

DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-115-134>

# Молекулярные маркеры как возможные предикторы эффективности таргетной терапии миелофиброза: одноцентровое исследование

О.Ю. Виноградова<sup>1,2,3</sup>, Д.И. Шихбабаева<sup>1</sup>, Ю.Н. Кобзев<sup>1</sup>, А.Л. Неверова<sup>1</sup>, М.М. Панкрашкина<sup>1</sup>, С.Г. Малахов<sup>1</sup>, М.В. Черников<sup>1</sup>, М.А. Мурзабекова<sup>1</sup>, А.Г. Попова<sup>3</sup>, Л.Б. Егорян<sup>4</sup>, А.В. Кречетова<sup>1</sup>, В.В. Птушкин<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Московский городской гематологический центр ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 5, корп. 17;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

<sup>3</sup>кафедра онкологии, гематологии и лучевой терапии педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

<sup>4</sup>кафедра гематологии и трансфузиологии им. акад. И.А. Кассирского и А.И. Воробьева ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

**Контакты:** Джарият Исмаиловна Шихбабаева [djeri.shih@mail.ru](mailto:djeri.shih@mail.ru)

**Введение.** Применение таргетных препаратов – наиболее перспективное направление терапии миелофиброза, но необходим поиск причин, ограничивающих их эффективность. Факторы, негативно влияющие на развитие миелофиброза, известны, но данные об их отрицательном воздействии в условиях таргетной терапии немногочисленны.

**Цель исследования** – оценка влияния молекулярно-генетических и цитогенетических аномалий на течение и результаты терапии первичного и вторичного миелофиброза при терапии руксолитинибом.

**Материалы и методы.** В проспективное исследование включены 106 больных миелофиброзом в хронической фазе (53 (50 %) мужчины и 53 (50 %) женщины), получавшие руксолитиниб в Московском городском гематологическом центре Городской клинической больницы им. С.П. Боткина. Медиана возраста пациентов – 62 (18–84) года. Медиана продолжительности заболевания до назначения руксолитиниба – 79 (1–432) мес. До терапии выполнены генетические исследования, включая секвенирование нового поколения. Медиана длительности терапии руксолитинибом – 33 (1–111) мес. Оценивалось влияние цитогенетической картины, драйверных мутаций, аллельной нагрузки *JAK2* (в динамике), *CALR*, дополнительных мутаций на динамику симптоматики, размера селезенки, достижения гематологического ответа, общую выживаемость, выживаемость без прогрессирования, выживаемость без бластного криза и без прогрессирования миелофиброза при таргетной терапии.

**Результаты.** Исследуемые генетические факторы не имели статистически значимой корреляции с показателями гемограммы. Гематологический ответ у больных с мутациями *JAK2*, *CALR* выгодно отличался от ответа в группах с мутацией *MPL* и трижды негативным статусом (triple negative status, TNS). При исходно низкой аллельной нагрузке *JAK2*, *CALR* <50 % получена более высокая частота гематологического ответа.

Выявлены статистически значимые различия в 5-летней общей выживаемости в группах пациентов с TNS и мутациями *JAK2*, *CALR* ( $p < 0,05$ ), с аллельной нагрузкой *CALR* <50 % и  $\geq 50$  % до начала терапии руксолитинибом ( $p = 0,01$ ), с наличием или отсутствием положительной динамики аллельной нагрузки *JAK2* в процессе лечения ( $p < 0,05$ ), отнесенных к разным группам патогенности дополнительных мутаций ( $p < 0,05$ ), с различным количеством патогенных мутаций (1 или  $\geq 2$ ), наличием или отсутствием патогенных мутаций генов *ASXL1* ( $p = 0,002$ ) и *SETBP1* ( $p = 0,00001$ ). Статистически значимо различалась 5-летняя выживаемость без прогрессирования в когортах больных с наличием или отсутствием положительной динамики аллельной нагрузки *JAK2* в процессе лечения ( $p < 0,05$ ), отнесенных к разным группам патогенности дополнительных мутаций ( $p < 0,05$ ), с различным количеством патогенных мутаций (1 или  $\geq 2$ ), с наличием или отсутствием патогенной мутации гена *SETBP1* ( $p = 0,003$ ). Выживаемость без прогрессирования не коррелировала с вариантом драйверной мутации или ее отсутствием, тем не менее все пациенты с TNS погибли от прогрессирования миелофиброза.

Статистически значимые различия в 5-летней выживаемости без развития бластного криза наблюдали между группами с мутациями *JAK2* и *MPL* ( $p = 0,001$ ), *JAK2* и TNS ( $p = 0,002$ ); в выживаемости без прогрессирования фиброза – между группами с патогенными и доброкачественными мутациями ( $p = 0,031$ ), неопределенными и доброкачественными мутациями ( $p = 0,001$ ).

**Заключение.** Результаты исследования выявили генетические маркеры, ассоциированные со снижением эффективности терапии руксолитинибом.

**Ключевые слова:** миелофиброз, первичный миелофиброз, постполицитемический миелофиброз, посттромбоцитемический миелофиброз, JAK2V617F, руксолитиниб, миелопролиферативное новообразование, таргетная терапия, секвенирование нового поколения, генетика, клиническая практика

**Для цитирования:** Виноградова О.Ю., Шихбабаева Д.И., Кобзев Ю.Н. и др. Молекулярные маркеры как возможные предикторы эффективности таргетной терапии миелофиброза: одноцентровое исследование. Онкогематология 2023;18(4):115–34. DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-115-134>

## Molecular markers as possible efficacy predictors of targeted therapy for myelofibrosis: single-center study

O.Yu. Vinogradova<sup>1,2,3</sup>, D.I. Shikhabaeva<sup>1</sup>, Yu.N. Kobzev<sup>1</sup>, A.L. Neverova<sup>1</sup>, M.M. Pankraskina<sup>1</sup>, S.G. Malakho<sup>1</sup>, M.V. Chernikov<sup>1</sup>, M.A. Murzabekova<sup>1</sup>, A.G. Popova<sup>3</sup>, L.B. Egoryan<sup>4</sup>, A.V. Krechetova<sup>1</sup>, V.V. Ptushkin<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Moscow City Hematology Center, S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department; Build 17, 5 2<sup>nd</sup> Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>2</sup>Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia;

<sup>3</sup>Department of Oncology, Hematology and Radiation Therapy, Faculty of Pediatrics, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

<sup>4</sup>Department of Hematology and Transfusiology named after. acad. I.A. Kassirskiy and A.I. Vorobyov, Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Build. 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993, Russia

**Contacts:** Dzhariyat Ismailovna Shikhabaeva [djeri.shih@mail.ru](mailto:djeri.shih@mail.ru)

**Background.** Targeted therapy is the most promising in the treatment of myelofibrosis, but it is necessary to search for the reasons limiting its effectiveness. There are known factors negatively affecting the development of myelofibrosis, but data on their negative impact in the context of targeted therapy are scarce.

**Aim.** Assessing the impact of cytogenetic and genetic abnormalities on the course and therapy results for primary and secondary myelofibrosis during ruxolitinib therapy.

**Materials and methods.** The prospective study included 106 patients with myelofibrosis in the chronic phase (53 (50 %) men and 53 (50 %) women) who received ruxolitinib at the Moscow City Hematology Center, S.P. Botkin City Clinical Hospital. The median age of patients was 62 (18–84) years. The median disease duration before initiation of ruxolitinib therapy was 79 (1–432) months. Before therapy, genetic studies were performed, including next-generation sequencing. The median duration of ruxolitinib therapy was 33 (1–111) months. The influence of the cytogenetic landscape, driver mutations, allele burden of *JAK2* (over time) and *CALR*, additional mutations on the dynamics of symptoms, spleen size, achievement of hematological response, overall survival, progression-free survival, survival without blast crisis and without progression of myelofibrosis with targeted therapy was assessed.

**Results.** The studied genetic factors did not have a significant correlation with hemogram parameters. The hematological response in patients with *JAK2* and *CALR* mutations compared favorably with the response in the groups with the *MPL* mutation and triple negative status (TNS). Higher hematological response rate was obtained in the group with initially low allele burden <50 % of *JAK2* or *CALR*.

Significant differences in 5-year overall survival were found between groups of patients with TNS and *JAK2* and *CALR* mutations ( $p < 0.05$ ); with *CALR* allele burden <50 % and  $\geq 50$  % before initiation of ruxolitinib therapy ( $p = 0.01$ ); the presence or absence of positive dynamics of the *JAK2* allele burden during treatment ( $p < 0.05$ ); additional mutations assigned to different pathogenicity groups ( $p < 0.05$ ); with different number of pathogenic mutations (1 or  $\geq 2$ ), the presence or absence of pathogenic mutations in the *ASXL1* ( $p = 0.002$ ) and *SETBP1* ( $p = 0.00001$ ) genes.

The 5-year progression-free survival was significantly different in cohorts of patients with or without positive dynamics of the *JAK2* allelic load during treatment ( $p < 0.05$ ); additional mutations assigned to different pathogenicity groups ( $p < 0.05$ ); with a different number of pathogenic mutations (1 or  $\geq 2$ ), the presence or absence of a pathogenic mutation of the *SETBP1* gene ( $p = 0.003$ ). Progression-free survival did not correlate with the type of driver mutation or its absence; however, all patients with TNS died from myelofibrosis progression.

Significant differences in 5-year blast crisis-free survival were observed between groups with *JAK2* and *MPL* mutations ( $p = 0.001$ ), *JAK2* and TNS ( $p = 0.002$ ); difference in 5-year survival without progression of fibrosis – between groups with pathogenic and benign ( $p = 0.031$ ); uncertain and benign ( $p = 0.001$ ) mutations.

**Conclusion.** The study identified genetic markers associated with decreased efficacy of ruxolitinib therapy.

**Keywords:** myelofibrosis, primary myelofibrosis, postpolycythemic myelofibrosis, postthrombocytopenic myelofibrosis, JAK2V617F, ruxolitinib, myeloproliferative neoplasm, targeted therapy, next generation sequencing, genetics, clinical practice

**For citation:** Vinogradova O.Yu., Shikhabaeva D.I., Kobzev Yu.N. et al. Molecular markers as possible efficacy predictors of targeted therapy for myelofibrosis: single-center study. Onkogematologiya = Oncohematology 2023;18(4):115–34. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2023-18-4-115-134>

## Введение

Rh-негативные хронические миелопролиферативные новообразования (ХМПН) – группа гематологических заболеваний, характеризующихся избыточной продукцией дифференцированных гемопоэтических клеток миелоидного ряда. Нозологические формы ХМПН в основном классифицируются на основании вовлеченности различных миелопролиферативных ростков. Несмотря на их различия, классические ХМПН, к которым относятся истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и первичный миелофиброз, имеют сходство в морфологической картине костного мозга, высоком риске артериальных и венозных тромбозов и тенденцию к метаморфозе истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии во вторичный миелофиброз и всех 3 нозологических форм в бластную трансформацию (острый миелобластный лейкоз).

Общие черты являются внешним признаком единого патогенетического механизма этих заболеваний. Доказательство клональной природы ХМПН было получено еще в 1976 г. в работах J.W. Adamson и P.J. Fialkow [1]. В последние 15 лет было показано, что патогенез заболеваний этой группы связан с сигнальным путем JAK/STAT, который активируется связыванием различных лигандов с цитокиновыми рецепторами 1-го типа: рецептором тромбопоэтина, рецептором эритропоэтина и рецептором гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Соматические мутации, активирующие сигнальный путь JAK/STAT, приводят к усиленной пролиферации стволовых гемопоэтических клеток и клеток-предшественников и в итоге к расширению соответствующего ростка. Поэтому такие мутации названы драйверными мутациями фенотипа ХМПН [2]. Они затрагивают белки, вовлеченные в разные уровни сигнального пути JAK/STAT. В каскаде лиганд→рецептор→тирозинкиназа→фактор транскрипции→промотор повреждение любого звена приводит к изменению активности транскрипции. Драйверными мутациями фенотипа ХМПН являются мутации тирозинкиназы, рецептора или лиганда.

История открытия драйверных мутаций фенотипа ХМПН началась в 2005 г., когда несколько групп ученых обнаружили у большинства пациентов с ХМПН точечную мутацию V617F в экзоне 14 гена *JAK2*, приводящую к усилению тирозинкиназной активности кодируемой им янус-киназы [3–6]. Это наиболее часто обнаруживаемая фенотипическая драйверная мутация при миелопролиферативных новообразованиях (МПН). Она обнаруживается в 95 % случаев истинной полицитемии и в 50–60 % случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза [7–10]. Замена G>T в положении 1849 приводит к замене валина на фенилаланин в положении 617 полипептидной цепи и нарушает функцию подавления доменом JH2 киназной активности *JAK2*, что проявляется в избыточной активности янус-киназы [11]. Поскольку янус-киназа является промежуточной сигнальной молекулой для нескольких типов рецепторов, включая рецепторы

тромбопоэтина (MPL), эритропоэтина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, мутация *JAK2V617F* может приводить к тромбоцитозу, эритроцитозу, лейкоцитозу. Конститутивная активация *JAK2V617F* вызывает повышение экспрессии молекул, связанных с воспалительным ответом, иммунной дисрегуляцией и манифестацией воспалительных состояний [12–14]. Цитокины, связанные с естественным иммунитетом, активно экспрессируются при МПН и выявляются также в стромальных клетках [13]. Предположительно этот процесс приводит к вовлечению стромы костного мозга и является причиной медуллярного фиброза и клональной экспансии [14]. В то же время в периферической крови гемопоэтические клетки, несущие мутацию *JAK2V617F*, взаимодействуя с эндотелием и иммунологическими молекулами, усиливают механизм иммунотромбоза [15]. Значительно реже, примерно у 3 % пациентов с истинной полицитемией, встречается мутация в экзоне 12 *JAK2*, которая приводит к конститутивной активации тирозинкиназы и обычно сопровождается клинической картиной эритроцитоза [4, 5, 7].

Вторая фенотипическая для ХМПН драйверная мутация была обнаружена практически одновременно с первой. В 2006 г. выявлена мутация W515L в гене *MPL* у пациентов с первичным миелофиброзом [16]. Ген *MPL* кодирует рецептор тромбопоэтина, и нарушение его структуры воздействует на мегакариоцитарный росток. Эта драйверная мутация выявляется у 6–9 % пациентов с первичным миелофиброзом и у 3–4 % пациентов с эссенциальной тромбоцитемией, но обычно не встречается при истинной полицитемии [2].

Последней была обнаружена 2-я по частоте встречаемости фенотипическая драйверная мутация ХМПН – мутация гена *CALR*, кодирующего калретикулин – шаперонный белок эндоплазматического ретикулума. В результате делеции или инсерции в экзоне 9 гена происходит сдвиг рамки считывания на положение 1 [17, 18]. Это приводит к формированию аномального белка с нетипичным карбоксильным концом. Связывание мутантного белка с рецептором тромбопоэтина приводит к тромбопоэтин-независимой активации сигнального пути [19]. Мутантный *CALR* выявляется в 26 % случаев эссенциальной тромбоцитемии, в 18–31 % случаев первичного миелофиброза и не встречается при истинной полицитемии [9, 10, 20].

Около 10 % пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и миелофиброзом не имеют ни одной из фенотипических драйверных мутаций и составляют группу трижды негативного статуса (triple negative status, TNS) [21]. В настоящее время известно, что трижды негативные варианты миелофиброза (отсутствие мутаций в генах *CALR*, *MPL*, *JAK2*) отличаются большей склонностью к лейкозной трансформации [22, 23].

В настоящее время практическая значимость указанных мутаций для диагностики классических ХМПН подтверждается включением их в основные критерии

для верификации данных нозологических форм, а также в прогностические шкалы. Так, значимость драйверных мутаций для миелофиброза учитывают прогностические шкалы MIPSS70 (Mutation-enhanced International Prognostic Scoring System for transplant-age patients), MIPSSv2 (версия 2.0 шкалы MIPSS70) и GIPSS (the Genetically Inspired Prognostic Scoring System). Шкала MIPSS70 основана на мутациях и клинических показателях, MIPSSv2 учитывает мутационный статус, кариотип и клинические показатели, GIPSS основана исключительно на мутациях и кариотипе. Кроме этого, существует прогностическая шкала MYSEC-PM (Myelofibrosis Secondary to PV and ET Prognostic Model), которая учитывает характер (первичный или вторичный) миелофиброза и определяет прогностическую роль мутационного статуса *CALR* при вторичном миелофиброзе. Для прогнозирования исхода после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток разработана прогностическая шкала MTSS (Myelofibrosis Transplant Scoring System), которая учитывает драйверные мутации *CALR* и *MPL* [24]. Драйверная мутация *JAK2* также учитывается при стратификации риска тромбгеморрагических осложнений при эссенциальной тромбоцитемии.

В последние годы возможности широкого использования секвенирования по Сенгеру, а также развитие секвенирования нового поколения (NGS) способствовали более подробному изучению генетического ландшафта и выявлению новых генетических факторов, приводящих к клональной эволюции и прогрессированию ХМПН. Различные мутации в генах эпигенетической регуляции (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), генах-транскрипторах (*TP53*, *RUNX1*, *IKZF1*) и генах сплайсинга (*SF3B1*, *U2AF1*, *SRSF2*) были определены как играющие роль в прогрессировании эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии во вторичный миелофиброз и острый лейкоз или из хронической фазы миелофиброза в бластный криз (БК), а также как ассоциированные с усилением миелодиспластического фенотипа [25]. Это подтверждается частыми находками мутаций в данных генах при миелодиспластическом синдроме и остром миелобластном лейкозе [26]. Часть этих мутаций модифицируют функцию стволовых клеток и клеток-предшественников и имеют ключевое значение при клональном гемопоэзе неопределенного значения (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP), что приводит к нарушению миелодной дифференцировки. Мутации в генах *ASXL1*, *IDH1/2*, *EZH2* или *SRSF2* выявляются у каждого 3-го пациента с первичным миелофиброзом и ассоциированы с более короткой общей выживаемостью (ОВ) и выживаемостью без прогрессирования (ВБП) [8]. Дополнительные мутации могут возникать как до фенотипических драйверных мутаций (в контексте CHIP), так и после их появления. При этом не выявлено взаимосвязи между CHIP-ассоциированными мутациями (*TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*) и фибротической прогресси-

ей, в то время как мутации в генах *SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, *IDH1/2*, *EZH2*, которые редко встречаются при CHIP, показали значимую корреляцию с прогрессией в фиброз [27].

В настоящее время эпигенетические мутации высокого риска включены в большие критерии диагностики миелофиброза [28], а также в указанные выше молекулярные шкалы его прогноза.

Исследователи единодушны в том, что изучение генетического ландшафта проливает свет на особенности течения и дает возможность прогнозирования ХМПН. В настоящее время генетические исследования этих нозологических форм решают несколько задач. С одной стороны, это поиск молекулярных нарушений, указывающих на конкретный диагноз внутри группы Ph-негативных ХМПН и особенности течения заболевания. Так, некоторые исследователи выделяют подтип миелофиброза с миелодеплетирующим фенотипом, связанный с молекулярным маркером *U2AF1*, характерным для варианта миелофиброза с цитопениями [29]. С другой стороны, это оценка риска трансформации в зависимости от выявленных дополнительных мутаций и их комбинаций [30, 31]. Еще одно важное направление — поиск предикторов эффективности ответа на лечение, в том числе таргетной терапии [24]. К настоящему времени разработан целый ряд таргетных препаратов различного механизма действия, направленных на терапию МПН, однако применение большинства из них при ХМПН находится на стадии клинических исследований [32].

На сегодняшний день в широкой клинической практике применяется только препарат руксолитиниб, направленный прежде всего на ингибирование янускиназы. Имеется определенный опыт его использования при всех 3 классических вариантах ХМПН, тем не менее опубликовано всего несколько работ, посвященных поиску молекулярных предикторов ответа на терапию этим препаратом. Несомненно, требуются дальнейшие исследования и только накопление и анализ полученных результатов позволят стратифицировать риски таргетной терапии, проводить более четкий выбор тактики лечения с учетом молекулярно-генетического статуса. Однако пока таких работ крайне мало.

**Цель исследования** — оценка влияния молекулярно-генетических и цитогенетических аномалий на течение и результаты таргетной терапии руксолитинибом первичного и вторичного миелофиброза.

### Материалы и методы

В Московском городском гематологическом центре Городской клинической больницы им. С.П. Боткина наблюдаются 238 больных с классическими Ph-негативными МПН, которые получали терапию руксолитинибом. У 206 пациентов диагностирован первичный либо вторичный миелофиброз, у 31 — истинная полицитемия, у 1 — эссенциальная тромбоцитемия.

В настоящем проспективном исследовании проводилась оценка данных 106 больных, страдающих миелофиброзом в хронической фазе, получавших руксолитиниб, которым проведено комплексное генетическое обследование, в обязательном порядке включающее NGS. Необходимым для верификации диагноза миелофиброза (первичного, постполицитемического, посттромбоцитемического) являлось его гистологическое подтверждение. Диагноз первичного миелофиброза устанавливали на основании критериев Всемирной организации здравоохранения 2016 г. [33], диагноз постполицитемического, посттромбоцитемического миелофиброза – на основании критериев А. Tefferi и соавт. 2007 г. [34]. У 82 (77 %) из 106 пациентов диагностирован первичный миелофиброз, у 22 (21 %) – постполицитемический, у 2 (2 %) – посттромбоцитемический миелофиброз.

В исследуемой группе было равное число мужчин и женщин – по 53 (50 %) пациента в каждой когорте. Медиана возраста пациентов составила 62 (18–84) года. Медиана возраста при диагностике Ph-негативно-го МПН – 54 (14–81) года.

Медиана продолжительности заболевания до назначения руксолитиниба – 79 (1–432) мес (табл. 1).

Все больные до назначения руксолитиниба получали антиагрегантную терапию. Подавляющему числу пациентов назначали также другие виды лечения: гидроксимочевину – 93 (88 %) больным, интерферон  $\alpha$  – 27 (25 %), эритропоэтины – 13 (12 %), иные химиотерапевтические препараты (бусульфан, 6-меркаптопурин, цитарабин) – 7 (7 %), даназол – 1 (1 %), децитабин – 1 (1 %), комбинацию венетоклакса и азациитидина – 1 (1 %). В 3 (3 %) случаях ранее была выполнена спленэктомия. У всех больных была зарегистрирована резистентность либо непереносимость ранее проведенного лечения. Терапию руксолитинибом в качестве 1-й линии лечения получили 3 (3 %) пациентов с учетом имеющейся группы высокого риска прогрессирования заболевания и изначально неблагоприятного прогноза (см. табл. 1).

Прогностическую оценку риска проводили в соответствии с клинической шкалой DIPSS (Dynamic International Prognostic Scoring System, Динамическая международная прогностическая шкала) [35–38]. Более половины пациентов были отнесены к группам высокого риска (52 %;  $n = 55$ ); промежуточного 2 – 38 % ( $n = 40$ ), высокого – 14 % ( $n = 15$ ). К группе низкого риска отнесены 17 % ( $n = 18$ ) больных, промежуточного 1 – 31 % ( $n = 33$ ). У подавляющего числа пациентов выявляли высокую степень фиброза: II – у 47 % ( $n = 50$ ), III – у 48 % ( $n = 51$ ). Только 5 (5 %) пациентов имели фиброз I степени (см. табл. 1).

К началу исследования в 75 % ( $n = 79$ ) случаев наблюдали конституциональные симптомы (слабость, потливость, повышение температуры тела, снижение массы тела). Оценка симптомов проводили с использованием опросника МПН-10 [39]. У 94 % ( $n = 100$ )

пациентов определяли увеличение размера селезенки (нижний край выступал из-под реберной дуги более чем на 0 см), при этом массивную спленомегалию (нижний край селезенки выступал из-под реберной дуги более чем на 10 см) выявили у 67 % ( $n = 71$ ) больных. Ряд пациентов (37 %;  $n = 39$ ) нуждались в трансфузиях эритроцитсодержащих сред. В 12 % ( $n = 13$ ) случаев пациенты перенесли тромбозы различной локализации (см. табл. 1).

Начальную дозу руксолитиниба определяли с учетом количества тромбоцитов: при  $50\text{--}100 \times 10^9/\text{л}$  руксолитиниб назначали в дозе 5 мг 2 раза в сутки, при  $100\text{--}200 \times 10^9/\text{л}$  – в дозе 15 мг 2 раза в сутки, в случаях, когда количество тромбоцитов превышало  $200 \times 10^9/\text{л}$ , – по 20 мг 2 раза в сутки [40]. В дальнейшем дозу корректировали в зависимости от ответа на лечение и проявлений токсичности препарата. Оценка эффективности терапии руксолитинибом проводили в соответствии с критериями ответа IWG-MRT (International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment, Международная рабочая группа исследования и лечения миелопролиферативных новообразований) и ELN (European Leukemia Net, Европейская организация по диагностике и лечению лейкозов) [41].

Перед терапией руксолитинибом пациентам выполняли стандартное цитогенетическое исследование (при необходимости – флуоресцентную иммуногибридизацию (флуоресцентную *in situ* гибридизацию)), качественную и количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на выявление BCR-ABL, секвенирование по Сенгеру для определения мутации *JAK2*, мутаций *CALR* и *MPL*, а также динамики аллельной нагрузки мутации *JAK2* в процессе лечения руксолитинибом (динамика аллельной нагрузки *CALR* и *MPL* в исследовании не оценивалась). Поскольку в период начала терапии технической возможности выполнения NGS не было, ДНК из биологического материала, полученного перед началом таргетной терапии, аккумулялировалась в биобанке до момента возможности проведения исследования.

Для проведения NGS выделяли ДНК из цельной крови набором реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия) по инструкции производителя. Чистоту ДНК и РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop OneC (Thermo Scientific, США), при этом для всех образцов соотношение OD260/280  $>1,8$ . Концентрацию ДНК оценивали флуориметрическим количественным определением с использованием флуориметра Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США) с набором для анализа QuDye HS (Lumiprobe, Россия). В работе применяли готовую панель генов AmpliSeq for Illumina Myeloid Panel (Illumina Inc., США). Данная панель позволяет проводить мультиплексное целевое ПЦР-обогащение 17 генов полностью (экзоны и интроны) и 23 генов по горячим точкам. Пробоподготовку к NGS выполняли с использованием набора AmpliSeq™ Library PLUS for Illumina (Illumina Inc., США)

Таблица 1. Характеристика пациентов с миелофиброзом перед назначением руксолитиниба ( $n = 106$ )Table 1. Characteristics of patients with myelofibrosis prior to ruxolitinib prescribing ( $n = 106$ )

Показатель Parameter	Значение Value	Показатель Parameter	Значение Value
Пол, $n$ (%): Gender, $n$ (%): мужской male женский female	53 (50) 53 (50)	Медиана длительности заболевания от диагностики до начала терапии руксолитинибом (диапазон), мес Median disease duration from diagnosis to initiation of ruxolitinib therapy (range), months	79 (1–432)
Медиана возраста при верификации диагноза (диапазон), лет Median age at diagnosis verification (range), years	54 (14–81)	Наличие тромбозов в анамнезе, $n$ (%) History of thrombosis, $n$ (%)	13 (12)
Медиана возраста при назначении руксолитиниба (диапазон), лет Median age at ruxolitinib prescription (range), years	62 (18–84)	Риск по DIPSS, $n$ (%): DIPSS risk, $n$ (%): низкий low промежуточный 1 intermediate 1 промежуточный 2 intermediate 2 высокий high	18 (17) 33 (31) 40 (38) 15 (14)
Фаза заболевания при верификации диагноза, $n$ : Disease phase at diagnosis verification, $n$ : хроническая chronic бластный криз blast crisis	106 0	Степень фиброза, $n$ (%): Fibrosis degree, $n$ (%): I II III	5 (5) 50 (47) 51 (48)
Фаза заболевания во время назначения терапии руксолитинибом, $n$ : Disease phase at ruxolitinib prescription, $n$ : хроническая chronic бластный криз blast crisis	106 0	Наличие симптомов опухолевой интоксикации, $n$ (%) Presence of tumor intoxication symptoms, $n$ (%)	79 (75)
Ранее проводимая терапия, $n$ (%): Previous therapy, $n$ (%): гидроксимочевина hydroxyurea интерферон $\alpha$ interferon $\alpha$ эритропоэтины erythropoietins другая химиотерапия other chemotherapy даназол danazol венетоклак + азациитидин venetoclax + azacitidine децитабин decitabine спленэктомия splenectomy	93 (88) 27 (25) 13 (12) 7 (7) 1 (1) 1 (1) 1 (1) 3 (3)	Спленомегалия (>0 см из-под реберной дуги), $n$ (%) Spleno-megaly (>0 cm below the costal arch), $n$ (%)	100 (94)
		Массивная спленомегалия ( $\geq 10$ см из-под реберной дуги), $n$ (%) Massive spleno-megaly ( $\geq 10$ cm below the costal arch), $n$ (%)	71 (67)
		Зависимость от гемотрансфузий, $n$ (%) Blood transfusion dependence, $n$ (%)	39 (37)

**Примечание.** DIPSS – Динамическая международная прогностическая шкала.  
Note. DIPSS – Dynamic International Prognostic Scoring System.

с индексированием AmpliSeq™ UD Indexes for Illumina® (Illumina Inc., США) по инструкции производителя. Секвенирование проводили на приборе MiSeqDx (Illumina Inc., США) с набором MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (Illumina Inc., США).

Для анализа полученных данных использовали приложения для ампликонов ДНК (Illumina Inc., США) от BaseSpace™ Sequence Hub. Варианты были отобраны, отфильтрованы с помощью различных баз данных, включая COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), VarSome (<https://varsome.com>) и ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), и классифицированы в соответствии со стандартами и рекомендациями AMP/

ASCO/CAP (Association for Molecular Pathology/College of American Pathologists/American Society of Clinical Oncology), ClinGen (Clinical Genome Resource), CGC (Cancer Genomics Consortium), VICC (Variant Interpretation for Cancer Consortium) по интерпретации и отчетности соматических вариантов [42, 43].

Результаты настоящего проспективного клинического исследования проанализированы в августе 2023 г. Для оценки характеристик исследуемых групп, длительности терапии, частоты достижения ответов использовали методы описательной статистики. Для сравнения показателей применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для построения кривой

ОВ продолжительность жизни больных рассчитывали от даты начала терапии до смерти по любой причине, кроме смерти от новой коронавирусной инфекции COVID-19. ВБП оценивали по сроку жизни пациентов от даты начала терапии до прогрессирования миелофиброза, или бластной трансформации, или смерти по этим причинам. Кривые выживаемости построены методом Каплана–Майера. Проверку статистической значимости различий проводили методом *log-rank*-теста с расчетом  $\chi^2$ -критерия Пирсона. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми. Сбор и анализ данных выполняли в программе Microsoft Excel 14 в составе пакета Microsoft Office 2010.

## Результаты

### Результаты комплексного генетического исследования больных миелофиброзом, проведенного перед началом терапии руксолитинибом

У 98 (93 %) из 106 пациентов при диагностике методом секвенирования по Сенгеру выявлены драйверные мутации: у 68 (64 %) – мутация JAK2V617F, у 5 (5 %) – гена *MPL*, у 25 (24 %) – гена *CALR* (тип 1 – у 23 больных, редкие варианты – у 2, тип 2 не выявлен ни у кого). В 8 (7 %) случаях результат был отрицательным, диагностирован TNS относительно драйверных мутаций.

Всем 106 пациентам было выполнено NGS. Их мутационный статус перед терапией руксолитинибом отражен на рис. 1, где продемонстрировано количество мутаций в каждом исследованном гене у каждого пациента. При этом при распределении выявленных мутаций по типам значимые мутации (миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, инсерции/делеции, образование стоп-кодона, мутации в регионе сплайсинга) составили 12,3 % от общего количества (рис. 2).

При анализе клинических данных для выявления предикторов эффективности терапии руксолитинибом

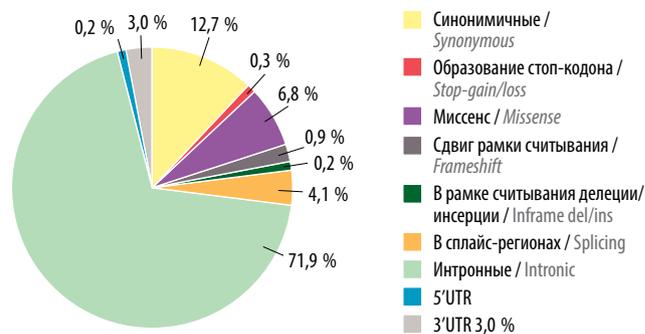
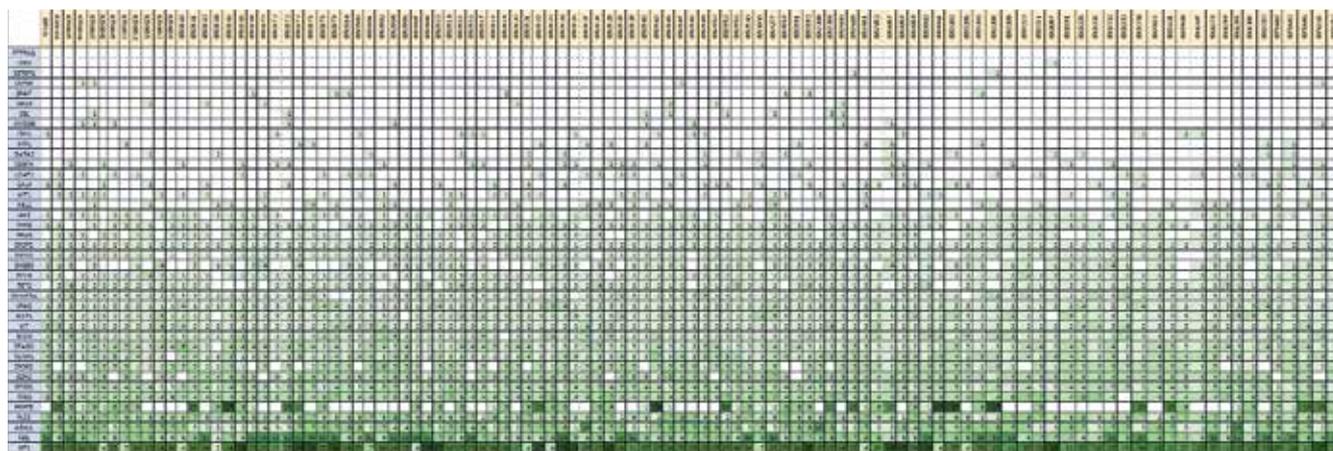


Рис. 2. Распределение выявленных мутаций по типам (n = 106)  
Fig. 2. Distribution of identified mutations by type (n = 106)

в данной работе учитывали только значимые мутации, оказывающие влияние на формирование белка, так как именно они, вероятнее всего, могут иметь различное клиническое значение. Такие мутации были определены в 35 генах исследуемой панели. Частота встречаемости мутаций в этих генах у пациентов исследуемой группы представлена на рис. 3, а.

При этом патогенные мутации с доказанным отрицательным клиническим значением определялись лишь в 13 генах: *ASXL1*, *MPL*, *CBL*, *EZH2*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *CALR*, *JAK2*, *PHF6*, *SETBP1*, *IDH1*, *IDH2*. Выявление драйверных мутаций JAK2V617F, *MPL*, *CALR* соответствовало ранее полученным результатам секвенирования по Сенгеру. Мутации неопределенного значения выявлены в 29 генах, мутации, признанные по данным литературы доброкачественными, – в 16 (рис. 3, б).

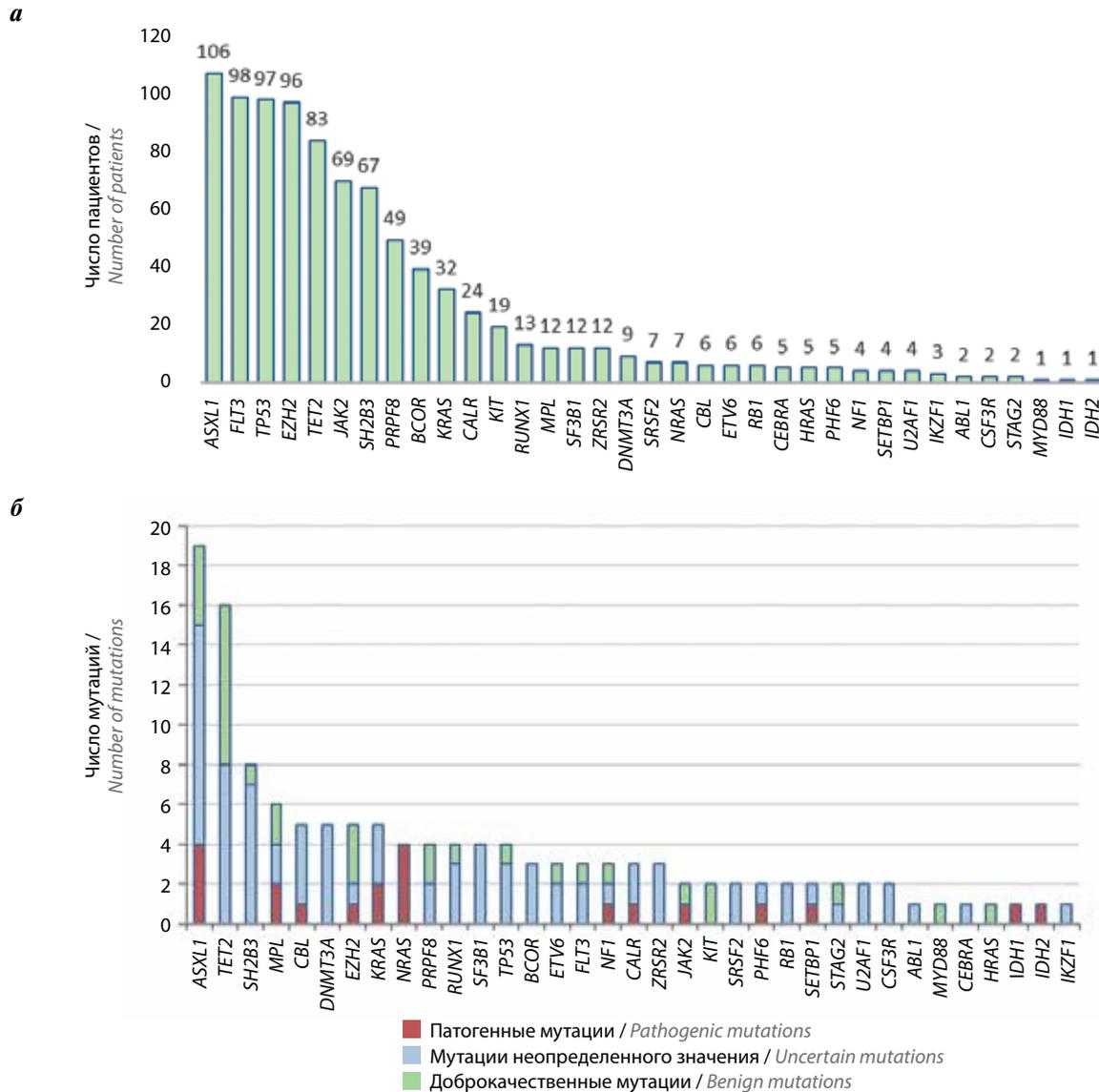
Общепринято разделение выявляемых мутаций по клинической значимости на 5 групп: патогенные, вероятно патогенные, неопределенного значения, вероятно доброкачественные, доброкачественные [42]. В соответствии с этим мы разделили пациентов на группы больных, имеющих патогенные мутации (за исклю-



0 1–3 4–6 7–9 10–12 13–15 ≥16

Рис. 1. Мутационный статус пациентов с миелофиброзом до терапии руксолитинибом (n = 106)

Fig. 1. Mutation status of patients with myelofibrosis before ruxolitinib therapy (n = 106)



**Рис. 3.** Число пациентов, имеющих значимые экзомные мутации и мутации в регионах сплайсинга в исследованных генах (а) и распределение этих мутаций по клинической значимости (б)

**Fig. 3.** Number of patients with significant exome mutations and mutations in splicing regions in the studied genes (a) and distribution of these mutations according to clinical significance (b)

чением *JAK2*, *CALR*, *MPL*); не имеющих их, но имеющих мутации неопределенного значения; имеющих только доброкачественные мутации. Больных без патогенных мутаций, но с мутациями вероятно патогенного значения в нашей когорте не выявлено. Малочисленную ( $n = 2$ ) группу больных, не имеющих патогенные мутации и мутации неопределенного значения, но имеющих вероятно доброкачественные, отдельно не рассматривали, объединив ее с группой доброкачественных мутаций.

Медиана аллельной нагрузки *JAK2V617F* до терапии руксолитинибом составила 60 (5,7–97,9) %, гена *CALR* – 49,8 (33,6–88,0) %, гена *MPL* – 68,64 (46,1–98,7) %.

Благодаря получению молекулярно-генетических характеристик больные были распределены по группам риска в соответствии с молекулярными шкалами

*MIPSSv2* и *GIPSS*. В соответствии с критериями *MIPSSv2* к группе низкого риска отнесены 4 % ( $n = 4$ ) больных, промежуточного 1 – 28 % ( $n = 30$ ), промежуточного 2 – 57 % ( $n = 60$ ), высокого – 11 % ( $n = 12$ ). Согласно критериям *GIPSS* – 21 % ( $n = 12$ ), 54 % ( $n = 31$ ), 21 % ( $n = 12$ ) и 4 % ( $n = 2$ ) больных соответственно.

Всем больным была проведена качественная и количественная ПЦР на наличие транскрипта *BCR-ABL* для исключения диагноза хронического миелолейкоза. Во всех случаях имел место отрицательный результат.

Стандартное цитогенетическое исследование (*G-banding*) клеток костного мозга перед началом исследования выполнено 57 пациентам. У 34 (60 %) из них определен нормальный кариотип. У остальных больных имели место его качественные и/или количественные

изменения, в том числе у 4 пациентов выявлены аномалии неблагоприятного прогноза (+8, перестройки 11q23, комплексный кариотип). Цитогенетические характеристики пациентов отражены в табл. 2.

**Таблица 2.** Цитогенетическая характеристика клеток костного мозга перед началом терапии руксолитинибом

**Table 2.** Cytogenetic characterization of bone marrow cells before ruxolitinib therapy initiation

Кариотип Karyotype	n	%
Нормальный кариотип Normal karyotype	34	60
Нет митозов No mitoses	1	2
Делеция 13q 13q deletion	4	7
Трисомия 8 Trisomy 8	1	2
Трисомия 9 Trisomy 9	2	3,5
Комплексный кариотип Complex karyotype	2	3,5
46,XYdel(20)(q12)	1	2
del20, t(6;15)	1	2
t(10;12)	1	2
t(1;7)	1	2
Делеция 11q 11q deletion	1	2
Трисомия 1 Trisomy 1	1	2
Патология хромосом 1, 9 Pathology of chromosomes 1, 9	1	2
Структурные нарушения хромосомы 18 Structural abnormalities of chromosome 18	1	2
46,XX,dup(1)(q11q44[5]/46,XX[15]	1	2
46,XY,del(20)(q11.2q13.1)[9]/46,XY,der(8),der(13)[2]/46XY[19]	1	2
t(12;17)	1	2
t(7;12)	1	2
Клон с дериватом хромосомы 20 и субклон с транслокацией 3;12 и дополнительным дериватом 20 A clone with a derivative of chromosome 20 and a subclone with translocation 3;12 and an additional derivative 20	1	2

### Результаты лечения руксолитинибом больных миелофиброзом, их взаимосвязь с генетическими нарушениями

Медиана продолжительности терапии руксолитинибом составила 33 (1–111) мес.

Значительное уменьшение выраженности конституциональной клинической симптоматики наблюдалось у всех пациентов (имеющих симптомы) с самого начала таргетной терапии и далее на протяжении лечения. Доля больных, имеющих симптоматику, снизилась к 6 мес на 58 %, к 12 мес – на 71 %, к 24 мес – на 93 %, к 36 мес – на 98 %. У остальных пациентов выраженность симптоматики как в течение первого года лечения, так и в дальнейшем имела тенденцию к уменьшению и к 5 годам наблюдения отсутствовала у 25 (96 %) из 26 пациентов. Снижение выраженности симптомов и улучшение общего самочувствия больных с трофологической недостаточностью сопровождалось увеличением массы тела.

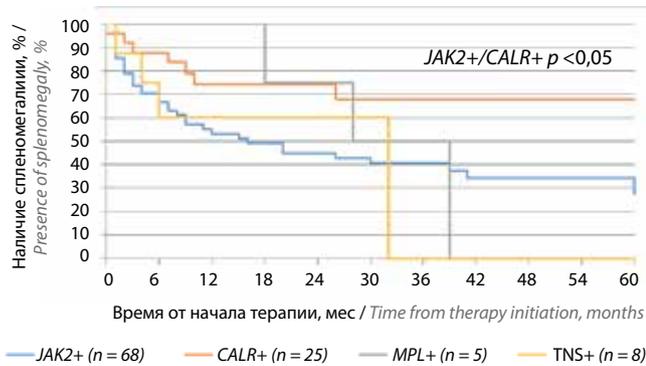
Динамика уменьшения выраженности симптомов опухолевой интоксикации по данным исследования не имела достоверной ассоциативной связи с вариантом драйверных мутаций или их отсутствием, уровнем аллельной нагрузки *JAK2* и *CALR* перед назначением руксолитиниба, выраженностью уменьшения аллельной нагрузки *JAK2* во время лечения, цитогенетической картиной при назначении препарата, принадлежностью к группе патогенности дополнительных мутаций, количеством патогенных мутаций ( $p > 0,05$ ).

При этом медиана времени достижения полного отсутствия конституциональной клинической симптоматики все же отличалась в группах пациентов с аллельной нагрузкой *JAK2*:  $< 50$  % – 3 мес и  $\geq 50$  % – 6 мес. Кроме этого, у больных со стартовой аллельной нагрузкой *JAK2*  $< 50$  % при терапии руксолитинибом симптоматика была купирована в 100 % случаев, тогда как при исходно более высоком уровне аллельной нагрузки *JAK2*  $\geq 50$  % она сохранялась к сроку 60 мес лечения руксолитинибом у 6 % больных.

Среди пациентов с мутацией *CALR* в процессе терапии симптоматика была купирована во всех случаях, однако в когорте с уровнем аллельной нагрузки *CALR* до начала лечения руксолитинибом  $< 50$  % медиана времени купирования симптоматики составила 3 мес, тогда как при аллельной нагрузке  $\geq 50$  % – 9 мес.

Также медиана срока окончательного купирования симптомов интоксикации под воздействием руксолитиниба отличалась в группе пациентов, достигших снижения аллельной нагрузки *JAK2* более чем на 50 %, по сравнению с группой больных, не достигших такого снижения, – 2,9 и 6 мес соответственно.

Параллельно со снижением конституциональных симптомов у пациентов наблюдали значительное уменьшение размера селезенки. К 12 мес лечения руксолитинибом доля больных с массивной спленомегалией (селезенка выступает из-под края реберной дуги на  $\geq 10$  см) снизилась с 67 до 17 %, в дальнейшем – до 8 %.



**Рис. 4.** Динамика нормализации размера селезенки в процессе терапии руксолитинибом миелофиброза при разных вариантах драйверных мутаций:  $JAK2+$  ( $n = 68$ ),  $CALR+$  ( $n = 25$ ),  $MPL+$  ( $n = 5$ ), трижды негативный статус+ ( $TNS+$ ) ( $n = 8$ )

**Fig. 4.** Spleen size normalization dynamics during the ruxolitinib therapy of patients with myelofibrosis with different types of driver mutations:  $JAK2+$  ( $n = 68$ ),  $CALR+$  ( $n = 25$ ),  $MPL+$  ( $n = 5$ ), triple negative status+ ( $TNS+$ ) ( $n = 8$ )

Доля пациентов со спленомегалией (селезенка выступает из-под края реберной дуги) снизилась к 6 мес терапии руксолитинибом на 28 %, к 12 мес – на 38 %, к 24 мес – на 46 %, к 36 мес – на 52 %. Размер селезенки нормализовался к году лечения руксолитинибом в 45 % случаев, к 5-летнему периоду наблюдения этот показатель соответствовал 64 %.

Динамика уменьшения размера селезенки статистически значимо различалась в группах больных с мутациями  $JAK2$  и  $CALR$ , медиана времени нормализации размера селезенки в первом случае составила 16 мес, во втором – не достигнута (рис. 4).

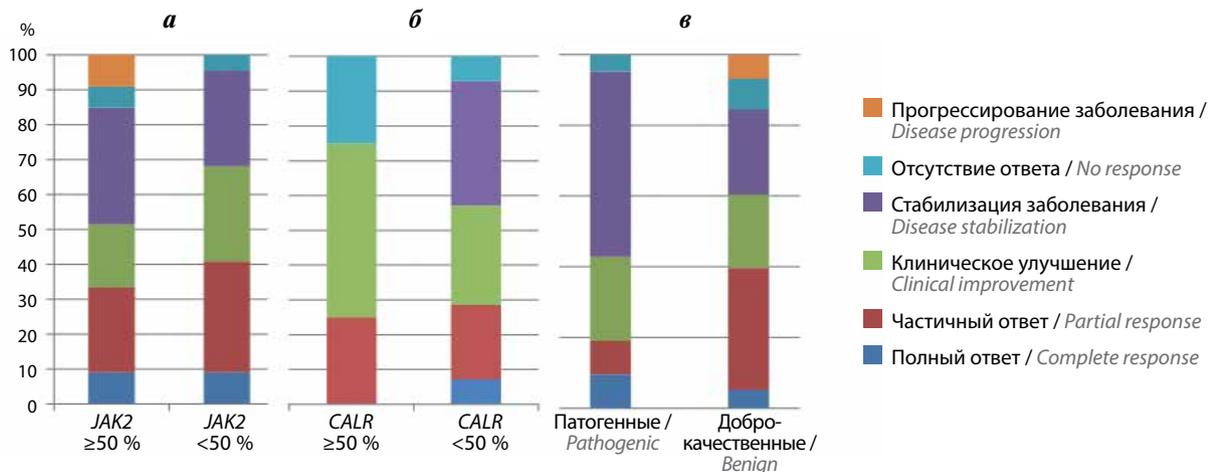
Анализ показал, что динамика уменьшения размера селезенки не имела достоверной ассоциативной связи с уровнем аллельной нагрузки  $JAK2$  и  $CALR$  перед назначением руксолитиниба, динамикой аллельной нагрузки  $JAK2$  во время лечения, цитогенетической картиной при назначении препарата, принадлежностью к группе патогенности дополнительных мутаций,

количеством патогенных мутаций ( $p > 0,05$ ). Однако отмечены различия в показателях медианы времени уменьшения размера селезенки до нормы в группах пациентов со снижением аллельной нагрузки  $JAK2$  более чем на 50 % (7 мес) от группы пациентов с уменьшением нагрузки менее чем на 50 % (15 мес).

Клинико-гематологический ответ на терапию у большинства пациентов был получен уже к 1-му месяцу лечения руксолитинибом. К этому сроку как минимум стабилизация заболевания была достигнута у 91 % больных. При этом полный ответ наблюдали в 1 % случаев, частичный – в 13 %, клиническое улучшение – в 21 %, стабилизацию состояния – в 56 %. К 3 мес терапии эти показатели соответствовали 3, 18, 34 и 36 %, к 12 мес – 7, 27, 21 и 31 %, к 5 годам – 8, 36, 20 и 23 %. Ответ не был достигнут у 9 (8 %) больных.

У пациентов с мутациями  $JAK2$  и  $CALR$  ответ был сопоставим. Однако у больных с мутацией  $CALR$  не наблюдалось случаев прогрессирования заболевания в отличие от пациентов с другими драйверными мутациями или их отсутствием.

В случаях исходно более низкой аллельной нагрузки  $JAK2$  ( $< 50$  %) отмечены тенденция к более высокой частоте достижения ответа на терапию руксолитинибом и отсутствие случаев прогрессирования заболевания по сравнению с ситуациями, при которых аллельная нагрузка  $JAK2$  перед началом терапии руксолитинибом была  $\geq 50$  % (рис. 5, а). У больных с мутацией  $CALR$  при исходно более низкой аллельной нагрузке ( $< 50$  %) наблюдались более высокая эффективность терапии и меньшее количество случаев отсутствия какого-либо ответа или только стабилизации состояния по сравнению с ситуациями, когда аллельная нагрузка  $CALR$   $\geq 50$  % (рис. 5, б). В группах пациентов, имеющих патогенные дополнительные мутации, эффективность терапии была ниже: имелась тенденция к меньшей частоте достижения полного, частичного ответа на терапию или хотя бы клинического улучшения (рис. 5, в).



**Рис. 5.** Частота ответа на терапию руксолитинибом к 12 мес лечения у больных миелофиброзом при разном уровне аллельной нагрузки  $JAK2$  (а) и  $CALR$  (б), а также в зависимости от выявленных дополнительных мутаций (в)

**Fig. 5.** Response rate to ruxolitinib at 12 months of therapy in patients with myelofibrosis with different levels of allelic load of  $JAK2$  (a) and  $CALR$  (б), and depending on additional mutations identified (в)

Данные гемограммы на протяжении терапии в целом свидетельствовали о положительной динамике ее показателей. Уровень лейкоцитов и процент бластных клеток периферической крови при терапии руксолитинибом имели тенденцию к снижению, показатели содержания гемоглобина и тромбоцитов в крови статистически значимо улучшились. Медиана уровня гемоглобина перед назначением руксолитиниба составляла 92 г/л, к 12 мес терапии этот показатель вырос до 100 г/л, к 36 мес — до 110 г/л, к 60 мес — до 120 г/л. Достигнутый уровень в большинстве случаев оставался стабильным на протяжении всего периода наблюдения. В результате уменьшилась зависимость пациентов от трансфузий эритроцитосодержащих сред. Уже в первые 12 мес лечения введение эритроцитосодержащих сред не требовалось 16 (41 %) из 39 больных, зависящих от трансфузий в начале терапии. В дальнейшем их число сократилось еще в 4 раза. При анализе динамики уровня тромбоцитов, медиана которых перед началом терапии составила  $143 (11-1101) \times 10^9/\text{л}$ , обратили внимание на нормализацию показателя у большинства пациентов с исходными высокими и низкими значениями уже к 3-му месяцу терапии, в дальнейшем этот эффект, как правило, был стабилен.

При проведении исследования не выявлено статистически значимых корреляций динамики отдельных показателей гемограммы с исследуемыми на этапе начала терапии руксолитинибом параметрами генетического статуса и цитогенетическими аномалиями.

При оценке молекулярно-генетического ответа на терапию руксолитинибом пациентов с мутацией *JAK2V617F* выявлена положительная динамика аллельной нагрузки. Перед назначением руксолитиниба ее медиана составляла 60 (5,7–97,9) %, в дальнейшем в 50 % случаев уровень аллельной нагрузки снизился более чем на 50 %.

Продолжают получать терапию руксолитинибом 60 (57 %) из 106 больных. У 3 (5 %) из них сохраняется полный клинико-гематологический ответ, у 20 (33 %) — частичный, у 4 (7 %) — клиническое улучшение, у 27 (45 %) — стабилизация заболевания. У 6 (10 %) пациентов, продолжающих в настоящее время терапию руксолитинибом, отмечено прогрессирование заболевания: у 2 — развитие БК, у 4 — значительное усугубление фиброза костного мозга, им продолжена терапия руксолитинибом в комбинации с венетоклаксом либо азациитидином. В процессе лечения у 5 (5 %) из 106 пациентов наблюдали эпизоды венозных тромбозов.

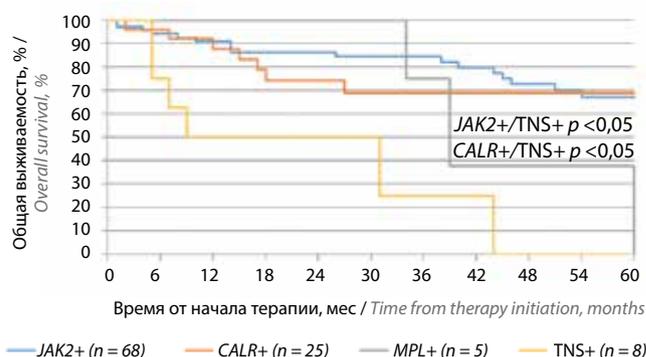
За весь период терапии руксолитинибом случаи прогрессирования заболевания (БК или прогрессирование фиброза) зафиксированы у 29 (27 %) больных. Показатель ВБП к году лечения составил 75 %, к 2 годам — 68 %, к 5 годам — 36 %.

Руксолитиниб был отменен у 46 (43 %) больных. Причинами отмены препарата явились: отсутствие эффекта от терапии — у 9 (8 %), серьезное нежелательное явление (гепатотоксичность — повышение уровня

трансаминаз III–IV степени) — у 4 (4 %), летальные исходы — у 33 (31 %). В 23 (21 %) случаях смерть пациентов была связана с прогрессированием заболевания (развитие БК или прогрессирование миелофиброза), в 10 случаях — с COVID-19. Ранее мы публиковали данные о влиянии новой коронавирусной инфекции на показатель ОБ больных миелофиброзом, получающих руксолитиниб [44].

Показатель ОБ к году лечения составил 86 %, без учета погибших от COVID-19 — 88 %, к 2 годам — 78 и 81 %, к 5 годам — 57 и 62 % соответственно.

В исследовании выявлены статистически значимые различия в показателях ОБ в группах пациентов с TNS и мутациями *JAK2* и *CALR* (рис. 6). Медиана ОБ больных с наличием мутаций *JAK2* и *CALR* не достигнута, у пациентов с мутацией *MPL* составила 39 мес, с TNS — 9 мес. Достоверные ассоциации ВБП с наличием конкретных драйверных мутаций или их отсутствием не обнаружены. Однако надо отметить, что все пациенты с TNS по драйверным мутациям погибли от прогрессирования заболевания.



**Рис. 6.** Общая выживаемость больных миелофиброзом, получавших руксолитиниб, в зависимости от типа драйверной мутации: *JAK2+* ( $n = 68$ ), *CALR+* ( $n = 25$ ), *MPL+* ( $n = 5$ ), трижды негативный статус+ (*TNS+*) ( $n = 8$ )

**Fig. 6.** Overall survival of patients with myelofibrosis receiving ruxolitinib, depending on the type of driver mutation: *JAK2+* ( $n = 68$ ), *CALR+* ( $n = 25$ ), *MPL+* ( $n = 5$ ), triple negative status+ (*TNS+*) ( $n = 8$ )

В исследовании не выявлена ассоциация уровня аллельной нагрузки *JAK2* перед терапией руксолитинибом с показателями ОБ и ВБП. При этом ОБ статистически значимо различалась ( $p = 0,01$ ) в группах пациентов с изначальной аллельной нагрузкой *CALR*  $<50$  и  $\geq 50$  % (рис. 7). Медиана ОБ при 5-летнем сроке наблюдения в когорте с аллельной нагрузкой  $<50$  % не достигнута, в то время как при исходной аллельной нагрузке  $\geq 50$  % она составила 18 мес. Таких различий для показателя ВБП не обнаружено, однако обращает на себя внимание тот факт, что медиана ВБП у больных с изначальной более низкой или высокой нагрузкой *CALR* различалась вдвое — 36 и 18 мес соответственно.

Также были выявлены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия в показателях ОБ и ВБП у пациентов с положительной динамикой аллельной нагрузки

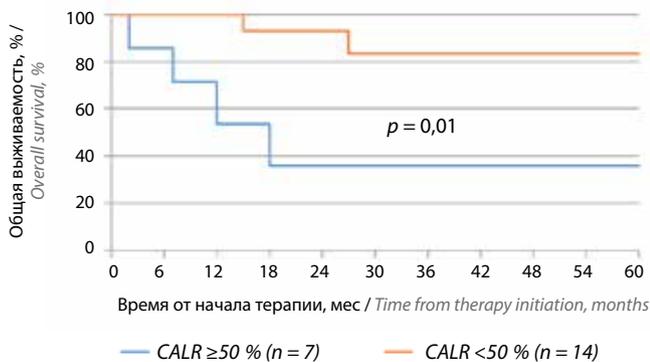


Рис. 7. Общая выживаемость больных миелофиброзом в зависимости от аллельной нагрузки *CALR* перед началом терапии руксолитинибом  
Fig. 7. Overall survival of patients with myelofibrosis, depending on *CALR* allelic load before starting ruxolitinib therapy

*JAK2* (оценивалось снижение на 20 % и более) и ее отсутствием (рис. 8). Медиана показателей ОВ и ВБП у больных с уменьшением нагрузки не достигнута, при отсутствии динамики медиана ОВ составила 41 мес, ВБП – 22 мес.

Кроме этого, обнаружены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия в показателях ОВ и ВБП у пациентов разных групп патогенности дополнительных мутаций (NGS) (рис. 9). Медиана ОВ больных, имеющих патогенные дополнительные мутации, составила 51 мес, в группах с неопределенными и доброкачественными мутациями она не достигнута. Медиана ВБП в этих группах составила 28, 12 и 44 мес соответственно.

В исследовании также выявлены статистически значимые ( $p < 0,05$ ) различия в показателях ОВ и ВБП у больных с разным количеством патогенных мутаций: 1 или  $\geq 2$  (рис. 10). Медиана ОВ в случаях, когда наблюдали

не более 1 патогенной мутации, составила 54 мес, при наличии  $\geq 2$  мутаций – 8 мес, т. е. отличалась в 6,7 раза. Медиана ВБП больных с 1 патогенной мутацией – 38 мес, при наличии  $\geq 2$  – 5 мес, т. е. различалась в 7,5 раза.

В исследовании не наблюдали статистически значимых ассоциаций ОВ и ВБП с кариотипом больных перед назначением руксолитиниба. При этом необходимо отметить, что все пациенты с неблагоприятными цитогенетическими аномалиями имели прогрессирование заболевания и погибли, в то время как медиана ОВ больных с нормальным кариотипом не достигнута, а медиана ВБП соответствовала 49 мес.

В данной работе прогрессирование заболевания рассматривали как наступление БК (у 6,6–7,0 % пациентов) или прогрессирование миелофиброза (у 20,7–22,0 % пациентов). Частота развития БК коррелировала с типом драйверной мутации (рис. 11). Статистически значимые различия наблюдались между группами с мутациями *JAK2* и *MPL* ( $p = 0,001$ ), *JAK2* и *TNS* ( $p = 0,002$ ). Медиана выживаемости без развития БК в группах больных с мутациями *JAK2* и *CALR* не достигнута, при мутации *MPL* она составила 27 мес, при отсутствии драйверных мутаций – 44 мес. У всех пациентов 2 последних групп развился БК.

Выживаемость без развития БК не имела статистически значимой зависимости от уровня аллельной нагрузки *JAK2* на начало терапии руксолитинибом, однако случаев БК у пациентов с аллельной нагрузкой *JAK2*  $< 50$  % не было. Также не выявлено статистически значимых корреляций с нагрузкой *CALR* на начало терапии, при этом у всех пациентов с изначальной аллельной нагрузкой  $\geq 50$  % за 5 лет терапии развился БК. Вариант кариотипа и отнесение больных к различным группам дополнительных патогенных мутаций также достоверно не сказались на показателе выжи-

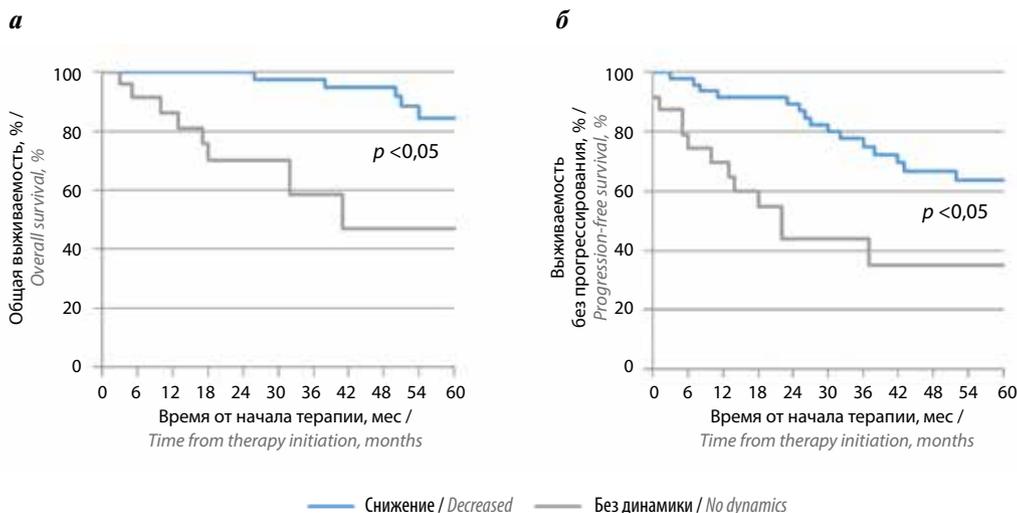
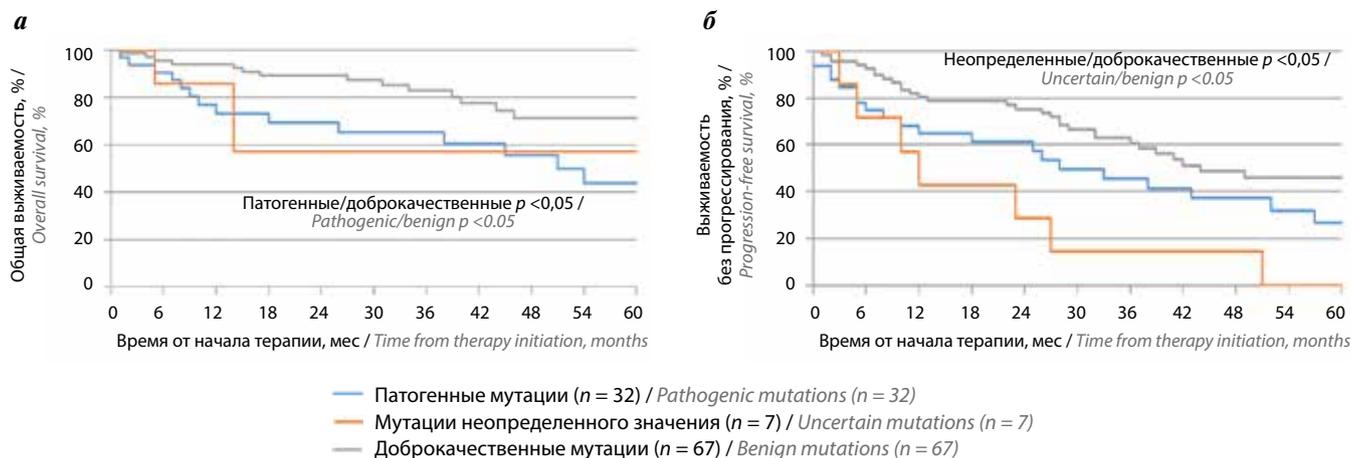
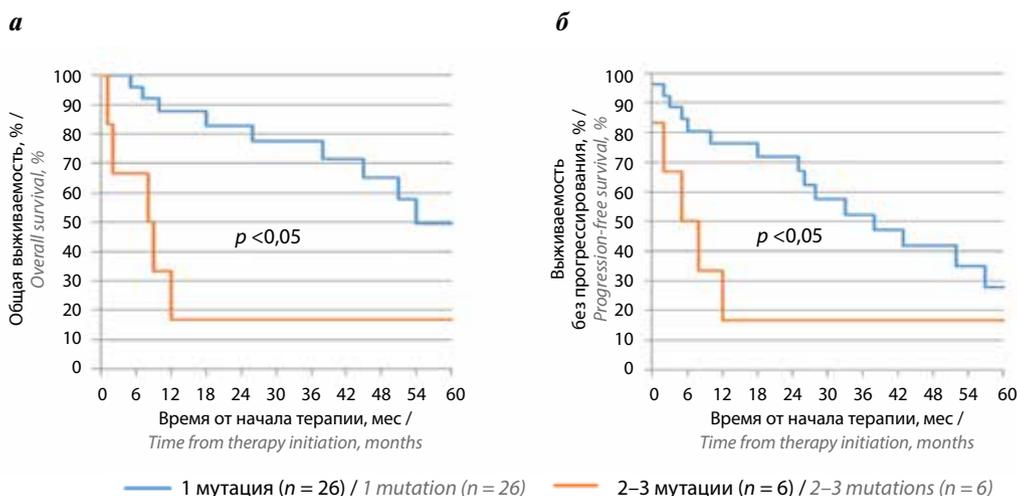


Рис. 8. Общая выживаемость (а) и выживаемость без прогрессирования (б) больных миелофиброзом в зависимости от динамики аллельной нагрузки *JAK2* во время терапии руксолитинибом

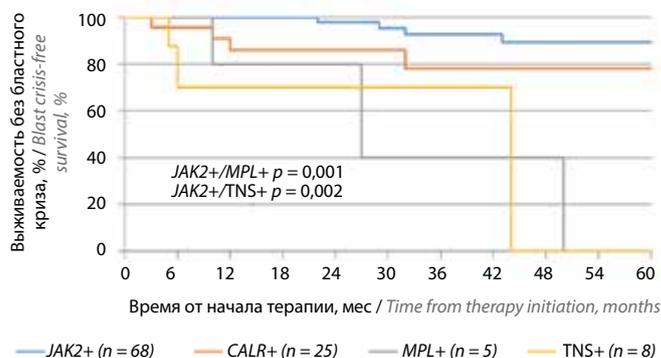
Fig. 8. Overall survival (a) and progression-free survival (b) of patients with myelofibrosis, depending on dynamics of *JAK2* allelic load during ruxolitinib therapy



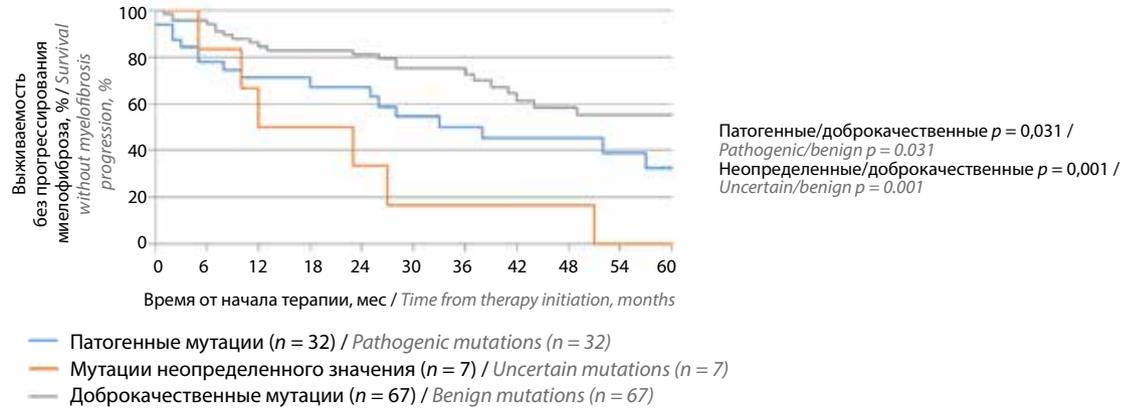
**Рис. 9.** Общая выживаемость (а) и выживаемость без прогрессирования (б) больных миелофиброзом, получавших руксолитиниб, в зависимости от типа выявленных дополнительных мутаций: патогенных (n = 32), неопределенного значения (n = 7), доброкачественных (n = 67)  
**Fig. 9.** Overall survival (a) and progression-free survival (б) of patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib, depending on the type of additional mutations identified: pathogenic mutations (n = 32), mutations of uncertain significance (n = 7), benign mutations (n = 67)



**Рис. 10.** Общая выживаемость (а) и выживаемость без прогрессирования (б) больных миелофиброзом, получавших руксолитиниб, в группе патогенных мутаций (выявленных секвенированием нового поколения) в зависимости от количества патогенных мутаций у пациента: 1 мутация (n = 26), 2–3 мутации (n = 6)  
**Fig. 10.** Overall survival (a) and progression-free survival (б) of patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib, in the group of pathogenic mutations (next generation sequencing), depending on the number of pathogenic mutations detected in the patient: 1 mutation (n = 26), 2–3 mutations (n = 6)



**Рис. 11.** Выживаемость без развития бластного криза у больных миелофиброзом, получавших руксолитиниб, в зависимости от типа драйверной мутации: JAK2+ (n = 68), CALR+ (n = 25), MPL+ (n = 5), трижды негативный статус+ (TNS+) (n = 8)  
**Fig. 11.** Blast crisis-free survival in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib, depending on the type of driver mutation: JAK2+ (n = 68), CALR+ (n = 25), MPL+ (n = 5), triple negative status+ (TNS+) (n = 8)



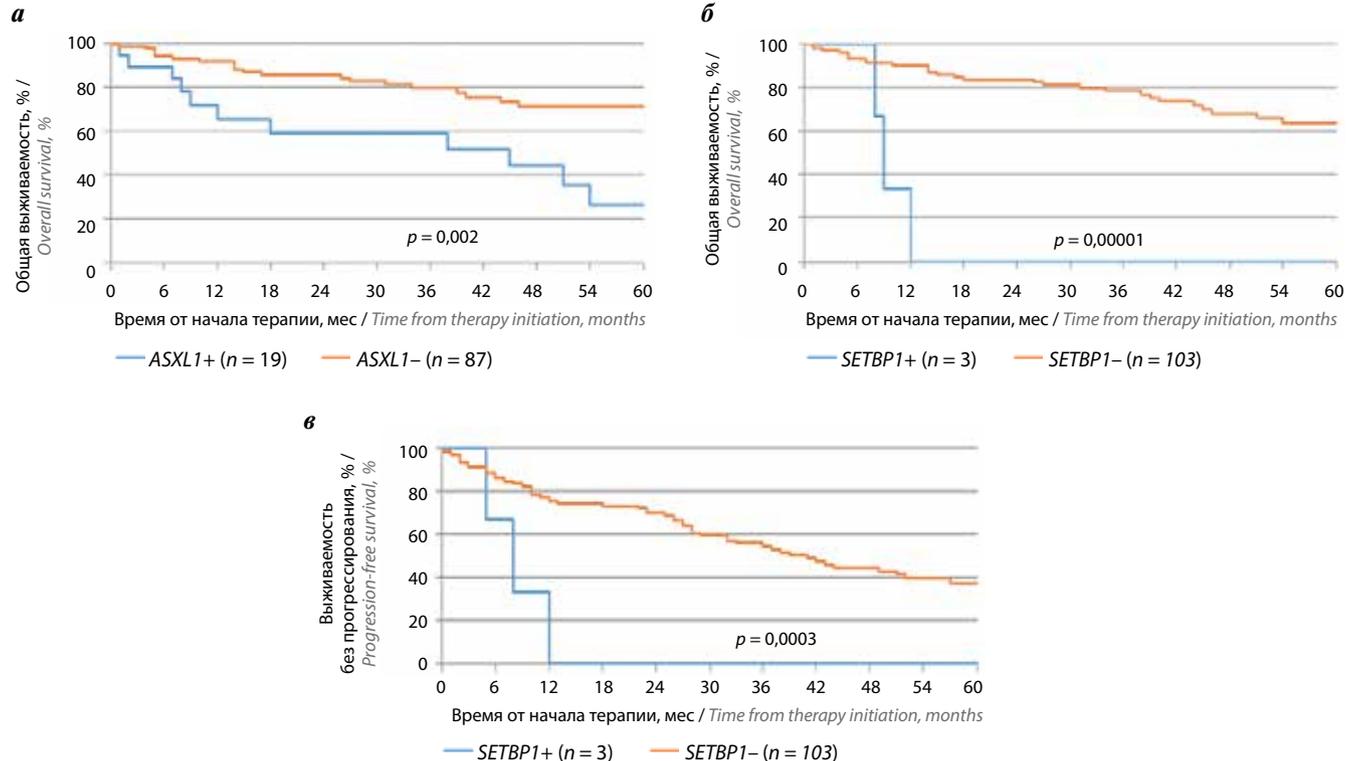
**Рис. 12.** Выживаемость без прогрессирования миелофиброза у больных, получавших руксолитиниб, в зависимости от типа выявленных дополнительных мутаций: патогенных (n = 32), неопределенного значения (n = 7), доброкачественных (n = 67)

**Fig. 12.** Survival without myelofibrosis progression in patients treated with ruxolitinib, depending on the type of additional mutations identified: pathogenic mutations (n = 32), mutations of uncertain significance (n = 7), benign mutations (n = 67)

ваемости без БК. При этом у всех пациентов с неблагоприятным кариотипом он был констатирован.

Выживаемость больных без прогрессирования фиброза статистически значимо ассоциировалась с типом выявленных дополнительных мутаций: корреляции отмечены между патогенными и доброкачественными

( $p = 0,031$ ), неопределенными и доброкачественными ( $p = 0,001$ ) мутациями (рис. 12). В группе пациентов, имеющих лишь доброкачественные мутации, в отличие от 2 других групп, медиана выживаемости без прогрессирования фиброза к сроку терапии 60 мес не достигнута.



**Рис. 13.** Общая выживаемость больных миелофиброзом, получавших руксолитиниб, в зависимости от наличия патогенных мутаций ASXL1 (а) (есть (n = 19), нет (n = 87)), SETBP1 (б) (есть (n = 3), нет (n = 103)) и ВБП в зависимости от наличия патогенных мутаций SETBP1 (в) (есть (n = 3), нет (n = 103))

**Fig. 13.** Overall survival of patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib, depending on the presence of pathogenic ASXL1 (a) (yes (n = 19), no (n = 87)) and SETBP1 (б) (yes (n = 3), no (n = 103)) mutations; progression-free survival depending on the presence of pathogenic SETBP1 mutations (в) (yes (n = 3), no (n = 103))

В отличие от показателя выживаемости без развития БК, выживаемость без прогрессирования фиброза не имела статистически значимой корреляции с типом драйверной мутации. Кроме этого, не выявлено статистически значимой корреляции выживаемости без развития БК с уровнем аллельной нагрузки *JAK2* и *CALR* на начало терапии руксолитинибом. Однако при этом данный показатель практически в 2 раза отличался у пациентов с нагрузкой *CALR*  $\geq 50$  % (медиана 18 мес) и  $< 50$  % (медиана 37 мес). Несмотря на то что не получено статистически значимой ассоциации выживаемости без прогрессирования фиброза с цитогенетической картиной, важно отметить, что у всех пациентов с аномалиями кариотипа наблюдалось прогрессирование фиброза.

Проведена оценка возможного влияния патогенных мутаций отдельных генов на показатели ОВ и ВБП при терапии руксолитинибом. Исследовалась зависимость от наличия патогенных мутаций в конкретных генах. Поскольку с учетом статистической необходимости в расчет брались только группы, состоящие не менее чем из 9 пациентов, таких групп в исследовании оказалось только 3: с наличием мутаций *ASXL1*, *NRAS*, *SETBP1*. Было показано статистически значимое влияние на показатель ОВ патогенных мутаций генов *ASXL1* ( $p = 0,002$ ) и *SETBP1* ( $p = 0,00001$ ) и на ВБП патогенных мутаций гена *SETBP1* ( $p = 0,003$ ) (рис. 13). Несмотря на то что статистически значимых различий в ВБП у пациентов с наличием или отсутствием мутаций *ASXL1* не выявлено, медиана этого показателя в первом случае составила 25 мес, во втором – 42 мес. Существенных различий в показателях выживаемости от присутствия или отсутствия патогенных мутаций *NRAS* не выявлено.

Крайне интересным представлялось исследование значения мутаций различных генов, которые до настоящего времени неизвестны либо мнения о значимости этих мутаций противоречивы. Исследование мутаций неопределенного значения проводили в группе больных, у которых помимо драйверных не было патогенных мутаций. Как и в предыдущем случае, анализировали влияние данных мутаций при их выявлении не менее чем у 9 пациентов. В исследуемую когорту вошли гены *TET2*, *SH2B3*, *PRPF8*, *RUNX1*, *TP53*, *ZRSR2*. Однако статистически значимого влияния присутствия таких мутаций в каждом из данных генов на показатели ОВ и ВБП не выявлено. Медиана ОВ во всех случаях как при наличии мутаций неизвестного значения указанных генов, так и при их отсутствии не была достигнута. Все же наблюдали некоторые различия в показателях медианы ВБП: при наличии мутаций неопределенного значения *TET2* она составила 36 мес, при их отсутствии – не достигнута; при выявлении мутаций *PRPF8* – 36 мес, в противном случае – не достигнута; при мутациях *RUNX1* – также 36 мес, без них – не достигнута; при мутациях *TP53* этот показатель составил 37 и 42 мес, *ZRSR2* – 37 и 41 мес

соответственно. Кроме этого, отмечено, что живы все больные с отсутствием мутаций неопределенного значения *RUNX1*, но и в группе с этими мутациями медиана ОВ не достигнута.

### Обсуждение

Внедрение ингибиторов *JAK2* в клиническую практику позволило добиться контроля над симптомами заболевания, улучшить на несколько лет показатели выживаемости и качество жизни пациентов. Однако это не повлекло значимого увеличения выживаемости и долгосрочных ремиссий.

Руксолитиниб был первым одобренным и внедренным в клиническую практику препаратом, обладающим таргетным воздействием и позволившим контролировать классические ХМПН. Основанием для его регистрации для терапии миелофиброза были результаты исследований COMFORT-I и COMFORT-II, в рамках которых он применялся у пациентов с данной нозологической формой. В долгосрочных исследованиях была показана возможность не только достижения клинико-гематологического ответа, но и снижения аллельной нагрузки *JAK2V617F* и в редких случаях даже получения практически полной молекулярной ремиссии [45].

Но, к сожалению, большинство пациентов, получавших руксолитиниб, с течением времени теряют достигнутый ответ: в исследовании COMFORT-II показано, что сохранение ответа в течение 5 лет возможно менее чем в 50 % случаев [46, 47]. Это обуславливает как необходимость разработки новых лекарственных подходов (новые лекарственные препараты, комбинации руксолитиниба с ингибиторами других мишеней и т. д.), так и совершенствования терапевтической тактики применения самого руксолитиниба. Последнее требует выявления прогностических факторов, оказывающих влияние на эффективность применения руксолитиниба, чтобы в дальнейшем успехи лечения были более значительными. С учетом того, что в основе потери ответа на ингибиторы *JAK2* лежат молекулярные механизмы, необходим поиск предикторов, в том числе на молекулярном уровне.

Определение фенотипических драйверных генных мутаций на сегодняшний день стало обязательным этапом диагностики классических ХМПН, в частности миелофиброза; оно входит в современную классификацию как по версии Всемирной организации здравоохранения, так и по версии ICC [28, 48]. Показано, что в подавляющем большинстве случаев у пациента присутствует лишь 1 драйверная мутация либо выявляется TNS. Что касается других генов, мутационный ландшафт миелофиброза характеризуется повышенной частотой мутаций в генах регуляторов хроматина и в генах сплайсинга [20, 49]. При этом мутации в генах сплайсинга редко встречаются одновременно с мутацией гена *CALR* [18, 20, 50].

Мутации в генах выявляются при диагностике МПН [51] и возникают в процессе трансформации

в БК [52]. Прогрессия ХМПН нередко сопровождается приобретением одной или нескольких мутаций, чаще всего в генах *ASXL1*, *TET2*, *EZH2* и *TP53* [46]. Мутация гена *ASXL1* является наиболее частой приобретенной мутацией в ходе клональной эволюции на фоне терапии ингибиторами *JAK2* [52].

Гетерогенность генетического ландшафта, несомненно, должна оказывать влияние на течение ХМПН, но остается вопрос, насколько она влияет на результаты терапии непосредственно руксолитинибом.

Применение NGS при ХМПН позволяет расширить знания о мутационном ландшафте и способствует определению клинической значимости мутаций. Эта молекулярная информация может использоваться не только в дальнейшем для выявления новых целевых мишеней для терапии миелофиброза и других ХМПН, но и сегодня для верификации или уточнения диагноза, стратификации риска тромбгеморрагических осложнений и прогрессирования заболевания, мониторинга остаточной болезни и ответа на лечение.

Рядом авторов было показано, что присутствие тех или иных мутаций может быть предиктором ответа на лечение ХМПН руксолитинибом [53, 54]. Так, J.Y. Spiegel и соавт. продемонстрировали, что наличие мутаций в генах *ASXL1*, *EZH2*, *CBL*, а также генетических аномалий высокого риска коррелирует с менее продолжительным ответом на ингибиторы *JAK2* [55].

В исследовании К.Р. Patel и соавт. было выявлено, что наличие мутаций *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* связано с менее выраженным ответом со стороны селезенки и более ранним прекращением терапии руксолитинибом. Авторы продемонстрировали, что у пациентов с 3 и более мутациями любого типа вероятность нормализации размера селезенки была ниже более чем в 9 раз, ОБ меньше, чаще наблюдались случаи раннего прекращения лечения [52].

Также К.Р. Patel и соавт. показали, что наличие мутации гена *ASXL1* у пациентов, получающих руксолитиниб, ассоциировано с течением ХМПН с признаками выраженного лейкоцитоза и небольшой тромбоцитопенией [52].

В исследовании, которое было проведено в Италии, на когорте из 464 пациентов, была подтверждена значимость генов сигнального пути *RAS/MAPK* с вовлечением генов *NRAS*, *KRAS* и *CBL* (*RAS/CBL*), несмотря на то что мутации данных генов крайне редко упоминаются при миелофиброзе (значительно чаще при солидных опухолях различной этиологии). В исследовании у пациентов, получавших руксолитиниб ( $n = 61$ ), при медиане наблюдения 30 мес показано, что наличие мутаций генов *RAS/CBL* является независимым предиктором сниженного ответа на терапию руксолитинибом [53]. Более того, в некоторых исследованиях было выявлено функциональное взаимодействие между путями *RAS/MAPK* и *JAK/STAT*, что потенцирует неконтролируемый рост клеток, трансформацию заболевания и резистентность к терапии [56]. Наличие

мутированного *RAS/CBL* в итальянском исследовании было связано с уменьшением ОБ. Было также показано, что первичная резистентность к терапии ингибиторами *JAK2* наблюдалась чаще у пациентов с мутацией *RAS/CBL* (29 % против 2 %;  $p = 0,0015$ ) [53].

В исследовании G. Barosi и соавт. был показан более хороший ответ на терапию ингибиторами *JAK2*, в частности со стороны селезенки, при уровне аллельной нагрузки *JAK2*  $\geq 50$  % [57].

Кроме этого, для прогнозирования ответа на таргетную терапию миелофиброза важно учитывать его подтипы: миелопролиферативный или миелодеплетирующий/цитопенический. Миелопролиферативный вариант чаще встречается при вторичном миелофиброзе (постполицитемический или посттромбоцитемический). Характерной особенностью миелодеплетирующего варианта является наличие цитопении 1 или более линий гемопоэза [58]. При этом показано, что цитопенический фенотип связан с прогностически неблагоприятными мутациями высокого риска и неблагоприятным кариотипом. Вследствие этого у пациентов с миелодеплетирующим вариантом изначально выявляют более высокий риск прогрессирования заболевания (в соответствии с DIPSS, MYSEC-PM) [53, 58].

В нашей работе проведена попытка выявления генетических предикторов эффективности лечения руксолитинибом в когорте из 106 пациентов с миелофиброзом. Исследование касалось оценки генетического статуса пациентов перед началом терапии руксолитинибом и попытки выявления генетических маркеров, ассоциированных с показателями эффективности лечения. Проводились оценка цитогенетической картины, поиск драйверных мутаций, исследование их аллельной нагрузки (для *JAK2* в динамике), а также определение дополнительных мутаций, которые могли бы иметь различное клиническое значение. Дополнительные мутации были выявлены в 35 генах исследуемой панели, при этом патогенные мутации с доказанным негативным клиническим значением определялись лишь в 13 генах, мутации неопределенного значения — в 29, доброкачественные — в 16. Выполнена оценка влияния этих факторов на динамику симптомов опухолевой интоксикации, уменьшение размера селезенки, достижение клинико-гематологического ответа, показатели ОБ, ВБП, выживаемости без БК и без прогрессирования миелофиброза в процессе таргетной терапии.

Было показано, что исследуемые генетические факторы в данной когорте больных не имели достоверной корреляции с динамикой уменьшения выраженности конституциональной клинической симптоматики, нормализацией размера селезенки, изменениями конкретных показателей диаграммы. При этом у пациентов с мутациями *JAK2* и *CALR* клинико-гематологический ответ был сопоставим и выгодно отличался от такового в группах больных с мутацией *MPL* и *TNS*. У пациентов с исходно более низкой аллельной нагрузкой

*JAK2* и *CALR* (<50 %) наблюдалась более высокая частота клинико-гематологического ответа по сравнению группой больных с аллельной нагрузкой драйверных мутаций  $\geq 50$  %.

В исследовании выявлены статистически значимые различия в показателях ОВ в группах пациентов: с TNS и мутациями *JAK2* и *CALR* ( $p < 0,05$ ); с аллельной нагрузкой *CALR* до начала терапии руксолитинибом <50 и  $\geq 50$  % ( $p = 0,01$ ); с наличием или отсутствием положительной динамики аллельной нагрузки *JAK2* в процессе лечения ( $p < 0,05$ ); отнесенных к разным группам патогенности дополнительных мутаций ( $p < 0,05$ ); с различным количеством патогенных мутаций (1 или  $\geq 2$ ); с наличием или отсутствием патогенных мутаций генов *ASXL1* ( $p = 0,002$ ) и *SETBP1* ( $p = 0,00001$ ).

В отличие от ОВ, ВБП не коррелировала с вариантом драйверной мутации или ее отсутствием, тем не менее все пациенты с TNS погибли от прогрессирования заболевания. В исследовании выявлены статистически значимые различия в показателях ВБП в когортах больных: с наличием или отсутствием положительной динамики аллельной нагрузки *JAK2* в процессе лечения ( $p < 0,05$ ); отнесенных к разным группам патогенности дополнительных мутаций ( $p < 0,05$ ); с различным количеством патогенных мутаций (1 или  $\geq 2$ ); наличием или отсутствием патогенной мутации гена *SETBP1* ( $p = 0,003$ ).

Результаты исследования показали, что выживаемость без развития БК коррелировала с типом драйверной мутации: статистически значимые различия наблюдались между группами с мутациями *JAK2* и *MPL* ( $p = 0,001$ ), *JAK2* и TNS ( $p = 0,002$ ). В то же время выживаемость больных без прогрессирования фиброза достоверно коррелировала с типом выявленных дополнительных мутаций: корреляции отмечены между патогенными и доброкачественными ( $p = 0,031$ ), неопределенными и доброкачественными ( $p = 0,001$ ) мутациями.

Из данных литературы известно об отрицательном влиянии TNS на течение миелофиброза. В проведенном исследовании показано, что и при таргетной терапии руксолитинибом данная зависимость сохраняется [59].

В отличие от работы G. Varosi и соавт. [57], в нашем исследовании не наблюдалось достоверной корреляции ОВ с уровнем аллельной нагрузки *JAK2* перед началом терапии. Однако имело значение как для ОВ, так и для ВБП снижение на 20 % и более аллельной нагрузки *JAK2* в процессе лечения.

Согласуются с данными литературы полученные данные о значимости для ОВ и ВБП присутствия дополнительных патогенных мутаций как предикторов ответа на лечение ХМПН руксолитинибом [49]. Как показали результаты нашей работы, важным для ОВ и ВБП при терапии руксолитинибом является и количество пато-

генных мутаций, что также соответствует немногочисленным опубликованным данным [52].

Высокая корреляция наличия патогенной мутации гена *ASXL1* со снижением ОВ также согласуется с данными К.Р. Patel и соавт. [52]. В источниках литературы нами не найдено сведений, согласующихся с полученными данными об отрицательном влиянии патогенной мутации *SETBP1* на ОВ и ВБП. В отличие от публикации G. Coltro и соавт., сообщивших о мутации *NRAS* как о независимом предикторе сниженного ответа на терапию руксолитинибом [53], мы не получили такой зависимости в нашей группе пациентов.

В настоящем исследовании также не получено статистически значимых различий в показателях ОВ и ВБП в зависимости от исходной цитогенетической картины перед назначением руксолитиниба. Однако мы знаем, что неблагоприятные цитогенетические аномалии всегда означают плохой прогноз течения ХМПН. Вероятно, отсутствие зависимости связано с малочисленностью группы больных с такими аномалиями в исследованной когорте. Стоит отметить, что все больные этой группы погибли от прогрессирования заболевания. При этом медиана ОВ больных с нормальным кариотипом не была достигнута, а медиана ВБП соответствовала 49 мес.

Остальные исследуемые факторы не имели статистической значимости для ОВ, ВБП, выживаемости без БК, выживаемости без прогрессирования фиброза, но в ряде случаев ассоциировались со значительными отличиями медианы этих показателей.

### Заключение

В настоящее время самым перспективным направлением терапии миелофиброза является применение препаратов с патогенетическим таргетным воздействием на JAK-киназы и другие молекулярные мишени, что способствует редукции опухолевого клона и вследствие этого – повышению показателей ОВ и ВБП, улучшению клинической симптоматики, качества жизни пациентов. Однако ограниченность терапевтического эффекта как руксолитиниба, так и других таргетных препаратов, предполагает поиски факторов, оказывающих влияние на потерю достигнутого ответа. Показатели, негативно влияющие на развитие миелофиброза, сегодня известны, но данные об отрицательных факторах прогноза в условиях таргетного воздействия немногочисленны. Проведенная работа позволила выявить генетические маркеры, отрицательно сказывающиеся на эффективности терапии руксолитинибом. Это добавит еще один фрагмент в общую картину представления о рисках лечения миелофиброза, что, несомненно, важно для работы клинициста.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Adamson J.W., Fialkow P.J. The pathogenesis of myeloproliferative syndromes. *Br J Haematol* 1978;38(3):299–303. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1978.tb01048.x
- Marneth A.E., Mullally A. The molecular genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2020;10(2):a034876. DOI: 10.1101/cshperspect.a034876
- James C., Ugo V., Le Couédic J.P. et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434(7037):1144–8. DOI: 10.1038/nature03546
- 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(9464):1054–61. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)71142-9
- 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):387–97. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.023
- 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):1779–90. DOI: 10.1056/NEJMoa051113
- Scott L.M., Tong W., Levine R.L. et al. *JAK2* exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 2007;356(5):459–68. DOI: 10.1056/NEJMoa065202
- 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
- Guglielmelli P., Lasho T.L., Rotunno G. et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28:1804–10. DOI: 10.1038/leu.2014.76
- 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
- Chen E., Mullally A. How does *JAK2V617F* contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2014;2014(1):268–76. DOI: 10.1182/asheducation-2014.1.268
- Milosevic J.D., Schischlik F., Jäger R. et al. Overexpression of PD-L1 correlates with *JAK2-V617F* mutational burden and is associated with chromosome 9p uniparental disomy in MPN. *Blood* 2020;136:24.
- Koschmieder S., Mughal T., Hasselbalch H.C. et al. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia* 2016;30:1018–24.
- Gleitz H., Dugourd A.J.F., Leimkuhler N.B. et al. Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood* 2020;136(18):2051–64. DOI: 10.1182/blood.2019004095
- Verstovsek S., Manshouri T., Pilling D. et al. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med* 2016;213(9):1723–40. DOI: 10.1084/jem.20160283
- 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
- Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;369(25):2379–90. DOI: 10.1056/NEJMoa1311347
- Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J. et al. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013;369:2391–405. DOI: 10.1056/NEJMoa1312542
- Elf S., Abdelfattah N.S., Chen E. et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov* 2016;6:368–81. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1434
- Lundberg P., Karow A., Nienhold R. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123:2220–8. DOI: 10.1182/blood-2013-11-537167
- Angona A., Fernández-Rodríguez C., Alvarez-Larrán A. et al. Molecular characterisation of triple negative essential thrombocythemia patients by platelet analysis and targeted sequencing. *Blood Cancer J* 2016;6(8):e463. DOI: 10.1038/bcj.2016.75
- Tefferi A., Guglielmelli P., Larson D.R. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014;124(16):2507–13. DOI: 10.1182/blood-2014-05-579136
- 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
- Morsia E., Torre E., Poloni A. et al. Molecular pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: from molecular landscape to therapeutic implications. *Int J Mol Sci* 2022;23(9):4573. DOI: 10.3390/ijms23094573
- Vainchenker W., Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016;129(6):676–9. DOI: 10.1182/blood-2016-10-695940
- Vénney D., Mohd-Sarip A., Mills K.I. The impact of epigenetic modifications in myeloid malignancies. *Int J Mol Sci* 2021;22(9):5013. DOI: 10.3390/ijms22095013
- Bartels S., Faisal M., Büsche G. et al. Mutations associated with age-related clonal hematopoiesis in PMF patients with rapid progression to myelofibrosis. *Leukemia* 2020;34(5):1364–72. DOI: 10.1038/s41375-019-0668-5
- Khoury J.D., Solary E., Abla O. et al. The 5<sup>th</sup> edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022;36(7):1703–19. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1
- Chifotides H.T., Verstovsek S., Bose P. Association of myelofibrosis phenotypes with clinical manifestations, molecular profiles, and treatments. *Cancers (Basel)* 2023;15(13):3331. DOI: 10.3390/cancers15133331
- Guglielmelli P., Biamonte F., Score J. et al. *EZH2* mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood* 2011;118(19):5227–34. DOI: 10.1182/blood-2011-06-363424
- 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
- Greenfield G., McMullin M.F., Mills K. Molecular pathogenesis of the myeloproliferative neoplasms. *J Hematol Oncol* 2021;14(1):103. DOI: 10.1186/s13045-021-01116-z
- 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):2391–405. DOI: 10.1182/blood-2016-03-643544
- Tefferi A., Thiele J., Orazi A. et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110(4):1092–7. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083501
- Varricchio L., Mancini A., Migliaccio A.R. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert Rev Hematol* 2009;2(3):315–34. DOI: 10.1586/ehm.09.17
- Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med* 2000;342(17):1255–65. DOI: 10.1056/NEJM200004273421706
- Cervantes F., Passamonti F., Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2008;22(5):905–14. DOI: 10.1038/leu.2008.72
- Абдулкадыров К.М., Шуваев В.А., Мартынкевич И.С. Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза. *Вестник гематологии* 2013;9(3):44–78. Abdulkadyrov K.M., Shuvaev V.A., Martynkevich I.S. Diagnostic criteria and modern therapy approaches of primary myelofibrosis.

- Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology 2013;9(3):44–78. (In Russ.).
39. Ионова Т.И., Виноградова О.Ю., Ефремова Е.В. и др. Разработка и результаты апробации русской версии опросника MPN10 для оценки симптомов у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями с учетом международных рекомендаций Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика 2020;13(2):176–84. Ionova T.I., Vinogradova O.Yu., Efremova E.V. et al. Development and validation results of the Russian MPN10 questionnaire version for symptom assessment in patients with myeloproliferative neoplasms compliant with international recommendations. Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamentalnye issledovaniya i klinicheskaya praktika = Clinical Oncohematology. Basic Research and Clinical practice 2020;13(2):176–84. (In Russ.).
  40. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Ковригина А.М. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, первичного миелофиброза) (редакция 2020 г.). Клиническая онкогематология 2021;14(2):262–98. Melikyan A.L., Turkina A.G., Kovrigina A.M. et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of Ph-negative myeloproliferative diseases (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (2020 edition). Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2021;14(2):262–98. (In Russ.).
  41. Gupta V., Hari P., Hoffman R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. Blood 2012;120(7):1367–79. DOI: 10.1182/blood-2012-05-399048
  42. Li M.M., Datto M., Duncavage E.J. et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn 2017;19(1):4–23. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002
  43. Horak P., Griffith M., Danos A.M. et al. Standards for the classification of pathogenicity of somatic variants in cancer (oncogenicity): joint recommendations of Clinical Genome Resource (ClinGen), Cancer Genomics Consortium (CGC), and Variant Interpretation for Cancer Consortium (VICC). Genet Med 2022;24(5):986–98. DOI: 10.1016/j.gim.2022.01.001
  44. Виноградова О.Ю., Панкрашкина М.М., Шихбабаева Д.И. и др. Возможности таргетной терапии миелофиброза: опыт применения в Москве. Онкогематология 2022;17(4):94–105. DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-94-105 Vinogradova O.Yu., Pankrashkina M.M., Shikhbabaeva D.I. et al. Possibilities of targeted therapy for myelofibrosis: Moscow experience. Onkogematologiya = Oncohematology 2022;17(4):94–105. (In Russ.). DOI: 10.17650/1818-8346-2022-17-4-94-105
  45. Verstovsek S., Gotlib J., Mesa R.A. et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. J Hematol Oncol 2017;10(1):156. DOI: 10.1186/s13045-017-0527-7
  46. Harrison C.N., Vannucchi A.M., Kiladjan J.J. et al. Long-term findings from COMFORT-II, a Phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. Leukemia 2016;30(8):1701–7. DOI: 10.1038/leu.2016.148
  47. Palandri F., Breccia M., Mazzoni C. et al. Ruxolitinib in cytopenic myelofibrosis: response, toxicity, drug discontinuation, and outcome. Cancer 2023;129(11):1704–13. DOI: 10.1002/cncr.34722
  48. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R.P. et al. International consensus classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: integrating morphological, clinical, and genomic data. Blood 2022;140:1200–28.
  49. Grinfeld J., Nangalia J., Baxter E.J. et al. Classification and personalized prognosis in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med 2018;379(15):1416–30. DOI: 10.1056/NEJMoa1716614
  50. Bartels S., Lehmann U., Büsche G. et al. *SRSF2* and *U2AF1* mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently reoccur after allogeneic stem cell transplantation. Leukemia 2015;29(1):253–5. DOI: 10.1038/leu.2014.277
  51. Abdel-Wahab O., Manshoury T., Patel J. et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res 2010;70(2):447–52. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3783
  52. Patel K.P., Newberry K.J., Luthra R. et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. Blood 2015;126(6):790–7. DOI: 10.1182/blood-2015-03-633404
  53. Coltro G., Rotunno G., Mannelli L. et al. RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. Blood Adv 2020;4(15):3677–87. DOI: 10.1182/bloodadvances.2020002175
  54. Braun B.S., Shannon K. Targeting Ras in myeloid leukemias. Clin Cancer Res 2008;14(8):2249–52. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1005
  55. Spiegel J.Y., McNamara C., Kennedy J.A. et al. Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. Blood Adv 2017;1(20):1729–38. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017009530
  56. Stivala S., Codilupi T., Brkic S. et al. Targeting compensatory MEK/ERK activation increases JAK inhibitor efficacy in myeloproliferative neoplasms. J Clin Invest 2019;129(4):1596–611. DOI: 10.1172/JCI98785
  57. Barosi G., Klersy C., Villani L. et al. JAK2(V617F) allele burden  $\geq 50\%$  is associated with response to ruxolitinib in persons with MPN-associated myelofibrosis and splenomegaly requiring therapy. Leukemia 2016;30(8):1772–5. DOI: 10.1038/leu.2016.45
  58. Chifotides H.T., Masarova L., Verstovsek S. SOHO State of the Art Updates and Next Questions: novel therapeutic strategies in development for myelofibrosis. Clin Lymphoma Myeloma Leuk 2023;23(4):219–31. DOI: 10.1016/j.clml.2022.12.014
  59. Della Porta M.G., Malcovati L. et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol 2009;27(5):754–72. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.2246

**Благодарность.** Авторы благодарят сотрудников лаборатории молекулярной генетики ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» и ее руководителя д.б.н. Ирину Степановну Мартынкевич за сохранение ряда образцов пациентов ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы» и предоставление их для исследования.

**Acknowledgement.** Authors gratitude the Laboratory of Molecular Genetics of the Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology and its head, Doctor of Biological Sciences Irina S. Martynkevich for saving a number of the samples of Botkin Hospital patients and providing them for research.

#### Вклад авторов

О.Ю. Виноградова: разработка концепции и дизайна исследования, сбор и обработка данных, ведение больных, анализ и интерпретация данных, написание статьи, окончательное одобрение рукописи, административная поддержка;

Д.И. Шихбабаева, М.М. Панкрашкина: сбор и обработка данных, ведение больных, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи;

Ю.Н. Кобзев: проведение лабораторных исследований, анализ и интерпретация данных, подготовка статьи;

А.Л. Неверова: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, написание статьи;  
 С.Г. Малахо: проведение лабораторных исследований, анализ и интерпретация данных;  
 М.В. Черников: сбор и обработка данных, статистический анализ;  
 М.А. Мурзабекова, Л.Б. Егорян: сбор и обработка данных, ведение больных;  
 А.Г. Попова: сбор и обработка данных;  
 А.В. Кречетова: подготовка статьи;  
 В.В. Птушкин: окончательное одобрение рукописи, административная поддержка.

#### Authors' contributions

O.Yu. Vinogradova: concept and design development, data collection, patient management, data analysis and interpretation, article writing, final article approval, administrative support;  
 D.I. Shikhbabaeva, M.M. Pankrashkina: data collection, patient management, data analysis and interpretation, article writing;  
 Yu.N. Kobzev: laboratory research, data analysis and interpretation, article writing;  
 A.L. Neverova: data collection, data analysis and interpretation, article writing;  
 S.G. Malakho: laboratory research, data analysis and interpretation;  
 M.V. Chernikov: data collection and analysis, statistical analysis;  
 M.A. Murzabekova, L.B. Egoryan: data collection and analysis, patient management;  
 A.G. Popova: data collection and analysis;  
 A.V. Krechetova: article writing;  
 V.V. Ptushkin: final article approval, administrative support.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

О.Ю. Виноградова / O.Yu. Vinogradova: <https://orcid.org/0000-0002-3669-0141>  
 Д.И. Шихбабаева / D.I. Shikhbabayeva: <https://orcid.org/0000-0002-1384-1621>  
 Ю.Н. Кобзев / Yu.N. Kobzev: <https://orcid.org/0000-0001-7542-9272>  
 А.Л. Неверова / A.L. Neverova: <https://orcid.org/0000-0001-9524-7070>  
 М.М. Панкрашкина / M.M. Pankrashkina: <https://orcid.org/0000-0002-5658-9729>  
 С.Г. Малахо / S.G. Malakho: <https://orcid.org/0009-0001-6019-8704>  
 М.В. Черников / M.V. Chernikov: <https://orcid.org/0000-0002-7869-209X>  
 А.Г. Попова / A.G. Popova: <https://orcid.org/0000-0001-5376-7473>  
 Л.Б. Егорян / L.B. Egoryan: <https://orcid.org/0000-0001-8077-5225>  
 А.В. Кречетова / A.V. Krechetova: <https://orcid.org/0009-0003-1871-7069>  
 В.В. Птушкин / V.V. Ptushkin: <https://orcid.org/0000-0002-9368-6050>

#### Конфликт интересов

О.Ю. Виноградова, Д.И. Шихбабаева, М.М. Панкрашкина: лекторские гонорары, участие в клинических исследованиях ООО «Новартис фарма».  
 В.В. Птушкин: лекторские гонорары ООО «Новартис фарма».  
 Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interest

O.Yu. Vinogradova, D.I. Shikhbabaeva, M.M. Pankrashkina: lecture fees, participation in clinical studies of Novartis Pharma LLC.  
 V.V. Ptushkin: lecture fees from Novartis Pharma LLC.  
 The other authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Статья подготовлена по результатам исследований, выполненных за счет бюджетных средств по государственному заданию ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы».

**Funding.** The article was prepared based on the results of studies carried out at the expense of budgetary funds on the state assignment of the S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department.

#### Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Московского городского гематологического центра ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы».

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 Moscow City Hematology Center, S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow Healthcare Department.

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