

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Ольховский И.А.^{1,2}, Горбенко А.С.^{1,2}, Столяр М.А.^{1,2}, Бахтина В.И.^{1,3,4}, Галанин В.В.^{1,3,4}, Евсеев Н.И.⁴,
Лопаткина М.А.³, Корчагин Е.Е.³

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ ПРИ ПОДОЗРЕНИИ НА МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ И АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАНИЙ К ИССЛЕДОВАНИЮ

¹Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

²ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный Центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

³КГБУЗ Краевая клиническая больница, 660022, Красноярск, Россия;

⁴ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава РФ, 660022, Красноярск, Россия

Соматические мутации в генах янускиназы 2 (JAK2), кальретикулина (CARL) и рецептора тромбопоэтина (MPL) включены в число ключевых диагностических критериев клинических рекомендаций диагностики R ϕ -негативных миелопролиферативных новообразований (МПН). Улучшение доступности молекулярно-генетических технологий позволяет в короткие сроки определять данные мутации, сокращая диагностический процесс, но одновременно, назначение тестов без строгих показаний увеличивает количество необоснованных анализов. Это может приводить к снижению экономической эффективности лабораторной службы и дополнительному выполнению неоправданных, в том числе инвазивных гематологических обследований. С целью снижения необоснованных тестов при диагностике МПН ранее предложено правило принятия решений «JAK2-free», основанное на предварительной оценке ограниченных показателей рутинного анализа крови: уровней гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов. Для выявления высоко ассоциированного с мутацией гена JAK2 варианта МПН истинной полицитемии предложены аналогичные алгоритмы «JAKPOT» и «two-step». Такие подходы могут быть легко включены в алгоритмы электронных медицинских систем для выявления необоснованных запросов на тестирование. Результаты их использования демонстрируют снижение объемов тестирования и увеличение эффективности выявления патологии без существенного снижения вероятности пропуска образцов с мутацией JAK2 V617F. Вместе с тем авторы не исследовали, каким образом предложенные алгоритмы могут предсказать вероятность выявления других диагностически важных для МПН мутаций в генах CALR и MPL. Многолетняя практика использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования образцов крови пациентов, направляемых врачами-гематологами КГБУЗ Краевой клинической больницы в лабораторию Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, позволила собрать достаточный объем данных для сравнительной ретроспективной оценки эффективности прогностических алгоритмов. Цель: анализ опыта использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования драйверных мутаций МПН и ретроспективная оценка прогностического значения алгоритмов их назначения в условиях реальной практики многопрофильного лечебного учреждения. Использована объединенная выборка из базы данных медицинской информационной системы КГБУЗ Красноярская краевая больница № 1 и Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России с января 2012 года по май 2023 года. Обобщенная выборка включала 5886 персонифицированных записей первичного обследования взрослых пациентов, направленных врачами-гематологами с подозрением на МПН. При молекулярно-генетическом тестировании применялся параллельный алгоритм одновременного выявления пяти основных драйверных мутаций МПН с использованием набора реактивов для мультиплексной ПЦР «Миелоскрин» (ООО «Формула гена», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Результаты рутинного гематологического обследования венозной крови в образцах и последующего молекулярно-генетического исследования доступны в медицинской информационной системе у 922 пациентов. Статистический и «дендритный» анализ персонифицированной выборки из баз данных выполняли, используя программный пакет R. Среди 5886 обследованных пациентов выявляемость мутаций составила: JAK2V617F 27,2-30,9%, ins/del CALR 4,6-5,3%, MPLW515L/K, сочетанных вариантов - до 2,0%. Двукратное повышение за последние 3 года ежегодных объемов тестирования снизило выявляемость мутаций не более чем на 5%. Ретроспективная оценка целесообразности ограничения объема исследований правилом «JAK2-free», либо критериями JAKPOT и «two-step», основанных на показателях рутинного гематологического анализа, привели бы к потере до 18% положительных результатов среди обследованных пациентов. Предложен альтернативный алгоритм принятия решения о показаниях к назначению молекулярно-генетических исследований, основанный на «дендритном анализе» накопленной базы данных результатов реальной практики, который дополнительно включает возраст пациента. Определены сочетания исходных показателей, при которых вероятность обнаружения драйверных мутаций МПН стремится к нулю и отдельные сочетания с максимальной (более 90%) вероятностью выявления мутации. Анализ 10-летнего опыта использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования пациентов с подозрением на МПН методом мультиплексной ПЦР продемонстрировал реальную возможность выявления всех пяти основных драйверных мутаций заболевания в одной аналитической серии. Предложенный на основе «дендритного» анализа алгоритм оценки вероятности выявления мутаций при интеграции в медицинскую информационную систему позволит с высокой степенью вероятности прогнозировать выявление драйверных мутаций, а также снизить долю необоснованных назначений.

Ключевые слова: алгоритмы лабораторного тестирования; мультиплексная ПЦР; хронические миелопролиферативные новообразования; JAK2V617F; CALR; MPL.

Для цитирования: Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Бахтина В.И., Галанин В.В., Евсеев Н.И., Лопаткина М.А., Корчагин Е.Е. Опыт использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования при подозрении на миелопролиферативные новообразования и алгоритм определения показаний к исследованию. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68(11): 694-701. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-694-701>

Для корреспонденции: Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, директор Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; e-mail: krashemcenter@mail.ru

Финансирование. Исследование проведено в рамках бюджетного финансирования КГБУЗ Краевая клиническая больница и Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России.

Благодарность. Авторы выражают признательность врачам-гематологам и специалистам АСУ КГБУЗ Красноярская краевая клиническая больница за содействие в выполнении данного исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 07.09.2023

Принята к печати 31.10.2023

Опубликовано 21.11.2023

Olkhovskiy I.A.^{1,2}, Gorbenko A.S.^{1,2}, Stolyar M.A.^{1,2}, Bakhtina V.I.^{1,3,4}, Galanin V.V.^{1,3,4}, Evseev N.I.⁴, Lopatkina M.A.³, Korchagin E.E.³
EXPERIENCE IN USING A PARALLEL METHOD OF MOLECULAR GENETIC TESTING FOR SUSPECTED MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS AND AN ALGORITHM FOR DETERMINING INDICATIONS FOR TESTING

¹Krasnoyarsk branch of the «National Medical Research Center for Hematology» Department of Health, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³Krasnoyarsk regional clinic Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation;

⁴Prof. V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Somatic mutations in the Janus kinase 2 (JAK2,) calreticulin (CALR) and thrombopoietin receptor (MPL) genes are included among the key diagnostic criteria for the diagnosis of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (MPN). Improving the availability of molecular genetic technologies makes it possible to determine these mutations in a short time, shortening the time of the diagnostic process, but at the same time, the appointment of tests without strict indications increases the number of unreasonably analyses. This, in turn, can lead to a decrease in the economic efficiency of laboratories, as well as to additional performance of unjustified, including invasive examinations. To reduce unreasonable tests in the diagnosis of MPN, the "JAK2 tree" rule was previously proposed, based on a preliminary assessment of limited indicators of a routine blood test (hemoglobin, platelets, and leukocytes). Similar "JAKPOT" and "two-step" algorithms have been proposed to identify a variant of MPN strongly associated with a JAK2 mutation, polycythemia vera. Such approaches can be easily incorporated into the algorithms of electronic medical systems to flag unreasonable requests for testing. The experience of their use demonstrates a significant reduction in the number of tests and an increase in the efficiency of pathology detection without a significant omission of samples with the JAK2 V617F mutation. At the same time, it has not been studied which algorithms can predict the detection of mutations in other CALR and MPL genes, which are also diagnostically significant for MPN. A long-term real practice of using a parallel method of testing blood samples simultaneously for all MPN driver mutations has accumulated a sufficient amount of data for a comparative assessment of the effectiveness of prognostic algorithms. Purpose: analyze the experience of using a parallel method of molecular genetic testing of MPN driver mutations and a retrospective assessment of the prognostic value of their prescription algorithms in real practice in a multidisciplinary medical institution. The work used a combined sample from the database of the medical information system of the Krasnoyarsk Regional Hospital No.1 and the Krasnoyarsk branch of the National Medical Research Center for Hematology of the Ministry of Health of Russia from January 2012 to May 2023. The joint data included 5886 non-personalized electronic medical records of patients with suspected MPN, referred after examination by hematologists. During molecular genetic testing, a parallel algorithm for the simultaneous detection of five major MPN driver mutations was used using the Myeloscreen multiplex PCR reagent kit ("Formula gene", Russia). The results of routine hematological examination of venous blood in samples followed by molecular genetic studies were available in the medical information system in 922 patients. Statistical and "dendritic" database analysis was performed using the R software package. Among 5886 examined patients, the detection of mutations was: JAK2V617F 27.2-30.9%, ins/del CALR 4.6-5.3%, as well as MPLW515L/K and combined variants - up to 2.0%. A two-fold increase in annual testing volumes reduced the detection of mutations by no more than 5%. But a retrospective assessment of the feasibility of limiting the scope of studies to the rule of the "JAK2 tree", or the JAKPOT or "two-stage" criteria, based on the indicators of routine hematological analysis, would lead to a loss of up to 18% of positive results among the examined patients. An alternative algorithm for deciding on indications for the appointment of molecular genetic testing is proposed, based on the "dendritic analysis" of the accumulated database of real practice, including routine hematological parameters and the patient's age. Combinations of initial indicators were determined, at which the probability of detecting mutations tends to zero, as well as individual combinations with the maximum (more than 90%) probability of detecting the JAK2 V617F mutation. The relatively high level of detection of these mutations (up to 35-37%) among patients in this study is also due to their preliminary selection after consultation with a hematologist. Analysis of the 10-year experience of using the parallel method of multiplex PCR in patients with suspected MPN showed a real possibility of detecting all five major driver mutations of the disease in one analytical series. The algorithm proposed based on "dendritic" analysis, when integrated into a medical information system, will allow predicting the detection of driver mutations with a high degree of probability, as well as reducing the proportion of unreasonable prescriptions.

Key words: laboratory testing algorithms; multiplex PCR; chronic myeloproliferative neoplasms; JAK2V617F; CALR; MPL.

For citation: Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Bakhtina V.I., Galanin V.V., Evseev N.I., Lopatkina M.A., Korchagin E.E. Experience in using a parallel method of molecular genetic testing for suspected myeloproliferative neoplasms and an algorithm for determining indications for testing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (11): 694-701 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-11-694-701>

For correspondence: *Olkhovskiy I.A.*, PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: kraschemcenter@mail.ru

Information about authors:

Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>;

Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>;

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>;
Bakhtina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-6465-9942>;
Galanin V.V., <https://orcid.org/0009-0008-1614-3387>;
Evseev N.I., <https://orcid.org/0000-0002-3827-7502>;
Lopatkina M.A., <https://orcid.org/0009-0002-7159-4961>;
Korchagin E.E., <https://orcid.org/0000-0002-4153-9585>.

Financing. *This study was carried out within the framework of the state order «Development of diagnostic reagent kits for molecular genetic detection of oncogenic transcripts for the purpose of early diagnosis and monitoring of minimal residual disease in acute leukemia № RK AAAA-A20-120021890163-5».*

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interest.*

Received 07.09.2023

Accepted 31.10.2023

Published 21.11.2023

Введение. Клинические рекомендации диагностики Ph-негативных миелопролиферативных новообразований (МПН) в качестве наиболее важных диагностических критериев предусматривают использование результатов молекулярно-генетических исследований наличия соматических мутаций в генах янускиназы 2 (*JAK2*) кальцетрикулина (*CARL*) и рецептора тромбопоэтина (*MPL*) [1,2]. Мутация *JAK2V617F* присутствует в 95-97% случаев истинной полицитемии и примерно 60-70% при других вариантах МПН. Мутации генов *CARL* и *MPL* характерны для большей части *JAK2V617F* - негативных вариантов эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. Примерно в 15-20% случаев при МПН не обнаруживаются мутации данных генов и они относятся к тринегативным вариантам. Обнаружение мутации *JAK2 V617F* является одной из наиболее частых находок среди лиц без МПН, где она может сопровождать клональное кроветворение неопределённого потенциала (clonal hematopoiesis of indeterminate potential, CHIP) [3]. Частота обнаружения мутаций закономерно зависит от аналитической чувствительности используемых тест-систем.

Широкая доступность молекулярно-генетических технологий позволяет в короткие сроки обнаружить наиболее частые мутации с помощью высокочувствительных тестов ПЦР. Однако, тестирование без строгих критериев их назначения увеличивает количество выполняемых тестов для пациентов, которые не имеют характерных для МПН клинических показаний. По данным I.N. Muhsen и соавт.[4], истинная полицитемия подтверждается только у 6,8% мужчин и 0,3% женщин с повышенными значениями гемоглобина и гематокрита, соответствующими этим диагностическим критериям. Ориентация только на эти два показателя может приводить к снижению экономической эффективности анализа и дополнительному выполнению ненужных, в том числе инвазивных гематологических обследований.

В ряде случаев необоснованное дорогостоящее тестирование может ограничивать возможности бюджетных ресурсов медицинской организации и приносить ущерб оказанию медицинской помощи при других заболеваниях. Выявление гематологических параметров высокой вероятности МПН на амбулаторном этапе или в рамках диспансеризации могло бы способствовать своевременному направлению пациента к гематологу и более раннему выявлению данного онкологического

заболевания. Поиск оптимальных критериев необходимости дорогостоящих исследований является одной из задач экспертных систем помощи принятия клинических решений [5].

С целью снижения необоснованных тестов при диагностике МПН ранее предложено правило принятия решений «*JAK2-tree*», основанное на оценке результатов рутинного анализа крови, включая уровень гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитов [6]. Для выявления истинной полицитемии, нозологического варианта МПН максимально ассоциированного с мутацией гена *JAK2*, предложен прогностический критерий «*ЯКРОТ*» [7] и последовательный двухэтапный алгоритм «*two-step*» [8], использующий рутинные показатели гемограммы. Такие подходы могут быть легко включены в алгоритмы электронных лабораторных систем для пометки необоснованных запросов на тестирование. При анализе накопленных лабораторных данных E. Mahe и соавт. [6] показано, что использование правила «*JAK2-tree*» для тестирования пациентов с подозрением на МПН уменьшило бы на 15% объёмы тестирования на мутацию *JAK2V617F* с ложноотрицательной ошибкой всего в 1,2%. Авторы не исследовали, каким образом их алгоритмы могут предсказать вероятность выявления других диагностически важных мутаций: делеций и вставок в гене *CALR* или однонуклеотидных замен *W515* в гене *MPL*.

Практика молекулярно-генетической диагностики МПН в большинстве клиничко-диагностических лабораторий обычно ограничивается тестами выявления мутации *JAK2 V617F*. Однако разработка перспективных прогностических алгоритмов для рационального использования лабораторного ресурса требует масштабного применения метода параллельного тестирования образцов одновременно на все драйверные мутации МПН.

Цель работы - анализ десятилетнего опыта использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования драйверных мутаций МПН и ретроспективная оценка прогностического значения алгоритмов их назначения в условиях реальной практики многопрофильного лечебного учреждения.

Материал и методы. Использована объединенная выборка из базы данных медицинской информационной системы qMS КГБУЗ Красноярская краевая больница № 1 и базы данных Красноярского филиала ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России с января 2012

по май 2023 г. Обобщённая выборка включала 5886 записей первичного обследования пациентов, направленных врачами гематологами с подозрением на МПН. Возрастной диапазон обследованных пациентов от 18 до 98 лет, 46,2% из них составляли женщины.

При молекулярно-генетическом тестировании применялся параллельный алгоритм одновременного выявления пяти основных драйверных мутаций МПН с использованием набора реактивов для мультиплексной ПЦР «Миелоскрин» (ООО «Формула гена», Россия). Заявленная чувствительностью не менее 0,05% мутантного аллеля *JAK2 V617F* и не менее 5,0% аллельной нагрузки мутаций других генов, с аналитической специфичностью выявления генетической мишени не менее 99,9% [9,10]. Венозную кровь отбирали в вакутейнеры с ЭДТА. Все исследования с марта 2014 года выполнялись в течение 1-3 рабочих дней после поступления образцов. Замороженные архивные образцы крови и ДНК, исследованные на мутацию *JAK2 V617F* в период до мая 2014 года, повторно протес-

тированы после разработки набора, позволяющего выполнять одновременную ПЦР детекцию всех пяти мутаций.

Результаты рутинного гематологического обследования венозной крови в образцах с последующим молекулярно-генетическим исследованием доступны в медицинской информационной системе у 922 пациентов. Статистический и «дендритный» анализ неперсонифицированной выборки из баз данных выполняли, используя программный пакет «Party» в среде программирования R (4.3.1).

Результаты. Обобщённые данные результатов молекулярно-генетического тестирования пациентов с подозрением на МПН представлены в табл. 1. Объём исследований значительно увеличился за последние два с половиной года в связи с включением данных исследований в программу финансирования из средств ОМС. При этом суммарная частота выявления всех пяти драйверных мутаций МПН снизилась с 38,3% до 32,9%.

Таблица 1

Частота выявления драйверных мутаций у пациентов, направленных с подозрением на МПН за период с 2012 г. по май 2023 г.

| Период | Всего проб | <i>JAK2 V617F</i> | | <i>CALR ins</i> | | <i>CALR del</i> | | <i>CALR</i> другие типы мутаций | | <i>MPL W515</i> | | Сочетанные мутации | |
|-----------------|------------|-------------------|-------|-----------------|------|-----------------|------|---------------------------------|------|-----------------|------|--------------------|------|
| | | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| 2012-2019 | 2933 | 907 | 30,9% | 62 | 2,1% | 77 | 2,6% | 17 | 0,6% | 30 | 1,0% | 31 | 1,1% |
| 2020-2023 (май) | 2953 | 804 | 27,2% | 53 | 1,8% | 65 | 2,2% | 18 | 0,6% | 19 | 0,6% | 14 | 0,5% |

Примечание. del – мутация 1 типа в гене *CALR* с.1099_1150del52; ins – мутация 2 типа в гене *CALR* с.1154_1155insTTGTC.

Жирным шрифтом выделена относительная частота встречаемости исследуемых мутаций, курсивом выделены названия генетических мутаций.

Для оценки целесообразности использования гематологических показателей при отборе образцов к дальнейшему молекулярно-генетическому исследованию проведён анализ выборки данных, в которой представлены результаты одновременно выполненного молекулярно-генетического и гематологического анализа.

На первом этапе, в соответствии с алгоритмом правила «*JAK2-tree*» [6], результаты молекулярно-генетического тестирования группировались в когорты, выделенных в зависимости от уровня гемоглобина: женщины с уровнем гемоглобина равным или более 160 г/л и мужчины с уровнем гемоглобина равным или более 165 г/л. Далее, среди пациентов с более низкими значениями гемоглобина выделяли группу с уровнем тромбоцитов равным или более 350×10^9 /л. Следующая группа формировалась из данных, полученных в отдельной группе пациентов с уровнем лейкоцитов более $7,0 \times 10^9$ /л. Заключительная группа (прочие) включала результаты молекулярно-генетического исследования в образцах, не имеющих параметров гематологического теста, соответствующих используемому правилу. Соотношение полученных результатов выявления мутаций в выборке в случае использования правила «*JAK2-tree*» представлены в табл. 2.

Всего по результатам тестирования среди 922 проб пациентов, одновременно обследованных на гематологическом анализаторе, исследуемые мутации выявлены у 327 (35,4%), в том числе у 299 пациентов обнаружена мутация *JAK2V617F* в диапазоне значений аллельной

нагрузки от 0,05% до 96%. У 20 пациентов обнаружены мутации в гене *CALR* (10 ins, 5 del, 5 - других мутаций) и у 8 пациентов в гене *MPL* (7 с *W515L* и 1 с *W515K*). У 3-х пациентов выявлено наличие одновременно двух мутаций (у двух *CALR+JAK2 V617F* и у одного *MPL W515L + JAK2 V617F*). В случае использования правил «*JAK2-tree*» объём выборки для молекулярно-генетического исследования мог бы сократиться до 727 образцов, но при этом были бы пропущены 36 пациентов с мутацией *JAK2V617F* и 6 пациентов с другими драйверными мутациями МПН.

Следует обратить внимание на различие результатов в отдельных группах, сформированных по правилам «*JAK2-tree*». Максимально высокий процент выявляемости мутации *JAK2V617F* наблюдался в группе женщин с гемоглобином более 160 г/л. И у них же наблюдался довольно высокий уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F*, что соответствует преобладающему у них диагнозу истинной полицитемии. У мужчин при уровне гемоглобина более 165 г/л, процент выявления данной мутации существенно ниже.

Критерий *ЖАКРОТ* включает соответствующую классификации ВОЗ выборку пациентов с гемоглобином (более 160 г/л у женщин и более 165 г/л у мужчин), в которой дополнительно определяется либо эритроцитоз выше $6,45 \times 10^{12}$ /л, либо уровень тромбоцитов выше 350×10^9 /л, либо уровень лейкоцитов более $6,2 \times 10^9$ /л (рис. 1).

Таблица 2

Распределение положительных результатов выявления драйверных мутаций МПН в группах пациентов, сформированных в соответствии с правилами «JAK2-tree»

| Группы | Всего проб | <i>JAK2 V617F</i> , абс. (%) | Аллельная нагрузка, % <i>JAK2 V617F Me</i> (Q25-Q75) | <i>CALR</i> (ins/del) | <i>MPL</i> (W515L/K) | С двойными мутациями (<i>JAK2+CALR</i>) и (<i>JAK2 + MPL</i>) |
|---------------------------------------|------------|------------------------------|--|-----------------------|----------------------|---|
| Вся исходная выборка | 922 | 299 (32,4%) | 27 (12-50) | 20 | 8 | 3 |
| Всего с показаниями для тестирования | 727 | 263 (28,5%) | 28 (12-49) | 17 | 5 | 3 |
| Прочие, без показаний к тестированию | 195 | 36 (18,5%) | 21 (11-44) | 3 | 3 | 0 |
| Из них выбраны по правилу «JAK2-tree» | | | | | | |
| Нб >160 г/л, женщины | 53 | 31 (58,5%)* | 38 (24-70)* | 0 | 0 | 0 |
| Нб >165 г/л, мужчины | 172 | 34 (19,8%)* | 23 (5-46)* | 1 | 0 | 1 |
| Тромбоциты >350x10 ⁹ /л | 319 | 162 (50,7%) | 25 (14-47) | 11 | 3 | 1 |
| Лейкоциты >7,0x10 ⁹ /л | 183 | 36 (19,7%) | 37 (10-63) | 5 | 2 | 1 |

Примечание. * - Статистически значимые различия между женщинами и мужчинами при p<0,05.

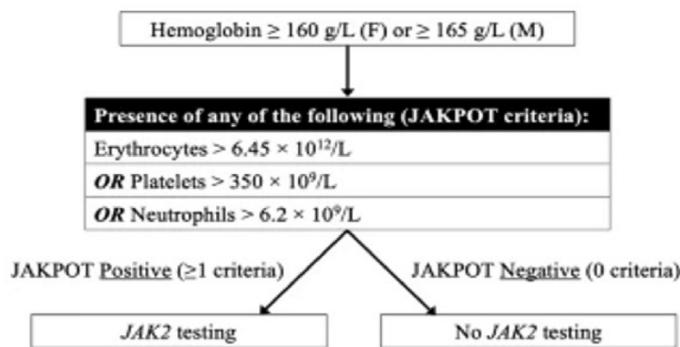


Рис. 1. Критерии JAKPOT (цит. по [7]).

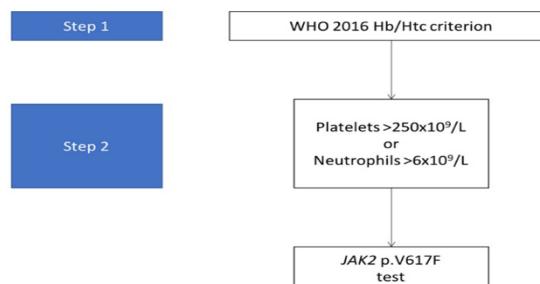


Рис. 2. Последовательный алгоритм «two-step» (цит. по [8]).

Похожий последовательный двухшаговый алгоритм «two-step» предполагает на первом этапе выделение группы пациентов в соответствии с критериями ВОЗ, суммарно по зависимому от пола уровню гемоглобина (160 г/л и 165 г/л) и гематокрита (48% и 49%) с последующим выбором пациентов, у которых уровень тромбоцитов превышает

250x10⁹/л или абсолютный уровень нейтрофилов более 6,0x10⁹/л (рис. 2).

Данные о распределении результатов молекулярно-генетического тестирования в соответствии с прогностическим критерием JAKPOT и последовательным критерием «two-step» представлены в табл. 4.

Распределение результатов выявления драйверных мутаций МПН в зависимости от групп пациентов, сформированных в соответствии с прогностическим критерием JAKPOT и последовательным алгоритмом «two-step»

| Группы | Всего исследовано | Выявлена мутация <i>JAK2 V617F</i> | Аллельная нагрузка <i>JAK2 V617F</i> |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| С критерием JAKPOT: | 103 | 55 (53,4%) | 35 (15-58) |
| Женщины | 34 | 31 (58,5%) | 39 (22-63) |
| Мужчины | 69 | 30 (43,5%) | 24 (13-53) |
| С критерием «two-step»: | 129 | 88 (68,2%) | 35 (17-57) |
| Женщины | 59 | 40 (67,8%) | 40 (24-63) |
| Мужчины | 70 | 48 (68,6%) | 24 (7-51) |

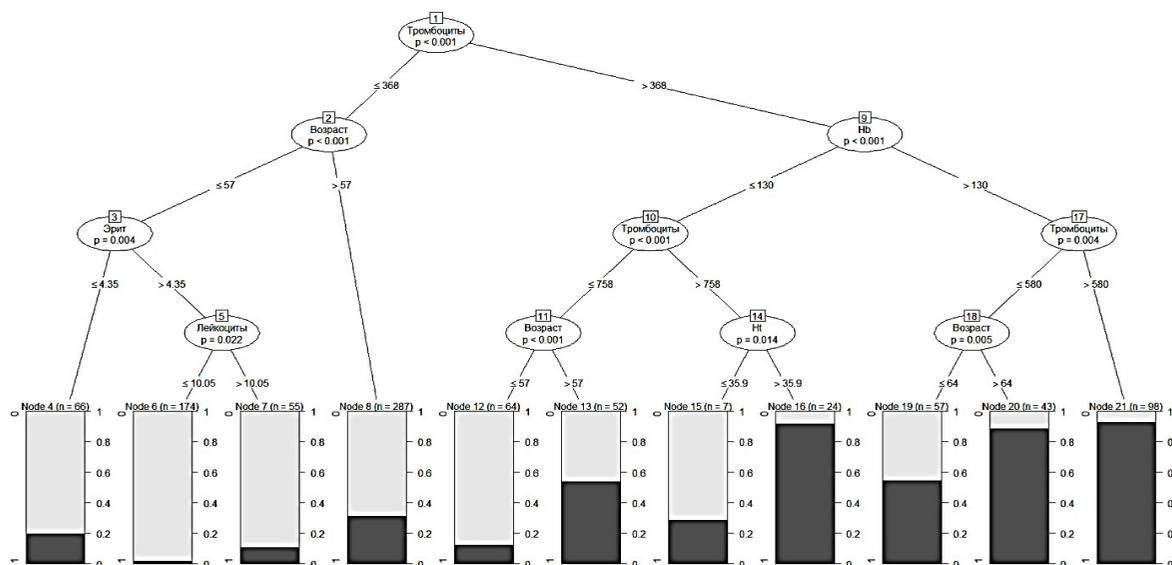


Рис. 3. Результаты математического анализа «дерева решений» базы данных результатов молекулярно-генетического исследования пациентов с подозрением на МПН.

Использование описанных ранее алгоритмов существенно снижает количество поводов для тестирования на *JAK2 V617F* по сравнению с правилами «JAK2-tree» при значительном приросте эффективности её выявления. В этом отношении критерий «two-step» является максимально эффективным и стирает отличия по этому показателю между мужчинами и женщинами. Независимо от используемых критериев уровень аллельной нагрузки *JAK2 V617F* у мужчин с повышенным уровнем гемоглобина оставался на более низком уровне. Пациент с эссенциальной тромбоцитемией и с сочетанной мутацией в гене *CALR* выявлялся при использовании всех трёх алгоритмов, поскольку имел как повышенный уровень гемоглобина, так и выраженный тромбоцитоз.

Все описанные выше варианты алгоритмов отбора образцов крови на молекулярно-генетическое исследование оказались существенно менее чувствительными к выявлению драйверных мутаций - МПН. При использовании наиболее универсального для МПН алгоритма «JAK2-tree» на нашей ретроспективной выборке у 922 пациентов фактически выявлено 327 (35,4%) положительных проб с мутациями, а при использовании правила «JAK2-tree», было бы пропущено 36 проб с мутацией *JAK2 V617F* и 6 проб с мутациями других драйверных генов, и соответственно частота выявления мутаций МПН составила статистически значимо мень-

шую величину 30,9% ($p < 0,05$). Два других алгоритма менее чувствительны к тестированию всех основных драйверных мутаций МПН, поскольку они изначально ориентированы только на выявление одного варианта МПН - ассоциированной с *JAK2 V617F* истинной полицитемией.

Вероятность обнаружения драйверных мутаций МПН в зависимости от гематологических показателей далее рассчитана с использованием «дендритного» анализа. Представленная на рис. 3 схема иллюстрирует полученные результаты. Наиболее приоритетным показателем для предсказания драйверных мутаций МПН среди наших пациентов оказался пороговый уровень тромбоцитов более $368 \times 10^9/\text{л}$. Последовательная оценка уровня гематокрита, эритроцитов, лейкоцитов, возраста пациента позволяет с высокой достоверностью предсказать вероятность положительного результата.

Для построения данного «дерева решений» использованы показатели рутинного анализа крови (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты, тромбоциты), пол и возраст всех обследованных пациентов. Нижние столбцы - «узлы» (Node) отражают частоту выявления драйверных мутаций МПН (темная зона) в сгруппированных программой совокупных анализируемых данных о результатах тестирования пациентах. По шкале 0 – ни у кого нет мутаций, 1 - мутации обнаружены у всех пациентов молекулярно-генетического исследования.

Из данной схемы следует, что, во-первых, сочетание уровня тромбоцитов ниже $368 \times 10^9/\text{л}$, в возрасте младше 57 лет, эритроцитов менее $4,35 \times 10^{12}/\text{л}$ и лейкоцитов менее $10,1 \times 10^9/\text{л}$ (левая «ветка дерева») определяет группу пациентов из 174 человек (27,7% от всей выборки), у которых вероятность обнаружения мутаций стремится к нулю. Во-вторых, более высокий уровень тромбоцитов в группах из

43 и 98 пациентов при значениях гемоглобина более 130 г/л и гематокрита более 35,9%, практически всегда (более 92%) сочетается с мутациями МПН (правые «ветки дерева»). Образцы с мутациями в гене *CALR* закономерно распределились в группы с более высокими значениями тромбоцитоза.

Обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о неоднократно отмеченной тенденции [3,6-8,12] повышения доли обследуемых пациентов без достаточных клинических оснований при улучшении доступности к тестированию. Вместе с тем, если средний ежегодный объём тестирования увеличился более чем в 2 раза, частота выявления исследуемых мутаций в нашей лаборатории снизилась не более чем на 5%. Это связано с тем, что, несмотря на повышение доступности теста, он назначается врачом-гематологом с учётом комплекса других исследований и клинических данных. Использование правила «JAK2-tree» и других алгоритмов, основанных только на результатах предшествующего рутинного гематологического анализа, привлекает простотой использования и возможностью интеграции в электронные системы для ограничения необоснованного тестирования. Вместе с тем, наша ретроспективная оценка демонстрирует, что формализованное использование таких алгоритмов без проверки их на собственной базе данных может уменьшить вероятность выявления мутаций. Остались бы без молекулярно-генетического подтверждения часть пациентов МПН с мутациями в других драйверных генах, что составляет 21,4% от всех случаев их выявления в анализируемой выборке.

Маскировать характерные показатели рутинного гематологического анализа могут различные патологические состояния [13], такие как дефицит железа и витаминов, кровопотеря, циторедуктивная терапия, аплазия на фоне терминальных стадий миелофиброза или при переходе в ОМЛ. Особо следует отметить выявляемые случаи МПН, клинически манифестирующие при венозных тромбозах необычной локализации [14,15] или сердечно-сосудистых катастрофах [3, 16], когда отсутствует должная настороженность в отношении онкогематологического заболевания. Могут существовать конкретные и очень значимые примеры клинических показаний тестирования на мутации МПН, основанные не только на общем анализе крови. E. Mahe и соавт. [6] отмечают, что их правило «JAK2-tree» не исключает использования других клинических показаний для тестирования.

Представляют интерес обнаруженные половые различия между частотой выявления *JAK2V617F*, её аллельной нагрузкой в зависимости от выделенных правилом «JAK2-tree» группах с разным уровнем тромбоцитов и лейкоцитов. Причины таких различий требуют дополнительного изучения и, вероятно, могут быть обусловлены как физиологическими отличиями, так и

дискордантностью доли мужчин и женщин в отдельных нозологических вариантах МПН, или же в преимущественных коморбидных заболеваниях с возраст-ассоциированным СНР.

Преимущества параллельного алгоритма одновременного тестирования на пять основных драйверных мутаций МПН, основанного на мультиплексной реакции ПЦР [9], определяются условиями обследования пациентов без предварительного отсева случаев истинной полицитемии. Использование параллельного алгоритма тестирования за весь период позволило выявить более 340 случаев мутаций в генах *CALR* или *MPL*, выделить группу из 45-ти пациентов, имеющих одновременно две драйверные мутации. Ранее предложено расценивать таких редких пациентов как особый клинический вариант МПН [17,18].

Анализ нашей базы данных продемонстрировал, что при МПН у женщин и у мужчин с характерным преимущественно для истинной полицитемии высоким уровнем гемоглобина во всех случаях выявляется только мутация *JAK2V617F*, и лишь у одного мужчины аллельная нагрузка 5% *JAK2V617F* дополнительно сочеталась с делецией в гене *CALR*. Выявляемость других драйверных мутаций в этой группе составляет 0,4% против 4% среди всех остальных обследованных пациентов. Эти результаты ставят вопрос о целесообразности использования параллельного алгоритма в данной когорте и позволяют предложить отдельный аналитический подход к пациентам с высоким уровнем гемоглобина и гематокрита без тестирования на мутации *CALR* или *MPL*, но включающим выявление более редких, но высокоспецифичных для истинной полицитемии других мутаций в 12 и 13-м экзонах гена *JAK2*.

В качестве примера возможного использования автоматизированного ограничения малообоснованных назначений молекулярно-генетических исследований при подозрении на МПН, мы предлагаем рассмотреть алгоритм «дерева решений», основанный на ретроспективном анализе получаемых результатов в реальной клинической практике. Использование «дендритного» алгоритма анализа гематологических параметров с учётом пола и возраста пациента смогло бы, не ограничивая возможность назначения, предоставить врачу сигнал-рекомендацию необходимости дополнительной оценки целесообразности выбранного теста. Условием внедрения данного алгоритма в информационную систему должна стать оценка его эффективности в дальнейшем проспективном исследовании.

К ограничениям данного исследования следует отнести отсутствие в анализируемой базе достаточного количества внесённых результатов морфологического анализа трепанобиоптатов, подтверждающих диагноз и, следовательно, невозможность выделения пациентов с разными нозологическими вариантами МПН. Из-за недостаточных сведений не удалось провести исследования соотношения между *JAK2* ассоциированным СНР и МПН с низкой аллельной нагрузкой *JAK2V617F*, что будет предметом дальнейших исследований.

Проведённый анализ данных не включал сведения о наличии спленомегалии и тромботических событий у пациентов, которые могли бы позволить улучшить прогностическую мощь «дендритного» алгоритма в отношении МПН. Обнаруженные с его помощью

высокие вероятности выявления онкогенных мутаций только по результатам гематологического исследования пациентов при первичном обращении к терапевту или при диспансеризации, могут служить основанием для их направления на консультацию гематолога.

Заключение. Анализ 10-летнего опыта использования параллельного метода молекулярно-генетического тестирования пациентов с подозрением на МПН методом мультиплексной ПЦР продемонстрировал реальную возможность выявления всех пяти основных драйверных мутаций заболевания в одной аналитической серии. В целом среди 5886 обследованных пациентов выявляемость мутаций составила: *JAK2 V617F* от 27,2 до 30,9%, *ins/del CALR 4,6-5,3%*, *MPL W515L/K* и сочетанных вариантов разных мутаций - до 2,0%. Ретроспективная оценка целесообразности ограничения объёма исследований правилом «JAK2-tree», либо критериями JAKPOT или «two-step», основанных на показателях рутинного гематологического анализа, привели бы к потере до 18% положительных результатов среди наших пациентов. Предложен альтернативный алгоритм принятия решения о показаниях к назначению молекулярно-генетических исследований, основанный на «дендритном анализе» базы данных результатов реальной практики. При назначении этих молекулярно-генетических тестов с целью диагностики МПН рекомендуется полагаться на показатели лабораторного анализа с обязательным учётом клинической симптоматики.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-7, 10-15, 17, 18 см.
REFERENCES)

1. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н., Шуваев В.А., Морозова Е.В., Ломаиа Е.Г. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Rh-негативных миелолипролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (ред. 2020 г.). *Клиническая онкогематология*. 2021; 14(2): 262-98.
9. Ольховский И.А., Столяр М.А., Горбенко А.С. Набор реактивов для выявления rh-негативных миелолипролиферативных новообразований и способ диагностики на его основе. Патент РФ № 2679653; 2019.
10. Горбенко А.С., Столяр М.А., Субботина Т.Н., Михалёв М.А., Ольховский И.А. Разработка метода определения аллельной нагрузки соматической мутации V617F в гене JAK2 (янус-киназы-2) в пулах проб венозной крови. *Лабораторная служба*. 2016; 5(1):19-25.
16. Ольховский И.А., Горбенко А.С., Столяр М.А., Грищенко Д.А., Ткаченко О.А., Марцинкевич Т.Л. Частота выявления соматической мутации V617F в гене *JAK2* у пациентов с сердечно-сосудистой патологией. *Терапевтический архив*. 2019; 91(7):25-8.

REFERENCES

1. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., Shuvaev V.A., Morozova E.V., Lomaia E.G. et al. National Clinical Guidelines on Diagnosis and Treatment of Ph-Negative Myeloproliferative Neoplasms (Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia, and Primary Myelofibrosis) (ed. 2020). *Gematologiya i transfuziologiya*. 2021;14(2):262-98. (in Russian)
2. Khoury J. D., Solary E., Abl O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J. F. et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification

- of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022; 36(7):1703-19. DOI: 10.1038/s41375-022-01613-1.
3. Sandes A.F., Gonçalves M.V., Chauffaille M.L. Frequency of polycythemia in individuals with normal complete blood cell counts according to the new 2016 WHO classification of myeloid neoplasms. *Int. J. Lab. Hematol.* 2017; 39(5):528-31. DOI: 10.1111/ijlh.12686.
4. Muhsen I.N., Shyr D., Sung A.D., Hashmi S.K. Machine Learning Applications in the Diagnosis of Benign and Malignant Hematological Diseases. *Clin. Hematol. Int.* 2020; 3(1):13-20. DOI: 10.2991/chi.k.201130.001.
5. Hoermann G. Clinical Significance of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential in Hematology and Cardiovascular Disease. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(7):1613. DOI: 10.3390/diagnostics12071613.
6. Mahe E., Pedersen K.M., Çolak Y., Bojesen S.E., Lynch T., Sinclair G. et al. JAK2-tree: a simple CBC-based decision rule to guide appropriate JAK2 V617F mutation testing. *J. Clin. Pathol.* 2019; 72:172-6. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205527.
7. Chin-Yee B., Bhai P., Cheong I., Matyashin M., Hsia C.C., Kawata E. et al. A Rational Approach to JAK2 Mutation Testing in Patients with Elevated Hemoglobin: Results from the JAK2 Prediction Cohort (JAKPOT) Study. *J. Gen. Intern. Med.* 2022; 38(8):1828-33. DOI: 10.1007/s11606-022-07963-x.
8. Piris-Villaespesa M., Álvarez-Larrán A., Saez-Marín A., Nuñez-Torrón C., Muñoz-Martin G., Sánchez R. et al. Development and validation of a sequential two-step algorithm for the screening of individuals with potential polycythaemia vera. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):209. DOI: 10.1038/s41598-020-80459-y.
9. Olkhovskiy I.A., Stolyar M.A., Gorbenko A.S. A set of reagents for detecting ph-negative myeloproliferative neoplasms and a diagnostic method based on it. Patent RF № 2679653; 2019. (in Russian)
10. Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Subbotina T.N., Mikhalev M.A., Olkhovskiy I.A. Developing method for allelic somatic mutations burden of Janus kinase 2 (V617F JAK2) detection in pools of venous blood samples. *Laboratornaya sluzhba*. 2016; 5(1):19-25. DOI: 10.17116/labs20165119-25. (in Russian)
11. Johnson S., Baker B. A CBC algorithm combined with immature platelet fraction is able to identify JAK2 V617F mutation-positive polycythaemia vera patients. *Int. J. Lab. Hematol.* 2019; 41(2):271-6. DOI: 10.1111/ijlh.12967.
12. Salinas M., López-Garrigós M., Flores E., Leiva-Salinas M., Asencio A., Lugo J. et al. Managing inappropriate requests of laboratory tests: from detection to monitoring. *Am. J. Manag. Care*. 2016; 22:e311-6.
13. Langabeer S.E. An increase in diagnostic JAK2 V617F mutation testing: Is masked polycythaemia vera the explanation? *Eur. J. Intern. Med.* 2018; 52:e37-e38. DOI: 10.1016/j.ejim.2018.03.017.
14. Goulding C., Uttenthal B., Foroni L., Duke V., Traore A., Kottaridis P. et al. The JAK2 (V617F) tyrosine kinase mutation identifies clinically latent myeloproliferative disorders in patients presenting with hepatic or portal vein thrombosis. *Int. J. Lab. Hematol.* 2008; 30:415-9. DOI: 10.1111/j.1751-553X.2007.00973.x.
15. Shetty S., Kulkarni B., Pai N., Mukundan P., Kasatkar P., Ghosh K. JAK2 mutations across a spectrum of venous thrombosis cases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2010; 134:82-5. DOI: 10.1309/AJCP7VO4HAIZYATP.
16. Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Griscchenko D.A., Tkachenko O.A., Martsinkevich T.L. et al. Somatic mutation of the V617F JAK2 gene in patients of the cardiovascular diseases. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2019; 91(7):25-8. DOI: 10.26442/00403660.2019.07.000245. (in Russian)
17. Gorbenko A.S., Stolyar M.A., Olkhovskiy I.A., Vasiliev E.V., Mikhalev M.A. Parallel algorithm for myeloproliferative neoplasms testing: the frequency of double mutations is found in the JAK2/MPL genes more often than the JAK2/CALR genes, but is there a clinical benefit? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2019; 57(4): E60-E62.
18. Ahmed R.Z., Rashid M., Ahmed N., Nadeem M., Shamsi T.S. Coexisting JAK2V617F and CALR exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms - do they designate a new subtype? *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2016; 17: 923-6. DOI: 10.7314/apjcp.2016.17.3.923.