



**Р. Ю. Лозинський¹, М. І. Вороняк¹, Л. О. Полубень²,
І. В. Дмитренко², М. Р. Лозинська^{1,3},
Я. І. Виговська¹, З. В. Масляк¹**

¹ ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини
НАМН України», м. Львів

² ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини
НАМН України», м. Київ

³ ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України», м. Львів

Інформативність поєднання молекулярно-генетичних і цитогенетичних методів діагностики мієлофіброзу

Вступ. Мієлофіброз (МФ) – рідкісне класичне мієлопроліферативне захворювання з ураженням стовбурових клітин – мієлоїдних попередників [7]. Відповідно до сучасних критеріїв визначення діагнозу МФ, вимагає підтвердження клональності патологічного мієлопроліферативного процесу [4]. Однак єдиного патогномонічного маркера захворювання не виявлено. Найчастіше за наявності МФ фіксуються точкова місенс-мутація гена *JAK2* в екзоні 12 – *JAK2V617F*, а також цитогенетичні аномалії [3]. У разі появи додаткових аномалій значно погіршується прогноз захворювання, зокрема, через вищий ризик трансформації в гостру лейкемію [5, 6].

Мета дослідження. З'ясувати інформативність молекулярно-генетичних, цитогенетичних методів виявлення клональних маркерів мієлофіброзу та їх поєднання для діагностики й прогнозування перебігу цього захворювання.

Матеріали й методи дослідження. Досліджувана група хворих складалася з 37 осіб (21 особа жіночої статі, 16 – чоловічої; середній вік пацієнтів 56,7 року), із яких 33 страждали на первинний МФ, а 4 – на вторинний МФ, що виник унаслідок трансформації справжньої поліцитемії.

Усі пацієнти, які проходили обстеження в цьому дослідженні, підписали інформовану згоду про участь у ньому. Дослідження було погоджене з Локальним етичним комітетом і проводилося згідно з принципами Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини, біомедицину та відповідних законів України. Діагностику проводили згідно з критеріями ВООЗ для мієлопроліферативних захворювань [4]. Курацію хворих здійснювали в клініці ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України» (ДУ «ІПКТМ НАМН») за протоколом надання медичної допомоги, затвердженим МОЗ для ідіопатичного МФ. Виділення та очищення дезоксирибонуклеїнової

кислоти (ДНК) здійснювали методом фенольної екстракції.

У молекулярно-генетичному дослідженні лейкоцитів периферійної крові для визначення мутації *JAK2V617F* застосовували алель-специфічну мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР). Зразки 10 хворих вивчали за допомогою гелі-електрофорезу продуктів ПЛР в ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України». Наявність мутації *JAK2V617F* у решти хворих, а також у динаміці через 1-2 роки для перших 10 хворих визначали в ДУ «ІПКТМ НАМН» за допомогою аналізу кривих утворення продуктів ПЛР у режимі реального часу, отриманих із використанням автоматичного термоциклера BIO-RAD CFX96. 34 обстеженим пацієнтам у ДУ «ІПКТМ НАМН» проводили цитогенетичне дослідження. Клітини *in vitro* для отримання метафазних хромосом культивували впродовж 24 год. Застосовували культуральне середовище RPMI 1640 та ембріональну телячу сироватку. Для зупинення мітозу на стадії метафази використовували розчин колхіцину. Проводили стандартну фіксацію клітин. Диференційне забарвлення хромосом здійснювали за допомогою G-методу.

Результати дослідження та їх обговорення. У 22 (59,5 %) хворих на МФ підтверджено наявність мутації *JAK2V617F*, а в 15 (40,5 %) її не вдалося виявити під час молекулярно-генетичного дослідження. Як і очікувалося [2], всі 4 хворі з трансформацією справжньої поліцитемії були позитивними за мутацією *JAK2V617F*. Отже, серед хворих на первинний МФ мутацію виявлено у 18 (54,5 %) із 33. Ці показники мутаційного статусу хворих наближені до отриманих швейцарсько-італійською групою вчених (57,0 %), які вперше довели взаємозв'язок мутації *JAK2V617F* із мієлопроліферативними захворюваннями [1].

Серед усіх хворих, у яких виявлено мутацію, троє раніше не отримували специфічного лікування. У 16

хворих із мутацією першою лінією лікування було використання гідроксисечовини. Четверо пацієнтів отримували інтерферон- α на різних етапах лікування (з них один – нерегулярно, вживаючи гідроксисечовину за відсутності інтерферону). Повної молекулярної відповіді на лікування гідроксисечовиною чи інтерфероном- α досягнути не вдалося у жодного з 10 хворих, яким проводили молекулярно-генетичне дослідження в динаміці. Водночас зазначимо, що загальна тривалість лікування препаратами інтерферону обстежених хворих не перевищувала 36 місяців, часткову молекулярну відповідь кількісними методами не визначали.

У двох хворих аналіз кривих ПЛР у режимі реального часу не виявив «дикого типу» алелі гена *JAK2*, а тільки мутантну алель. Таким чином, у цих хворих підтверджено гомозиготність за мутантною алеллю. Це підтверджує еволюцію патологічного клона з витісненням первинного пулу клітин, гетерозиготного за цією мутацією. У решти хворих, у яких виявлено мутацію, в лейкоцитах крові була присутня ДНК як мутантної алелі гена, так і незміненої. Це може бути зумовлене не лише гетерозиготністю патологічних клітин, що несуть мутацію, але й наявністю значної кількості клітин без мутації в циркуляції. У двох хворих без алелі «дикого типу» можна констатувати майже повне пригнічення нормального кровотворення й підтримання клітинного складу крові лише за рахунок патологічних клітин, причому це стосується також клітин лімфоїдного ряду. Хоча відсоток лейкоцитів немієлоїдного походження в крові цих хворих невисокий (11,0–12,0 %), однак достатній для виявлення незміненої алелі гена. Можна припустити, що власне у таких хворих існує ризик трансформації МФ в гостру лімфоїдну, а не лише мієлоїдну лейкемію.

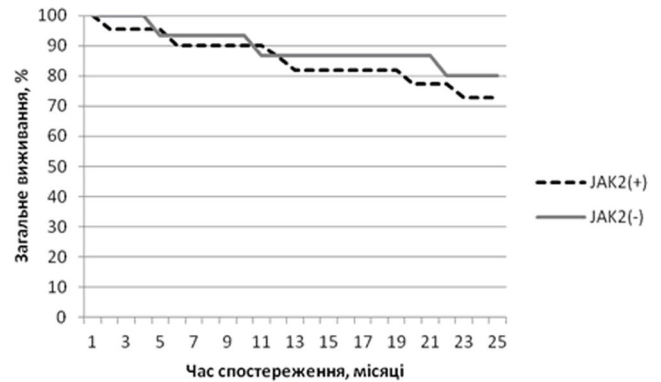
Наявність мутантної алелі асоційована з вищою частотою цитогенетичних аномалій. Хромосомну патологію виявили у 13 хворих (38,2 %). Спектр аномалій включав делеції і транслокації 1-ї хромосоми, делеції 5q і 20q, трисомії 3-ї, 8-ї, 9-ї, 12-ї хромосом, моносомії 3-ї, 5-ї, 7-ї, 9-ї, 11-ї, 13-ї, 15-ї, 17-ї хромосом, появу ізохромосоми і(17q), а також поліплоїдію. У чотирьох хворих був комплексний каріотип.

У трьох хворих зафіксовано збільшення плоїдності клітин, що несуть мутацію *JAK2V617F*, унаслідок чого може зростати кількість мутантних алелей гена в клітині й посилюватися його експресія. Кількість мутантних алелей може зростати за рахунок трисомії 9-ї хромосоми (одна хвора).

Поседнання досліджуваної точкової мутації та аномалій каріотипу виявлено у восьми хворих (21,6 %). У п'яти хворих (13,5 %) цитогенетичні аномалії були єдиними виявленими клональними маркерами, які дали підставу підтвердити хронічний мієлопроліферативний процес. Таким чином, клональні генетичні маркери вдалося визначити у 27 хворих (73,0 %), що спростило диференційний діагноз.

Наявність мутації *JAK2V617F* за відсутності цитогенетичних аномалій свідчить про її первинну роль у започаткуванні патологічного мієлопроліферативного процесу в цих пацієнтів із МФ.

Серед хворих із мутацією *JAK2V617F* за 24 місяці спостереження померло шестеро (27,3 %), а без мутації – троє (20,0 %). Загальне виживання хворих із різним мутаційним статусом зображено на рисунку.



Криві виживання Е. Л. Каплана – П. Мейєра хворих на мієлофіброз, залежно від наявності мутації *JAK2V617F*: суцільна – хворі без мутації, штрихова – мутація наявна.

Як бачимо з рисунка, спостерігається тенденція до зростання смертності з плином часу у хворих, клітини крові яких несуть мутацію *JAK2V617F*. Однак у дослідження слід залучати більшу кількість хворих для підтвердження статистичної достовірності цих відмінностей.

Висновки. Використання тільки одного методу дослідження – або молекулярно-генетичного (визначення мутації *JAK2V617F*), або цитогенетичного – дало змогу виявити клональний маркер для підтвердження діагнозу мієлофіброзу лише в 38,2 і 59,5 % хворих відповідно. Натомість за одночасного проведення молекулярно-генетичного та цитогенетичного аналізу відсоток виявлення клональності підвищився до 73,8.

Цитогенетичні аномалії зафіксовано і в хворих із мутацією *JAK2V617F*, і в тих, у кого її не було. У деяких пацієнтів клітинний склад крові підтримувався лише за рахунок патологічного кровотворення з мутантних за геном *JAK2* клітин. Наявність таких цитогенетичних аномалій, як поліплоїдія та трисомія 9-ї хромосоми, може призводити до збільшення кількості мутантних алелей гена *JAK2* в клітині. Виявлення аномалій окремих хромосом може прискорити й здешевити пошук інших (зокрема, додаткових) молекулярно-генетичних аномалій, відмінних від *JAK2V617F*. Хворі на мієлофіброз із мутацією *JAK2V617F* мали трохи коротше загальне виживання.

Список літератури

1. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorder / R. Kralovics, F. Passamonti, A. S. Buser [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – P. 1779–1790.
2. Diagnosis and Management of Polycythemia Vera in the Post-*JAK2* V617F Discovery Era : A Survey of Practice Patterns / B. L. Stein, E. M. Kander, Z. Zhou [et al.] // *Blood.* – 2014. – Vol. 124, N 21. – P. 2172–2172.
3. Somatic *CALR* mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated *JAK2* / J. Nangalia, C. E. Massie, E. J. Baxter [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, N 25. – P. 2391–2405.
4. Tefferi A. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms : the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms / A. Tefferi, J. W. Vardiman // *Leukemia.* – 2008. – Vol. 22, N 1. – P. 14–22.
5. The impact of cytogenetic abnormalities on the prognosis of primary myelofibrosis : a prospective survey of 202 cases in Japan / T. Hidaka, K. Shide, H. Shimoda [et al.] // *Europ. J. Haematol.* – 2009. – Vol. 83, N 4. – P. 328–333.
6. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis : applicability at the time of diagnosis and later during disease course / C. S. Tam, L. V. Abruzzo, K. I. Lin [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 113, N 18. – P. 4171–4178.
7. Them N. C. C. Genetic Basis of MPN: Beyond *JAK2*-V617F / N. C. C. Them, R. Kralovics // *Curr. Hematol. Malignan. Reports.* – 2013. – Vol. 8, N 4. – P. 299–306.

Стаття надійшла до редакції журналу 29 січня 2016 р.

Інформативність поєднання молекулярно-генетичних і цитогенетичних методів діагностики мієлофіброзу

Р. Ю. Лозинський, М. І. Вороняк, Л. О. Полубень,
І. В. Дмитренко, М. Р. Лозинська, Я. І. Виговська, З. В. Масляк

Вивчено інформативність молекулярно-генетичних і цитогенетичних клональних маркерів мієлофіброзу, а також їх поєднання для діагностики та прогнозування перебігу цього захворювання. В дослідженні взяло участь 37 хворих (33 з первинним мієлофіброзом і 4 з вторинним мієлофіброзом, що виник унаслідок трансформації справжньої поліцитемії). У 59,5 % хворих підтверджено наявність мутації *JAK2*V617F. Хромосомні аномалії виявили у 38,2 % хворих. Загальна смертність хворих із мутацією *JAK2*V617F становила 27,3 % за 24 місяці. За відсутності цієї мутації рівень смертності був трохи нижчим і становив 20,0 %. У 13,5 % пацієнтів цитогенетичні аномалії були єдиними виявленими клональними маркерами, за допомогою яких підтверджено хронічний мієлопроліферативний процес. Одночасне проведення цитогенетичного аналізу та визначення мутації *JAK2*V617F у хворих на мієлофіброз підвищило відсоток підтвердження клональності патологічного процесу до 73,0 % хворих проти 38,2–59,5 % за умови використання лише одного методу дослідження.

Ключові слова: мієлофіброз, мутація *JAK2*V617F, хромосомні аномалії.

Informative Value of Combination of Molecular Genetic and Cytogenetic Diagnostic Methods in Myelofibrosis

R. Lozynskyy, M. Voronyak, L. Poluben, I. Dmytrenko, M. Lozynska,
Ya. Vygovska, Z. Maslyak

Introduction. Myelofibrosis is a rare disease affecting myeloid progenitor stem cells. According to the modern criteria of myelofibrosis diagnostics, the confirmation of the clonality of pathological myeloproliferative process is needed. However, the unique pathognomonic marker for this disease is not revealed. Point missense mutation of *JAK2* gene in exon 12 - the *JAK2*V617F mutation, and karyotype abnormalities are the most frequently found in myelofibrosis patients. In case of additional anomalies the disease prognosis worsens dramatically, in particular, because of higher risk of the transformation to acute leukemia.

The purpose of the study was to identify informative combination of molecular genetic and cytogenetic clonal markers for diagnosis and prognosis of myelofibrosis.

Materials and research methods. 37 patients were recruited in the study (33 with primary myelofibrosis and 4 with secondary post-polycythemia vera myelofibrosis). Cytogenetic studies were performed for 34 patients. All the patients underwent molecular genetic studies of blood to detect the *JAK2*V617F mutation. The mutational status of *JAK2* gene was reexamined in 10 patients from 1 to 2 years after the initial examination.

Results of the investigation and their discussion. The presence of the mutation *JAK2V167F* was confirmed in 59.5 % of the patients. Chromosomal abnormalities were revealed in 38.2 % of patients. The spectrum of abnormalities included deletions and translocations of chromosome 1, deletions of 5q and 20q, trisomies of chromosomes 3, 8, 9 and 12, monosomies of chromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 17, appearance of isochromosome 17q, and polyploidy. 4 patients had a complex karyotype. The coincidence of investigated point mutation and karyotype abnormalities was revealed in the total of 8 (21.6 %) patients. The presence of the mutant allele V617F was associated with higher frequency of cytogenetical abnormalities. The complete molecular response to the therapy with hydroxyurea and interferon- α was not achieved in any of the 10 patients who underwent the molecular genetic re-examination. The overall mortality of the patients with *JAK2V167F* mutation was 27.3 % in 24 months. In the absence of the mutation the mortality rate was slightly lower and constituted 20.0 %. Cytogenetic abnormalities were the only detected clonal markers that allowed to confirm the chronic myeloproliferative process in 13.5 % of patients.

Conclusions. Simultaneous cytogenetic analysis and the identification of *JAK2V167F* mutation increased the rate of clonal confirmation of the pathological process in myelofibrosis patients to 73.0 %, in contrast to 38.2–59.5 % using only one method of investigation. The presence of such cytogenetic anomalies as polyploidy and trisomy of chromosome 9 could result in increase of the copy number of *JAK2* gene mutant alleles in pathological cells. The patients having both no detectable level of "wild type" allele of *JAK2* gene and considerable quantity of lymphocytes in the blood, could possibly be of higher risk of further transformation of myelofibrosis to acute lymphoid, and not only myeloid leukemia.

Keywords: myelofibrosis, *JAK2V617F* mutation, chromosomal abnormalities.