

Анализ соматических мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и *ASXL1* и оценка их влияния на выживаемость пациентов с миелофиброзом

Т.Н. Субботина^{1,2}, И.Е. Маслокова^{1,2}, К.С. Семашенко¹, Г.А. Ходос¹, Д.В. Курочкин^{1,2}, А.А. Шалёва^{1,2}, М.А. Михалёв³, Е.В. Васильев³, М.Г. Осадчая⁴, Е.А. Дунаева⁵, А.С. Есьман⁵, К.О. Миронов⁵

¹ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; Россия, 660041 Красноярск, пр-кт Свободный, 79;

²ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства»; Россия, 660037 Красноярск, ул. Коломенская, 26;

³КГБУЗ «Краевая клиническая больница»; Россия, 660022 Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3а;

⁴КГБУЗ «Красноярская межрайонная поликлиника № 1»; Россия, 660003 Красноярск, ул. Академика Павлова, 4, стр. 7;

⁵ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Россия, 111123 Москва, ул. Новогиреевская, 3а

Контакты: Татьяна Николаевна Субботина stn.25@mail.ru

Введение. Развитие миелофиброза (МФ) обусловлено сложными молекулярно-генетическими событиями, которые включают драйверные соматические мутации, ответственные за конститутивную активацию JAK/STAT-сигнального пути (*JAK2*, *CALR* и *MPL*), дополнительные мутации, затрагивающие эпигенетические регуляторы (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2* и др.) и сплайсинг РНК (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1* и др.), а также генетические aberrации, способствующие генетической нестабильности и прогрессированию заболевания.

Цель исследования – проанализировать драйверные (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностические (*ASXL1*) соматические мутации у пациентов с МФ и оценить их влияние на выживаемость.

Материалы и методы. В исследование были включены 29 пациентов с МФ, отобранных врачами-гематологами Горьковской клинической больницы № 7 и Краевой клинической больницы (Красноярск).

Результаты. У 26 (89,6 %) из 29 обследованных пациентов выявлены какие-либо драйверные мутации в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*. Мутация p.V617F в гене *JAK2* была обнаружена у 20 (68,9 %) пациентов. Мутации в гене *CALR* выявлены у 4 (13,8 %) пациентов, в гене *MPL* – у 3 (10,3 %). У 1 из 26 пациентов присутствовали одновременно 2 драйверные мутации. Тринегативными оказались 3 (10,3 %) пациента. Соматические мутации в гене *ASXL1* выявлены методом Сэнгера у 12 (41,4 %) из 29 обследованных пациентов. Проведение таргетного секвенирования нового поколения (NGS) для 13 из 29 пациентов позволило обнаружить дополнительные генетические варианты, способствующие пониманию механизма развития и течения заболевания. При оценке общей выживаемости в группах обследуемых пациентов с диагнозом МФ, проведенной в зависимости от сочетания драйверных (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностических (*ASXL1*) мутаций, статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,12$), что, по-видимому, обусловлено небольшим размером выборки. В то же время оценка выживаемости пациентов в зависимости от *ASXL1*-статуса показала, что при наличии мутаций в гене *ASXL1* медиана выживаемости составила 45 (7–120) мес, тогда как при отсутствии мутаций – 48 (21–359) мес ($p = 0,03$).

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что присутствие мутации в гене *ASXL1* является неблагоприятным фактором течения заболевания.

Ключевые слова: *ASXL1*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, миелофиброз, общая выживаемость

Для цитирования: Субботина Т.Н., Маслокова И.Е., Семашенко К.С. и др. Анализ соматических мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и *ASXL1* и оценка их влияния на выживаемость пациентов с миелофиброзом. Онкогематология 2023;18(1):63–75. DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-1-63-75

Analysis of somatic mutations in the *JAK2*, *CALR*, *MPL* and *ASXL1* genes and evaluation of their impact on the survival of patients with myelofibrosis

T.N. Subbotina^{1,2}, I.E. Maslyukova^{1,2}, K.S. Semashchenko¹, G.A. Khodos¹, D.V. Kurochkin^{1,2}, A.A. Shalyova^{1,2}, M.A. Mikhalev³, E.V. Vasiliev³, M.G. Osadchaya⁴, E.A. Dunaeva⁵, A.S. Esmann⁵, K.O. Mironov⁵

¹Siberian Federal University; 79 Svobodnyy Prospekt, Krasnoyarsk 660041, Russia;

²Federal Siberian Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency; 26 Kolomenskaya St., Krasnoyarsk 660037, Russia;

³Regional Clinical Hospital; 3a Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk 660022, Russia;

⁴Krasnoyarsk Interdistrict Polyclinic No. 1; Build. 7, 4 Akademika Pavlova St., Krasnoyarsk 660003, Russia;

⁵Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; 3a Novogireevskaya St., Moscow 111123, Russia

Contacts: Tatiana Nikolaevna Subbotina stn.25@mail.ru

Background. The development of myelofibrosis (MF) is driven by complex molecular genetic events that include driver somatic mutations responsible for the constitutive activation of the JAK/STAT signaling pathway (*JAK2*, *CALR*, and *MPL*), additional mutations affecting epigenetic regulators (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*, etc.) and RNA splicing (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, etc.), as well as genetic aberrations that contribute to genomic instability and disease progression.

Aim. To analyze driver (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) and prognostic (*ASXL1*) somatic mutations in patients with MF and evaluate their impact on survival.

Materials and methods. The study included 29 patients diagnosed with MF, selected by hematologists from the City Clinical Hospital No. 7 and Regional Clinical Hospital (Krasnoyarsk).

Results. 26 (89.6 %) out of 29 examined patients had some driver mutations in *JAK2*, *CALR*, *MPL* genes. The p.V617F mutation in the *JAK2* gene was found in 20 (68.9 %) patients. Mutations in the *CALR* gene were detected in 4 (13.8 %) patients, mutations in the *MPL* gene were found in 3 patients (10.3 %). In 1 of 26 patients, 2 driver mutations were present simultaneously. 3 (10.3 %) patients were triple negative. Mutations in the *ASXL1* gene were detected in 12 (41.4 %) out of 29 examined patients. Conducted targeted NGS (next generation sequencing) for 13 out of 29 patients revealed additional genetic variants that contribute to the understanding of the development mechanism and disease course. When evaluating the overall survival in the groups of patients diagnosed with MF examined by us, depending on the combination of driver (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) and prognostic (*ASXL1*) mutations, no statistically significant differences were found ($p = 0.12$). This appears to be due to the small sample size. At the same time, assessment of patient survival depending on *ASXL1* status showed that in the presence of mutations in the *ASXL1* gene, the median survival was 45 months (range 7–120 months), while in the absence of mutations it was 48 months (range 21–359 months) ($p = 0.03$).

Conclusion. The results obtained allow us to assume that the presence of mutations in the *ASXL1* gene is an unfavorable factor in the course of the disease.

Keywords: *ASXL1*, *JAK2*, *CALR*, *MPL*, myelofibrosis, overall survival

For citation: Subbotina T.N., Maslyukova I.E., Semashchenko K.S. et al. Analysis of somatic mutations in the *JAK2*, *CALR*, *MPL* and *ASXL1* genes and evaluation of their impact on the survival of patients with myelofibrosis. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2023;18(1):63–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2023-18-1-63-75

Введение

Миелофиброз (МФ) относится к Ph-негативным миелопролиферативным новообразованиям (МПН), которые представляют собой приобретенные клональные заболевания стволовых кроветворных клеток, характеризующиеся аномальной пролиферацией и накоплением зрелых клеток крови [1]. МФ является более агрессивной злокачественной опухолью, чем другие Ph-негативные МПН (истинная полицитемия и эссенциальная тромбоцитемия), и часто снижает качество жизни пациентов из-за анемии, спленомегалии и конституциональных симптомов, таких как усталость, зуд и ночная потливость [2]. Центральную роль в патогенезе клональной пролиферации и генезе симптомов играет избыточная продукция провоспалительных и профиброгенных цитокинов, приводящая к ретикулиновому фиброзу костного мозга, остеосклерозу и ангиогенезу. В то же время развитие МФ обусловлено сложными молекулярно-генетическими событиями, которые включают драйверные соматические мутации, ответственные за конститутивную активацию JAK/STAT-сигнального пути (*JAK2*, *CALR* и *MPL*), дополнительные мутации, затрагивающие эпигенетические регуляторы (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1/2*

и др.) и сплайсинг РНК (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1* и др.), а также генетические aberrации, способствующие геномной нестабильности и прогрессированию заболевания [3].

На сегодняшний день доказано, что большим прогностическим значением при МФ обладает наличие соматических мутаций в гене *ASXL1*, которые связывают с риском преждевременной смерти или лейкемической трансформации [4–6]. Исследование мутаций в гене *ASXL1* как одного из маркеров плохого прогноза рекомендовано для пациентов с МФ, особенно для тринегативных пациентов, и включено в Международную мутационную прогностическую шкалу (MIPSS) [5].

Ген *ASXL1* находится на хромосоме 20q11 и кодирует ядерный белок, регулирующий эпигенетическое метечение и транскрипцию через взаимодействие с белками PcG и различными активаторами и супрессорами транскрипции. Мутации в *ASXL1* приводят к потере триметилирования гистона H3 лизина 27 (H3K27), опосредованного поликомб-репрессивным комплексом 2, и последующим нарушениям экспрессии гена *HOXA*, который играет роль в гемопоэтической трансформации. Кроме того, *ASXL1* может взаимодействовать с BAP1, образуя деубиквитиназу гистона H2AK119.

Убиквитинирование вместе с потерей триметилирования H3K27 активирует гены, участвующие в дифференцировке клеток миелоидного ряда [4, 7].

Подавляющее количество соматических мутаций в гене *ASXL1*, которые обнаружены при миелоидных злокачественных опухолях, сосредоточены в экзоне 12 гена, но иногда встречаются мутации и в других экзонах [7]. Известно несколько типов мутаций *ASXL1*, включая миссенс, нонсенс и мутации со сдвигом рамки считывания, которые приводят к потере PHD-пальца в структуре белка. Наиболее часто встречающейся мутацией, на которую приходится до 50 % всех мутаций в гене *ASXL1*, является дупликация гуанина с.1934_1935insG (p.G646Wfs*12; rs1085307856; COSV60102155), что приводит к сдвигу рамки считывания [8].

Цель исследования — проанализировать драйверные (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностические (*ASXL1*) соматические мутации у пациентов с МФ и оценить их влияние на выживаемость.

Материалы и методы

В исследование были включены 29 пациентов (11 (37,9 %) мужчин и 18 (62,1 %) женщин) с диагнозом МФ, отобранных врачами-гематологами Городской клинической больницы № 7 и Краевой клинической больницы (Красноярск). Медиана возраста пациентов на момент начала заболевания составляла 59 (24–81) лет. Для анализа мутаций использовали геномную ДНК, выделенную из лейкоцитов цельной крови с помощью наборов «ДНК-Сорб-В» (АмплиСенс, Россия).

Выявление и количественную оценку наиболее распространенной драйверной мутации p.V617F в экзоне 14 гена *JAK2* проводили методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [9] и пиросеквенирования [10].

Анализ и количественную оценку более редких драйверных мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, в экзоне 9 гена *CALR* и экзоне 10 гена *MPL* проводили также методом пиросеквенирования. В отличие от секвенирования по Сэнгеру, которое не позволяет определять уровень аллельной нагрузки (VAF) автоматически и требует для этого специализированного программного обеспечения Minor Variant Finder (Applied Biosystems, США), использование технологии пиросеквенирования с применением систем генетического анализа серии PyroMark (Qiagen, Германия) позволяет автоматически определять VAF с помощью базовых версий программного обеспечения. Также нужно отметить, что для предварительного скринингового выявления мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* и в экзоне 9 гена *CALR* проводили гетеродуплексный анализ с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле [11, 12].

Мутации в гене *ASXL1* выявляли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Для этого участки экзона 12 гена *ASXL1* (NM_015338) амплифицировали, используя 2 пары праймеров: ASXL1_F (5'-ACAGTCCCTAG-

GTCAGATCACC-3') и ASXL1_R (5'-TCCCCTAGAG-ACGGAATGG-3'); ASXL2_F (5'-CGGATGTTAGAACTGAATGTGAGT-3') и ASXL2_R (5'-CATGTCACCA-TTCACCTTGG-3') на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Для анализа продуктов амплификации проводили электрофорез с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете с использованием системы геледокументирования Gel Doc (Bio-Rad, США). Продукт ПЦР очищали с помощью реагента ExoSAP-IT (Applied Biosystems, США). Секвенирующую ПЦР с прямого и обратного праймеров и очистку полученного продукта проводили с помощью BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и BigDye X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) соответственно. Секвенирование проводили с помощью генетического анализатора AB 3500 (Applied Biosystems, США).

Тринадцать из 29 исследуемых образцов ДНК, в которых секвенированием по Сэнгеру были обнаружены мутации в гене *ASXL1*, также были секвенированы методом NGS (секвенирование нового поколения) (Illumina, США) с помощью генетической панели SOPHiA Myeloid Solution (SOPHiA GENETICS, Швейцария), позволяющей проводить анализ различных экзонов в 30 генах, ассоциированных, по данным литературы, в том числе с МПН. При этом используемые в панели праймеры позволяют анализировать не только те участки, в которых расположены наиболее распространенные, ассоциированные с МПН варианты соматических мутаций, но и те участки, в которых встречаются редкие варианты. Так, для анализа мутаций в гене *JAK2* в панель включены праймеры, ограничивающие экзоны 3–25, для анализа мутаций в гене *CALR* — экзон 9, для анализа мутаций в гене *MPL* — экзон 10, для анализа мутаций в гене *ASXL1* — экзоны 9, 11, 12.

Для достижения статистически значимого различия между генетическими вариантами и шумом, а также для обеспечения надежной работы алгоритма выявления вариантов при использовании панели SOPHiA Myeloid Solution разработчики рекомендуют включение в отчет вариантов, величина покрытия для которых составляет не менее 1000х, а варианты, детектированные с величиной VAF <2,5 %, интерпретировать с осторожностью и при необходимости подтверждать их наличие другими методами. Варианты с VAF <5 % могут не быть детектированы. В соответствии с этим в данной работе отражены только те варианты, которые имели величину покрытия не менее 1000х. Патогенность вариантов приведена согласно данным платформы SOPHiA DDM.

Результаты

В таблице представлены результаты анализа драйверных и прогностических мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* и *ASXL1* для всех 29 пациентов с диагнозом МФ, а также результаты анализа уровня VAF, определенной методами пиросеквенирования и NGS.

У 26 (89,6 %) из 29 обследованных пациентов были выявлены какие-либо драйверные мутации в генах

Характеристика обследуемых пациентов с диагнозом миелофиброза
 Characteristics of patients with myelofibrosis

№ па- циента Patient number	Пол Gender	Возраст на момент начала миелофи- броза, лет Age at onset of myelofibrosis, years	Длительность миелофиброза, мес/исход Myelofibrosis duration, months/disease outcome	Драйверные мутации (ген, мутация) Driver mutations (gene, mutation)	VAF, %	Мутации в гене <i>ASXL1</i> Mutations in the <i>ASXL1</i> gene	VAF, %
1	Мужской Male	73	96/умер 96/died	<i>CALR</i> c.1099_1150del p.L367Tfs*46 rs1555760738 COSV57116546	46,0	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	28,8
2	Мужской Male	75	45/умер 45/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	47,4	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	39,9
3	Женский Female	66	9/умерла 9/died	—	—	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	28,1
4	Женский Female	62	158/умерла 158/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	31,6	—	—
5	Женский Female	81	11/умерла 11/died	—	—	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	28,1
6	Женский Female	64	27/умерла 27/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	31,3	c.2113G>T p.E705* rs — COSV60103524	37,3
7	Мужской Male	54	73/умер 73/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	49,4	c.1900_1922del p.E635Rfs*15 rs766433101 COSV60102280	38,3
8	Мужской Male	71	120/умер 120/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	14,6	c.2077C>T p.R693* rs373221034 COSV60102332	36,9
				<i>MPL</i> c.1544G>T p.W515L rs121913615 COSV65243776	22,2		
9	Женский Female	42	76/жива 76/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	71,0	—	—
10	Женский Female	64	112/жива 112/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	40,0	—	—

Продолжение таблицы

Continuation of table

№ па- циента Patient number	Пол Gender	Возраст на момент начала миелофи- броза, лет Age at onset of myelofibrosis, years	Длительность миелофиброза, мес/исход Myelofibrosis duration, months/disease outcome	Драйверные мутации (ген, мутация) Driver mutations (gene, mutation)	VAF, %	Мутации в гене <i>ASXL1</i> Mutations in the <i>ASXL1</i> gene	VAF, %
11	Женский Female	65	95/умерла 95/died	<i>CALR</i> c.1099_1150del p.L367Tfs*46 rs1555760738 COSV57116546	41,1	New Mutation c.3065delC p.A1022Efs*2	38,9
12	Женский Female	24	359/умерла 359/died	<i>CALR</i> c.1154_1155insTTGTC p.K385Nfs*47 rs765476509 COSV57116551	46,0	—	—
13	Мужской Male	54	120/умер 120/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	77,5	—	—
14	Мужской Male	76	21/умер 21/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	35,0	—	—
15	Женский Female	68	70/умерла 70/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	89,4	—	—
16	Женский Female	47	112/жива 112/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	58,0	—	—
17	Женский Female	37	48/умерла 48/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	19,8	—	—
18	Женский Female	68	24/умерла 24/died	<i>MPL</i> c.1543_1544delinsAA p.W515K rs121913616 COSV65243979	13,0	—	—
19	Женский Female	51	70/жива 70/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	50,5	—	—
20	Мужской Male	39	26/умер 26/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	36,7	—	—

Окончание таблицы
End of table

№ па- циента Patient number	Пол Gender	Возраст на момент начала миелофи- броза, лет Age at onset of myelofibrosis, years	Длительность миелофиброза, мес/исход Myelofibrosis duration, months/disease outcome	Драйверные мутации (ген, мутация) Driver mutations (gene, mutation)	VAF, %	Мутации в гене <i>ASXL1</i> Mutations in the <i>ASXL1</i> gene	VAF, %
21	Женский Female	41	76/жива 76/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	86,5	—	—
22	Женский Female	63	46/умерла 46/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	56,0	—	—
23	Женский Female	69	54/жива 54/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	86,0	—	—
24	Мужской Male	52	7/умер 7/died	—	—	c.2996C>T p.T999M rs778222400 COSV105193687	50,0
25	Мужской Male	31	64/жив 64/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	25,0	—	—
26	Мужской Male	63	66/умер 66/died	<i>MPL</i> c.1544G>T p.W515L rs121913615 COSV65243776	64,3	New Mutation c.2445_2449delGTCTC p.L817Gfs*3	24,0
27	Женский Female	44	228/жива 228/alive	New Mutations <i>CALR</i> 1) c.1128_1129ins CTTTGCTT p.K377Lfs*? 2) c.1131_1133delAGA p.E381del	1) 39,0 2) 34,0	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	45,4
28	Женский Female	43	159/жива 159/alive	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	70,1	New Mutation c.1772_1773insAA p.Y591fs*1	34,4
29	Мужской Male	56	36/умер 36/died	<i>JAK2</i> c.1849G>T p.V617F rs77375493 COSV67569051	38,4	c.1934_1935insG p.G646Wfs*12 rs1085307856 COSV60102155	43,9

Примечание. VAF — уровень аллельной нагрузки.
Note. VAF — variant allele frequency.

JAK2, *CALR*, *MPL*. При этом самой частой была мутация p.V617F в гене *JAK2*, которая обнаружена у 20 (68,9 %) пациентов. Мутации в гене *CALR* выявлены у 4 (13,8 %) пациентов, в гене *MPL* — у 3 (10,3 %). У 1 из 26 пациентов присутствовали одновременно 2 драйверные мутации. Тринегативными оказались 3 (10,3 %) пациента, у них не выявлены драйверные мутации. Стоит отметить, что у пациентки № 27 обнаружены 2 сочетанные мутации в гене *CALR*, располагающиеся в области с частыми онкогенными мутациями, но не описанные в литературе и не представленные в базе COSMIC. Информация об этой пациентке и выявленных мутациях была нами представлена в предыдущей публикации [12].

Таргетное секвенирование с помощью генетической панели SOPHiA Myeloid Solution позволило выявить у 2 (№ 2 и 26) из 13 проанализированных NGS пациентов дополнительный терминальный вариант с.3188G>A (p.R1063H; rs41316003) в гене *JAK2*, который, по данным платформы SOPHiA, относится к вероятно патогенным. Также при проведении NGS у некоторых пациентов выявлялись дополнительные мутации в генах *CALR* и *MPL*, но поскольку величина покрытия составляла менее 1000х, то информация о таких вариантах здесь не приведена.

Соматические мутации в гене *ASXL1* методом секвенирования по Сэнгеру были выявлены у 12 (41,4 %) из 29 обследованных пациентов. При этом 6 (50 %) пациентов имели самую распространенную мутацию с.1934_1935insG (p.G646Wfs*12; rs1085307856; COSV60102155), что соответствует данным литературы. Остальные 6 пациентов имели другие варианты мутаций, 3 из которых (у пациентов № 11, 26, 28) не описаны в литературе и не представлены в базе COSMIC. Все выявленные варианты соматических мутаций приводят к преждевременной терминации синтеза белка (5 из них — мутации со сдвигом рамки считывания и 2 — нонсенс-мутации) и, таким образом, являются патогенными. Уровень VAF мутаций находился в диапазоне 24,0–43,9 %. У пациента № 24 выявлен гетерозиготный вариант с.2996C>T (p.T999M; rs778222400; COSV105193687), который присутствует в базе COSMIC, но в литературе имеется лишь единичное упоминание о том, что он был обнаружен при массивном анализе SNPs в образце карциномы от пациента с ампулярным раком (распространенность, по данным ALFA, 0,005 %) [13]. Данных о влиянии этого варианта на исход МФ нами не найдено.

Таргетное NGS с помощью генетической панели SOPHiA Myeloid Solution позволило выявить у 11 из 13 проанализированных NGS пациентов (с ранее выявленными методом Сэнгера мутациями в гене *ASXL1*) дополнительные сочетанные мутации в данном гене. При этом в экзоне 12 обнаружен 41 вариант (из них 8 патогенные с VAF 1,0–21,8 %), в экзоне 11 — 5 вариантов (из них 2 патогенные с VAF 1,7–2,3 %), в экзоне 9 — 1 возможно патогенный вариант и 1 вариант неопре-

деленного значения. VAF для 38 из 41 дополнительного *ASXL1* варианта, выявленного методом NGS, не превышала 2,5 % (информация не приведена). Три из 41 варианта имели VAF выше 2,5 % и, по данным платформы SOPHiA, относятся к патогенным вариантам, приводя к ранней терминации синтеза соответствующего белка. Так, у пациента № 1 помимо основной наиболее распространенной прогностической мутации с.1934_1935insG (p.G646Wfs*12; rs1085307856; COSV60102155; VAF 28,8 %) была найдена патогенная мутация с.2077C>T (p.R693*; rs373221034; COSV60102332; VAF 6,6 %), а у пациента № 26 кроме выявленной методом Сэнгера мутации с.2445_2449delGTCTC (p.L817Gfs*3; VAF 24,0 %) обнаружены 2 патогенные мутации (с.2632delA; p.S878Vfs*8; VAF 8,4 % и с.4238T>A; p.L1413*; VAF 21,8 %). Все 3 обнаруженные у пациента № 26 мутации не описаны ранее в литературе и отсутствуют в базе данных COSMIC. Можно предположить, что каждый из выявленных вариантов мутантных аллелей, приводящих к ранней терминации, вносит свой вклад в суммарный патогенный эффект, который будет зависеть как от количества патогенных вариантов, так и от VAF. В литературе также описаны случаи присутствия более одной мутации в гене *ASXL1* у пациентов с МФ. При этом отмечается постепенное накопление различных вариантов мутаций в гене *ASXL1* при переходе из истинной полицитемии или эссенциальной тромбоцитемии в МФ и далее в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [14].

Оценку выживаемости в группах обследуемых нами пациентов с диагнозом МФ проводили в зависимости как от сочетания драйверных (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностических (*ASXL1*) мутаций, так и от наличия только мутаций *ASXL1*. Результаты оценки выживаемости в зависимости от сочетания драйверных и прогностических (*ASXL1*) мутаций приведены на рис. 1.

Пациенты обеих групп несли хотя бы одну драйверную мутацию и различались по *ASXL1*-статусу. Продолжительность жизни пациентов в группе с наличием какой-либо драйверной мутации в сочетании с мутацией *ASXL1* от момента постановки диагноза до настоящего времени или до момента летального исхода составила 27–228 мес (медиана 84 мес). Продолжительность жизни пациентов в группе с наличием какой-либо драйверной мутации и отсутствием мутации *ASXL1* от момента постановки диагноза до настоящего времени или до момента летального исхода составила 21–359 мес (медиана 70 мес). При этом на данный момент статистически значимых различий в исследуемой выборке не выявлено.

Результаты оценки выживаемости в группах обследуемых пациентов с диагнозом МФ в зависимости от наличия мутаций в гене *ASXL1* приведены на рис. 2.

При этом учитывали число живых и умерших пациентов групп *ASXL1*(–) и *ASXL1*(+), а также продолжительность их жизни в месяцах от момента постановки диагноза до настоящего времени или до момента

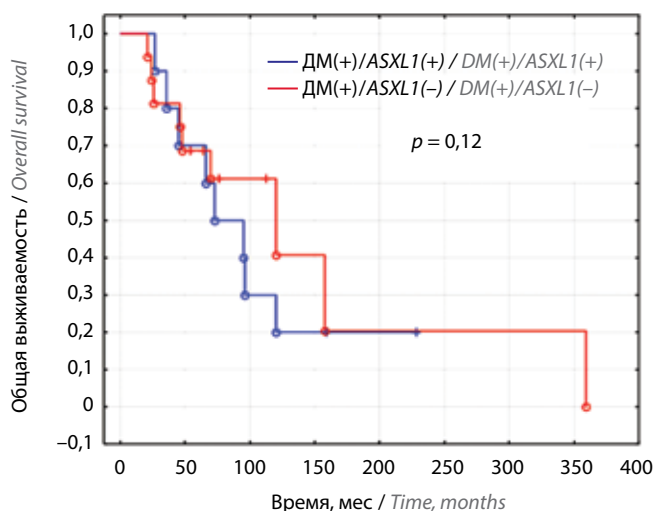


Рис. 1. Анализ общей выживаемости пациентов с миелофиброзом по методу Каплана—Майера в зависимости от наличия драйверных и прогностических мутаций (Cox's F-Test, $p = 0,12$). ДМ — любая драйверная мутация

Fig. 1. Overall survival of patients with myelofibrosis according to the Kaplan—Meier method, depending on the presence of driver and prognostic mutations (Cox's F-Test, $p = 0.12$). DM — any of the driver mutations

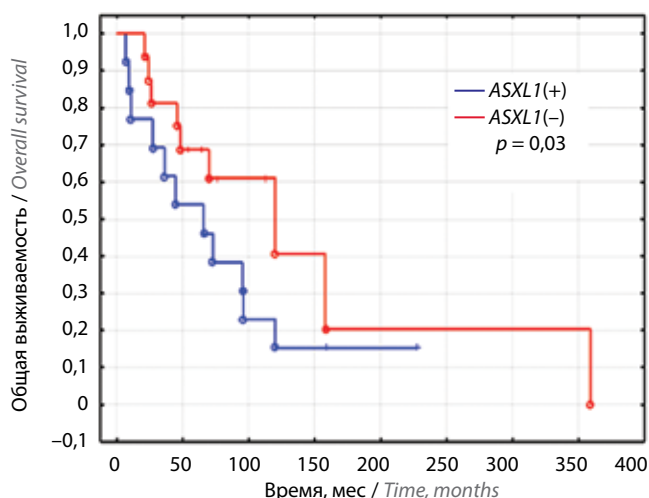


Рис. 2. Анализ общей выживаемости пациентов с миелофиброзом по методу Каплана—Майера в зависимости от ASXL1-статуса (Cox's F-Test, $p = 0,03$)

Fig. 2. Overall survival of patients with myelofibrosis according to the Kaplan—Meier method, depending on ASXL1 status (Cox's F-Test, $p = 0.03$)

летального исхода. В группу *ASXL1*(–) вошли 16 пациентов, из них на сегодняшний день живы 7 (43,8 %) человек, продолжительность жизни от момента постановки диагноза до настоящего времени составила 54–112 мес (медиана 76 мес). В данной группе 9 (56,2 %) пациентов умерли, продолжительность жизни с момента постановки диагноза до момента смерти составила 21–359 мес (медиана 48 мес). В группу *ASXL1*(+) вошли 13 пациентов, из них на сегодняшний день живы 2 (15,4 %) человека, продолжительность жизни от момента постановки диагноза до настоящего времени составила 159 и 228 мес (медиана 193,5 мес).

В данной группе 11 (84,6 %) пациентов умерли, продолжительность жизни с момента постановки диагноза до момента смерти составила 7–120 мес (медиана 45 мес).

Обсуждение

Центральным патогенным механизмом МФ является конститутивная активация пути JAK/STAT, приводящая к изменениям экспрессии генов, которые вызывают патологическую миелопролиферацию и дальнейшее функциональное нарушение костного мозга. Большинство пациентов (90 %) с МФ имеют 1 из 3 классических активирующих мутаций: *JAK2*, *CALR* или *MPL*. Их частота при МФ составляет 50–60 % для *JAK2V617F*, 20–25 % для *CALR* и 6–7 % для *MPL*. Приблизительно у 10–15 % пациентов с МФ не экспрессируется ни одна из 3 драйверных мутаций [14]. Встречаемость драйверных мутаций в исследуемой нами группе пациентов с МФ согласуется с данными литературы.

Мутация *JAK2V617F* представляет собой соматическую мутацию, приводящую к замене валина на фенилаланин в кодоне 617, что вызывает конститутивную активацию нижележащих сигнальных систем в JAK/STAT-пути и неконтролируемый рост клеток. В проведенном нами исследовании мутация *JAK2V617F* обнаружена у 20 (68,9 %) из 29 пациентов. Помимо наиболее распространенной мутации в гене *JAK2* у 2 из 13 проанализированных NGS пациентов был выявлен герминальный вариант с.3188G>A (p.R1063H; rs41316003), который связывают со случаями наследственных эритроцитозов. Мутация расположена за пределами основного регуляторного домена, а именно во 2-м протеин-киназном домене белка JAK2, поэтому замена может изменить чувствительность клеток к эритропоэтину и, следовательно, способствовать пролиферации. Кроме этого, замену p.R1063H связывают с усилением JAK2-активности, хотя и намного слабее, чем *JAK2V617F* [15]. Как упоминалось выше, в нашем исследовании мутация с.3188G>A была обнаружена у 2 пациентов. Значения показателей красного кровяного роста у данных пациентов, как и у других пациентов с МФ, на момент постановки диагноза были снижены. Оба пациента к настоящему моменту погибли и, таким образом, не представляется возможным оценить вклад выявленной, ассоциированной с наследственным эритроцитозом мутации на показатели крови в период жизни пациентов до начала развития МФ.

Соматическая мутация p.W515L/K в гене *MPL*, кодирующем рецептор тромбопоэтина, приводит к гиперчувствительности рецептора к тромбопоэтину с последующей конститутивной активацией JAK/STAT-пути, обеспечивая цитокин-независимый рост миелоидных клеток [16]. В нашем исследовании мутация в гене *MPL* была выявлена у 3 (10,3 %) пациентов, диапазон VAF составил от 13,0 до 64,3 %. При этом вариант p.W515L

выявлен у 2 пациентов, а вариант p.W515K — у 1. Интересно отметить, что у пациента № 8 мутация в гене *MPL* обнаружена в сочетании с наиболее частой драйверной мутацией p.V617F в гене *JAK2* и при этом уровень VAF обеими мутациями был выше 10 % (22,2 и 14,6 % соответственно).

Мутации гена *CALR*, кодирующего шаперон эндоплазматического ретикулума, приводят к сдвигу рамки считывания, в результате чего образуется новая С-концевая последовательность, не содержащая кальций-связывающих сайтов и KDEL-последовательности. Это наделяет мутантный *CALR* свойством усиления функции, что в конечном итоге приводит к активации рецептора тромбопоэтина, фосфорилированию *JAK2* и конститутивной активации *JAK/STAT*. К настоящему времени в гене *CALR* выявлено более 50 различных вариантов мутаций, среди которых наиболее распространенными являются делеция 52 пар оснований (тип 1: c.1099_1150del; p.L367Tfs*46; rs1555760738; COSV57116546) и вставка 5 пар оснований (тип 2: c.1154_1155insTTGTC; p.K385Nfs*47; rs765476509; COSV57116551). Встречаемость этих 2 мутаций составляет 88 % всех мутаций в гене *CALR*. Оставшиеся 12 % включают другие варианты делеций/вставок или их комбинаций, которые либо уникальны, либо обнаружены у небольшого числа пациентов [16].

В нашем исследовании мутации в гене *CALR* были выявлены у 4 (13,8 %) из 29 обследованных пациентов, диапазон VAF составил от 34,0 до 46,0 %. При этом 3 из 4 пациентов имели наиболее распространенные варианты мутаций, а у 1 пациентки были обнаружены 2 новые сочетанные мутации (c.1128_1129insCTTTGCTT (p.K377Lfs*56) и c.1131_1133delAGA (p.E378del)), располагающиеся в области с частыми онкогенными мутациями. В результате выявленных у пациентки мутаций происходит сдвиг рамки считывания так же, как и при других описанных в литературе мутациях *CALR*, поэтому можно предполагать, что новые мутации *CALR* имеют такое же значение для онкогенности, как и другие известные мутации в данном гене [12].

Биологические процессы, вызывающие МФ и способствующие его развитию, не ограничиваются только аномалиями передачи сигналов *JAK/STAT*, но также зависят от измененной экспрессии генов посредством метилирования ДНК, модификаций гистонов и др. Мутации в эпигенетических регуляторах распространены при МФ, при этом целевое секвенирование выявило мутации у 81 % пациентов [17]. В нашем исследовании у 12 (41,4 %) из 29 обследованных пациентов были обнаружены соматические мутации в гене *ASXL1*, диапазон VAF составил от 24,0 до 45,4 %. У 9 из 12 пациентов выявленные мутации описаны в литературе и представлены в базе COSMIC. Данные мутации приводят к преждевременной термации синтеза белка, из-за чего экспрессируется укороченный белок, опосредованно приводящий к нарушению миелоидной дифференцировки, способствуя развитию МПН.

У 3 из 12 пациентов выявлены новые мутации в гене *ASXL1* (рис. 3).

Поскольку все 3 новых варианта мутаций *ASXL1* локализованы в той же области, что и изученные ранее мутации, ведут к сдвигу рамки считывания, образованию раннего стоп-кодона и выявлены у пациентов с подтвержденным диагнозом МФ, то можно предполагать, что они также, как и другие отраженные в базе COSMIC неблагоприятные варианты *ASXL1*, являются патогенными.

Для определения тактики лечения пациентов с МФ важна оценка прогноза. Для этого существуют специальные прогностические шкалы риска на основе баллов, которые постоянно дополняются. Лишь в MIPSS был включен анализ как драйверных, так и прогностических маркеров. Так, к неблагоприятным прогностическим маркерам относят наличие мутаций в генах *JAK2*, *MPL*, *ASXL1*, а также тринегативные случаи МФ, причем последнее вносит больший вклад в расчет риска, чем наличие мутаций [5]. Несмотря на то что общая выживаемость у *ASXL1*(+)-пациентов существенно ниже, чем у *ASXL1*(-), продолжительность жизни пациентов с наличием какой-либо драйверной мутации всегда больше, чем продолжительность жизни тринегативных пациентов вне зависимости от *ASXL1*-статуса [18]. Как упоминалось выше, в нашем исследовании 3 пациента оказались тринегативными (№ 3, 5 и 24) и *ASXL1*(+). У пациентов № 3 и 5 при таргетном NGS не выявлено дополнительных мутаций в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL*, а для пациента № 24 таргетное NGS не проводилось. Продолжительность жизни всех 3 пациентов (медиана 9 мес) оказалась меньше медианы общей выживаемости *ASXL1*(+)-пациентов (медиана 45 мес). Также можно отметить, что мутации *ASXL1* в сочетании с драйверными мутациями выявлены у 6 из 20 *JAK2V617F*(+)-пациентов, у 2 из 3 *MPL*(+)-пациентов и у 3 из 4 *CALR*(+)-пациентов. По данным литературы, наличие мутации в гене *CALR* для пациентов с МФ имеет благоприятный прогноз и выживаемость таких пациентов не зависит от статуса мутации *ASXL1* [18].

При оценке общей выживаемости в группах обследуемых пациентов с диагнозом МФ, проведенной в зависимости от сочетания драйверных (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностических (*ASXL1*) мутаций, статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,12$) (см. рис. 1). В то же время оценка выживаемости пациентов в зависимости от *ASXL1*-статуса показала, что при наличии мутаций в гене *ASXL1* медиана выживаемости составила 45 (7–120) мес, тогда как при отсутствии мутаций — 48 (21–359) мес ($p = 0,03$) (см. рис. 2). Это позволяет предполагать, что присутствие мутации в гене *ASXL1* является неблагоприятным фактором течения заболевания.

По данным литературы, 17 % пациентов с МФ умирают из-за прогрессирования в ОМЛ. Медиана общей выживаемости таких пациентов в бластной

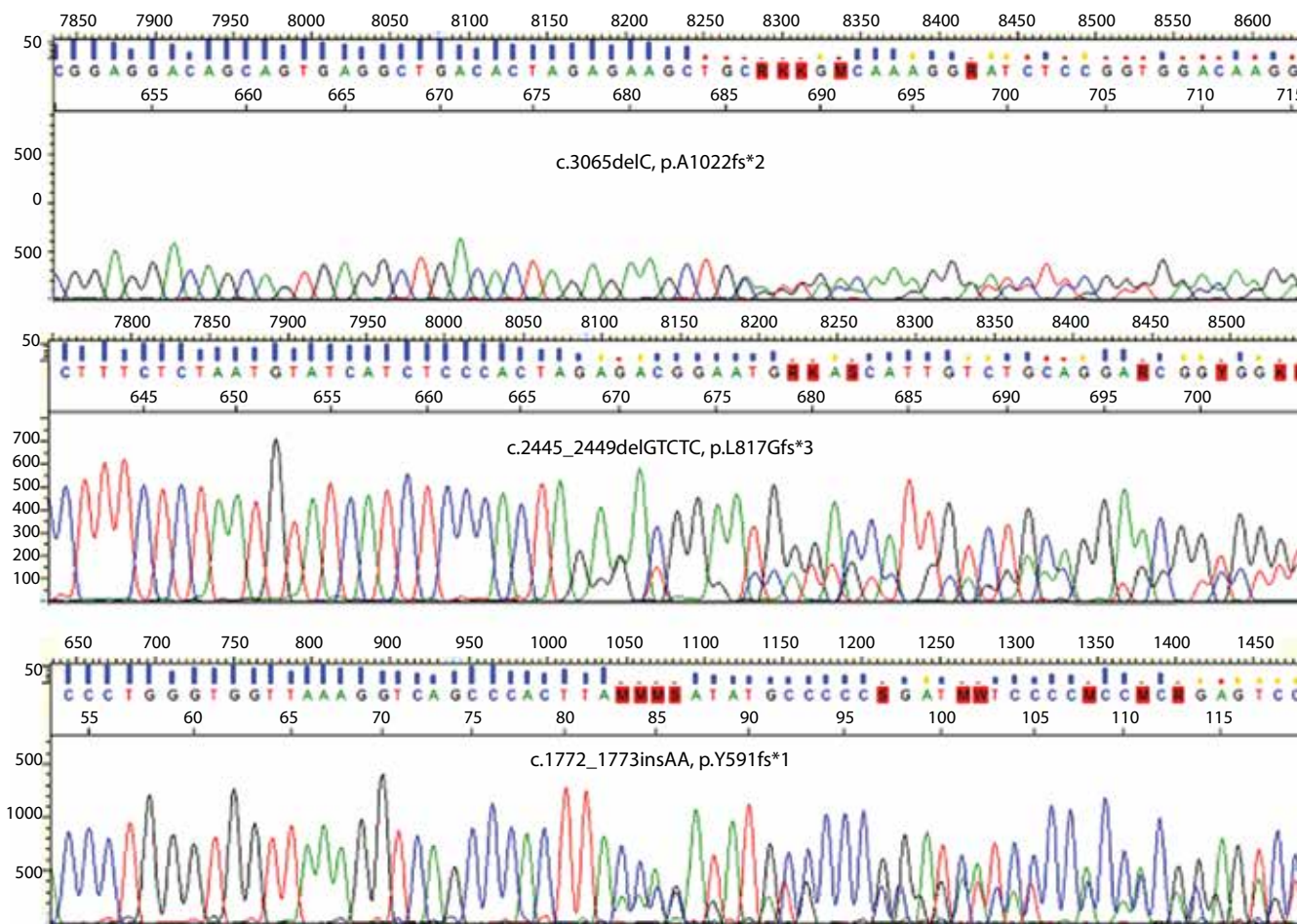


Рис. 3. Результаты секвенирования ДНК от пациентов № 11, 26 и 28 с новыми мутациями в экзоне 12 гена *ASXL1*: c.3065delC, p.A1022fs*2; c.2445_2449delGTCTC, p.L817Gfs*3 и c.1772_1773insAA, p.Y591fs*1 соответственно

Fig. 3. DNA sequencing results from patients No. 11, 26 and 28 with new mutations in exon 12 of the *ASXL1* gene: c.3065delC, p.A1022fs*2; c.2445_2449delGTCTC, p.L817Gfs*3 and c.1772_1773insAA, p.Y591fs*1, respectively

фазе составляет 3,6 (0–122) мес [19]. В фазе бластного криза генетические изменения встречаются в 3 раза чаще, чем при хронической фазе. В исследовании R.M. Scherber, R.A. Mesa выявлен ряд генов, мутации в которых ассоциированы как с ОМЛ, так и с МФ, особенно при прогрессировании заболевания или в фазу бластного криза. В эту группу вошли следующие гены: *ASXL1*, *CBL*, *DNMT3A*, *IDH1/IDH2*, *NRAS*, *KIT*, *RUNX1*, *TET2*, *TP53*, *U2AF1*, *ZRSR2* [20]. Наличие соматических мутаций в данных генах у пациентов с МФ может предполагать потенциальную возможность трансформации в ОМЛ, а рост VAF в динамике заболевания будет демонстрировать клональную эволюцию.

В представленной нами выборке пациентов с МФ по результатам наблюдения на сегодняшний день у 4 из 29 пациентов произошел переход из МФ в ОМЛ, а у 1 пациента – в хронический миеломоноцитарный лейкоз. Медиана выживаемости в данной группе составила 18 (8–30) мес. Для 4 из указанных 5 пациентов (3 пациента (№ 1, 4 и 8) с переходом из МФ в ОМЛ и 1 пациент (№ 29) с переходом из МФ в хронический миеломоноцитарный лейкоз) было проведено тар-

гетное NGS с помощью генетической панели SOPHiA Myeloid Solution. Как было указано выше, панель включает анализ различных экзонов в 30 генах, но здесь в соответствии с рекомендациями R.M. Scherber, R.A. Mesa [20] приводятся данные анализа 12 генов, мутации в которых могут быть ассоциированы с переходом из МФ в ОМЛ. Нужно отметить, что у 3 (№ 1, 8 и 29) из 4 проанализированных NGS пациентов ранее методом Сэнгера были выявлены «основные» мутации в гене *ASXL1* с уровнем нагрузки 28,8; 36,9 и 43,9 % соответственно.

Далее приводится информация о дополнительных мутациях, выявленных методом NGS. Так, у 2 из 4 проанализированных NGS пациентов были обнаружены дополнительные мутации в *ASXL1*, у 2 из 4 – в *TET2*, у 1 из 4 – в *KIT*, у 1 из 4 – в *DNMT3A*, у 1 из 4 – в *CBL*, которые, по данным платформы SOPHiA, относятся к патогенным и вероятно патогенным вариантам. В частности, у пациента № 1 в образце после развития бластного криза в гене *ASXL1* дополнительно обнаружены мутация c.2077C>T (p.R693*; rs373221034; COSV60102332; VAF 6,6 %) и мутация c.4030T>C (p.S1344P; VAF 2,5 %),

которая не описана ранее в литературе и отсутствует в базе данных COSMIC. Также мутация с.2077C>T была найдена и у пациента № 8 в образце после развития бластного криза с VAF 35,9 %. С учетом того что данную мутацию напрямую связывают с лейкомогенезом [21], можно предполагать ее участие в процессе перехода из МФ в ОМЛ у этих 2 пациентов. Также у пациента № 8 в том же образце в гене *ASXL1* обнаружена мутация с.1782C>A (p.C594*; rs755974145; COSV60106156; VAF 2 %), которую, по данным литературы, находили в доминантном лейкоэмическом клоне у пациентов с ОМЛ с нормальным кариотипом [22]. В гене *TET2* у пациентки № 4 в образце после развития бластного криза была найдена мутация с.3951delA (p.E1318Rfs*45; COSV54413882; VAF 4,1 %), которую выявляли при полноэкзонном секвенировании у пациентов с хроническим миеломоноцитарным лейкозом [23], а также у пациента № 29 в обеих пробах до и после развития бластного криза выявлена мутация с.2599T>C (p.Y867H; rs144386291; COSV54409754; VAF 46,1 и 50,7 % соответственно). В гене *KIT* у пациента № 4 в образце после развития бластного криза была найдена мутация с.199A>G (p.W67A; VAF 3 %), которая не описана ранее в литературе и отсутствует в базе данных COSMIC. В гене *DNMT3A* у пациента № 4 в образце после развития бластного криза была найдена мутация с.2204A>G (p.Y735C; rs147828672; COSV53036596; VAF 3,3 %), которая упомянута во многих публикациях как одна из ряда «опасных» мутаций в гене при ОМЛ [24]. В гене *CBL* у пациента № 29 в образце после развития бластного криза была найдена мутация с.1139T>C (p.L380P; COSV50630049; VAF 84,6 %). Важно отме-

тить, что в образце ДНК данного пациента до развития бластного криза эта мутация отсутствовала. Также на фоне появления этой мутации уровень VAF *JAK2*V617F у данного пациента снизился с 38,4 до 3,6 %, что напрямую указывает на клональную эволюцию в бластной фазе заболевания. Подобный случай был описан у пациента с прогрессирующим МФ, у которого за 3 года мутация в гене *CBL* полностью вытеснила p.V617F [25].

Заключение

В ходе проведенной работы по анализу соматических мутаций у пациентов с МФ драйверные мутации в генах *JAK2*, *CALR*, *MPL* были найдены у 26 из 29 пациентов, а прогностические мутации в гене *ASXL1* — у 12 из 29 пациентов. Проведенное таргетное NGS для 13 из 29 пациентов позволило выявить дополнительные генетические варианты, способствующие пониманию механизма развития и течения заболевания. При оценке общей выживаемости в группах обследуемых пациентов с диагнозом МФ, проведенной в зависимости от сочетания драйверных (*JAK2*, *CALR*, *MPL*) и прогностических (*ASXL1*) мутаций, статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,12$). Это, по-видимому, обусловлено небольшим размером выборки. В то же время оценка выживаемости пациентов в зависимости от *ASXL1*-статуса показала, что при наличии мутаций в гене *ASXL1* медиана выживаемости составила 45 (7–120) мес, тогда как при отсутствии мутаций — 48 (21–359) мес ($p = 0,03$). Таким образом, можно предполагать, что присутствие мутации в гене *ASXL1* является неблагоприятным фактором течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Luque Paz D., Riou J., Verger E. et al. Genomic analysis of primary and secondary myelofibrosis redefines the prognostic impact of *ASXL1* mutations: a FIM study. *Blood Adv* 2021;5(5):1442–51. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020003444
2. Morishita S., Ochiai T., Misawa K. et al. Clinical impacts of the mutational spectrum in Japanese patients with primary myelofibrosis. *Int J Hematol* 2021;113(4):500–7. DOI: 10.1007/s12185-020-03054-x
3. Morsia E., Gangat N. Myelofibrosis: challenges for preclinical models and emerging therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2021;25(3):211–22. DOI: 10.1080/14728222.2021.1915992
4. Barbui T., Thiele J., Gisslinger H. et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* 2018;8(2):15. DOI: 10.1038/s41408-018-0054-y
5. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2020 г.). Клиническая онкогематология 2021;14(2):262–98. DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-2-262-298
6. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N. et al. National Clinical Guidelines on diagnosis and treatment of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis) (edn. 2020). *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2021;14(2):262–98. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2021-14-2-262-298
7. Vannucchi A.M., Lasho T.L., Guglielmelli P. et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861–9. DOI: 10.1038/leu.2013.119
8. Abdel-Wahab O., Adli M., LaFave L.M. et al. *ASXL1* mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. *Cancer Cell* 2012;22(2):180–93. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.06.032
9. Alvarez Argote J., Dasanu C.A. *ASXL1* mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival. *Curr Med Res Opin* 2018;34(5):757–63. DOI: 10.1080/03007995.2016.1276896
10. Larsen T.S., Christensen J.H., Hasselbalch H.C. et al. The *JAK2* V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2007;136(5):745–51. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06497.x

10. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Дрибноходова О.П. и др. Количественное определение мутации V617F в гене *JAK2* методом пиросеквенирования. Клиническая лабораторная диагностика 2014;59(11):60–3.
Dunaeva E.A., Mironov K.O., Dribnokhodova O.P. et al. The quantitative testing of V617F mutation in gene *JAK2* using pyrosequencing technique. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics 2014;59(11):60–3. (In Russ.).
11. Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена *JAK2*. Лабораторная служба 2017;6(1):29–33. DOI: 10.17116/labs20176129-33
Subbotina T.N., Kharsekina A.E., Dunaeva E.A. et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with *JAK2* exon 12 mutations. Laboratornaya sluzhba = Laboratory Service 2017;6(1):29–33. (In Russ.). DOI: 10.17116/labs20176129-33
12. Субботина Т.Н., Курочкин Д.В., Маслюкова И.Е. и др. Использование гетеродуплексного анализа для скринингового выявления соматических мутаций в 9 экзоне гена *CALR* у пациентов с Ph-МПН. Онкогематология 2021;16(2):48–55. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55
Subbotina T.N., Kurochkin D.V., Maslyukova I.E. et al. Application of heteroduplex analysis for *CALR* mutation screening detection in patients with Ph-myeloproliferative neoplasms. Onkogematologiya = Oncohematology 2021;16(2):48–55. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55
13. Stein B.L., Williams D.M., O’Keefe C. et al. Disruption of the *ASXL1* gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. Haematologica 2011;96(10):1462–9. DOI: 10.3324/haematol.2011.04559
14. Szuber N., Tefferi A. Driver mutations in primary myelofibrosis and their implications. Curr Opin Hematol 2018;25(2):129–35. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000406
15. Kapralova K., Horvathova M., Pecquet C. et al. Cooperation of germ line *JAK2* mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. Blood 2016;128(10):1418–23. DOI: 10.1182/blood-2016-02-698951
16. 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
17. Tefferi A., Lasho T.L., Finke C.M. et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. Blood Adv 2016;1(2):105–11. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016000208
18. 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
Polushkina L.B., Shuvaev V.A., Fominykh M.S. et al. Current genetic models for prediction of primary myelofibrosis. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2019;12(4):391–7. (In Russ.). DOI: 10.21320/2500-2139-2019-12-4-391-397
19. Tefferi A., Mudireddy M., Mannelli F. et al. Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. Leukemia 2018;32(5):1200–10. DOI: 10.1038/s41375-018-0019-y
20. Scherber R.M., Mesa R.A. Managing myelofibrosis (MF) that “blasts” through: advancements in the treatment of relapsed/refractory and blast-phase MF. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2019;2019(1):630. DOI: 10.1182/hematology.201900100
21. Ferrer-Marín F., Bellosillo B., Martínez-Avilés L. et al. Leukemic transformation driven by an *ASXL1* mutation after a JAK2V617F-positive primary myelofibrosis: clonal evolution and hierarchy revealed by next-generation sequencing. J Hematol Oncol 2013;6:68. DOI: 10.1186/1756-8722-6-68
22. Conte N., Varela I., Grove C. et al. Detailed molecular characterisation of acute myeloid leukaemia with a normal karyotype using targeted DNA capture. Leukemia 2013;27(9):1820–5. DOI: 10.1038/leu.2013.117
23. Mason C.C., Khorashad J.S., Tantravahi S.K. et al. Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. Leukemia 2016;30(4):906–13. DOI: 10.1038/leu.2015.337
24. Park D.J., Kwon A., Cho B.S. et al. Characteristics of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. Blood Res 2020;55(1):17–26. DOI: 10.5045/br.2020.55.1.17
25. Grand F.H., Hidalgo-Curtis C.E., Ernst T. et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. Blood 2009;113(24):6182–92. DOI: 10.1182/blood-2008-12-194548

Вклад авторов

Т.Н. Субботина: разработка дизайна исследования, научное редактирование, утверждение статьи;
И.Е. Маслюкова, К.С. Семашенко, Г.А. Ходос, Д.В. Курочкин, А.А. Шалёва: получение данных, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
М.А. Михалёв, Е.В. Васильев, М.Г. Осадчая: предоставление материалов для исследования, анализ полученных данных;
Е.А. Дунаева, А.С. Есьман: получение данных, анализ полученных данных;
К.О. Миронов: научное редактирование, утверждение статьи.

Authors' contributions

T.N. Subbotina: research design development, article editing, article approval;
I.E. Maslyukova, K.S. Semashchenko, G.A. Khodos, D.V. Kurochkin, A.A. Shalyova: obtaining data, analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme, article writing;
M.A. Mikhalev, E.V. Vasiliev, M.G. Osadchaya: providing materials for research, analysis of the obtained data;
E.A. Dunaeva, A.S. Esman: obtaining data, analysis of the obtained data;
K.O. Mironov: article editing, article approval.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Субботина / T.N. Subbotina: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>
И.Е. Маслюкова / I.E. Maslyukova: <https://orcid.org/0000-0003-1323-2612>
К.С. Семашенко / K.S. Semashchenko: <https://orcid.org/0000-0002-8735-2716>
Г.А. Ходос / G.A. Khodos: <https://orcid.org/0000-0002-4726-3102>
Д.В. Курочкин / D.V. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0003-1063-7702>
А.А. Шалёва / A.A. Shalyova: <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>
М.А. Михалёв / M.A. Mikhalev: <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>

Е.В. Васильев / E.V. Vasiliev: <https://orcid.org/0000-0003-3780-3758>
М.Г. Осадчая / M.G. Osadchaya: <https://orcid.org/0000-0002-4942-4299>
Е.А. Дунаева / E.A. Dunaeva: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>
А.С. Есьман / A.S. Esman: <https://orcid.org/0000-0002-5456-7649>
К.О. Миронов / K.O. Mironov: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства». Протокол № 10 от 01.02.2017.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics.

The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of Federal Siberian Research and Clinical Center, Federal Medical and Biological Agency. Protocol No. 10 dated 01.02.2017.

All patients gave written informed consent to participate in the study.