СБОРНИК ТРУДОВ К 90-ЛЕТИЮ СТЕРНАЛЬНОЙ ПУНКЦИИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОГО МИЕЛОФИБРОЗА

Л.Б. Полушкина [1], И.С. Мартынкевич [1], В.А. Шуваев [1], М.С. Фоминых [1], Е.В. Карягина [2], А.М. Саврилова [3], К.М. Абдулкадыров [1]

[1] Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА, Санкт-Петербург, Россия
[2] Городская больница № 15, Санкт-Петербург, Россия
[3] Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

Molecular and cytogenetic features of primary myelofibrosis

L.B. Polushkina [1], I.S. Martynkevich [1], V.A. Shuvaev [1], M.S. Fominykh [1], E.V. Karyagina [2], A.M. Savrilova [3], K.M. Abdulkadyrov [1]

[1] Russian research institute of hematology and transfusiology, Saint Petersburg, Russia
[2] City hospital № 15, Saint Petersburg, Russia
[3] Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia

Первичный миелофиброз – миелопролиферативное новообразование, характеризующееся фиброзом костного мозга и риском лейкемической трансформации. Клональный гемопоэз при первичном миелофиброзе обусловлен трансформацией гемопоэтической стволовой клетки в результате соматических мутаций генома, которые могут приводить к нарушениям пролиферации и дифференцировки. Вариабельность клинического течения и прогноз первичного миелофиброза во многом определяется спектром молекулярных и цитогенетических дефектов, обнаруживаемых в опухолевых клетках.

В обзоре описаны известные на сегодняшний день соматические мутации, определяемые у пациентов с первичным миелофиброзом, и рассмотрены возможные пути их патогенетического действия. Проанализированы данные о влиянии молекулярно-генетических и цитогенетических аномалий на клинические особенности и прогноз заболевания.

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

Primary myelofibrosis is a myeloproliferative neoplasm characterized by bone marrow fibrosis and the risk of leukemic transformation. Clonal hematopoiesis underlying this pathology is caused by transformation of hematopoietic stem cells by somatic mutations of the genome which may lead to both aberrant proliferation and differentiation. The variability of the clinical course and prognosis of primary myelofibrosis is largely determined by the spectrum of molecular and cytogenetic defects detected in tumor cells.

This review describes the currently known somatic mutations defined in patients with primary myelofibrosis and possible ways of their pathogenic action are discussed. Recent data of the impact of molecular and cytogenetic abnormalities in clinical features and prognosis of the disease were analyzed.

Keywords: primary myelofibrosis, mutations, karyotype, prognosis.

Введение

Среди классических Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН) первичный миелофиброз (ПМФ) — наиболее серьезная патология, приводящая к значительному снижению качества и продолжительности жизни пациентов. Как и истинная полицитемия (ИП) и эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), ПМФ является клональным заболеванием, развивающимся в результате трансформации гемопоэтической стволовой клетки (ГСК). Трансформированная ГСК приобретает пролиферативное преимущество, реализуемое в случае ПМФ на уровне, главным образом, мегакариоцитарной линии и в меньшей степени – гранулоцитарной. Данный процесс сопровождается сокращением объема «продуктивной» стромы костного мозга в результате фиброза и остеосклероза и угнетением кроветворения с развитием цитопений [1].

Префибротическая стадия ПМФ во многом сходна по своим клиническим проявлениям с ЭТ. В постановке окончательного диагноза при этом ведущую роль играют результаты морфологического исследования мегакариоцитов, которые при ПМФ обнаруживают признаки дисплазии [2, 3]. Можно, таким образом, утверждать, что ПМФ является более «продвинутой» стадией МПН, когда клетки патологического клона имеют нарушения как пролиферации, так и дифференцировки.

e-mail: m.s.fominyh@gmail.com

Мутации и патогенез

Мутации генов сигнальных путей

В настоящее время установлена патогенетическая причина порядка 90% всех МПН, в том числе ПМФ. Исходя из типа «пусковой» мутации в ГСК, в дальнейшем выступающей маркером клонального процесса (маркером клональности (МК)), выделяют *JAK2V617F, MPL* и *CALR*-положительные МПН. При ПМФ частота обнаружения данных маркеров составляет 60–65%, 5–8% и 17–20% соответственно [4, 5].

Мутация *JAK2V617F* затрагивает псевдокиназный домен тирозинкиназы JAK2, приводя к активации киназного домена и подавлению физиологического ингибирования янускиназы. В результате происходит цитокин-независимая или цитокин-гиперчувствительная активация JAK2/STAT5 сигнального пути,

обуславливающая пролиферативное преимущество клетки [6]. Этот же сигнальный путь оказывается затронут и при мутациях гена *MPL*. При замене аминокислоты Trp в 515 положении белка MPL рецептор тромбопоэтина (TPO) c-MPL активируется независимо от стимуляции цитокинами [6, 7].

Пока не до конца ясна роль мутантного CALR в активации STAT5, регистрируемой в *CALR*$^{+}$-клетках. Физиологически CALR не является сигнальной молекулой. Это шаперон эндоплазматического ретикулума (ЭР) – белок, обеспечивающий конденсацию вновь синтезируемых гликопротеинов для достижения стабильной нативной структуры и модулирующий гомеостаз кальция [8]. Полагают, что мутантный CALR взаимодействует с рецептором TPO c-MPL и индуцирует его структурные изменения, достаточные для активации JAK2 (рис. 1). Далее запускаются процессы фосфорилирования сигнальных молекул ERK1/2 и STAT5. Этот процесс оказывается возможным благодаря смене отрицательного заряда домена С белка CALR на положительный в результате делеций/инсерций в гене *CALR*, приводящих к сдвигу рамки считывания и изменению С-концевой последовательности полипептида [9]. Структурно белок CALR представлен тремя доменами: N, P и C. N-домен выполняет функции шаперона, но также может связывать c-MPL. В белке дикого типа этому противодействует домен P. Мутантный С-конец блокирует P-домен, освобождая N-домен и делая возможным его связывание с c-MPL. Таким образом, происходит TPO-независимая активация JAK2. При del52 (мутация типа 1) теряется практически весь отрицательный заряд С-конца молекулы, в то время как при ins5 (мутация типа 2) – только половина [10]. Принимая это во внимание, можно ожидать, что при мутациях типа 1 CALR прочнее связывает c-MPL и сильнее изменяет его структуру. Это приводит к более выраженной цитокин-независимой пролиферации. На мышиных моделях показано, что при del52 процесс замещения ретикулиновых волокон в костном мозге более активен и быстрее приводит к фиброзу, чем при ins5 [11]. С этим фактом согласуются данные зарубежных авторов, показавших, что частота обнаружения мутаций 1 типа при ПМФ выше, чем мутаций 2 типа (в исследовании E. Rumi с соавт. (2014), 72% и 28% соответственно) [12, 13]. При этом выдвигается гипотеза, что фенотип ПМФ при ins5 формируется под действием дополнительных мутаций. Поскольку мутация в гене *CALR* является, по всей видимости, инициирующим событием неогенеза при МПН, в отсутствии дополнительных генетических нарушений заболевание может длительное время протекать индолентно, и лишь при приобретении дополнительных цитогенетических или молекулярных поломок происходит манифестация заболевания [13].

Еще одна возможная патогенетическая причина дисмиелопоэза при мутациях *CALR* – нарушение обмена Ca^{2+} в клетке. Показано, что цитозольный кальций регулирует функции мегакариоцитов и тромбоцитов. Кальретикулин связывает и удерживает ионы кальция в ЭР. Мутантный белок утрачивает эту способность, что приводит к утечке Ca^{2+} из ЭР в цитоплазму, где он участвует в процессах проведения сигнала [14].

Вне ЭР кальретикулин обнаруживают в меж- и внеклеточном пространстве, а также на поверхности клеток. Вероятно, секретированный мутантный белок может активировать другие клетки, особенно моноциты, провоцируя выработку воспалительных цитокинов, большинство из которых участвует в передаче сигнала по JAK/STAT-пути [15].

У небольшой доли пациентов с ПМФ обнаруживают мутации генов *LNK* (0–4%) и *CBL* (4–6%), продукты которых также участвуют в проведении сигнала для выживания и пролиферации клеток. Данные мутации могут присутствовать как изолированно, так и в сочетании с МК [16, 17].

Таким образом, для большинства МПН, в частности ПМФ, можно определить мутацию, активирующую JAK/STAT сигнальный путь, как маркер клонального процесса [18]. У 10–15% пациентов с ПМФ соответствующие маркеры не обнаруживают – их относят в группу три-негативных (ТН) МПН. Это довольно гетерогенная группа, в которую могут попасть пациенты с нетипичными мутациями в генах *JAK2, MPL*, поликлональными заболеваниями наследственной природы, а также миелодиспластическим синдромом (МДС), ассоциированным с миелофиброзом. Последние имеют весьма неблагоприятный прогноз течения заболевания, что сказывается на прогнозе для всей группы ТН пациентов в целом.

Эпигенетические и сплайсосомные мутации

Мутации генов сигнальных путей – не единственные нарушения, обнаруживаемые в клетках патологического клона. Полноэкзомное секвенирование позволило выявить также мутации генов эпигенетических регуляторов (*TET2, DNMT3A, ASXL1,*

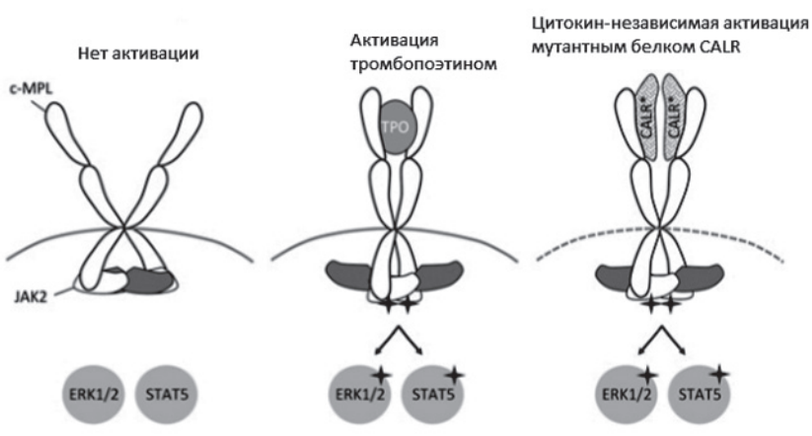

Рис. 1. Активация рецептора тромбопоэтина c-MPL мутантным белком CALR [9]

EZH2, IDH1/2) и компонентов сплайсосом (*SRSF2, UA2F1, SF3B1*), встречающиеся как отдельно, так и сочетанно с мутациями МК *JAK2, MPL, CALR* [19–22].

Эпигенетическая регуляция транскрипции заключается в изменении экспрессии генов путем модификации хроматина. Ремоделирование хроматина осуществляется посредством двух основных механизмов: пост-трансляционной модификацией гистонов и ДНК-метилированием регуляторных последовательностей генов. Изменение активности ферментов, катализирующих данные процессы, может приводить к существенным изменениям в процессах эпигенетического контроля транскрипции и запускать механизмы канцерогенеза.

Продукт гена *EZH2* входит в качестве каталитического компонента – H3K27 метилтрансферазы – в мультибелковый ферментный комплекс PRC2 (polycomb repressive complex 2), инициирующий и поддерживающий подавление транскрипции через специфическую пост-трансляционную модификацию гистонов. PRC2 относится к группе белков Polycomb Group (PcG), имеющих первостепенное значение в процессах дифференцировки клеток. При миелоидных неоплазиях выявляют мутации, приводящие к потере функций *EZH2*, но точные механизмы действия мутантного белка не определены [23]. В экспериментах in vivo удаление Ezh2 в гемопоэтическом компартменте приводило к дефектам В-лимфопоэза без влияния на миелопоэз [24]. При удалении же неэнзиматических компонентов PRC2 наблюдали миелоидную трансформацию и усиленное обновление компартмента ГСК. [23]. Вместе с тем, мутации других компонентов PRC2 (EED, SUZ12, RBAP48) при МПН – событие крайне редкое. Гиперэкспрессия EZH2 также приводит к миелоидной трансформации, что говорит о роли *EZH2* не только как гена-супрессора опухоли, но и онкогена [25]. При МПН мутации гена *EZH2* обнаруживают почти исключительно при ПМФ, а также вторичном МФ, развившемся после ИП или ЭТ. Частота данных мутаций невелика и составляет 3–7% [5, 20, 21].

Ген *ASXL1* кодирует ядерный белок, регулирующий эпигенетическое мечение и транскрипцию через взаимодействие с белками PcG и различными активаторами и супрессорами транскрипции. Так, ASXL1 ассоциирован с BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1) в составе комплекса PR-DUB (Polycomb Repressive Deubiquitylase), выполняющего функции по пост-трансляционной модификации гистона H2AK119 через удаление мономеров убиквитина с целью подавления транскрипции. ASXL1 также взаимодействует с компонентами комплекса PRC2 – EZH2 и SUZ12 – в процессах H3K27-триметилирования кластера гомеозисных (определяющих процессы роста и дифференцировки организма) генов *HOXA*, вовлеченных в лейкемогенез. Ингибирование ASXL1 вследствие мутаций гена приводит к нарушению метильного «мечения» и активации транскрипции *HOXA*. Кроме того, ASXL1 взаимодействует с комплексом HP1a/CBX5, вовлеченным в процесс инактивации гетерохроматина. Интересно, что на уровне этого комплекса проявляются эпигенетические свойства JAK2. Показано, что тирозинкиназа может находиться не только в цитоплазме, но и в ядре, где фосфорилирует гистон H3Y41, вследствие чего уменьшается его связывание с белком HP1a и активируется транскрипция [19]. Мутации гена *ASXL1* с большей частотой обнаруживают при ПМФ (18–22%), чем при ИП (7–10%) или ЭТ (4–7%). В хронической (ХФ) и бластной фазах (БФ) ПМФ частота данных мутаций примерно одинакова [5, 22].

Изоцитрат дегидрогеназы IDH1/2 – ключевые ферменты цикла трикарбоновых кислот (цитозольный и митохондриальный соответственно), превращающие изоцитрат в альфа-кетоглутарат. Мутации в генах *IDH1/2* приводят к изменению функций ферментов и синтезу 2-гидроксикетоглутарата (2-HG). 2-HG может напрямую ингибировать TET2 и ряд диоксигеназ, что приводит к глобальному гиперметилированию ДНК. Экспрессия мутантных IDH1/2 в клетках костного мозга мышей приводила к появлению маркеров незрелых клеток, что указывало на нарушение процессов дифференцировки [26]. В исследовании Green с соавт. было обнаружено, что у 3 из 5 *JAK2*$^{+}$*/IDH*$^{+}$-пациентов со вторичным ОМЛ из МПН бластные клетки были *JAK2*-негативными. При этом у 1 пациента *IDH*-позитивными были как эритроидные колонии с мутацией *JAK2V617F,* так и бластные клетки. У двух других пациентов мутации *IDH* в *JAK2*-позитивных эритроидных предшественниках отсутствовали [27]. Полученные данные могут указывать на способность субклона *IDH1/2(+)* вытеснять субклон *JAK2V617F* в процессе бластной трансформации (БТ). На возможный лейкемогенный эффект мутаций в генах *IDH1/2* указывает существенно большая частота их обнаружения в БФ ПМФ (21% против 4% в ХФ) [5].

Ген *DNMT3A* кодирует белок – член семейства метилтрансфераз, которые присоединяют метильную группу к цитозину в CpG динуклеотидах ДНК. Большинство мутаций – нонсенс или сдвига рамки считывания – приводят к преждевременной остановке трансляции и появлению функционально неполноценного белка со сниженной каталитической активностью и афинностью к ДНК. Потеря функций приводит к гипометилированию ДНК и изменению экспрессии генов ключевых путей метаболизма и апоптоза клетки. В экспериментах in vivo удаление Dnmt3a приводило к прогрессирующей экспансии долгоживущих ГСК без усиления пролиферации и нарушения дифференцировки. Метиломный анализ этих ГСК показал наличие участков гипер- и гипометилирования ДНК, причем гипометилированы были те участки, на которых расположены гены самообновления клетки [20]. При ПМФ мутации *DNMT3A* определяются у 7–10% пациентов в ХФ с некоторым увеличением частоты в БФ (15–17%) [29].

Мутации в гене *TET2*, белковый продукт которого катализирует превращение 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, приводят к гиперметилированию ДНК. При этом, полагают, ингибируется транскрипция генов опухолевых супрессоров. Мутации обнаруживают во всех экзонах гена (миссенс, нонсенс, сдвига рамки считывания). Считают, что мутации *TET2* в долгоживущих ГСК дают им пролиферативное преимущество с тенденцией к миелопролиферации. Частота обнаружения мутаций в гене *TET2* при ПМФ составляет порядка 15% в ХФ и незначительно выше в БФ (17%) [30].

Нарушения сплайсинга РНК как патогенетической основы миелодисплазии было показано Yoshida с соавт. в 2011 г.. При анализе экзома 29 образцов пациентов с МДС были обнаружены мутации компонентов сплайсосом [31]. Ряд из них за-

тем были обнаружены у пациентов с ПМФ. Частоты мутаций генов *U2AF1, SRSF2, SF3B1* составили 16, 17, 7% соответственно [5]. При ИП и ЭТ данные мутации обнаруживают крайне редко. Гены *U2AF1, SRSF2, SF3B1* кодируют факторы, вовлеченные в узнавание 3'-концевого интронного сайта прематричной РНК. Исследования на мышиных моделях показали, что компоненты сплайсосом необходимы для выживания ГСК, но одних только сплайсосомных мутаций недостаточно для нарушения дифференцировки клеток и развития миелодисплазии [32, 33].

Таким образом, эпигенетические мутации могут влиять на пролиферативный потенциал клетки (*TET2, DNMT3A*) либо приводить к нарушениям дифференцировки (*ASXL1, EZH2, IDH1/2*). Мутации генов компонентов сплайсосом ассоциированы с миелодисплазией. Учитывая тот факт, что при МПН часто обнаруживают сочетание эпигенетических и сплайсосомных мутаций, например, *SRSF2* часто детектируют совместно с *TET2/ASXL1/IDH1,2* [34], можно заключить, что фенотип опухолевой клетки формируется в результате синергичного действия различных генетических нарушений.

В отличие от мутаций в генах сигнальных путей, встречающихся в основном только при МПН, эпигенетические и сплайсосомные мутации являются «неспецифическими» событиями канцерогенеза и часто определяются у больных с МДС и МДС/МПН [13, 21]. Частота их встречаемости у больных с ПМФ в совокупности достигает 80%. Более того, порядка 50% пациентов с данным диагнозом имеет 2 и более «неспецифических» мутаций [13]. Данный факт во многом согласуется с представлением о патогенезе миелофиброза как реакции стромы на клональный процесс, сопровождаемый выходом профибротических цитокинов [35, 36, 37]. Мутации в эпигенетических регуляторах и компонентах сплайсосом приводят к дефектам миелоидной дифференцировки, особенно в мегакариоцитах (МКЦ). МКЦ – ключевые клетки, вовлеченные в миелофиброз, так как в костном мозге они могут испускать большие количества профибротических (TGF-β1, фактор роста фибробластов, тромбоцит-производный фактор роста), провоспалительных (IL-1), ангиогенных (сосудистый эндотелиальный фактор роста) цитокинов [35]. Роль МКЦ в развитии миелофиброза объясняет связь между гиперплазией МКЦ и МФ. Цитокины (н-р, TGF-β1) хранятся в специфических α-гранулах МКЦ. При ПМФ МКЦ обязательно имеют дефекты дифференцировки, что приводит к дефектам α-гранул и испусканию профибротических цитокинов, усиливающих пролиферацию фибробластов и остеобластов [13, 38].

Молекулярная модель ПМФ

Как показано выше, ПМФ – миелопролиферативное заболевание с признаками миелодисплазии, характер которого определяется совокупностью генетических поломок опухолевых клеток. Более того, есть основания полагать, что фенотип болезни зависит также от типа инициирующей мутации и порядка возникновения новых дефектов. Так, в исследовании C.A. Ortmann с соавт. (2015) был проведен генетический анализ ГСК и клеток-предшественниц пациентов с МПН положительных по *JAK2V617F* и *TET2*. Оказалось, что ГСК и предшественники, в которых мутации *TET2* возникли первыми, были склонны к расширению популяции без избытка мегакариоцитных и эритроидных клеток до появления *JAK2V617F*. Напротив, ГСК и предшественники, в которых *JAK2V617F* была единственной мутацией, пролиферировали в мегакариоциты и эритроциты без экспансии компартмента ГСК вплоть до появления мутаций в *TET2*. Это соотносится с фенотипическим проявлением МПН, инициирующим событием которого было появление *JAK2V617F*. У таких пациентов наблюдается быстрое образование избытка мегакариоцитов и эритроцитов [39].

Tefferi с соавт. при исследовании влияния мутаций в генах *IDH1/2* на выживаемость и риск БТ среди 301 пациента с ПМФ обнаружили, что частота бластной прогрессии заболевания была выше у $JAK2^{+}IDH^{+}$ по сравнению с $JAK2^{-}IDH^{+}$-пациентами (67 и 17%, соответственно) [40]. Это свидетельствует не только о патогенетическом вкладе эпигенетических мутаций в БТ, но и о возможном синергетическом эффекте молекулярных поломок.

P. Lundberg с соавт. (2014) предложили модель клональной эволюции, объясняющей патогенез всех МПН в целом [41]. Инициирующим и единственным событием в патогенезе заболевания примерно у половины больных являются мутации генов *JAK2* и *CALR*. Такие МПН отличаются низким риском прогрессии и трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), причем мутации гена *CALR* ассоциированы с более благоприятным течением заболевания и меньшим риском прогрессии. Полагают, что во всех случаях $CALR^{+}$ МПН мутация данного гена является самым ранним инициирующим событием. При этом появление дополнительных мутаций (*TET2, DNMT3A, EZH2, ASXL1* и др.) приводит к развитию более «продвинутых» форм МПН, таких как ПМФ, и ухудшению прогноза. *JAK2/CALR*-отрицательные пациенты могут быть носителями клона, первоначально не являющимся патологическим, но обладающим повышенным миелопролиферативным потенциалом (вследствие мутаций *TET2*, предрасполагающего гаплотипа, неизвестных мутаций). Появление новых соматических мутаций в генах *JAK2, DNMT3A, EZH2, ASXL1* и др. приводит к быстрой манифестации признаков МПН и ухудшению прогноза. Если добавочным событием в клетках, несущих «предрасполагающую» мутацию, будет лейкемогенное повреждение (например, мутация *TP53*), то возможно развитие ОМЛ без стадии МПН. Трансформации МПН в ОМЛ способствует последующее накопление мутаций в генах, участвующих в процессах дифференцировки и регуляции клеточного цикла (*EZH2, ASXL1, IDH1/2, CBL, TP53*). Стоит отметить, что большинство данных мутаций обнаруживают задолго до БТ. Вероятно, для развития ОМЛ при этом требуется вовлечение в процесс еще не известных мутаций или потеря гетерозиготности (например, по *TP53*).

Таким образом, патогенез ПМФ представляет собой последовательный процесс многоступенчатой аккумуляции соматических повреждений, приводящих к нарушениям пролиферации и дифференцировки клеток. Баланс между ними определяет фенотип неоплазии (рис. 2).

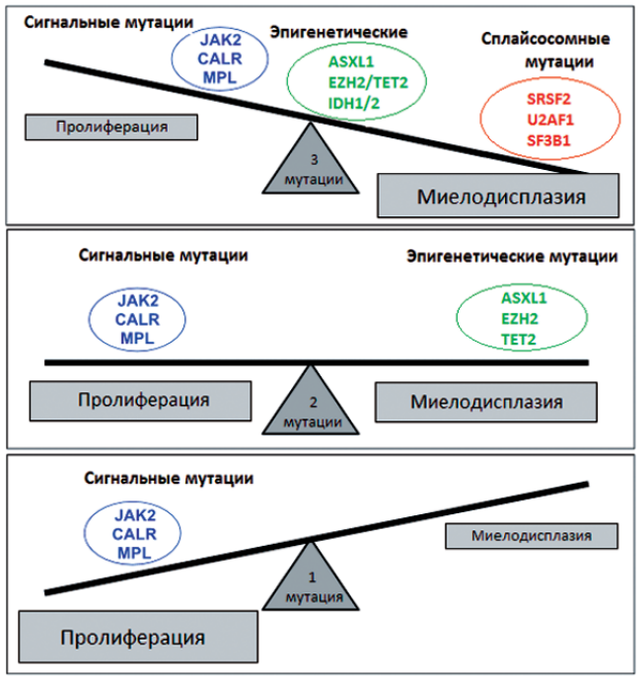

Рис. 2. Влияние типа и числа мутаций на фенотип первичного миелофиброза, по [13] с изм.

Хромосомные аберрации

Кроме генных мутаций причиной клонального миелопоэза при ПМФ могут быть хромосомные перестройки. Аномалии кариотипа выявляют у 35-60% больных при постановке диагноза и до 90% — в процессе трансформации в МДС или ОМЛ [51]. Наиболее частыми цитогенетическими находками при ПМФ, равно как и при ИП и ЭТ, являются del(20q) (10–36%), del(13q) (14–25%), +8 (8–16%), +9 (3–14%), дупликация 1q (3–22%), которые могут быть представлены как отдельно, так и сочетанно с другими хромосомными аберрациями (рис. 3) [51].

Реже обнаруживают перестройки 3 хромосомы, -5/del(5q), -7/del(7q), del(12p), i(17q), +21 [44, 51]. Изолированные сбалансированные транслокации встречаются крайне редко. Как правило, их обнаруживают в составе комплексного кариотипа (рис. 4). Последний наиболее часто обнаруживают при БТ ПМФ [44].

Генетические нарушения, возникающие при перестройках хромосом и приводящие к миелопролиферации, удается определить далеко не всегда. Так, при del(20q) среди идентифицированных на данном участке генов-кандидатов наиболее вероятным представляется ген *L3MBTL*, продукт которого является репрессором транскрипции. Однако мутации данного гена у пациентов с МПН не обнаружены. Нечастые при ПМФ транслокации с вовлечением 12 хромосомы ассоциированы с гиперэкспрессией гена *HMGA2* — фактора регуляции транскрипции — отмечаемой при многих неоплазиях. Сбалансированные транслокации с участием 8p11 приводят к перестройкам гена рецептора фактора роста фибробластов *FGFR1*. Идентифицирован ряд химерных генов, образованных с участием этого гена, например, *ZNF198/FGFR1* при t(8;13)(p11;q12). Данная аберрация более характерна для гиперэозинофильного синдрома и при ПМФ встречается редко. При аномалиях кариотипа, связанных с 5q33, в патологический процесс вовлекается ген рецептора тирозин-киназы *PDGFR*β. Частая находка при МПН — трисомия 9p — является результатом несбалансированных транслокаций с вовлечением 1p, 1q и 9q. Ключевым геном патогенеза при данной аберрации является, по всей видимости, *JAK2*. Редко обнаруживаемая при ПМФ и крайне неблагоприятная по прогнозу del(17p) приводит к «потере» гена опухолевого супрессора *TP53*. Нарушения регуляции клеточного цикла и апоптоза клеток с поврежденной ДНК являются следствием дефектов гена протеинкиназы *ATM* в результате перестроек 11q23 [56, 57]. При del(13q), dup(1q), +8 пока не выявлены гены, вовлекаемые в патогенез МПН.

Стоит отметить, что методами молекулярной цитогенетики (FISH и CGH) показано, что хромосомные изменения, затрагивающие 20q, 13q, 9, распространены при МПН и в частности ПМФ гораздо шире, чем это выявляется при стандартном цитогенетическом исследовании. То есть клональный гемопоэз

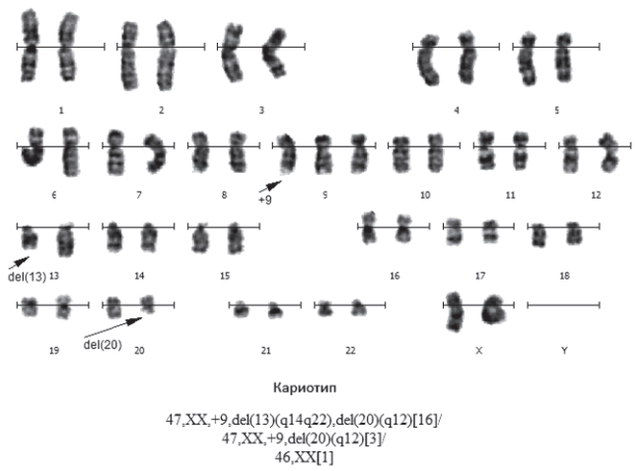

Рис. 3. Кариограмма пациентки с хронической фазой ПМФ

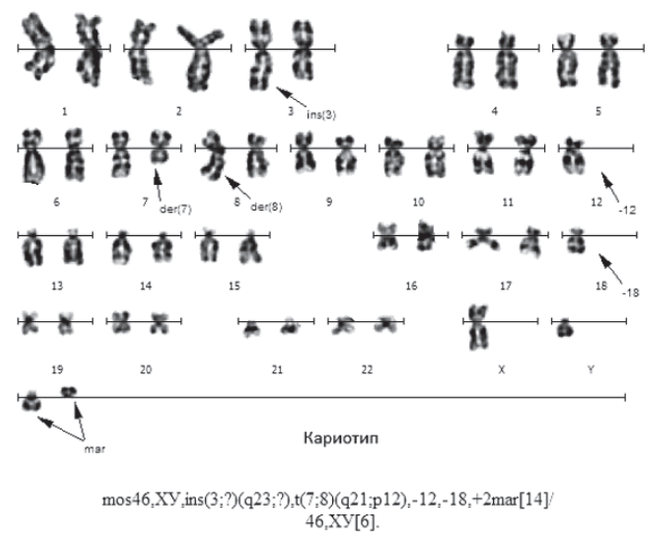

Рис. 4. Кариограмма пациента с бластной фазой ПМФ

в большом количестве случаев обусловлен надмолекулярными аберрациями. Поэтому наряду с идентификацией генных мутаций при МПН крайне важно исследование кариотипа опухолевых клеток.

Клинические особенности и прогноз

Вместе с определением роли обнаруживаемых при ПМФ мутаций и хромосомных аберраций в патогенезе заболевания предпринимаются попытки определить ассоциации дефектов генома с различными клиническими проявлениями и оценить их влияние на прогноз.

Мутация *JAK2V617F* ассоциирована со старшим возрастом, высоким уровнем гемоглобина, лейкоцитозом, менее выраженным тромбоцитозом, повышенным риском тромбозов, спленомегалией [5]. Ряд исследователей сообщали об ухудшении выживаемости при ПМФ в случае низкой аллельной нагрузки [42, 43]. Низкие уровни *JAK2V617F* отмечались у пациентов с истощением костного мозга, выраженными цитопениями, инфекционными осложнениями, БТ [44]. Вероятно, такой фенотип болезни обусловлен поликлональной природой ПМФ и вытеснением *JAK2V617F* клона более агрессивными субклонами.

ПМФ пациенты с мутацией в гене *CALR* моложе, имеют более высокий уровень тромбоцитов, а также у них реже отмечают анемию и лейкоцитоз [5, 12]. Интересно, что тип мутации также влияет на фенотип заболевания. При ПМФ мутации типа 2 ассоциированы с более высокой оценкой риска DIPSS$^+$, количеством циркулирующих бластов ≥1% и лейкоцитозом [5].

ТН пациенты, по данным многоцентрового исследования Rumi с соавт., старше, у них чаще отмечают анемию, тромбоцитопению, а также определяют более высокие оценки по прогностической шкале IPSS (International Prognostic Scoring System) [12].

Анализ выживаемости пациентов с различными МК и ТН показал, что при ПМФ лучшую выживаемость демонстрируют *CALR*$^+$-пациенты, а худшую — ТН. Достоверных различий в выживаемости *JAK2*$^+$ и *MPL*$^+$-пациентов не обнаружено [12, 45]. При учете типа мутации в гене *CALR* выживаемость при типе 1 значимо лучше, чем при мутациях типа 2. Вместе с этим нет различий в выживаемости между пациентами *JAK2*$^+$ и *CALR*$^+$ с мутациями 2-го типа. Риск БТ также выше у ТН пациентов по сравнению с пациентами с любым из трех маркеров и наименьший — у носителей мутации в гене *CALR* по сравнению с ТН и *JAK2*$^+$ [45, 46].

Среди «неспецифических» мутаций дефекты гена *TET2* ассоциированы с анемией [40], *U2AF1, SRSF2* — с анемией и тромбоцитопенией [12], *EZH2* — с лейкоцитозом, появлением в крови циркулирующих бластов (более 1%), *ASXL1* — с лейкоцитозом, бластозом, анемией, спленомегалией, конституциональными симптомами [47].

Данные о прогностическом потенциале мутаций в гене *TET2* противоречивы. Считают, что их обнаружение не влияет на общую выживаемость (ОВ), риск БТ или тромботических осложнений, однако частота этих мутаций в БФ несколько выше [30, 48]. Прогностическая значимость мутаций в гене *DNMT3A* при ПМФ также однозначно не определена.

До открытия мутаций в гене *CALR* A.M. Vannucchi с соавт. (2013) на двух выборках пациентов (483 и 396 человек) проанализировали прогностическую значимость мутаций в генах *TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2, IDH1/2, SRSF2, CBL, JAK2, MPL*. Было показано, что мутации в генах *ASXL1, EZH2, SRSF2* независимо друг от друга ухудшают выживаемость пациентов с ПМФ, а риск БТ возрастает при обнаружении мутаций в генах *ASXL1, SRSF2, IDH1/2*. Пациентов, имеющих хотя бы одну из мутаций в указанных генах, авторы предлагают относить к группе «высокого молекулярного риска». Эти пациенты по сравнению с группой «низкого молекулярного риска» (без мутаций) имели худшую выживаемость и больший риск прогрессии до БФ. Однако при учете оценок по IPSS, DIPSS, DIPSS+ только *ASXL1*-статус сохранял достоверную значимость [47].

В 2014 г. A. Tefferi с соавт. анализируя влияние мутационного статуса генов *JAK2, MPL, CALR, ASXL1, EZH2, IDH1/2, SRSF2* на клинические особенности ПМФ и прогноз, установили достоверное снижение выживаемости у *CALR*$^-$, *ASXL1*$^+$ и *SRSF2*$^+$-пациентов. При учете факторов DIPSS+ стратификации только *CALR*- и *ASXL1*-статус сохранили свою значимость. Было показано, что среди *CALR*$^+$-пациентов наличие мутации в гене *ASXL1* было ассоциировано с более низким числом тромбоцитов и уровнем гемоглобина, выраженным лейкоцитозом, повышением процента циркулирующих бластов, необходимости в гемотрансфузиях и конституциональными симптомами. Последующий анализ выживаемости с учетом *CALR/ASXL1*-статуса показал, что лучшую выживаемость независимо от DIPSS+ и IPSS стратификации демонстрируют *CALR*$^+$*ASXL1*$^-$-пациенты (медиана 10,4 года), а худшую — *CALR*$^-$*ASXL1*$^+$ (медиана 2,3 года). При сравнении выживаемости *CALR*$^+$*ASXL1*$^-$ и *CALR*$^+$*ASXL1*$^+$-пациентов отмечена статистическая тенденция к снижению ОВ у последних (медиана 7,8 года, $p = 0{,}13$). Достоверных различий в выживаемости *CALR*$^+$*ASXL1*$^+$ и *CALR*$^-$*ASXL1*$^-$-пациентов не было выявлено. *CALR*$^-$*ASXL1*$^+$-пациенты также демонстрировали более короткую выживаемость без БТ. На основании полученных данных A. Tefferi с соавт. (2014) предложили считать *CALR/ASXL1*-статус наиболее прогностически значимым фактором выживаемости пациентов с ПМФ [49].

A. Vannucchi с соавт. (2014) на 56 ежегодной встрече Американского общества гематологов представили Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) для ПМФ, учитывающую данные молекулярного тестирования пациентов. Данная шкала оценки прогноза, по данным авторов, лучше предсказывала выживаемость пациентов, чем IPSS (по значению информационного критерия Акаике) (табл. 1) [50].

Итак, можно утверждать, что, по крайней мере, некоторые молекулярные события, запускающие процессы миелопролиферации, влияют на фенотип ПМФ и его прогноз. Не совсем очевидна прогностическая роль мутаций в генах *EZH2, IDH1/2, SRSF2*. С одной стороны, сочетанное выявление мутаций, ассоциация с клиническими признаками и повышение их частоты в БФ указывают на определенный вклад в малигнизацию клона. С другой стороны, отсутствие достоверного влияния на выживаемость и риск БТ могут говорить о том, что данные генетические нарушения являются лишь проявлением уже существующей нестабильности генома в преддверии БФ. Также обнаружение данных мутаций в ХФ и БФ может быть следствием существования разных субклонов одного предка, впоследствии претерпевшего злокачественную трансформацию из-за других генетических дефектов.

Таблица 1. Альтернативные системы стратификации MIPSS и GPSS [50, 55]

Шкала	Критерии и баллы	Группы риска (сумма баллов)	ОВ*, лет
MIPSS	Возраст более 60 лет (1,5) Конституциональные симптомы (0,5)	Низкий (0–0,5)	26,4
	Гемоглобин менее 100 г/л (0,5) Тромбоциты менее 200×10^9/л (1)	Промежуточный-1 (1–1,5)	9,7
	Отсутствие МК (1,5) JAK2V617F+ или MPLW515+ (0,5)	Промежуточный-2 (2–3,5)	6,4
	ASXL1+ (0,5) SRSF2+ (0,5)	Высокий	1,9
GPSS	Возраст более 60 лет (2)	Низкий (0)	>17,9
	Кариотип «очень высокого риска» (3) (моносомный, inv(3), i(17q), -7/7q-, 11q или 12p перестройки)		
	Кариотип «высокого риска» (1) (комплексный немоносомный, 2 перестройки не из группы «очень высокого риска), -5q, +8, другие трисомии (кроме +9), одиночные аберрации (кроме 13q-, 20q-, +1q))	Промежуточный-1 (1–2)	9,0
	Отсутствие МК (2)		
	JAK2/MPL/CALR (тип 2) (2)	Промежуточный-2 (3–4)	5,0
	ASXL1+ (1)	Высокий (≥5)	2,2
	SRSF2+ (1)		

*Примечание: * — медиана выживаемости по данным исследовательских групп, предложивших данную систему стратификации; ОВ — общая выживаемость; МК — маркер клональности.*

Анализ выживаемости ПМФ пациентов с различными аномалиями кариотипа показал, что лучшую выживаемость демонстрируют пациенты с изолированными del(20q) и del(13q) по сравнению с любыми другими цитогенетическими находками. По данным Tefferi с соавт., трисомия 8 хромосомы и del(12p) являются предикторами короткой выживаемости, а риск БТ выше у пациентов с -5/del(5q), -7/del(7q), del(12p), +8 и перестройками хромосомы 1 [52]. Исследователями из MD Anderson Cancer Center удалось выделить 3 варианта повреждений кариотипа при МПН: благоприятный, неблагоприятный и крайне неблагоприятный [57]. Благоприятный кариотип объединяет del(20q), del(13q) и трисомию 9 хромосомы в виде единственной аберрации или в сочетании с одним дополнительным повреждением. Аномалии 5 и 7 хромосом, а также случаи с множественными аберрациями вошли в состав неблагоприятного кариотипа. Крайне неблагоприятный кариотип — повреждения 17 хромосомы независимо от вида, наличия или отсутствия других аберраций.

В настоящее время показано, что неблагоприятный кариотип (комплексные аберрации, +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- или 11q23) является независимым неблагоприятным прогностическим фактором и учитывается при стратификации пациентов по шкале DIPSS+ (табл. 2) [3, 53].

В исследовании E. Wassie с соавт. (2015) проведен анализ ассоциации различных цитогенетических аберраций с молекулярными и фенотипическими особенностями ПМФ у 826 пациентов. Обнаружено, что любые нарушения кариотипа коррелировали с анемией, лейкопенией и тромбоцитопенией. Лейкопения была, в частности, характерна для del(20q), +8, -7/del(7q), а тромбоцитопения — только для del(20q) и -7/del(7q). Достоверно более высокие уровни тромбоцитов определяли при del(13q). Среди *CALR*$^+$ пациентов достоверно чаще обнаруживали del(13q), среди *JAK2*$^+$ более частой находкой была трисомия 9 хромосомы. Мутации *ASXL1* и *U2AF1* были значимо ассоциированы с нормальным кариотипом, *SRSF2* — с del(20q) [54]. Ассоциация del(13q) с мутациями в гене *CALR* может объяснять связь данной хромосомной аберрации с тромбоцитозом и благоприятным прогнозом, но причины такой ассоциации пока неясны. Более высокая вероятность обнаружения трисомии 9 хромосомы у *JAK2*$^+$ пациентов, по всей видимости, отражает процессы экспансии *JAK2V617F*-клона или является следствием хромосомной нестабильности, вызванной мутацией. Повышение частоты мутаций в генах *ASXL1* и *U2AF1* при нормальном кариотипе может указывать на первостепенную роль точечных соматических мутаций у таких больных.

Доказанная прогностическая значимость как ряда соматических мутаций, так и кариотипа при ПМФ говорит о важности их совокупной оценки при определении прогноза для пациента. A. Tefferi с соавт. (2014) показали состоятельность прогностической модели, базирующейся только на данных молекулярного и цитогенетического анализа (табл. 1). Genetics-Based Prognostic Scoring System (GPSS), учитывающая данные возраста, кариотип, тип/отсутствие МК, *ASXL1* и *SRSF2*-статус, позволила стратифицировать пациентов в группы риска, достоверно отличающиеся по ОВ и выживаемости без БТ [55].

Таблица 2. Системы определения групп риска пациентов с первичным миелофиброзом [58–60]

Шкала	Критерии и баллы	Группы риска (сумма баллов)	ОВ*, лет
IPSS	Возраст более 65 лет (1)	Низкий (0)	11,3
	Гемоглобин менее 100 г/л (1)	Промежуточный-1 (1)	7,9
	Лейкоциты более 25×10^9/л (1)	Промежуточный-2 (2)	4,0
	Бласты в периферической крови ≥1% (1)	Высокий (≥3)	2,3
	Конституциональные симптомы (1)		
DIPSS	Возраст более 65 лет (1)	Низкий (0)	>14,6
	Гемоглобин менее 100 г/л (2)	Промежуточный-1 (1-2)	9,8
	Лейкоциты более 25×10^9/л (1)	Промежуточный-2 (3-4)	4,8
	Бласты в периферической крови ≥1% (1)	Высокий (5-6)	2,3
	Конституциональные симптомы (1)		
DIPSS+	Группа риска по DIPSS	Низкий (0)	15,4
	Низкий (0)		
	Промежуточный-1 (1)		
	Промежуточный-2 (2)	Промежуточный-1 (1)	6,5
	Высокий (3)		
	Зависимость от гемотрансфузий (1)		
	Тромбоциты менее 100×10^9/л (1)	Промежуточный-2 (2-3)	2,9
	Неблагоприятный кариотип (1)		
	(изолированные или 2 нарушения +8, 7/7q, i (17q), inv (3), 5/5q, 12p или перестройка 11q23, комплексный кариотип)	Высокий (≥4)	1,3

Примечание: * – медиана выживаемости по данным исследовательских групп, предложивших данную систему стратификации; ОВ – общая выживаемость; IPSS – International Prognostic Scoring System; DIPSS – Dynamic International Prognostic Scoring System Plus.

Собственные данные

По результатам лаборатории молекулярной генетики ФГБУ РосНИИГТ у 115 пациентов с диагнозом ПМФ маркеры клонального гемопоэза выявлены у 87 (75,7%) пациентов: *JAK2*$^+$ – в 47,0% (54/115), *CALR*$^+$ – в 22,6% (26/115), *MPL*$^+$ – в 6,1% (7/115) случаев. Не обнаружено МК у 24,3% (28/115) пациентов. Данные анализа выживаемости в целом согласуются с мировыми, показывая достоверное снижение ОВ в группе ТН пациентов как по сравнению с группой пациентов, у которых обнаруживали любой из МК (p = 0,005), так и с *JAK2*$^+$ и *CALR*$^+$ группами в отдельности (p = 0,032 и p = 0,007, соответственно). Пятилетняя ОВ ТН пациентов составила 30,6%, *JAK2*$^+$ – 83,8% и *CALR*$^+$ – 93,5% (p = 0,046). Медиана выживаемости *JAK2*$^+$ пациентов составила 14,7 лет, *CALR*$^+$ – 9,8 лет. У *MPL*$^+$ пациентов при сроке наблюдения 4 года медиана выживаемости достигнута не была (рис. 5).

По результатам цитогенетического исследования 47 доступных образцов костного мозга выделены 2 группы пациентов: в группу «низкого цитогенетического риска» вошли 27 (57,4%) пациентов с нормальным кариотипом и 5 (10,6%) – с одиночными аберрациями del(13)(q22), del(20)(q12), add(6)(p25), del(6)(q15); группу «высокого цитогенетического риска» составили 15 (32,0%) пациентов с комплексными нарушениями кариотипа и аберрациями +8, -7/7q-, -5/5q-, 12p-. Медиана выживаемости пациентов первой группы составила 7,5 лет, второй – менее 1,5 лет (p = 0,025).

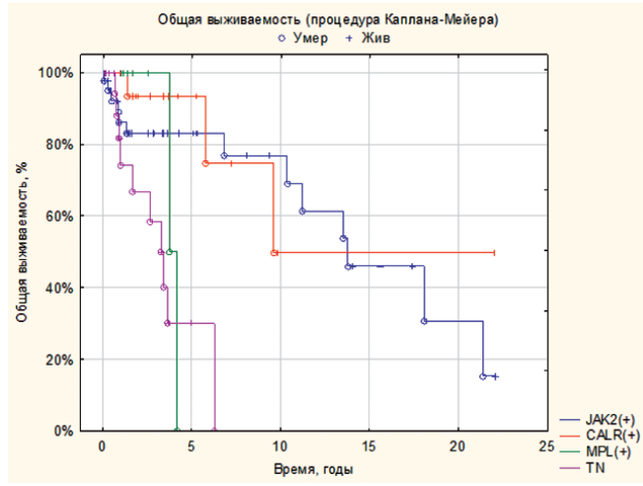

Рис. 5. Кривые общей выживаемости пациентов с первичным миелофиброзом с различными маркерами клональности и три-негативных

Частота встречаемости мутаций в гене *ASXL1* составила 22,6% (26/115). Мутации обнаружены во всех группах пациентов: 13,0% (7/54) среди *JAK2*$^+$, 26,9% (7/26) – *CALR*$^+$, 28,6% (2/7) – *MPL*$^+$ и 32,1% (9/28) – среди ТН пациентов. При оценке влияния *ASXL1*-статуса на ОВ выявлено статистически значимое укорочение медианы выживаемости среди ТН пациентов: при *ASXL1*$^-$ ее значение составило 3,5 года, а при *ASXL1*$^+$ – лишь 1,5 года (p = 0,013).

Полученные данные еще раз доказывают, что характер МК, наличие цитогенетических аберраций и эпигенетических изменений могут быть взаимосвязаны с различным прогнозом течения ПМФ. Отсутствие МК и наличие неблагоприятного кариотипа ассоциировано со снижением общей выживаемости. Положительный *ASXL1*-статус является предиктором короткой выживаемости у пациентов без МК.

Заключение

Обобщая все вышесказанное, можно заключить, что основу патологической миелопролиферации при ПМФ составляют преимущественно молекулярные дефекты генов, продукты которых прямо или косвенно участвуют в JAK/STAT-пути передачи сигнала. Конститутивная активация сигнальных путей является причиной усиленной пролиферации клеток патологического клона. Вместе с тем для ПМФ характерны явления миелодисплазии, обусловленные дополнительными генетическими изменениями, включающими мутации эпигенетических регуляторов и компонентов сплайсосом. Основу патогенеза ПМФ у пациентов без мутаций в генах сигнальных путей составляет, судя по всему, совокупность неспецифических молекулярных событий с превалированием нарушений дифференцировки.

Гетерогенность заболевания определяется соотношением долей миелопролиферативного и миелодиспластического компонентов, и прогноз неблагоприятен при превалировании признаков миелодисплазии. Для определения характера течения заболевания и прогноза оптимальным является исследование мутационного статуса целого ряда генов, вовлеченных в процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Независимая прогностическая значимость неблагоприятного кариотипа для общей выживаемости и риска бластной трансформации, а также данные об ассоциации различных хромосомных аберраций с клиническими проявлениями и прогнозом делают цитогенетическое исследование незаменимым и мощным инструментом в диагностике и тактике ведения пациентов с ПМФ.

Комплексная оценка результатов молекулярно-генетического тестирования, кариотипа и клинических данных видится уже не только оптимальной, но и необходимой моделью прогноза при ПМФ.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Абдулкадыров К. М., Шуваев В. А., Мартынкевич И. С. Первичный миелофиброз: собственный опыт и новое в диагностике и лечении. Онкогематология 2015; 2: 25-35.
2. Barosi G., Ambrosetti A., Finelli C. et al. The Italian Conference on diagnostic criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia. Br. J. Haematol. 1999; 104(4): 730-37.
3. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 2016; 127 (20): 2391-405.
4. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. Leukemia 2010; (24): 1128-38.
5. Tefferi A., Pardanani A. Myeloproliferative neoplasms. A contemporary review. JAMA Oncology 2015; 1(1): 97-105.
6. Соколова М.А. Современные представления о «класических» Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях. Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. 2010; 3(3):235–242.
7. Pardanani A.D., Levine R.L., Lasho T. et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients Blood 2006; 108(10): 3472-6.
8. Michalak M., Groenendyk J., Szabo E. et al. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. Biochem. J. 2009; 417(3): 651-66.
9. Araki M., Yang Y., Masubuchi N. et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Blood 2016; 127(10): 1307-16.
10. 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.
11. Pietra D., Rumi E., Ferretti V.V. et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Leukemia 2016; 30(2): 431-8.
12. 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.
13. Vainchenker W., Constantinescu S.N., Plo I. Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocytemia. F1000Res. 2016; 5. doi: 10.12688/f1000research.8081.1.
14. Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A.S. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N. Engl. J. Med. 2013; 369: 2379-90.
15. Garbati M.R., Welgan C.A., Landefeld S.H. et al. Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. Am. J. Hematol. 2016; 127(10): 1317-24.
16. Oh S.T., Simonds E.F., Hale M.B. et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. Blood 2010; 116(6): 988-92.
17. Schwaab J., Ernst T., Erben P. et al. Activating CBL mutations are associated with a distinct MDS/MPN phenotype. Ann. Hematol. 2012; 91(11): 1713-20.
18. Rampal R., Al-Shahrour F., Abdel-Wahab O. et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood 2014; 123 (22): e123-e133.
19. Shih A.H., Abdel-Wahab O., Patel J.P. et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Nat. Rev. Cancer. 2012; 12(9): 599-612.
20. Milosevic J.D., Kralovics R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. Int. J. Hematol. 2013; 97: 183-97.
21. Mascarenhas J., Roper N., Chaurasia P., Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. Clin. Epigenet. 2011; 2: 197-212.
22. Gelsi-Boyer V., Brecqueville M., Devillier R. et al. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. J. Hematol. Oncol. 2012; 5: 12.
23. Ernst T., Chase A.J, Score J. et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase. Nat. Gen. 2010; 42(8): 722-7.
24. Su I.H., Basavaraj A., Krutchinsky A.N. et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. Nat. Immunol. 2003; 4(2): 124-31.
25. Herrera-Merchan A., Arranz L., Ligos J.M. et al. Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. Nat. Commun. 2012; 3: 623.
26. Figueroa M.E., Abdel-Wahab O., Lu C. et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell 2010; 18(6): 553-67.
27. Green A., Beer P. Somatic Mutations of IDH1 and IDH2 in the Leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. N. Engl. J. Med. 2010; 362: 369-70.
28. Challen G.A., Sun D., Jeong M. et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat. Gen. 2012; 44: 23-31.
29. Abdel-Wahab O., Pardanani A., Rampal R. et al. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms Leukemia 2011; 25: 1219-20.
30. Tefferi A., Pardanani A., Lim K-H et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis Leukemia 2009; 23: 905-11.
31. Yoshida K., Sanada M., Shiraishi Y. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature 2011; 478: 64-9.
32. Komeno Y., Huang J-E, Qiu J. et al. SRSF2 Is Essential for hematopoiesis, and its myelodysplastic syndrome-related mutations dysregulate alternative pre-mRNA splicing. Mol. Cell. Biol. 2015; 35(17): 3071-82.
33. Shirai C.L., Ley J.N., White B.S. et al. Expression alters hematopoiesis and pre-mRNA splicing in vivo. Cancer Cell 2015; 27(5): 631-43.
34. Zhang S.J., Rampal R., Manshouri T. et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. Blood 2012; 119(19): 4480-5.
35. Castro-Malaspina H., Rabellino E.M., Yen A. et al. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. Blood 1981; 57(4): 781-7.

36. Wagner-Ballon O., Chagraoui H., Prina E. et al. Monocyte/macrophage dysfunctions do not impair the promotion of myelofibrosis by high levels of thrombopoietin. J. Immunol. 2006; 176(11): 6425-33.

37. Chagraoui H., Komura E., Tulliez M. et al. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. Blood 2002; 100(10): 3495-03.

38. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. Best Pract. Res. Clin. Haematol. 2014; 27(2): 129-40.

39. Ortmann C.A, Kent D.G., Nangalia J. et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. N. Engl. J. Med. 2015; 372: 601-12.

40. Tefferi A., Jimma T., Sulai N.H. et al. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F Leukemia 2012; 26: 475-80.

41. Lundberg P., Karow A., Nienhold R. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood 2014; 123(14): 2220-8.

42. Guglielmelli P., Barosi G., Specchia G. et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. Blood 2009; 114: 1477-83.

43. Tefferi A., Lasho T.L., Huang J. et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. Leukemia 2008; 22: 756-61.

44. Singh N.R. Genomic diversity in myeloproliferative neoplasms: focus on myelofibrosis. Transl. Pediatr. 2015; 4(2): 107-15.

45. Tefferi A., Lasho T.L., Finke C.M. et al. CALR vs JAK2 vs MPL mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia 2014; 28(7): 1472-7.

46. Tefferi A., Guglielmelli P., Larson D. et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood 2014; 124(16): 2507-13.

47. Vannucchi A.M., Lasho T.L., Guglielmelli P. et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia 2013; 27(9): 1861-9.

48. Kim E., Abdel-Wahab O. Focus on the epigenome in the myeloproliferative neoplasms. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2013; 2013: 538-44.

49. Tefferi A., Guglielmelli P., Lasho T.L. et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. Leukemia 2014; 28(7): 1494-500.

50. Vannucchi A., Guglielmelli P., Rotunno G. et al. Mutation-enhanced international prognostic scoring system (MIPSS) for primary myelofibrosis: an AGIMM&IWG-MRT project. Blood 2014; 124(21): 405.

51. Hussein K., Van Dyke D.L., Tefferi A. Conventional cytogenetics in myelofibrosis: literature review and discussion. Euro. J. Haematol. 2009; 82: 329-38.

52. Tefferi A., Mesa R.A., Schroeder G. et al. Cytogenetic findings and their clinical relevance in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Br. J. Haematol. 2001; 113: 763-71.

53. Меликян А.Л., Туркина А.Г., Абдулкадыров К.М. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз). Гематология и трансфузиология 2014; 59(4): 31-56.

54. Wassie E., Finke C., Gangat N. et al. A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. Br. J. Haematol. 2015; 169(1): 71-6.

55. Tefferi A., Guglielmelli P., Finke C. et al. Integration of mutations and karyotype towards a genetics-based prognostic scoring system (GPSS) for primary myelofibrosis. Blood 2014; 124: 406.

56. Panani A.D. Cytogenetic and molecular aspects of Philadelphia negative chronic myeloproliferative disorders: clinical implications. Cancer letters 2007; 255: 12-25.

57. Tam C.S., Kantarjian H., Cortes J. et al. Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post–polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. J. Clin. Oncol. 2009; 27(33): 5587-93.

58. Passamonti F., Cervantes F., Vannucchi A.M. et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). Blood 2010; 115(9): 1703-8.

59. Gangat N., Caramazza D., Vaidya R. et al. DIPSS Plus: A refined dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. J. Clin. Oncol. 2011; 29(4): 392-7.

60. Cervantes F., Dupriez B., Pereira A. et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood 2009; 113(13): 2895-901.

Поступила: 12.08.2016