Клинико-лабораторные особенности эссенциального тромбоцитоза и первичного миелофиброза в зависимости от мутационного статуса генов *JAK2* и *CALR1*

Е.Г. Лисина¹, Н.Т. Сиordia², П.А. Бутылин², А.А. Силютин², Н.М. Матюхина²,
О.М. Сендерова³, Е.С. Фокина⁴, В.А. Овсепян⁴, Э.Г. Ломаиа², А.Ю. Зарицкий²

¹БУ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Чувашской Республики;
Россия, 428018 Чебоксары, просп. Московский, 9;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России;
Россия, 197341 Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2;

³ГБУЗ «Иркутская ордена “Знак Почета” областная клиническая больница»; Россия, 664049 Иркутск, м-н Юбилейный, 100;

⁴ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 610027 Киров, ул. Красноармейская, 72

Контакты: Екатерина Геннадьевна Лисина eglisina@mail.ru

Введение. Мутация гена *JAK2V617F* встречается примерно у 50 % пациентов с эссенциальным тромбоцитозом (ЭТ) и первичным миелофиброзом (ПМФ). В 2013 г. у большинства *JAK2*-негативных пациентов выявлены мутации в гене *CALR*. Диагностическая ценность мутаций в генах *JAK2* и *CALR* высокая, но их прогностическая значимость недостаточно ясна. Данные о влиянии мутационного статуса генов *JAK2* и *CALR* на тромботические осложнения при ЭТ и ПМФ противоречивы.

Цель исследования – выявление клинико-лабораторных особенностей у пациентов с ЭТ и ПМФ в зависимости от наличия мутаций генов *JAK2V617F* и *CALR*.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное исследование пациентов, наблюдавшихся в четырех медицинских учреждениях Санкт-Петербурга, Чебоксар, Иркутска и Кирова (БУ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Чувашской Республики, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ГБУЗ «Иркутская ордена “Знак Почета” областная клиническая больница», ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»). В клетках периферической крови пациентов проводили определение генетических мутаций: *CALR* (с выделением 1-го и 2-го типов), *MPL W515L/K*, *JAK2V617F*.

Результаты. При ЭТ у 21 % ($n = 16$) больных зарегистрированы тромботические осложнения, при этом они встречались чаще среди носителей мутации *JAK2V617F* ($p < 0,05$). При ПМФ медиана уровня гемоглобина оказалась наименьшей в группе пациентов с «тройным негативным» статусом, а уровень лейкоцитов более высоким, чем в группе с мутациями *CALR* ($p = 0,014$).

Заключение. При ЭТ мутация *JAK2* сопровождается высоким риском развития тромбозов. Наличие мутации *CALR* может иметь благоприятный прогноз в плане риска развития тромботических осложнений. Выявлены некоторые лабораторные особенности, характерные для мутации *CALR* при ЭТ и ПМФ.

Ключевые слова: эссенциальный тромбоцитоз, миелофиброз, хронические миелопролиферативные заболевания, *JAK2*, *CALR*, тромботические осложнения

DOI: 10.17650/1818-8346-2017-12-3-8-16

Clinical and laboratory features of essential thrombocytosis and primary myelofibrosis depending on *JAK2* and *CALR1* mutation status

E.G. Lisina¹, N.T. Siordiya², P.A. Butylin², A.A. Silyutina², N.M. Matyukhina²,
O.M. Senderova³, E.S. Fokina⁴, V.A. Ovsepyan⁴, E.G. Lomaia², A.Yu. Zaritskiy²

¹Chuvash Republican Clinical Hospital; 9 Moscovskiy prospect, Cheboksary, Chuvash Republic, Russia, 428018;

²Almazov National Medical Research Center; 2 Akkuratova str., St. Petersburg, Russia, 197341;

³“Badge of Honor” Irkutsk Regional Clinical Hospital; 100 Yubileyny microrayon, Irkutsk, Russia; 664049;

⁴Kirov Scientific Research Institute of Hematology and Blood Transfusion; 72 Krasnoarmeiskaya str., Kirov, Russia, 610027

Introduction. *JAK2V617F* mutation is detected in approximately 50 % of patients with essential thrombocytosis (ET) and primary myelofibrosis (PMF). In 2013 most of the *JAK2* negative patients showed mutations in the *CALR* gene. Diagnostic value of *JAK2* and *CALR* mutations is high, but their prognostic significance is not sufficiently clear. Data on impact of *JAK2* and *CALR* mutational status on thrombotic complications in ET and myelofibrosis patients are contradictory.

The aim of the study was to identify clinical and laboratory features in patients with ET and PMF in accordance with the mutational status of *JAK2V617F* and *CALR* gene.

Materials and methods. Patients treated in Almazov National Medical Research Center (St. Petersburg), Chuvash Republican Clinical Hospital (Cheboksary), Irkutsk Regional Clinical Hospital (Irkutsk), Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion (Kirov)

was included in the retrospective study. *CALR* mutation (1 and 2 types), *MPL W515L/K* and *JAK2V617F* mutation were detected in peripheral blood cells.

Results. We identified that 21 % ($n = 16$) of ET patients had thrombotic complications, and they occurred more often among *JAK2V617F* positive patients ($p < 0.05$). The median of hemoglobin level in PMF was the lowest in the group of triple negative patients. The level of leukocytes in PMF was higher in the group of triple negative patients than in the group with mutated *CALR* ($p = 0.014$).

Conclusion. *JAK2V617F* mutation in ET patients was associated with a high risk of thrombosis. Patients with *CALR* mutations may have a favorable prognosis regarding to thrombotic complications. Some laboratory features of *CALR* mutations in ET and PMF patients have been revealed.

Key words: essential thrombocytosis, myelofibrosis, chronic myeloproliferative diseases, *JAK2*, *CALR*, thrombotic complications

Введение

Эссенциальный тромбоцитоз (ЭТ), истинная полицитемия (ИП) и первичный миелофиброз (ПМФ) являются классическими хроническими миелопролиферативными заболеваниями (ХМПЗ), характеризующимися повреждением полипотентной кроветворной клетки и избыточной пролиферацией клеток миелоидной линии на разных стадиях созревания. Этим заболеваниям присущи следующие общие клинико-лабораторные особенности: мегакариоцитарная гиперплазия и тромбоцитоз, спленомегалия, частые тромботические осложнения, при длительном течении — риск трансформации миелодиспластического синдрома в острый лейкоз.

Клинические особенности течения болезни находятся в непосредственной связи с молекулярно-генетическим профилем. На сегодняшний день при ХМПЗ выявляется несколько мутаций. В 2005 г. была обнаружена точечная соматическая мутация в 14-м экзоне гена *JAK2* у большинства пациентов с хроническими миелопролиферативными неоплазиями [1–4]. Мутация *JAK2V617F* определяется более чем у 95 % пациентов с ИП [1, 5] и у 50–60 % пациентов с ЭТ [1, 5–9] или ПМФ [1, 5, 8, 10, 11]. Мутация в 12-м экзоне гена *JAK2* обнаружена у 4 % пациентов с ИП [12]. *JAK2*, являясь цитоплазматической тирозинкиназой, передает внутриклеточный сигнал с рецепторов для цитокинов — эритропоэтина, тромбопоэтина, G-CSF (гранулоцитарного колониестимулирующего фактора), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора) и интерлейкина 3 к ядру клетки для активации процессов пролиферации [13, 14]. Мутация *JAK2V617F* приводит к цитокин-независимой активации сигнальных путей *JAK-STAT*, *PI3K* (фосфатидилинозитол-3-киназы), АКТ (протеинкиназы B), *m-TOR* и *MAPK-ERK* (митоген-активированных протеинкиназ — внеклеточной регулируемой киназы) [2–4, 15], которые участвуют в передаче сигналов с цитокиновых рецепторов [15].

Позже была выявлена мутация в гене рецептора тромбопоэтина (*MPL W515*) [16], которая встречается при ПМФ и ЭТ в 3–8 % случаев [17, 18]. Мутация *MPL W515* наблюдалась только при ЭТ или ПМФ и никогда при ИП, что свидетельствует о потенцирующем эффекте *MPL W515* в поддержании мегакариоцитарной гиперплазии и тромбоцитоза [18].

В 2013 г. были опубликованы данные двух независимых лабораторий об открытии мутаций в гене *CALR*. У пациентов с ЭТ и ПМФ, не имеющих мутаций в генах *JAK2* или *MPL*, мутации *CALR* выявлялись с частотой от 67 до 88 % случаев [19, 20]. На сегодняшний день обнаружено более 40 различных мутаций в 9-м экзоне гена *CALR*. Все они являются инсерциями и/или делециями и приводят к образованию новой C-концевой последовательности белка и потере сигнальной последовательности *KDEL* за счет сдвига рамки считывания на 1 нуклеотид: +1 пара оснований (п. о.) [19–21]. Наиболее часто встречающимися мутациями являются делеция 52 п. о. (1-й тип) и инсерция 5 п. о. (2-й тип), причем мутации 1-го типа чаще встречаются при ПМФ [22].

Кальретикулин — многофункциональный Ca^{2+} -связывающий белок, локализуется преимущественно в эндоплазматической сети, но также обнаруживается в цитоплазме и на поверхности клетки. Показано, что мутантные формы кальретикулина способны связываться с экстраклеточным доменом *MPL* и, таким образом, индуцировать конститутивную лиганд-независимую активацию *JAK2-STAT/PI3K/MAPK* сигнальных путей, что ведет к пролиферации и автономному росту клеток линий *Ba/F3 UT-7/TPO* [23, 24].

Участием *JAK-STAT* сигнального пути у пациентов с мутацией *CALR* можно объяснить эффективность *JAK2*-ингибиторной терапии ПМФ у этой группы больных [19]. Тем не менее около 5–10 % пациентов с ЭТ и ПМФ являются «тройными негативными» (triple negative), т. е. у них не обнаруживаются мутации в генах *JAK2*, *MPL*, *CALR*. Мутации в других генах, таких как *TET2*, *ASXL1* и *CBL*, были описаны при всех видах ХМПЗ, тем не менее они сосуществуют с мутациями в генах *JAK2*, *MPL* и *CALR* и встречаются при различных миелоидных опухолях [20, 25–27]. Было показано, что большинство из них участвует в прогрессии клонального гемопоэза заболевания [28]. В случаях «тройных негативных» ХМПЗ также имеется повышенная активация *JAK-STAT* сигнального пути [29]. Таким образом, Ph-отрицательные ХМПЗ описываются как заболевания, обусловленные гиперактивацией *JAK-STAT* сигнального пути [30].

На сегодняшний день доказана диагностическая значимость мутаций *JAK2*, *MPL*, *CALR* и они включе-

ны в критерии для постановки диагноза эссенциальной тромбоцитемии и ПМФ по критериям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ, 2016) [31]. Кроме того, опубликован ряд работ, описывающих клинические изменения, характерные для каждого типа мутаций при ЭТ и ПМФ, однако сравнительный анализ международных данных выявляет некоторые различия между ними. В ряде исследований когорт пациентов с ЭТ и ПМФ показано, что носители мутации в гене *CALR* имеют более низкие уровни гемоглобина и лейкоцитов и более высокое содержание тромбоцитов по сравнению с группой больных, имеющих мутацию в гене *JAK2* [19, 31–33]. При этом среди пациентов с мутацией *CALR* отмечена редкая встречаемость венозных тромбозов [22, 34–36]. Также выявлена более высокая частота фиброзной трансформации при ЭТ с мутацией в гене *CALR* [20, 34]. Однако некоторые исследователи не выявили существенных различий в развитии венозных тромбозов и риска фибротической трансформации [31, 32], а также в показателях общей выживаемости [32, 34] у пациентов с ЭТ в зависимости от наличия мутации *CALR* или *JAK2*. В одном из исследований не выявлено значимой связи между присутствием мутации *CALR* и клинико-лабораторными особенностями или стратификацией пациентов при ПМФ в соответствии со шкалой IPSS (International Scoring Prognostic System – Международная шкала оценки прогноза) [37]. Тем не менее при ЭТ и ПМФ подтверждается положительное влияние мутации гена *CALR* на выживаемость больных [19, 33].

Кроме того, в ряде работ были выявлены различия в клинических и лабораторных особенностях пациентов, несущих разные типы мутаций *CALR* [38, 39]. Сравнительный анализ мутаций 1-го и 2-го типов в группе пациентов с ПМФ показал, что пациенты с мутациями 2-го типа относились к группе высокого риска (4 балла и более по системе стратификации DIPSS⁺), имели выраженный лейкоцитоз и повышенное содержание бластных клеток в периферической крови по сравнению с пациентами, несущими мутации 1-го типа. Общая выживаемость пациентов с мутациями *CALR* 2-го типа и *JAK-2* была значительно ниже выживаемости пациентов с мутациями 1-го типа [38]. Исследование когорты пациентов с ЭТ не выявило различий между вариантами мутаций *CALR* в уровне гемоглобина, количестве лейкоцитов и стратификацией пациентов в соответствии с классификацией по системе IPSS, а также в показателях общей выживаемости и риска возникновения тромботических осложнений, однако содержание тромбоцитов при мутациях 2-го типа *CALR* было значительно выше, чем при мутациях 1-го типа [39].

Целью данного исследования стало выявление клинических особенностей у пациентов с ЭТ и ПМФ в зависимости от наличия мутаций генов *JAK2V617F* и *CALR*.

Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование пациентов, наблюдавшихся в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» (НМИЦ им. В.А. Алмазова) Минздрава России (Санкт-Петербург), БУ «Республиканская клиническая больница» Минздрава Чувашии (Чебоксары), ГБУЗ «Иркутская ордена “Знак Почета” областная клиническая больница» (Иркутск), ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства» (Киров). В исследование были включены 149 пациентов, у 76 из них диагностирован ЭТ (22 мужчины, 54 женщины), у 73 – ПМФ (30 мужчин, 43 женщины).

Всеми пациентами было подписано информированное согласие на участие в исследовании. Данные собирались из медицинской документации, полученной в ходе амбулаторного консультирования пациентов с установленными диагнозами ПМФ и ЭТ.

Диагноз устанавливался с учетом действующих рекомендаций ВОЗ (2008) [40], в дальнейшем пересматривался ретроспективно в соответствии с новыми критериями ВОЗ от 2016 г. [31]. Показатели гемограмм (уровень гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов, количество бластных клеток) регистрировались на момент диагностики, учитывались клинические данные, размеры печени и селезенки, проводилась стратификация пациентов по группам риска в соответствии с системами IPSS и DIPSS [41, 42]. Исследование утверждено этическим комитетом ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

В клетках периферической крови больных проводили определение возможных генетических мутаций, встречающихся при данных нозологиях: *CALR* (с выделением 1-го и 2-го типов), *MPL W515L/K*, *JAK2V617F*. При получении отрицательных результатов на вышеуказанные мутации устанавливался «тройной негативный» статус (triple negative).

Исследование образцов крови. Выделение ДНК проводили из 500 мкл крови с использованием набора реагентов FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Германия) и в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту ДНК оценивали с помощью прибора NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США).

Для амплификации 9-го экзона гена *CALR1* использовали пару специфических олигонуклеотидных праймеров *CALR-F* и *CALR-R* [20]. Реакционная смесь содержала: 10X Taq-буфера (Евроген, РФ), 50X смесь dNTP (10 mM каждого) (Евроген, РФ), 50X Taq ДНК-полимеразы (Евроген, РФ), 0,4 мкМ праймера *CALR-F*, 0,4 мкМ праймера *CALR-R* и 100 нг ДНК, конечный объем реакционной смеси составил 25 мкл. Для проведения амплификации использовали прибор DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Программа для амплификации включала: первичную денатурацию (95 °C/5 мин); циклирование – 10 циклов:

94 °C/30 с; 67 °C (–0,5 °C/1 цикл)/30 с; 72 °C/30 с; и 29 циклов: 94 °C/30 с; 62 °C/30 с; 72 °C/30 с; и конечную элонгацию (72 °C/10 мин).

Очистка продуктов амплификации. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 2 % агарозном геле при напряжении 5V/см³ в течение 2,5 ч. Для визуализации продуктов амплификации непосредственно в гель добавляли бромистый этидий до концентрации 10 мг/л. В качестве электрофоретического буфера использовали 1-кратный раствор ТАЕ (трис-ацетатного буфера): 40 мМ Трис, 40 мМ СН₃СООН, 2 мМ EDTA-Na pH 8,0). После окончания электрофореза из геля вырезали фрагменты интересующей длины. ДНК из геля выделяли с помощью набора для экстракции ДНК из агарозного геля (Амбер, РФ).

Для проведения сиквенсовой реакции использовали прибор DNA Engine Dyad Thermal Cycler (BioRad, США). Реакционную смесь готовили с использованием пары праймеров для амплификации и набора реагентов BigDye® Terminator v^{3.1} Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США). Реакционная смесь содержала 5X Sequencing Buffer, BigDye Terminator v^{3.1} Ready Reaction Mix, 3,2 мкМ праймера *CALR-F* или *CALR-R* и 30 нг ДНК, конечный объем реакционной смеси был равен 10 мкл. Программа для сиквенсовой реакции включала первичную денатурацию (96 °C/1 мин) и циклирование: 25 циклов (96 °C/10 с; 50 °C/5 с; 60 °C/4 мин).

Очистка продуктов сиквенсовой реакции. Для очистки продуктов сиквенсовой реакции к 10 мкл смеси, полученных на предыдущем этапе, добавляли 1 мкл 3М ацетата натрия, 1 мкл 0,125М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,5 мкл гликогена и 25 мкл охлажденного 96° этилового спирта. Полученную смесь оставляли на ночь при температуре –20 °C. Далее откручивали микропробирки в центрифуге в течение 20 мин при 4 °C и 12600 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и промывали осадок 35 мкл охлажденного 80° этилового спирта, затем повторяли данный шаг. Осадки сушили при комнатной температуре в течение 10 мин в темном месте. Добавляли к полученным осадкам 10 мкл Hi-Di Formamide (CE-IVD) (Applied Biosystems, США) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин в темном месте.

Секвенирование 9-го экзона гена *CALR1*. Секвенирование 9-го экзона гена *CALR* проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). При анализе нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Unipro UGENE 1.15 (РФ).

Данные обрабатывали в программе Statistica for Windows 6.0. При анализе вариационного ряда использовали среднее (M), медиану (Me) и стандартное отклонение (σ), для сравнения средних при правильном распределении – t-критерий Стьюдента (p),

при неправильном распределении либо малом числе наблюдений – критерий Манна–Уитни (p_{m-u}), при сравнении 3 групп и более – критерий Крускала–Уоллиса.

Анализ качественных величин проводили по критерию хи-квадрат (p_{χ^2}), при количестве наблюдений менее 5 в одной из ячеек либо общем числе наблюдений в таблице менее 30 применяли точный критерий Фишера (p_F). Результаты анализа считались приемлемыми при вероятности ошибки ($p, p_{m-u}, p_F, p_{\chi^2}$) менее 0,05.

Результаты

В группе пациентов с ЭТ мутация *JAK2V617F* выявлена у 46,1 % больных, *CALR* – у 44,7 % больных, в 1 случае детектирована мутация *MPL W515L*, у 7,9 % больных не выявлено ни одной «драйверной» мутации (triple negative). Частота встречаемости мутации *CALR* при ПМФ была практически сопоставима, за исключением мутации *CALR* 2-го типа, которая в 2 раза чаще наблюдалась при ЭТ, чем при ПМФ: 17,1 % против 9,6 %, $p = 0,178$ (табл. 1).

Частота обнаружения *JAK2* была несколько выше в группе с ПМФ – 53,4 % против 46,1 % ($p = 0,368$), а частота обнаружения *CALR* ниже – 35,6 % против 44,7 % ($p = 0,256$). Примечательно, что уровень экспрессии гена *JAK2* среди *JAK2*-позитивных лиц с ПМФ был выше по сравнению с ЭТ – $54,0 \pm 36,5$ % против $36,5 \pm 27,2$ %, $p_{m-u} = 0,023$.

При анализе встречаемости генетических мутаций выявлены гендерные особенности структуры популяции при ПМФ в отличие от ЭТ (табл. 2). Медиана периода наблюдения пациентов с ЭТ составила 50 ± 38 мес. У 4 пациентов с мутацией *JAK2* и 1 пациента с мутацией *CALR* (1-й тип – инсерция) констатирована трансформация во вторичный миелофиброз. Анализ гематологических показателей выявил более высокий уровень лейкоцитов у пациентов с 1-м типом мутации ($p = 0,043$), уровень гемоглобина при данном варианте оказался ниже ($p = 0,009$). У 21 % больных ($n = 16$) зарегистрированы тромботические осложнения, и они встречались чаще среди носителей мутации *JAK2V617F* ($p < 0,05$) (табл. 3). При этом медиана уровня тромбоцитов несколько ниже у пациентов с мутацией *JAK2* ($p = 0,074$), а уровень лейкоцитов при *JAK2* выше, чем при мутации *CALR*: $8,4$ и $6,55 \times 10^9$ /л ($p = 0,067$).

Медиана периода наблюдения пациентов с ЭТ с 1-м типом мутации составила 36 мес (3–87), со 2-м типом – 22 мес (2–90). Размер селезенки по данным ультразвукового исследования на момент диагностики при 1-м типе составлял 106,5 мм, при 2-м типе – 119,6 мм ($p = 0,076$). Тип мутации не оказал влияния на распределение пациентов по степени риска согласно шкале IPSET (International Prognostic Score WHO for ET – шкала риска развития тромбозов ВОЗ при эссенциальной тромбоцитемии), также нами не выявлены значимые отличия при оценке терапии.

Таблица 1. Встречаемость генетических мутаций при эссенциальном тромбоцитозе и первичном миелофиброзе, % (abs.)

Table 1. The frequency of genetic mutations in essential thrombocytosis and primary myelofibrosis, % (abs.)

Генетический маркер Genetic marker	Первичный миелофиброз, n = 73 Primary myelofibrosis, n = 73	Эссенциальный тромбоцитоз, n = 76 Essential thrombocytosis, n = 76	p_{χ^2}
<i>JAK2</i>	53,4 (39)	46,1 (35)	0,368
<i>CALR</i> , всего <i>CALR</i> , total	35,6 (26)	44,7 (34)	0,256
<i>CALR</i> , 1-й тип <i>CALR</i> , 1 st type	24,7 (18)	25,0 (19)	0,962
<i>CALR</i> , 2-й тип <i>CALR</i> , 2 nd type	9,6 (7)	17,1 (13)	0,178
<i>CALR</i> , тип не уточнен <i>CALR</i> , type unspecified	1,4 (1)	2,6 (2)	0,584
<i>MPL</i>	2,7 (2)	1,3 (1)	0,536
Тройной негативный статус Triple negative	8,2 (6)	7,9 (6)	0,942

Примечание: p_{χ^2} – критерий хи-квадрат.

Note: p_{χ^2} – chi-square test.

Таблица 2. Встречаемость генетических мутаций при эссенциальном тромбоцитозе и первичном миелофиброзе у мужчин и женщин, % (abs.)

Table 2. The frequency of genetic mutations in essential thrombocytosis and primary myelofibrosis in men and women, % (abs.)

Генетический маркер Genetic marker	Первичный миелофиброз Primary myelofibrosis		p	Эссенциальный тромбоцитоз Essential thrombocytosis		p
	Мужчины, n = 30 Men, n = 30	Женщины, n = 43 Women, n = 43		Мужчины, n = 22 Men, n = 22	Женщины, n = 54 Women, n = 54	
<i>JAK2</i>	40,0 (12)	62,8 (27)	0,055	45,5 (10)	46,3 (25)	0,947
<i>CALR</i>	46,7 (14)	27,9 (12)	0,100	45,5 (10)	44,4 (24)	0,936
<i>MPL</i>	0 (0)	4,7 (2)	0,231	0 (0)	1,9 (1)	0,521
Тройной негативный статус Triple negative	13,3 (4)	4,7 (2)	0,184	9,1 (2)	7,4 (4)	0,805

Примечание: p – t -критерий Стьюдента.

Note: p – Student's t -test.

Медиана периода наблюдения пациентов с ПМФ с 1-м типом мутации составила 46 мес (3–133), со 2-м типом – 77 мес (4–115) (табл. 4). При ПМФ медиана уровня гемоглобина оказалась наименьшей в группе «тройных негативных» пациентов, а уровень лейкоцитов – выше в группе «тройных негативных» пациентов, чем в группе с мутациями *CALR* ($p = 0,014$). При сравнении уровня тромбоцитов в исследуемых группах этот показатель был наименьшим в группе «тройных негативных» пациентов ($p = 0,025$). В группе *CALR*-позитивных пациентов уровень тромбоцитов оказался более высоким у пациентов с ПМФ при мутациях *CALR* 2-го типа ($p = 0,014$).

При анализе динамики развития анемического синдрома получены следующие данные. Среди *JAK2*-позитивных пациентов 28 % имели трансфузионную зависимость на момент диагностики заболевания. Среди больных ПМФ с мутацией *CALR* медиана времени до развития анемии (менее 100 г/л) составила 37 мес, при этом на момент диагностики она была выявлена у 5 (из 22) и была трансфузионно зависимой у 3 пациентов (13 %). В группе без мутаций у 4 пациентов из 10 анемия констатирована на момент диагностики заболевания, при этом у 3 – гемотрансфузионно зависимая (30 %). Медиана времени до развития клинически значимой анемии

Таблица 3. Клинико-лабораторные особенности пациентов с эссенциальным тромбоцитозом в зависимости от генетических мутаций

Table 3. Clinical and laboratory features of essential thrombocytosis patients depending on genetic mutations

Показатель Criteria	Мутации			p		
	1	2	3	1–2	1–3	2–3
	<i>JAK2</i> , n = 35	<i>CALR</i> , n = 32	Тройной негативный статус, n = 6 Triple negative, n = 6			
Возраст средний (диапазон), лет Age average (range), years	48 (20–70)	51 (16–76)	45,5 (17–68)	0,363	0,867	0,501
Мужской пол, % Male, %	28,6	29,4	33,3	33,3	33,3	33,3
Гемоглобин, г/л Hemoglobin, g/L	135 (100–168)	130,1 (102–142)	133 (110–140)	0,150	0,749	0,560
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л Platelets, ×10 ⁹ /L	920 (611–1638)	944 (603–3209)	1069 (652–1414)	0,074	0,378	0,749
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л Leukocytes, ×10 ⁹ /L	8,4 (4,6–22,1)	6,55 (3,9–24,0)	6,77 (4,6–9,8)	0,067	0,085	0,587
Лейкоциты >11, ×10 ⁹ /л Leukocytes >11, ×10 ⁹ /L	20	11,8	0	0,274	0,508	0,299
Длинник селезенки, мм Spleen size, mm	116 (85–300)	108,5 (84–200)	97 (93–100)	0,407	0,150	0,110
Срединный размер печени, мм Median liver size, mm	119,8 ± 31,8	131,1 ± 12,2	123,5 ± 6,4	0,237	0,875	0,414
Портальная гипертензия, % Portal hypertension, %	14,3	0	0	0,022	0,335	1,000
Тромбозы в течение наблюдения, % Thrombosis during follow-up, %	37,1 (13)	8,8 (3)	16,7 (1)	0,005	0,341	0,567
Тромбозы на момент диагностики Thrombosis at the time of diagnosis	22,9 (8)	6,3 (2)	0 (0)	0,057	0,706	0,246
Риск тромбозов по шкале IPSET, балл Risk of thrombosis on the IPSET scale, score	1,49 ± 0,56	0,29 ± 0,52	0,67 ± 0,82	<0,001	0,004	0,149

Примечание. IPSET – шкала риска развития тромбозов ВОЗ при эссенциальном тромбоцитозе, p – t-критерий Стьюдента.

Note. IPSET – International Prognostic Score WHO for essential thrombocytosis, p – Student's t-test.

в группе «тройных негативных» пациентов составила 34,3 мес.

Тромботические осложнения при ПМФ зарегистрированы за период наблюдения при мутациях *JAK2* и *CALR* соответственно в 20,5 % (n = 8) и в 19,2 % случаев (n = 5), а в группе с «тройным негативным» молекулярным статусом тромботические осложнения не встречались.

Трансформация ПМФ в острый миелоидный лейкоз/смерть больных развивались с одинаковой частотой во всех трех исследованных группах: *JAK2* (n = 3), *CALR* (n = 3) и *JAK2/CALR*-негативные (n = 2). Тип

мутации *CALR* не оказал влияние на распределение пациентов с ПМФ в зависимости от групп риска по классификации систем IPSS и DIPSS. В группе пациентов с мутацией *CALR* 1-го типа (делеция) 4 пациента вышли из наблюдения по причине летального исхода (трансформация в ОМЛ).

Обсуждение

Мы последовательно исследовали драйверные мутации у пациентов с ПМФ и ЭТ, учитывая тот факт, что данные мутации были описаны как взаимоисключающие [19, 20]. Наши наблюдения совпадают с иссле-

Таблица 4. Клинико-лабораторные особенности пациентов с первичным миелофиброзом в зависимости от генетических мутаций

Table 4. Clinical and laboratory features of primary myelofibrosis patients depending on genetic mutations

Показатель Criteria	Мутации			p		
	1	2	3	1–2	1–3	2–3
	<i>JAK2</i> , n = 39	<i>CALR</i> , n = 26	Тройной негативный статус, n = 6 Triple negative, n = 6			
Возраст средний (диапазон), лет Age average (range), years	55 (20–81)	55,5 (35–76)	61 (18–76)	0,862	0,972	0,909
Гемоглобин, медиана (диапазон), г/л Hemoglobin, median (range), g/L	121 (54–173)	114 (79–140)	100 (83–114)	0,228	0,069	0,065
Тромбоциты, медиана (диапазон), $\times 10^9$ /л Platelets, median (range), $\times 10^9$ /L	493 (28–2326)	458 (120–1149)	198 (80–260)	0,717	0,102	0,025
Лейкоциты, медиана (диапазон), $\times 10^9$ /л Leukocytes, median (range), $\times 10^9$ /L	14,7 (3,4–67)	8,8 (3,7–22,6)	22 (80–260)	0,017	0,261	0,014
Размеры селезенки по УЗИ (длинник), см Spleen size, cm	169,56 $\pm$ 32,81	178,27 $\pm$ 38,77	178 $\pm$ 40,46	0,343	0,575	0,988
Портальная гипертензия (по УЗИ) Portal hypertension (ultrasound)	0,44 $\pm$ 0,5	0,35 $\pm$ 0,49	0,17 $\pm$ 0,41	0,445	0,209	0,409
Тромботические осложнения Thrombotic complications	20,5 (8)	19,2 (5)	0	0,78	0,209	0,256
Лейкоцитоз более $>25 \times 10^9$ /л Leukocytes $>25 \times 10^9$ /L	0,25 $\pm$ 0,44	0,19 $\pm$ 0,4	0,33 $\pm$ 0,52	0,599	0,676	0,468
Появление бластных клеток (1–5 %) в периферической крови Blast cells (1–5 %) in peripheral blood	0,42 $\pm$ 0,5	0,58 $\pm$ 0,5	0,83 $\pm$ 0,41	0,219	0,061	0,256
Трансформация в ОМЛ AML transformation	0,03 $\pm$ 0,17	0,04 $\pm$ 0,2	0,33 $\pm$ 0,52	0,834	0,007	0,025
Время до трансформации в ОМЛ, мес Time to AML transformation, months	83	98	46 $\pm$ 25,46	<0,001	0,446	0,344

Примечание. ОМЛ – острый миелоидный лейкоз.

Note. AML – acute myeloid leukemia.

дованиями, проведенными на больших когортах пациентов в отношении лабораторных особенностей при различном молекулярном профиле миелолипролиферативного заболевания: носители мутации в гене *CALR* имеют более низкий уровень лейкоцитов и более высокое содержание тромбоцитов по сравнению с группой больных, имеющих мутацию в гене *JAK2* [19, 32, 33, 43]. В отношении концентрации гемоглобина в нашем исследовании у *CALR*-позитивных пациентов с ЭТ выявлено его более низкое содержание, чем в группе с мутацией *JAK2* и «тройным негативным» молекуляр-

ным статусом, однако при использовании 95 % доверительного интервала не получена статистическая значимость. Одним из важнейших наблюдений стало подтверждение более редкой частоты встречаемости тромбозов (венозных и артериальных) при *CALR*-положительном ЭТ. Более частая встречаемость портальной гипертензии при *JAK2*-положительном ЭТ обусловлена, вероятно, высокой частотой тромботических осложнений в сосудах портальной системы.

Что касается ПМФ, то мы не выявили значимых различий в частоте развития тромботических ослож-

нений в зависимости от мутационного статуса. Уровень лейкоцитов при ПМФ у *CALR*-позитивных пациентов оказался ниже, чем у носителей мутации *JAK2* и группы пациентов с молекулярным профилем «triple negative». Уровень тромбоцитов у больных без драйверных мутаций был ниже, чем у пациентов с мутацией в гене *CALR*.

Профиль драйверной генетической мутации не только определяет фенотипические проявления миелопролиферативного заболевания и имеет диагностическую значимость [31], но и отражается на прогностических факторах и рисках в его течении. Случаи с «тройным негативным» молекулярным статусом являются наиболее неблагоприятными по выживаемости.

Выводы

1. Риск тромбозов выше среди пациентов с *JAK2*-позитивных ЭТ по сравнению с пациентами с *CALR*-позитивных ЭТ.

2. Более высокий уровень тромбоцитов, характерный для пациентов с *CALR*-позитивным ЭТ, не приводит к увеличению риска тромботических осложнений.

3. При ПМФ не выявлено значимых отличий по частоте развития тромботических осложнений в исследуемых группах.

4. Пациенты с ПМФ с мутацией *CALR* имеют более низкий уровень лейкоцитов в сравнении с группой пациентов *JAK2*-положительных и с «тройным негативным» молекулярным статусом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России 2015–2017 гг. «Риск-адаптированные подходы к терапии на основе новых молекулярных факторов прогноза при лимфо- и миело-пролиферативных заболеваниях» (платформа «Онкология и радиационные технологии»).

Financing. Work performed under the state order of Ministry of Health of Russia 2015–2017 yy. «Risk-adapted therapy approaches based on new molecular prognosis factors for lympho- and myeloproliferative diseases» (platform «Oncology and Radiation Technologies»).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–1056. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9. PMID: 15781101.
- James C., Ugo V., Le Couedic J.P. et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144–1148. DOI: 10.1038/nature03546. PMID: 15793561.
- Levine R.L., Wadleigh M., Cools J. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387–397. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.023. PMID: 15837627.
- Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S. et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779–1790. DOI: 10.1056/NEJMoa051113. PMID: 15858187.
- Levine R.L., Belisle C., Wadleigh M. et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative *JAK2V617F* assessment reveals a strong association between clonality and *JAK2V617F* in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of *JAK2V617F*-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood* 2006;107(10):4139–4141. DOI: 10.1182/blood-2005-09-3900. PMID: 16434490.
- Antonioni E., Guglielmelli P., Pancrazzi A. et al. Clinical implications of the *JAK2 V617F* mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2005;19:1847–1849. DOI: 10.1038/sj.leu.2403902. PMID: 16079890.
- Campbell P.J., Scott L.M., Buck G. et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythemia vera based on *JAK2 V617F* mutation status: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1945–1953. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67785-9. PMID: 16325696.
- Jones A.V., Kreil S., Zoi K. et al. Widespread occurrence of the *JAK2 V617F* mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005;106(6):2162–2168. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1320. PMID: 15920007.
- Wolanskyj A.P., Lasho T.L., Schwager S.M. et al. *JAK2* mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol* 2005;131(2):208–213. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05764.x. PMID: 16197451.
- Campbell P.J., Griesshammer M., Dohner K. et al. *V617F* mutation in *JAK2* is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2006;107:2098–2100. DOI: 10.1182/blood-2005-08-3395. PMID: 16293597.
- Tefferi A., Lasho T.L., Schwager S.M. et al. The *JAK2(V617F)* tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates. *Br J Haematol* 2005;131(3):320–328. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05776.x. PMID: 16225651.
- Passamonti F., Elena C., Schnittger S. et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with *JAK2* exon 12 mutations. *Blood* 2011;117(10):2813–6. DOI: 10.1182/blood-2010-11-316810. PMID: 21224469.
- Kisseleva T., Bhattacharya S., Braunstein J., Schindler C.W. Signaling through the *JAK/*

- STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002;285(1–2):1–24. PMID: 12039028.
14. Sandberg E.M., Wallace T.A., Godeny M.D. et al. Jak2 tyrosine kinase: a true jak of all trades? *Cell Biochem Biophys* 2004;41(2):207–232. PMID: 15475610.
 15. Zhao R., Xing S., Li Z. et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem* 2005;280(24):22788–22792. DOI: 10.1074/jbc.C500138200. PMID: 15863514.
 16. Staerk J., Lacout C., Sato T. et al. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006;107(5):1864–1871. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2600. PMID: 16249382.
 17. Pikman Y., Lee B.H., Mercher T. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3(7):e270. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030270. PMID: 16834459.
 18. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108(10):3472–6. DOI: 10.1182/blood-2006-04-018879. PMID: 16868251.
 19. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–2390. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347. PMID: 24325356.
 20. Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369(25):2391–2405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542. PMID: 24325359.
 21. Rumi E., Pietra D., Ferretti V. et al. Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123(10):1544–1551. DOI: 10.1182/blood-2013-11-539098. PMID: 24366362.
 22. Cabagnols X., Defour J.P., Ugo V. et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015;29:249–252. DOI: 10.1038/leu.2014.270. PMID: 25212275.
 23. Chachoua I., Pecquet C., El-Khoury M. et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* 2016;127(10):1325–35. DOI: 10.1182/blood-2015-11-681932. PMID: 26668133.
 24. Araki M., Yang Y., Masubuchi N. et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016;127(10):1307–1316. DOI: 10.1182/blood-2015-09-671172. PMID: 26817954.
 25. Abdel-Wahab O., Manshouri T., Patel J. et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res* 2010;70(2):447–452. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3783. PMID: 20068184.
 26. Delhommeau F., Dupont S., Della Valle V. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009;360(22):2289–2301. DOI: 10.1056/NEJMoa0810069. PMID: 19474426.
 27. Zhang S.J., Rampal R., Manshouri T. et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood* 2012;119(19):4480–4485. DOI: 10.1182/blood-2011-11-390252. PMID: 22431577.
 28. Tefferi A., Lasho T.L., Finke C.M. et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472–1477. DOI: 10.1038/leu.2014.3. PMID: 24402162.
 29. Rampal R., Ahn J., Abdel-Wahab O. et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(50):E5401–E5410. DOI: 10.1073/pnas.1407792111. PMID: 25516983.
 30. Skoda R.C., Duek A., Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol* 2015;43(8):599–608. DOI: 10.1016/j.exphem.2015.06.007. PMID: 26209551.
 31. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127(20):2391–2405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544. PMID: 27069254.
 32. Rumi E., Pietra D., Pascutto C. et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062–9. DOI: 10.1182/blood-2014-05-578435. PMID: 24986690.
 33. Tefferi A., Wässie E.A., Lasho T.L. et al. Calreticulin mutations and long-term survival in essential thrombocythemia. *Leukemia* 2014;28(12):2300–3. DOI: 10.1038/leu.2014.148. PMID: 24791854.
 34. Andrikovics H., Krahling T., Balassa K. et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica* 2014;99(7):1184–1190. DOI: 10.3324/haematol.2014.107482. PMID: 24895336.
 35. Roques M., Park J.H., Minello A. et al. Detection of the CALR mutation in the diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol* 2015;169(4):601–603. DOI: 10.1111/bjh.13235. PMID: 25413838.
 36. Turon F., Cervantes F., Colomer D. et al. Role of calreticulin mutations in the aetiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *J Hepatol* 2015;62(1):72–74. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.08.032. PMID: 25173966.
 37. Sazawal S., Singh N., Mahapatra M. et al. Calreticulin mutation profile in Indian patients with primary myelofibrosis. *Hematology* 2015;20(10):567–570. DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000018. PMID: 25959795.
 38. Tefferi A., Lasho T.L., Finke C. et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014;28(7):1568–1570. DOI: 10.1038/leu.2014.83. PMID: 24569778.
 39. Tefferi A., Wässie E.A., Guglielmelli P. et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* 2014;89(8):E121–E124. DOI: 10.1002/ajh.23743. PMID: 24753125.
 40. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22(1):14–22. DOI: 10.1038/sj.leu.24049550. PMID: 17882280.
 41. Cervantes F., Dupriez B., Pereira A. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113(13):2895–901.
 42. Passamonti F., Cervantes F., Vannucchi A.M. et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010;115(9):1703–8.
 43. Al Assaf C., Van Obbergh F., Billiet J. et al. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica* 2015;100(7):893–897. DOI: 10.3324/haematol.2014.118299. PMID: 25934766.