Клиническая онкогематология. 2018;11(4):354–9

ОНКО клиническая ГЕМАТОЛОГИЯ

МИЕЛОИДНЫЕ ОПУХОЛИ

Экспрессия гена *BCR-ABL1* у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями с признаками прогрессирования

Л.А. Кесаева[1], Е.Н. Мисюрина[2], Д.С. Марьин[2], Е.И. Желнова[2], А.Ю. Буланов[2], А.Е. Мисюрина[3], А.А. Крутов[4], И.Н. Солдатова[4], С.С. Зборовский[4], В.А. Мисюрин[1,4], В.В. Тихонова[1], Ю.П. Финашутина[1], О.Н. Солопова[1], Н.А. Лыжко[1], А.Е. Беспалова[1], Н.Н. Касаткина[1], А.В. Пономарев[1], М.А. Лысенко[2], А.В. Мисюрин[1,4]

[1] ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

[2] ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52 ДЗМ», ул. Пехотная, д. 3, Москва, Российская Федерация, 123182

[3] ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Новый Зыковский пр-д, д. 4, Москва, Российская Федерация, 125167

[4] ООО «ГеноТехнология», ул. Профсоюзная, д. 104, Москва, Российская Федерация, 117485

РЕФЕРАТ

Актуальность. Известно, что мутация V617F гена *JAK2* обнаруживается при Ph-негативных хронических миелопролиферативных заболеваниях (хМПЗ) — эритремии, тромбоцитемии, миелофиброзе. Эти заболевания прогрессируют, нередко переходя в более агрессивные формы вплоть до острого лейкоза. Механизм прогрессирования неизвестен, в связи с чем высокоактуальной остается задача его изучения. Есть предположение, что ген *JAK2*, несущий мутацию V617F, приводит к постоянной активации рекомбиназы V(D)J в миелоидных опухолевых клетках больных хМПЗ. В результате аберрантной активности V(D)J-рекомбиназы в опухолевых клетках больных хМПЗ может происходить хромосомная перестройка t(9;22)(q34;q11).

Цель. Изучить экспрессию гена *BCR-ABL1*, который является продуктом транслокации t(9;22)(q34;q11), у больных хМПЗ на этапе прогрессирования с целью проверить выдвинутую гипотезу.

Материалы и методы. Экспрессию гена *BCR-ABL1* определяли в гранулоцитах периферической крови больных хМПЗ методом ПЦР в реальном времени. Мутацию *JAK2* V617F устанавливали с помощью количественной аллель-специфичной ПЦР. Для определения мутаций экзона 12 гена *JAK2* проводили прямое секвенирование ПЦР-продуктов по Сэнгеру.

Результаты. Обнаружено, что у 29 % больных с прогрессированием хМПЗ наблюдается экспрессия гена

Clinical oncohematology. 2018;11(4):354–9

ONCO clinical HEMATOLOGY

MYELOID TUMORS

Expression of the *BCR-ABL1* Gene in Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases with Signs of Progression

LA Kesaeva[1], EN Misyurina[2], DS Mar'in[2], EI Zhelnova[2], AYu Bulanov[2], AE Misyurina[3], AA Krutov[4], IN Soldatova[4], SS Zborovskii[4], VA Misyurin[1,4], VV Tikhonova[1], YuP Finashutina[1], ON Solopova[1], NA Lyzhko[1], AE Bespalova[1], NN Kasatkina[1], AV Ponomarev[1], MA Lysenko[2], AV Misyurin[1,4]

[1] NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

[2] Municipal Clinical Hospital No. 52, 3 Pekhotnaya str., Moscow, Russian Federation, 123182

[3] National Research Center for Hematology, 4 Novyi Zykovskii pr-d, Moscow, Russian Federation, 125167

[4] GenoTekhnologiya, 104 Profsoyuznaya str., Moscow, Russian Federation, 117485

ABSTRACT

Background. The V617F mutation of *JAK2* is known to manifest in Ph-negative chronic myeloproliferative diseases (cMPD), such as polycythemia vera, thrombocythemia, and myelofibrosis. These diseases not infrequently advance into more aggressive forms up to acute leukemia. As the progression mechanism is still unknown, its study retains a high priority. *JAK2* carrying the V617F mutation is believed to cause constant activation of V(D)J recombinase in myeloid tumor cells in cMPD patients. Aberrant activation of V(D)J recombinase in tumor cells in cMPD patients can lead to t(9;22)(q34;q11) chromosomal rearrangement.

Aim. To study the expression of *BCR-ABL1* resulting from translocation t(9;22)(q34;q11) in cMPD patients at the progression stage in order to test the suggested hypothesis.

Materials & Methods. The *BCR-ABL1* expression was assessed in peripheral blood granulocytes in cMPD patients by real-time PCR. The *JAK2* V617F mutation was identified by quantitative allele-specific PCR. The *JAK2* exon 12 mutations were determined using Sanger direct sequencing of PCR products.

Results. The *BCR-ABL1* expression was discovered in 29 % of patients with cMPD progression. The *BCR-ABL1* expression in these patients correlated with hepatosplenomegaly and hyperleukocytosis.

© 2018 практическая медицина

BCR-ABL1. Наличие экспрессии гена *BCR-ABL1* у этих больных коррелировало с гепатоспленомегалией и повышенным лейкоцитозом.
Заключение. У значительной доли больных хМПЗ прогрессирование заболевания может быть связано с активацией экспрессии гена *BCR-ABL1*.

Ключевые слова: *JAK2* V617F, *BCR-ABL1,* V(D)J-рекомбиназа, t(9;22)(q34;q11), истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, миелофиброз, хронический миелолейкоз.

Получено: 2 апреля 2018 г.
Принято в печать: 5 августа 2018 г.

Для переписки: Андрей Витальевич Мисюрин, канд. биол. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; тел.: +7(499)612-80-38; e-mail: and@genetechnology.ru

Для цитирования: Кесаева Л.А., Мисюрина Е.Н., Марьин Д.С. и др. Экспрессия гена BCR-ABL1 у пациентов с хроническими миелопролиферативными заболеваниями с признаками прогрессирования. Клиническая онкогематология. 2018;11(4):354–9.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-354-359

Conclusion. In a significant proportion of cMPD patients the disease progression can be associated with activation of the *BCR-ABL* expression.

Keywords: *JAK2* V617F, *BCR-ABL1,* V(D)J recombinase, t(9;22)(q34;q11), polycythemia vera, essential thrombocythemia, myelofibrosis, chronic myeloid leukemia.

Received: April 2, 2018
Accepted: August 5, 2018

For correspondence: Andrei Vital'evich Misyurin, PhD in Biology, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; Tel.: +7(499)612-80-38; e-mail: and@genetechnology.ru

For citation: Kesaeva LA, Misyurina EN, Mar'in DS, et al. Expression of the BCR-ABL1 Gene in Patients with Chronic Myeloproliferative Diseases with Signs of Progression. Clinical oncohematology. 2018;11(4):354–9.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-4-354-359

ВВЕДЕНИЕ

В 1951 г. W. Dameshek предложил объединить эритремию, или истинную полицитемию (ИП), эссенциальную тромбоцитемию (ЭТ) и идиопатический миелофиброз (ИМФ) вместе с хроническим миелолейкозом (ХМЛ) в одну группу хронических миелопролиферативных заболеваний (хМПЗ) благодаря сходству клинических и морфологических свойств, а также на основании предположения об общей патогенетической природе этих заболеваний [1]. В 1960 г. P. Nowell и D. Hungerford [2] обнаружили, что специфическим цитогенетическим маркером ХМЛ является филадельфийская хромосома (Ph), которая, как позднее было показано [3, 4], возникает в результате реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11). При реализации транслокации t(9;22) в составе Ph-хромосомы образуется химерный ген *BCR-ABL1*, белковый продукт которого p210 BCR-ABL1 служит причиной развития ХМЛ [4, 5]. Таким образом, оказалось, что ХМЛ имеет особый механизм патогенеза, отличающий это заболевание от ИП, ЭТ и ИМФ, которые поэтому стали называть Ph-негативными хМПЗ. Долгое время причины развития Ph-негативных хМПЗ были неизвестны, однако с открытием точечной мутации в экзоне 14 гена Янус-киназы 2 *JAK2* V617F [6], микроделеций экзона 12 этого гена (*JAK2*-12ex) [7], мутаций гена рецептора тромбопоэтина *MPL* W515L/K [8] и кальретикулина *CALR* [9, 10] существенно возросло понимание молекулярных механизмов патогенеза хМПЗ [11–13].

В 2007 г. было описано два клинических наблюдения ИП, которые в дебюте были *BCR-ABL1*-негативными, однако в результате прогрессирования заболевания приобрели черты классического ХМЛ с экспрессией *BCR-ABL1* и выявляемой при цитогенетическом исследовании Ph-хромосомой [14]. В 2010 г. сочетание экспрессии *BCR-ABL1* и мутации *JAK2* V617F наблюдалось у беременной женщины в Тегеране (Иран) [15]. В том же 2010 г. описано сочетание *BCR-ABL1*-позитивного ХМЛ и *JAK2* V617F-позитивной ИП у 60-летнего мужчины из Малайзии. Оказалось, что эти маркеры существовали в разных опухолевых клонах, каждый из которых был причиной одной из двух болезней у этого пациента [16]. В более ранних публикациях, предшествовавших «эре *JAK2* V617F», неоднократно упоминались случаи хМПЗ, при исследовании которых выявляли экспрессию гена *BCR-ABL1* [17–19]. В связи с этим мы предположили, что ИП, ЭТ и ИМФ нельзя безоговорочно считать Ph-негативными заболеваниями. Вероятно, W. Dameshek был прав, когда говорил об общности патогенеза не только ИП, ЭТ и ИМФ, но и ХМЛ. Но почему Ph-хромосома и экспрессия гена *BCR-ABL1* отсутствуют у первичных больных ИП, ЭТ и ИМФ? Мы предположили, что этот молекулярно-генетический маркер появляется у больных ИП, ЭТ и ИМФ только при длительном течении этих заболеваний и является вероятной причиной их прогрессирования в более поздние стадии. В связи с этим целью нашей работы стало изучение экспрессии гена *BCR-ABL1* у больных хМПЗ с явными признаками прогрессирования, которые проявлялись недостаточным ответом на проводимую терапию, гепатоспленомегалией, высокими показателями при морфологическом анализе крови, а также выраженным миелофиброзом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы периферической крови объемом 15 мл были получены от 32 больных ИП, 34 — ЭТ, 85 — ИМФ. При заболеваниях крови использовалась 6% этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) в качестве антикоагулянта. Диагноз хМПЗ у всех па-

циентов установлен не менее чем за 5 лет до начала исследования. Все больные имели явные признаки прогрессирования согласно клиническим критериям. Кроме того, мы исследовали периферическую кровь 200 первичных больных хМПЗ и 50 больных ХМЛ, которые составили группы контроля. Больные наблюдались в онкогематологических отделениях лечебных учреждений Москвы. От пациентов были получены информированные согласия на проведение данного исследования.

Выделение фракции гранулоцитов

Для осаждения эритроцитов в пробирку с кровью добавляли равный объем 3% раствора декстрана 500000. После осаждения эритроцитов собирали верхнюю фазу и центрифугировали ее в течение 10 мин со скоростью 1500 об./мин. Верхнюю фазу удаляли и растворяли клеточный осадок в изотоническом растворе натрия хлорида, объем которого был равен начальному объему крови. Для выделения фракции чистых гранулоцитов полученный раствор наслаивали на 5 мл фиколла (Mono-Poli, ICN) и центрифугировали в течение 40 мин при 1500 об./мин. Затем удаляли верхнюю фазу, содержащую мононуклеары. Оставшиеся эритроциты элиминировались посредством гипотонического лизиса (0,2% натрия хлорид в течение не более 30 с). Этот метод позволял получить более чем на 98 % чистую фракцию гранулоцитов, что было подтверждено при проведении визуального контроля мазков, окрашенных по Романовскому—Гимзе.

Выделение тотальной РНК

Полученные гранулоциты лизировали в 500–600 мкл буфера следующего состава: 4,5 моль гуанидин изотиоцианата, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % лаурил саркозила, 0,1 моль 2-меркаптоэтанола. Добавляли $^{1}/_{10}$ объема 2 моль ацетата натрия, pH 4,0, 50 мкл насыщенного DEPC-обработанной водой фенола и 20 мкл хлороформа с изоамиловым спиртом (49:1). Смесь встряхивали на шейкере и помещали на 15 мин в лед, после чего центрифугировали при температуре 4 °С в течение 10 мин при 10 000 g. Верхнюю водную фазу еще раз экстрагировали смесью фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (24:24:1), насыщенной водным раствором 10 ммоль Трис-HCl, 1 ммоль ЭДТА, pH 8,0. Водную фазу смешивали с 50 мкл изопропанола и выдерживали не менее 4 ч при температуре –20 °С. Центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин при температуре 25 °С и получали осадок РНК. Этот осадок растворяли в буфере ТЕ, сделанном на DEPC-обработанной воде, вновь осаждали РНК тремя объемами 98% этанола в присутствии 0,5 моль натрия хлорида. Качество полученной РНК оценивали электрофорезом в 1,6% агарозном геле.

Пригодными для дальнейшего анализа считали те образцы, которые давали характерную картину распределения пиков рРНК и тРНК.

Реакция обратной транскрипции

При проведении реакции обратной транскрипции выполняли отжиг РНК (1 мкг) и 2 мкл случайных гексамеров (концентрация 99 пкмоль/л) в течение 30 с при температуре 95 °С с последующим быстрым охлаждением (лед). Далее добавляли реакционную смесь (20 мкл) следующего состава: 75 ммоль калия хлорида, 50 ммоль Трис (pH 8,9), 10 ммоль DTT, 3 ммоль магния хлорида, 1 ммоль каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов, 20 ед. ингибитора РНКаз (Promega), 100 ед. обратной транскриптазы M-MLV (Promega). Реакцию обратной транскрипции проводили при температуре 37 °С в течение 60 мин.

Выделение геномной ДНК

Для выделения геномной ДНК использовали следующую процедуру. К осадку гранулоцитов добавляли 1 мл буфера STE (10 ммоль Трис-HCl, pH 8,0; 100 ммоль натрия хлорида; 1 ммоль ЭДТА, pH 8,0) и встряхивали на шейкере для получения суспензии клеток. Добавляли протеиназу К до конечной концентрации 50 мкг/мл и додецилсульфат натрия до 0,5 %. Оставляли инкубироваться при температуре 37 °С в течение ночи. На следующий день для очистки от полипептидов добавляли равный объем фенола, уравновешенного 0,1 моль Трис-HCl (pH 8,0), перемешивали и центрифугировали при 6000 об./мин в течение 15 мин. Отбирали водную фазу, повторяли очистку, используя смесь хлороформ/изоамиловый спирт (24:1). ДНК осаждали из верхней фазы в присутствии 0,3 моль ацетата натрия 2,5 объема этанола при температуре –20 °С. Центрифугировали при 9000 g в течение 15 мин. Осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали, растворяли в ТЕ. Качество полученной ДНК оценивали электрофорезом в 0,6% агарозном геле.

Пригодными для дальнейшего анализа считали те образцы ДНК, которые имели меньшую подвижность, чем интактная ДНК маркерного бактериофага λ.

ПЦР в реальном времени

Для количественного определения уровней экспрессии генов *BCR-ABL* типов p190, p210 и p230 использовали диагностические тест-системы «ОНКОСКРИН-1-1Q», «ОНКОСКРИН-1-2Q» и «ОНКОСКРИН-1-3Q» («ГеноТехнология», Россия). Для количественной оценки уровня экспрессии гена «домашнего хозяйства» ABL использовали набор «ОНКОСКРИН-14Q» («ГеноТехнология», Россия). Анализ мутаций V617F гена *JAK2* и W515L/K гена *MPL* осуществляли с помощью наборов JAK2V617F-тест и MPLW515-тест («ГеноТехнология», Россия). Реакции проводили согласно протоколам производителя с использованием ПЦР-амплификатора LC96 (Roche, Швейцария).

Определение мутаций экзона 12 гена *JAK2* проводили с помощью прямого секвенирования ПЦР-продуктов по Сэнгеру. При этом использовали праймеры Jak2 e12-F AATCAAACCTTCTAGTCTTCAG и Jak2 e12-R CCAATGTCACATGAATGTAA. Секвенирование очищенных с помощью электрофореза фрагментов ДНК выполняли с использованием генетического анализатора AB310 (Applied BioSystems, США). Секвенирующие реакции проводили с использованием наборов 3.1 BigDye (Life Technologies, США). Условия секвенирующей ПЦР были следующими: 40 циклов по 95 °С — 30 с, 50 °С — 4 мин. Для освобождения от невключившихся флюоресцентных нуклеотидов ПЦР-продукты переосаждали с помощью 95% этанола в присутствии ЭДТА и ацетата натрия. Отмывали

75% этанолом, высушивали в твердотельном термостате. После растворения в формамиде HiDi (Life Technologies, США) образцы подвергали термической денатурации при температуре 95 °C в течение 3 мин и немедленно помещали в лед, затем использовали для секвенирующего электрофореза с помощью AB310. Результаты секвенирования предварительно обрабатывали с помощью штатных программ, поставляемых вместе с генетическим анализатором, а затем изучали в пакете программ Vector NTI 11.5.1.

Статистический анализ

Согласно тесту Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса, количественные данные имели нормальное распределение значений. Согласно критерию Фишера, генеральные дисперсии количественных значений в анализируемых группах незначимо отличались друг от друга. В связи с этим анализ количественных данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Для анализа качественных данных использовался критерий χ^2. Данные представлены в виде медианы и диапазона значений с 95%-м доверительным интервалом. Различия признавались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Анализ проводился в программе STATISTICA 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения стоявшей перед нами проблемы мы провели отбор больных хМПЗ и сформировали группу пациентов с явными признаками прогрессирования и сроком от установления диагноза более 5 лет. Для изучения этой группы определяли экспрессию гена *BCR-ABL1* (p190, p210 и p230) с помощью ПЦР в реальном времени. Мутации *JAK2* V617F, *JAK2*-ex12 и *MPL* W515L/K выявляли путем аллель-специфичной ПЦР и прямого секвенирования ПЦР-продуктов.

Мы проанализировали образцы крови от 151 больного хМПЗ с признаками прогрессирования (ИП — 21 %, 32/151; ЭТ — 23 %, 34/151; ИМФ — 56 %, 85/151); медиана возраста составила 62 года (диапазон 23–86 лет), 65 % (98/151) женщин, 35 % (53/151) мужчин. Кроме того, были сформированы группы контроля из образцов крови больных ХМЛ ($n = 200$) и хМПЗ ($n = 50$) на разных стадиях развития заболеваний.

Экспрессия *BCR-ABL1* была обнаружена у 29 % (43/151) больных с прогрессированием хМПЗ, в основном типа p210, только 2 случая были p190, и ни в одном не был обнаружен вариант p230. Уровень экспрессии *BCR-ABL1* (если выявлялся) у большинства больных был довольно низким: медиана составила 0,03 (25–75%-й интервал 0,012–0,68 % IS, международная шкала ELN).

JAK2 V617F наблюдали у 117 (78 %) из 151 больного, *JAK2*-ex12 — у 2 (1 %). У 21 % (32/151) пациентов данные мутации не обнаружены. Мутации *MPL* W515L/K у 151 больного с признаками прогрессирования не выявлены.

BCR-ABL1-позитивные (BA+) и *BCR-ABL1*-негативные (BA–) группы пациентов имели равное соотношение мужчин и женщин. Эти группы не различались и по уровню гемоглобина и эритроцитов. При этом в группе BA+ было обнаружено существенное повышение уровня лейкоцитов в сравнении с группой BA–. Кроме того, у BA+ пациентов наблюдался повышенный уровень тромбоцитов. Еще одним ярким отличием группы BA+ было большое число случаев гепатоспленомегалии (табл. 1).

В контрольной группе ХМЛ экспрессия гена *BCR-ABL1* наблюдалась у 100 % (200/200) больных, при этом ни у кого из них не было мутаций гена *JAK2*. В контрольной группе первичных больных хМПЗ слабая экспрессия гена *BCR-ABL1* наблюдалась у 2 (4 %) из 50 пациентов, а мутации гена *JAK2* — у 45 (90 %).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прогрессирование хМПЗ в ХМЛ с приобретением опухолевыми клетками способности экспрессировать ген *BCR-ABL1* описано многими авторами в виде отдельных клинических наблюдений, но без объяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе этого феномена. В результате ген *BCR-ABL1* возникает у больных с *JAK2* V617F-позитивными хМПЗ и приводит к развитию второй злокачественной опухоли — ХМЛ, а также к усугублению тяжести состояния пациентов [14–19]. Известно, что ген *BCR-ABL1* является результатом транслокации t(9;22)(q34;q11). Еще в 1998 г. мы обнаружили, что геномные точки разрыва в гене *BCR* при t(9;22) у многих больных ХМЛ локализуются в последовательностях, которые содержат мотивы, подобные сигналам, распознаваемым рекомбиназой V(D)J, которая в норме приводит к перестройке генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [20]. В 2010 г. объединенными

Таблица 1. Клинические показатели у *BCR-ABL1*-позитивных и *BCR-ABL1*-негативных больных хМПЗ с явными признаками прогрессирования

Показатель	*BCR-ABL1*-позитивные	*BCR-ABL1*-негативные	*p*
Средний (диапазон) возраст, лет	59 (30–86)	62 (23–84)	0,671*
Мужской пол, %	33	36	0,679**
Наличие *JAK2* V617F, %	78	93	0,014**
Средний (диапазон) уровень гемоглобина, г/л	136,57 (72,05–204,74)	132,18 (61,63–217,95)	0,497*
Средний (диапазон) уровень тромбоцитов, $\times 10^9$/л	475,91 (89,16–5988,93)	422,29 (42,36–1998,05)	0,055*
Средний (диапазон) уровень эритроцитов, $\times 10^{12}$/л	4,87 (2,39–7,29)	4,23 (2,47–9,28)	0,513*
Средний (диапазон) уровень лейкоцитов, $\times 10^9$/л	10,45 (1,87–280,33)	8,19 (1,18–32,05)	0,009*
Наличие гепатоспленомегалии, %	65	40	0,005**

* *t*-критерий Стьюдента.
** Критерий χ^2.

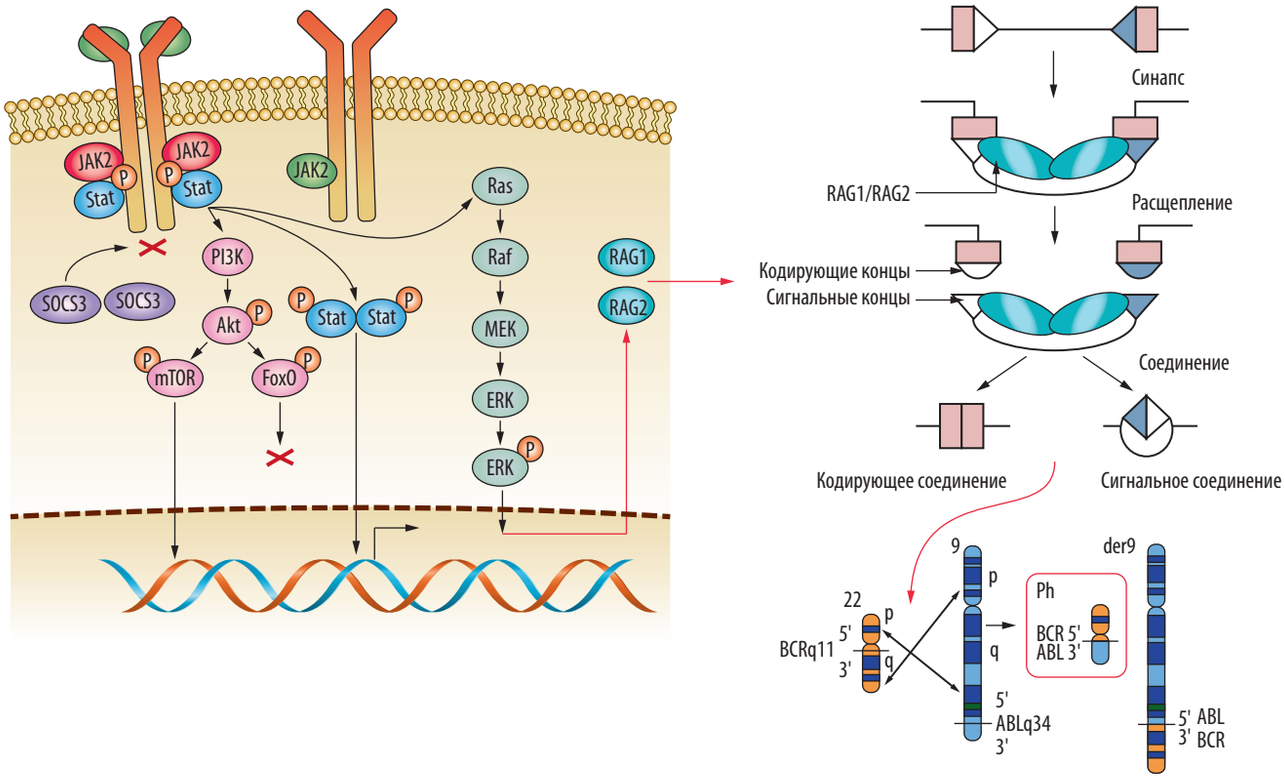

Рис. 1. Вероятный молекулярный механизм активации экспрессии химерного онкогена *BCR-ABL1* у больных хМПЗ с прогрессированием

Fig. 1. Suggested molecular mechanism of activation of the chimeric *BCR-ABL1* gene expression in patients with cMPD progression

усилиями нескольких западных научных коллективов было показано, что транслокация t(9;22)(q34;q11) может осуществляться при участии V(D)J-рекомбиназы с вовлечением характерных мотивов не только в гене *BCR* хромосомы 22, но и гена *ABL1* хромосомы 9 [21].

В настоящее время достаточно хорошо известно, каким образом активируется V(D)J-рекомбиназа в созревающих В- и Т-лимфоцитах для того, чтобы в этих клетках могли перестроиться гены иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов [22]. Основные регуляторные сигналы для этого от рецепторов цитокинов передаются посредством пути Jak-Stat. Обнаруженный нами феномен высокой частоты экспрессии гена *BCR-ABL1* у больных с *JAK2* V617F-позитивными хМПЗ позволил нам сформулировать гипотезу о том, ген *BCR-ABL1* возникает в опухолевых клетках этих больных не случайным образом, а из-за активации рекомбиназного комплекса V(D)J в связи с перенапряжением регуляторного пути Jak2-Stat, вызванным соматической мутацией V617F в гене *JAK2*.

Мутация *JAK2* V617F приводит к независимой от рецепторов цитокинов постоянной активации белка JAK2, что служит причиной развития хМПЗ, а также, следуя нашей гипотезе, приводит к прогрессированию заболевания и эволюции в ХМЛ из-за осуществления транслокации t(9;22)(q34;q11) путем зависимого от V(D)J-рекомбиназы реципрокного обмена материала между хромосомами 9 и 22 и образования химерного онкогена *BCR-ABL1* (рис. 1).

У большинства *BCR-ABL1*-позитивных больных хМПЗ уровень сигнала *BCR-ABL1* оказался в нашем исследовании низким. Возможно, это связано с тем, что возникший в результате прогрессирования хМПЗ дополнительный Ph-позитивный клон на момент наблюдения еще не стал преобладающим. Однако у 3 больных этот сигнал составил уже 0,3–0,5 % IS, еще у 1 — 12,62 % IS (все они — *JAK2* V617F-позитивные).

В одной из групп контроля у больных ХМЛ, как и ожидалось, в 100 % случаев экспрессировался ген *BCR-ABL1*. При этом ни один из этих больных не имел мутаций гена *JAK2*. Очевидно, что химерный онкоген *BCR-ABL1* у этих больных возник в результате иного механизма, нежели при прогрессировании *JAK2* V617F-позитивных хМПЗ. Кроме того, это наблюдение показывает, что в обратном направлении обнаруженная нами закономерность не действует. Наличие химерного онкогена *BCR-ABL1* в опухолевых клетках больных ХМЛ никак не способствует увеличению риска мутации *JAK2.*

Другая группа контроля в нашем исследовании была составлена из первичных больных хМПЗ. Подавляющее большинство больных в этой группе (90 %) имели мутации гена *JAK2*. Только у 2 из 50 больных этой группы мы обнаружили слабую экспрессию *BCR-ABL1*, они были *JAK2* V617F-позитивными. На примере этих первичных больных мы видим, что в дебюте хМПЗ активация экспрессии гена *BCR-ABL1* — явление редкое. Для того чтобы произошла реципрокная транслокация хромосом 9 и 22 в *JAK2* V617F-позитивных опухолевых клетках у больных хМПЗ и сформировался химерный онкоген *BCR-ABL1*, должно пройти некоторое время и осуществиться множество митотических делений стволовых опухолевых клеток. Не исключено, что мутации гена *JAK2* являются необходимым, но недостаточным фактором транслокации t(9;22)(q34;q11). Вполне воз-

можно, для того чтобы эта транслокация произошла, в опухолевых клетках больных хМПЗ должны возникнуть дополнительные генетические изменения, которые еще только предстоит изучить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мы обнаружили, что экспрессия *BCR-ABL1* у больных хМПЗ с признаками прогрессирования — достаточно частое явление (29 %). Более того, активность *BCR-ABL1* объясняет прогрессирование у больных хМПЗ, т. к. этот признак связан с высоким уровнем тромбоцитов, лейкоцитов и наличием гепатоспленомегалии. Наше наблюдение делает вновь актуальным вопрос о роли экспрессии гена *BCR-ABL1* в патогенезе и прогрессировании хМПЗ.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГеноТехнология» (Москва, Россия).

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Е.Н. Мисюрина, А.В. Мисюрин, В.А. Мисюрин, Л.А. Кесаева.
Сбор и обработка данных: все авторы.
Предоставление материалов исследования: Е.Н. Мисюрина, Д.С. Марьин, Е.И. Желнова, А.Ю. Буланов, А.Е. Мисюрина, М.А. Лысенко, А.В. Мисюрин.
Анализ и интерпретация данных: Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин.
Подготовка рукописи: Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин.
Окончательное одобрение рукописи: Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин.
Административная поддержка: М.А. Лысенко, А.В. Мисюрин.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. Blood. 1951;6(4):372–5.

2. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science. 1960;132:1497, abstract.

3. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243(5405):290–3. doi: 10.1038/243290a0.

4. Davis R, Konopka J, Witte O. Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. Mol Cell Biol. 1985;5(1):204–13. doi: 10.1128/mcb.5.1.204.

5. Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, et al. BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL thyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. Mol Cell Biol. 1991;11(4):1785–92. doi: 10.1128/mcb.11.4.1785.

6. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. Nature. 2005;434(7037):1144–8. doi: 10.1038/nature03546.

7. Scott LM, Tong W, Levine RL, 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.

8. Pikman Y, Lee BH, 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.

9. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013;369(25):2379–90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347.

10. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N Engl J Med. 2013;369(25):2391–405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542.

11. Tutaeva V, Misurin AV, Rozenberg JM, et al. Application of PRV-1 mRNA expression level and JAK2V617F mutation for the differentiating between polycytemia vera and secondary erythrocytosis and assessment of treatment by interferon or hydroxyurea. Hematology. 2007;12(6):473–9. doi: 10.1080/10245330701384005.

12. Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний. Клиническая онкогематология. 2009;2(3):211–9.

[Misyurin AV. Molecular pathogenesis of myeloproliferative disorders. Klinicheskaya onkogematologiya. 2009;2(3):211–9. (In Russ)]

13. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2011;118(7):1723–35. doi: 10.1182/blood-2011-02-292102.

14. Mirza I, Frantz C, Clarce G, et al. Transformation of polycythemia vera to chronic myelogenous leukemia. Arch Pathol Lab Med. 2007;131(11):1719–24.

15. Toogeh G, Ferdowsi S, Naadali F, et al. Concomitant presence of JAK2 V617F mutation and BCR-ABL translocation in a pregnant woman with polycythemia vera. Med Oncol. 2011;28(4):1555–8. doi: 10.1007/s12032-010-9570-8.

16. Bee PC, Gan GG, Nadarajan VS, et al. A man with concomitant polycythaemia vera and chronic myeloid leukemia: the dynamics of the two disorders. Int J Hematol. 2010;91(1):136–9. doi: 10.1007/s12185-009-0471-6.

17. Kemp NH, Stafford JL, Tanner R. Chromosome studies during early and terminal chronic myeloid leukemia. Br Med J. 1964;1(5389):1010–4. doi: 10.1136/bmj.1.5389.1010.

18. Hoppin EC, Lewis JP. Polycythemia Rubra Vera Progressing to Ph-Positive Chronic Myelogenous Leukemia. Ann Intern Med. 1975;83(6):820–3. doi: 10.7326/0003-4819-83-6-820.

19. Saviola A, Claudia Fiorani C, Ferrara L. Transition of polycythemia vera to chronic myeloid leukaemia. Eur J Haematol. 2005;75(3):264–6. doi: 10.1111/j.1600-0609.2005.00488.x.

20. Мисюрин А.В., Сурин В.Л., Тагиев А.Ф. Новые точки разрыва транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе. Биоорганическая химия. 1999;25(3):234–6.

[Misyurin AV, Surin VL, Tagiev AF. New breakpoints of translocation t(9;22) in chronic myeloid leukemia. Bioorganicheskaya khimiya. 1999;25(3):234–6. (In Russ)]

21. Score J, Calasanz MJ, Ottman O, et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia. 2010;24(10):1742–50. doi: 10.1038/leu.2010.174.

22. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. Cell. 2002;109(2):S45–S55. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00675-X.