

МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-227-230

УДК 591.156:575.113:616-005.6:616.155.191

Полубень Л. О., Неумержицька Л. В., Вербиленко Р. М., Шумейко О. О., Клименко С. В.

**ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІКО-ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ХВОРИХ
НА МІЕЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗІЇ ІЗ
CALR-ПОЗИТИВНИМ МУТАЦІЙНИМ СТАТУСОМ**

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (м. Київ)

larysa.poluben@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Публікація є фрагментом планової науково-дослідної роботи ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»: «Молекулярно-генетичні особливості Рn-негативних мієлопроліферативних неоплазій у осіб, які зазнали впливу чинників аварії на Чорнобильській АЕС», № державної реєстрації 0117U000625.

Вступ. Класичні хронічні Рn-негативні мієлопроліферативні неоплазії (МПН) – це окрема група гематологічних захворювань, до яких відносять справжню поліцитемію (СП), есенціальну тромбоцитемію (ЕТ) та первинний мієлофіброз (ПМФ). МПН спричинені появою соматичних мутацій у гематопоетичній стовбуровій клітині (ГСК), які активують відповідальні за гематопоез фізіологічні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи. Таким чином, ГСК набувають селективних переваг до проліферації у порівнянні зі здоровими, із наступним зрушенням до мієлоїдного диференціювання та встановленням клонального мієлопроліферативного фенотипу [7,10,13]. Важливим для розуміння генетичного підґрунтя розвитку МПН був 2005 рік, коли вперше була описана рекурентна мутація псевдокіназного домену JH2 гена Янус кінази 2 (*JAK2*) у 14-му екзоні, *JAK2* V617F, у більшості хворих на СП, а також у частини хворих на ЕТ та ПМФ [3,12]. Пізніше, у 2006 році, була виявлена мутація позаклітинного домену гена рецептора тромбопоєтину (*MPL*) у 10-му екзоні, *MPL* W515L, у *JAK2* V617F-негативних хворих на ЕТ та ПМФ [12]. Соматичні мутації гена кальретикуліну (*CALR*) у 9-му екзоні були описані у 2013 році у більшості хворих на ЕТ та ПМФ, негативних за *JAK2* та *MPL*. В літературі описано понад 40 різновидів мутацій гена *CALR* (делеції та інсерції із зсувом рамки зчитування), із яких найчастіше зустрічаються мутація 1-го типу (делеція 52 пар основ) у 53% та 2-го типу (інсерція 5 пар основ) у 37,1% [2,4,8]. Нещодавно були описані інші мутації генів *JAK2* у 12-му та 13-му екзонах та *MPL* у межах 10-го екзону та поза ним. В більшості випадків мутації, які спричиняють розвиток МПН, виникають у взаємовиключаючий спосіб у одному із трьох драйверних генів (*JAK2*, *MPL* або *CALR*) та переважно активу-

ють *JAK*-*STAT3/5* внутрішньоклітинний сигнальний шлях [7]. За даними літератури мутація *JAK2* V617F позитивна близько у 95% випадків хворих на СП та у 50-60% випадків хворих на ЕТ та ПМФ [1,5,6,8]. Мутації гена *CALR* в 9-му екзоні описані у 25% та 35% хворих на ЕТ та ПМФ, відповідно [2,4,8]. Окрім *JAK2* та *CALR*, у незначній кількості хворих на ЕТ та ПМФ визначаються мутації гена *MPL* у 10-му екзоні від 5 до 10% випадків [7,8,12]. Таким чином, враховуючи спільні молекулярно-генетичні характеристики, ці захворювання за клінічними проявами можуть маскувати одне одного. Однак, в результаті дії специфічних внутрішніх та зовнішніх факторів, що впливають на ГСК із соматичною мутацією, фенотипові ознаки МПН можуть значно відрізнятися. Наприклад, було показано, що наявність мутації гена *CALR* асоціюється із вищим рівнем тромбоцитів, нижчим рівнем лейкоцитів у хворих на ЕТ та ПМФ та кращою загальною виживаністю, порівняно із *JAK2*-позитивними пацієнтами [4,11]. Також попереднє дослідження показало, що МПН у хворих, які зазнали дії низьких доз іонізуючої радіації (ІР), відрізняються на молекулярно-генетичному рівні від спонтанних МПН. Зокрема, у хворих на радіаційно-асоційований ПМФ частота мутації *JAK2* нижча, ніж у пацієнтів зі спонтанним ПМФ [9]. Визначення мутацій генів *JAK2*, *CALR* та *MPL* у хворих на МПН є необхідним для встановлення діагнозу та прогнозування груп ризиків.

Мета дослідження: вивчення частоти найбільш розповсюджених мутацій гена *CALR* та їх асоціацію із клініко-гематологічними показниками у хворих на ЕТ та ПМФ в Україні із акцентом на радіаційно-асоційовані МПН.

Об'єкт і методи дослідження. В дослідження включено 144 хворих, яким був встановлений діагноз ЕТ або ПМФ у різних медичних закладах України з 2009 по 2016 рік, з них 79 чоловіків та 65 жінок. Середній вік хворих склав 53,3 роки. Група пацієнтів складалася із 42 хворих, які попередньо зазнали дії ІР внаслідок аварії на ЧАЕС та із 102 хворих на спонтанні МПН. Діагностичні критерії Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) 2016 року перегляду були використані для верифікації діагнозу

МПН. Всі пацієнти підписали інформовану згоду на проведення дослідження в ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (ННЦРМ). Дослідження було схвалене Етичним Комітетом ННЦРМ. Були проаналізовані клініко-гематологічні показники периферичної крові хворих на МПН на момент встановлення діагнозу. Зразки ДНК були отримані із лейкоцитів периферичної крові за допомогою набору для виділення ДНК Qiamp DNA (Qiagen, Німеччина) у відповідності до рекомендацій виробника. Мутацію *JAK2* V617F визначали за допомогою методу алей-специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Мутацію 1-го типу гена *CALR* визначали за допомогою ПЛР в реальному часі (РЧ-ПЛР) із аналізом температури плавлення продуктів ампліфікації. Мутацію 2-го типу гена *CALR* визначали за допомогою методу РЧ-ПЛР TaqMan із використанням специфічних олігонуклеотидних проб до ділянки дикого типу гена *CALR* та ділянки із інсерцією 5 пар основ. Використовували інструмент для РЧ-ПЛР (Applied Biosystems 7500 Fast-Time PCR System), а також 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Великобританія) та 2X TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems, Великобританія) для визначення мутацій гена *CALR* 1-го та 2-го типів, відповідно.

Обробка даних: статистичні розрахунки проводили за допомогою статичного пакету для аналізу даних в середовищі Microsoft Excel 2016. Дані оцінювали із використанням точного тесту Фішера у двобічному варіанті та дисперсійного аналізу. Різницю між показниками вважали значимою при $p <$

CALR були виявлені у 26 із 144 (18,1%) випадків, із них у 12 із 42 (28,6%) хворих на радіаційно-асоційовані МПН та у 14 із 102 (13,7%) хворих на спонтанні МПН. Під час аналізу клініко-гематологічних показників хворих на МПН були враховані мутаційний статус генів *JAK2* та *CALR*, а також факт впливу малих доз ІР в анамнезі (табл.).

Отже, мутаційний статус гена *JAK2* у хворих на ЕТ та ПМФ був визначений у першу чергу, адже мутація *JAK2* V617F виявляється позитивною у 50-60% випадків таких пацієнтів. Отримані дані можна порівняти із результатами авторів інших опублікованих робіт [1,5,6,8]. Необхідно відмітити, що частота *JAK2* V617F мутації дещо нижча серед пацієнтів, які попередньо зазнали дії малих доз ІР, 47,6% проти 61,8% серед хворих на спонтанні МПН ($p = 0,1$), однак знаходиться поза межами статистичної вірогідності. Недавнє дослідження показало, що у хворих на радіаційно-асоційований ПМФ частота *JAK2* V617F мутації також дещо нижча та знаходиться на межі статистичної вірогідності [9]. Оскільки мутації гена *CALR*, які спричиняють розвиток МПН, виключені у *JAK2* V617F-позитивних хворих, тестування на наявність 1-го та 2-го типів мутацій гена *CALR* проводилось лише у *JAK2* V617F-негативних пацієнтів. Частота мутацій гена *CALR* дещо нижча, ніж за даними опублікованих досліджень, що можна пояснити особливостями української популяції, проте для підтвердження наших даних необхідно розширити досліджувану групу хворих на ЕТ та ПМФ із *JAK2* V617F-негативним статусом. На відміну від *JAK2* V617F, мутації гена *CALR* виявляють-

Таблиця.

Клініко-гематологічні показники хворих на МПН

Мутаційний статус	МПН (ЕТ та ПМФ)	Клініко-гематологічні показники			
		Еритроцити, $\times 10^{12}/л$	Гемоглобін, г/л	Тромбоцити, $\times 10^9/л$	Лейкоцити, $\times 10^9/л$
<i>JAK2</i> V617F	Радіаційно-асоційовані МПН	4,6 ± 0,2	132,6 ± 6,8	541,9 ± 79, 1	12,4 ± 2,7
	Спонтанні МПН	5,1 ± 0,2	139,1 ± 3,9	729,1 ± 48,0	14,6 ± 1,3
	Радіаційно-асоційовані МПН vs спонтанні МПН	$p = 0,4$	$p = 0,4$	$p = 0,1$	$p = 0,6$
	Загалом	5,1 ± 0,2	137,4 ± 3,4	691,4 ± 41,6	14,2 ± 1,2
<i>CALR</i>	Радіаційно-асоційовані МПН	3,8 ± 0,3	117,1 ± 5,0	1026,8 ± 223,4	11,5 ± 1,6
	Спонтанні МПН	4,3 ± 0,1	126,5 ± 12,0	1091,5 ± 120,0	9,3 ± 0,5
	Радіаційно-асоційовані МПН vs спонтанні МПН	$p = 0,1$	$p = 0,2$	$p = 0,8$	$p = 0,5$
	Загалом	4,1 ± 0,3	122,1 ± 0,8	1064,3 ± 119,6	10,5 ± 1,2
	<i>JAK2</i> V617F vs <i>CALR</i>	$p = 0,04$	$p = 0,05$	$p = 0,0004$	$p = 0,1$

0,05.

Результати дослідження та їх обговорення. З 144 хворих мутація *JAK2* V617F була виявлена у 83 із 144 (57,6%) випадків, із них у 20 із 42 (47,6%) хворих, які попередньо зазнали дії ІР внаслідок аварії на ЧАЕС, та у 63 із 102 (61,8%) хворих на спонтанні МПН. Мутацію 1-го та 2-го типів гена *CALR* визначали у *JAK2* V617F-негативних пацієнтів. Мутації гена

ся частіше серед хворих на радіаційно-асоційовані МПН, 28,6% проти 13,7% ($p = 0,05$). Виявилось, що кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну нижчі серед *CALR*-позитивних хворих, ніж у хворих із *JAK2* V617F-позитивним мутаційним статусом, $4,1 \pm 0,3 \times 10^{12}/л$ проти $5,1 \pm 0,2 \times 10^{12}/л$ ($p = 0,04$) та $122,1 \pm 0,8$ г/л проти $137,4 \pm 3,4$ г/л ($p = 0,05$), відповідно. Натомість, кількість тромбоцитів є вищою

серед *CALR*-позитивних хворих $1064,3 \pm 119,6 \times 10^9/\text{л}$ проти $691,4 \pm 41,6 \times 10^9/\text{л}$ ($p = 0,0004$), про що повідомлялось і в недавніх роботах інших дослідників. Згідно діагностичних критеріїв для ЕТ та ПМФ ВООЗ 2016 року перегляду, визначення наявності мутацій в генах *JAK2* та *CALR* відносять до великих діагностичних критеріїв разом із патогістологічним дослідженням трепанобіоптату кісткового мозку та клініко-гематологічними показниками периферичної крові. Таким чином, тестування мутаційного статусу гена *CALR* серед *JAK2* V617F-негативних хворих є необхідним для підвищення точності діагностики МПН, особливо радіаційно-асоційованих МПН, визначення групи ризику пацієнта для вибору адекватної тактики в лікуванні з метою покращення загальної виживаності та збереження якості життя.

Висновки. За результатами нашого дослідження, частота мутацій гена *CALR* вища серед хворих на радіаційно-асоційовані ЕТ та ПМФ. Хворі на ЕТ та ПМФ із *CALR*-позитивним мутаційним статусом характеризуються підвищеною кількістю тромбоцитів, та нижчим рівнем гемоглобіну та еритроцитів, порівняно із *JAK2*-позитивними пацієнтами.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення частоти та спектру драйверних та не драйверних мутацій серед хворих на Ph-негативні мієлопроліферативні неоплазії в Україні допоможе краще зрозуміти молекулярно-генетичні механізми розвитку захворювання, підвищить точність діагностики, визначення груп ризику та відкриє дослідникам даної проблеми нові напрямки цільового лікування.

Література

1. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar;19-25;365(9464):1054-61.
2. Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2017 Jun;105(6):743-7.
3. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
4. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic J, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec;269(25):2379-90.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
6. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase *JAK2* in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387-97.
7. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1607-16.
8. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel *MPL* and *JAK2* mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016 Jan 21;127(3):325-32.
9. Mishcheniuk OY, Kostukevich OM, Dmytrenko IV, Sholoyko VV, Prokopenko IM, Martina ZV, et al. Molecular characterization of Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Ukraine. *Exp Oncol*. 2013 Sep;35(3):202-6.
10. Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*. 2012 Jul 23;12:304.
11. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanese C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in *CALR*-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016 Feb;30(2):431-8.
12. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. *MPLW515L* is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):1140-51.
13. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization Classification System for Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer*. 2009 Sep 1;115(17):3842-7.

ОСОБЛИВОСТІ КЛІНІКО-ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ХВОРИХ НА МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ НЕОПЛАЗІЇ ІЗ *CALR*-ПОЗИТИВНИМ МУТАЦІЙНИМ СТАТУСОМ

Полубень Л. О., Неумержицька Л. В., Вербиленко Р. М., Шумейко О. О., Клименко С. В.

Резюме. Визначена частота мутацій 1-го та 2-го типів гена *CALR* у 144 хворих на ЕТ та ПМФ. Мутації гена *CALR* були виявлені у 26 (18,1%) випадків, із них у 12 (28,6%) хворих на радіаційно-асоційовані МПН. Показано, що мутації гена *CALR* виявляються частіше серед хворих на радіаційно-асоційовані МПН ($p = 0,05$). Хворі на ЕТ та ПМФ характеризуються підвищеною кількістю тромбоцитів ($p = 0,0004$). Кількість еритроцитів ($p = 0,04$) та рівень гемоглобіну ($p = 0,05$) є нижчими серед *CALR*-позитивних хворих, ніж у хворих із *JAK2* V617F-позитивним мутаційним статусом.

Ключові слова: мієлопроліферативна неоплазія, мутація, *CALR*, *JAK* V617F.

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИКО-ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ У БОЛЬНЫХ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ С *CALR*-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫМ МУТАЦИОННЫМ СТАТУСОМ

Полубень Л. А., Неумержицкая Л. В., Вербиленко Р. Н., Шумейко А. А., Клименко С. В.

Резюме. Определена частота мутаций 1-го и 2-го типов гена *CALR* у 144 больных ЭТ и ПМФ. Мутации гена *CALR* были обнаружены в 26 (18,1%) случаях, из них у 12 (28,6%) больных радиационно-ассоциированными МПН. Показано, что мутации гена *CALR* оказываются чаще среди больных радиационно-ассоциированными МПН ($p = 0,05$). Больные ЭТ и ПМФ характеризуются повышенным количеством тромбоцитов ($p = 0,0004$). Количество эритроцитов ($p = 0,04$) и уровень гемоглобина ($p = 0,05$) является ниже среди *CALR*-положительных больных, чем у больных с *JAK2* V617F-положительным мутационным статусом.

Ключевые слова: миелопролиферативная неоплазия, мутация, *CALR*, *JAK* V617F.

FEATURES OF HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN *CALR*-POSITIVE PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

Poluben L., Neumerzhitska L., Verbylenko R., Shumeiko O., Klymenko S.

Abstract. Classic chronic Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are an unique group of hematologic diseases encompassing polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). Our understanding of the mechanisms of MPNs development was dramatically changed in 2005, when recurrent mutation of tyrosine kinase *JAK2* V617F was described in most patients with PV and in 50-60% patients with ET and PMF. Later, other MPNs-causing mutations were reported in *MPL*, *CALR* genes as well as in *JAK2* gene involving other localizations. In most cases mutations in these genes arise in mutually exclusive way and cause establishment of myeloproliferative phenotype predominantly through JAK-STAT3/5 signalling pathway. Therefore, MPNs have common molecular genetic features and can mimic each other. However, due to impact of the factors such as specific disease-causing mutations in one of three mentioned genes, experiencing of low doses of ionizing radiation, they can present with different clinical characteristics.

Aim of our research was to study the frequency of the most common *CALR* gene mutations and their association with clinical hematological characteristics in Ukrainian patients with ET and PMF with accent on radiation-associated MPNs. 144 patients with ET and PMF (including 42 patients who were previously exposed to low doses of ionizing radiation) were tested for presence of *JAK2* V617F mutation using allele-specific PCR, 1st type *CALR* (52 bp deletion) and 2nd type *CALR* (5 bp insertion) gene mutations using RT-PCR. Hematological parameters in 144 MPN patients were analysed. *CALR* gene mutations were detected in 26 (18,1%) cases, including 12 (28,6%) patient with MPNs previously exposed to ionizing radiation. In our study we showed that *CALR* gene mutations are more common among MPN patients who were previously exposed to ionizing radiation ($p = 0,05$). Platelets count is higher ($p = 0,0004$), but red blood cells count ($p = 0,04$) and level of hemoglobin ($p = 0,05$) are lower in *CALR*-positive patients, than in *JAK2*-positive patients.

Key words: myeloproliferative neoplasm, mutation, *CALR*, *JAK* V617F.

Рецензент – проф. Скрипник І. М.

Стаття надійшла 22.01.2018 року