrации не из группы высокого риска, «генетический» прогноз оценивают, исходя из данных молекулярного анализа. Пациента относят к группе крайне неблагоприятного прогноза при отсутствии ДМ и наличии мутации в гене *ASXL1*; неблагоприятного — при отсутствии мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*, *ASXL1*; промежуточного — при наличии ДМ в сочетании с мутацией *ASXL1*; благоприятного — при наличии ДМ и отсутствии мутации в гене *ASXL1* (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты позволяют заключить, что широкая распространенность и очевидный неблагоприятный прогностический эффект терминирующих мутаций гена *ASXL1* указывают на необходимость включения данного молекулярного маркера в алгоритм обследования пациентов с диагнозом

ПМФ наряду с тестированием на наличие драйверных мутаций и кариотипированием.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: И.С. Мартынкевич, В.А. Шуваев, Л.Б. Полушкина.

Сбор и обработка данных: Л.Б. Полушкина.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: Л.Б. Полушкина.

Подготовка рукописи: Л.Б. Полушкина.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении. Онкогематология. 2015;10(2):26–36. doi: 10.17650/1818-8346-2015-10-2-26-36. [Abdulkadyrov KM, Shuvaev VA, Martynkevich IS. Primary myelofibrosis: own experience and news from diagnostic and treatment. Oncohematology. 2015;10(2):26–36. doi: 10.17650/1818-8346-2015-10-2-26-36. (In Russ)]
2. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Миелолипролиферативные новообразования. М.: Литтерра, 2016. 298 с. [Abdulkadyrov KM, Shuvaev VA, Martynkevich IS. Mieloproliferativnye novoobrazovaniya. (Myeloproliferative neoplasms.) Moscow: Litterra Publ.; 2016. 298 p. (In Russ)]
3. Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза. Вестник гематологии. 2013;9(3):44–78.

[Abdulkadyrov KM, Shuvaev VA, Martynkevich IS. Diagnostic criteria and current methods of primary myelofibrosis treatment. Vestnik gematologii. 2013;9(3):44–78. (In Russ)]

4. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. J Clin Oncol. 2005;23(23):8520–30. doi: 10.1200/jco.2004.00.9316.
5. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, et al. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. Nat Rev Cancer. 2007;7(9):673–83. doi: 10.1038/nrc2210.
6. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(3):325–32. doi: 10.1182/blood-2015-07-661835.
7. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. Am J Hematol. 2018;93(12):1551–60. doi: 10.1002/ajh.25230.
8. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. Blood Adv. 2016;1(2):105–11. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000208.
9. Hussein K, Van Dyke DL, Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. Eur J Haematol. 2009;82(5):329–38. doi: 10.1111/j.1600-0609.2009.01224.x.
10. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. J Clin Oncol. 2011;29(4):392–7. doi: 10.1200/jco.2010.32.2446.
11. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. Blood. 2011;118(19):5227–34. doi: 10.1182/blood-2011-06-363424.
12. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. Blood. 2014;124(15):2465–6. doi: 10.1182/blood-2014-07-588426.
13. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. Leukemia. 2014;28(7):1568–70. doi: 10.1038/leu.2014.83.
14. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. Leukemia. 2014;28(7):1494–500. doi: 10.1038/leu.2014.57.
15. Argote JA, Dasanu CA. ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. Curr Med Res Opin. 2016;34(5):757–63. doi: 10.1080/03007995.2016.1276896.
16. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391–405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
17. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(4):310–8. doi: 10.1200/jco.2017.76.4886.
18. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(17):1769–70. doi: 10.1200/jco.2018.78.9867.
19. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(7):1631–42. doi: 10.1038/s41375-018-0107-z.