

# Znaczenie badań molekularnych dla oceny ryzyka i rokowania u chorych na pierwotne włóknienie szpiku w oparciu o wskaźniki prognostyczne IPSS, DIPSS oraz MIPSS

## Importance of molecular diagnostics for risk stratification and prognostication in patients with primary myelofibrosis on the basis on IPSS, DIPSS and MIPSS prognostic systems

### Article history:

Received: 12.11.2018

Accepted: 14.11.2018

Dorota Link-Lenczowska<sup>1\*</sup>,  
Tomasz Sacha<sup>2</sup><sup>1</sup> Zakład Diagnostyki Hematologicznej,  
Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Polska  
<sup>2</sup> Katedra i Klinika Hematologii, Uniwersytet  
Jagielloński Collegium Medicum, Polska

### Streszczenie

Ocena ryzyka w przebiegu PMF opiera się o powszechnie uznawane skale prognostyczne. Wskaźniki IPSS oraz DIPSS bazują na parametrach klinicznych pacjenta, natomiast skala MIPSS uwzględnia dodatkowo mutacje somatyczne. Celem niniejszej pracy było dokonanie oceny ryzyka u chorych na PMF z wykorzystaniem skal IPSS, DIPSS i MIPSS oraz porównanie wyników stratyfikacji w oparciu o te wskaźniki. Według IPSS, DIPSS i MIPSS 10% pacjentów zostało zakwalifikowanych do grupy niskiego ryzyka, odpowiednio 40%, 60% i 35% do pośredniego – 1, a 25%, 20% i 55% do pośredniego – 2. Według IPSS i DIPSS 25% i 10% pacjentów zaseregowano do grupy wysokiego ryzyka, według MIPSS żaden chory nie spełniał kryteriów kwalifikujących do tej grupy. Do wyższej kategorii ryzyka według MIPSS zakwalifikowano odpowiednio 25% oraz 35% pacjentów kwalifikowanych do niższej kategorii przy pomocy wskaźników IPSS oraz DIPSS (odpowiednio 15% i 23% pacjentów zmieniło kategorię ryzyka z pośredniego – 1 według IPSS i DIPSS na ryzyko pośrednie – 2 według MIPSS). Do niższej kategorii ryzyka według MIPSS przydzielono w sumie 45% pacjentów z kategorii większego ryzyka według skali IPSS i 20% według skali DIPSS. Zastosowanie skali prognostycznej MIPSS może zapewnić większą trafność w identyfikacji osób należących do wyższych kategorii ryzyka i doprowadzić do zmiany leczenia obejmującego także procedurę allo-HSCT.

### Abstract

Disease risk assessment in primary bone marrow fibrosis (PMF) is based on prognostic scores. The IPSS and DIPSS consider the clinical data of the patient, and recently introduced MIPSS includes the results of detection of somatic mutations characteristic for the MPNs Ph(-). The aim of this study was to assess the risk in patients with PMF with the use of IPSS, DIPSS and MIPSS prognostic scores and to compare the risk stratification based on these scores. According to IPSS, DIPSS and MIPSS scales 10% patients were classified to low risk category. The 40%, 60% and 35% of patients were classified to intermediate-1 risk category and 25%, 20% i 55% to intermediate-2 risk category according to the IPSS, DIPSS and MIPSS scales, respectively. With the use of IPSS and DIPSS 25% and 10% of patients belonged to high risk category, whereas in MIPSS none of patients was classified into this group.

MIPSS stratification allocated 25% and 35% of patients to a higher risk category than IPSS and DIPSS, respectively (15% and 25% of patients changed the intermediate-1 in IPSS and DIPSS risk group into intermediate-2 in MIPSS). 45% and 20% of patients, respectively qualified to higher risk category according to IPSS and DIPSS were stratified to lower risk group with the use of MIPSS. Appropriate risk stratification and identification of patients with higher risk, requiring more intensive therapy has crucial importance. Introduction of MIPSS could identify more precisely the group of intermediate-2 and high risk, which could result in therapy modification including the qualification to allo-HSCT procedure.

© 2018 Polish Society of Hematology and Transfusion Medicine, Institute of Hematology and Transfusion Medicine. All rights reserved.

### Słowa kluczowe:

pierwotne włóknienie szpiku, skala IPSS, skala DIPSS, skala MIPSS, wysokie ryzyko molekularne

### Keywords:

primary bone marrow fibrosis, IPSS prognostic score, DIPSS prognostic score, MIPSS prognostic score, high molecular risk

## Wstęp

Pierwotne włóknienie szpiku kostnego (*primary myelofibrosis* – PMF) należy do nowotworów mieloproliferacyjnych bez chromosomu

Filadelfia. Charakteryzuje się najbardziej niekorzystnym rokowaniem spośród nowotworów mieloproliferacyjnych [1, 2]. Do jego oceny wykorzystywane są różne modele prognostyczne. System oceny punktowej stanowi wskazówkę dla decyzji dotyczących sposobów

\* Adres do korespondencji: Dorota Link-Lenczowska, Pracownia Diagnostyki Molekularnej Zakładu Diagnostyki Hematologicznej, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, ul. Kopernika 19, 31-501 Kraków, Polska. Tel.: +48 12 424 76 41, e-mail: [dlink@su.krakow.pl](mailto:dlink@su.krakow.pl)

leczenia, obejmujących także allogeniczne przeszczepienie komórek macierzystych (*allogeneic hematopoietic stem cell transplantation* – allo-HSCT). Do powszechnie stosowanych skal prognostycznych należą: Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny (*International Prognostic Scoring System* – IPSS) [3] oraz dynamiczny IPSS (*Dynamic IPSS* – DIPSS) (Tab. I) [4]. Pierwszy z nich stosowany jest u chorych na PMF w chwili rozpoznania, jego odmiana dynamiczna natomiast przeznaczona jest do oceny ryzyka u chorych w dowolnej chwili trwania choroby. Każdy z tych modeli prognozuje całkowity czas przeżycia pacjentów w oparciu o parametry kliniczne, których analiza pozwala na przydzielenie chorych, zgodnie z rekomendacjami IWG-MRT (*International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment*), do 4 grup ryzyka: niskiego, pośredniego – 1, pośredniego – 2 oraz wysokiego, różniących się istotnie czasem przeżycia [3, 4]. Zgodnie z tymi zaleceniami u osób z niskiej grupy ryzyka wg IPSS oraz wg DIPSS rekomendowana jest jedynie obserwacja. W przypadku pacjentów o ryzyku pośrednim – 1 postępowanie powinno być zindywidualizowane i może obejmować obserwację, konwencjonalną farmakoterapię lub zastosowanie leczenia eksperymentalnego w ramach badania klinicznego. Rozważenie możliwości przeprowadzenia allo-HSCT lub kwalifikacja do badania klinicznego jest zalecane jedynie dla grup pośredniego – 2 i wysokiego ryzyka według klasyfikacji IPSS oraz DIPSS [2, 5]. W przebiegu PMF wykrywane są mutacje somatyczne w genie *JAK2*, *CALR* oraz *MPL*. Są to tzw. mutacje wiodące, które wykrywane są u około 90% pacjentów. Pozostałych 10% określa się mianem „potrójnie negatywnych” [2]. Stanowią oni grupę o niekorzystnym rokowaniu. PMF cechuje znaczna złożoność zmian genetycznych, która wpływa na fenotyp choroby i modyfikuje jej kliniczny przebieg [6]. W przebiegu PMF wykrywane są zmiany między innymi w obrębie genów: *ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A*, *EZH2*, *SRSF2*, *IDH1/2*, *IKZF1*, *TP53*. Zmiany te są następstwem mutacji somatycznych pogarszających rokowanie, z tego powodu zostały określone mianem mutacji wysokiego ryzyka molekularnego (*high molecular risk* – HMR); ich wystąpienie wiąże się ze skróconym czasem przeżycia oraz ze zwiększonym ryzykiem transformacji białaczkowej [7, 8] niezależnie od grupy ryzyka wg IPSS oraz DIPSS [9, 10]. Z uwagi na to niedawno zaproponowano wdrożenie nowego modelu prognostycznego, będącego rozszerzeniem Międzynarodowego Wskaźnika Prognostycznego (*Mutation Enhanced International Prognostic Scoring System* – MIPSS), uwzględniającego mutację *JAK2V617F* oraz zmiany w genach *MPL*, *CALR*, *ASXL1* oraz *SRSF2*. Dodatkowo, w porównaniu ze wskaźnikami IPSS i DIPSS, w modelu MIPSS obniżono tzw. wiek graniczny pacjenta (60 lat vs 65), nie jest brana pod uwagę leukocytoza ani odsetek blastów we krwi obwodowej, pojawia się natomiast liczba płytek krwi jako parametr poddawany ocenie (Tab. II) [11]. U podłoża sformułowania wskaźnika MIPSS leżała potrzeba identyfikacji chorych z wysokim ryzykiem zarówno skróconego czasu przeżycia, jak i transformacji białaczkowej niezależnie od grupy ryzyka wg IPSS i DIPSS, co jest kluczowe w przypadku klasyfikacji pacjentów do procedury allo-HSCT. Wobec istotnego ryzyka, jakie niesie ze sobą przeprowadzenie powyższej procedury, wskaźnik MIPSS podlega ciągłej walidacji i ocenie przydatności klinicznej u chorych na PMF. Celem badania było dokonanie oceny ryzyka u pacjentów z rozpoznaniem PMF przy pomocy wskaźników

**Tabela I. Grupy ryzyka oraz mediana czasu przeżycia według skal prognostycznych dla PMF. IPSS – Międzynarodowy Wskaźnik Prognostyczny, DIPSS – Dynamiczny IPSS**

**Table I. Risk groups and median survival time according to the prognostic scales for PMF. IPSS – International Prognostic Index, DIPSS – Dynamic IPSS**

Czynniki ryzyka	IPSS (punktacja)	DIPSS (punktacja)
Wiek > 65 lat	1	1
Objawy ogólne	1	1
Hb < 10 g/dl	1	2
Leukocytoza > 25 x 10 <sup>9</sup> /dl	1	1
Odsetek blastów ≥ 1%	1	1
Grupa ryzyka	Liczba punktów (mediana czasu przeżycia w latach)	
Niska	0 (11,3)	0 (nieosiągalna)
Pośrednia – 1	1 (7,9)	1-2 (14,2)
Pośrednia – 2	2 (4)	3-4 (4)
Wysoka	≥ 3 (2,3)	5-6 (1,5)

rokowniczych IPSS, DIPSS oraz MIPSS oraz porównanie wyników stratyfikacji w oparciu o te wskaźniki. Dodatkowo postawiono sobie za cel identyfikację pacjentów podwyższonego ryzyka, wymagających rozważenia allo-HSCT w oparciu o wyniki badań molekularnych.

## Materiał i metody

Grupę badanych stanowiło 20 pacjentów diagnozowanych i leczonych z powodu PMF w Klinice Hematologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Rozpoznanie PMF dokonano w oparciu o kryteria WHO z 2008 roku [12]. Badania wykonano po uprzednim uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, z poszanowaniem zasad Deklaracji Helsińskiej. Analizie poddano parametry kliniczno-laboratoryjne stanowiące potencjalne czynniki ryzyka oceniane w trakcie wyznaczania wskaźników rokowniczych IPSS i DIPSS: stężenie hemoglobiny, liczbę leukocytów, liczbę płytek krwi, odsetek komórek blastycznych we krwi obwodowej, objawy konstytucjonalne w chwili rozpoznania oraz wiek pacjenta. Dodatkowo charakterystykę kliniczną pacjentów poszerzono o informacje uwzględniające odsetek osób po przeprowadzonej procedurze allo-HSCT, po transformacji do ostrej białaczki szpikowej oraz liczbę zgonów. W oparciu o przedstawione parametry dokonano oceny ryzyka według skali prognostycznej IPSS oraz DIPSS [3, 4]. Równocześnie wykonano analizy molekularne eksonu 14 genu *JAK2* (ocena mutacji *JAK2V617F*), eksonu 9 genu *CALR*, eksonu 10 genu *MPL* oraz eksonu 13 genu *ASXL1*. Materiałem wyjściowym była krew obwodowa, z której pozyskiwano leukocyty. Z komórek izolowano DNA stanowiące matrycę do badań molekularnych. Oznaczenie mutacji *JAK2V617F* przeprowadzono zgodnie z protokołem Larsena umożliwiającym ilościową ocenę obciążenia nieprawidłowym allelem, wykorzystując ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qPCR) [13]. Oceny obecności zmian w genie *CALR* dokonano w oparciu o metodę analizy długości fragmentów DNA oraz sekwencjonowanie Sangera [14]. Obecność zmian w eksonie 10 genu *MPL* weryfikowano z wykorzystaniem wysokorozdzielczej analizy krzywych topnienia

**Tabela II. Grupy ryzyka według wskaźnika prognostycznego MIPSS. MIPSS – Mutation Enhanced International Prognostic Scoring System**

**Table II. Risk groups according to the MIPSS prognosis indicator. MIPSS – Mutation Enhanced International Prognostic Scoring System**

Czynniki ryzyka	MIPSS (punktacja)
Wiek > 60 lat	1,5
Objawy ogólne	0,5
Hb < 10 g/dl	0,5
PLT < 200 x 10 <sup>9</sup> /l	1
Bez mutacji JAK2/MPL/CALR	1,5
JAK2 lub MPL dodatnie	0,5
ASXL1	0,5
SRSF2	0,5
<b>Grupa ryzyka</b>	<b>Liczba punktów (mediana czasu przeżycia w latach)</b>
Niska	0-0,5 (26,4)
Pośrednia – 1	1-1,5 (9,7)
Pośrednia – 2	2-3,5,9 (6,4)
Wysoka	≥ 4 (1,9)

**Tabela III. Charakterystyka kliniczno-laboratoryjna badanej grupy chorych na PMF. Hb – hemoglobina, WBC – białe krwinki krwi, PLT – płytki krwi, allo-HSCT – przeszczep allogenicnych komórek krwiotwórczych, AML – ostra białaczka szpikowa**

**Table III. Clinical and laboratory characteristics of the studied group of patients with PMF. Hb – hemoglobin, WBC – white blood cells, PLT – platelets, allo-HSCT – transplantation of allogeneic hematopoietic cells, AML – acute myeloid leukemia**

Analizowany parametr	Wartość/występowanie
Wiek w latach; mediana (zakres)	64,5 (35-78)
Płeć (M/K); n (%)	11/9 (55/45%)
Objawy ogólne; n (%)	13 (65%)
Hb g/dl; mediana (zakres)	11,5 (8,2-16)
Hb < 10 g/dl; n (%)	3 (15%)
WBC, x10 <sup>9</sup> /l; mediana (zakres)	9,4 (5,2-22,5)
WBC > 25 x 10 <sup>9</sup> /l; n (%)	0
PLT x 10 <sup>9</sup> /l; mediana (zakres)	550 (184-1200)
PLT < 200 x 10 <sup>9</sup> /l; n (%)	2 (10%)
Odsetek blastów we krwi obwodowej ≥ 1%; n (%)	8 (47%)
Allo-HSCT; n (%)	0
Transformacja w AML; n (%)	1 (5%)
Zgon n (%)	9 (45%)

(HRM) [15] oraz sekwencjonowania Sangera [16]. Dodatkowo, stosując sekwencjonowanie Sangera, analizowano aberracje w eksonie 13 genu ASXL1 [17]. Wykrywane zmiany identyfikowano w oparciu o sekwencje referencyjne ludzkiego genomu dla genów: CALR, RefSeq:NM\_004343.3, MPL, RefSeq:NM\_005373.2, ASXL1, RefSeq:NM\_015338.5, dostępne w metabazie NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Następnie każdy wariant genu opisano w notacji nukleotydowej oraz aminokwasowej zgodnie z wytycznymi HGVS (*Human Genome Variation Society*) z 2016 roku.

Po uwzględnieniu parametrów kliniczno-laboratoryjnych oraz wyniku analiz molekularnych dokonano oceny grup ryzyka wśród pacjentów PMF w oparciu o skale prognostyczne IPSS, DIPSS oraz MIPSS [11]. W badaniach nie uwzględniono oceny mutacji w genie SRSF2.

## Wyniki

Mediana wieku pacjentów w chwili rozpoznania choroby wynosiła 64,5 roku (zakres 35-78 lat). 11 osób badanych stanowili mężczyźni, a 9 kobiety. Objawy konstytucjonalne zgłaszało 13 pacjentów. Mediana stężenia hemoglobiny w chwili rozpoznania to 11,5 g/dl. Wartość mediany dla liczby leukocytów oraz płytek krwi wynosiła odpowiednio 9,4 x 10<sup>9</sup>/l i 550 x 10<sup>9</sup>/l. Odsetek blastów ≥ 1% krążących w krwi obwodowej wykazano u 47% pacjentów. Szczegółową charakterystykę kliniczną badanej grupy pacjentów przedstawiono w tabeli III. W badaniu molekularnym wariant JAK2V617F wykryto u 12 (60%) pacjentów. Średnie obciążenie zmutowanym allele w tej grupie wynosiło 42,5% (0,34-92,8%). Zmiany molekularne w eksonie 9 genu CALR wykryto u 7 pacjentów, u 6 wystąpiła mutacja typu 1 (wariant patogenny NM\_004343.3(CALR):c.1099\_1150del), u 1 mutacja typu 2 (wariant patogenny NM\_004343.3(CALR):c.1154\_1155insTTGTC). Chorzy z powyższymi aberracjami stanowili 35% badanej grupy. Zmiany w eksonie 10 genu MPL wykryto u 2 (10%) pacjentów. W przypadku 5 pacjentów (25% badanej grupy) potwierdzono obecność wariantów genu ASXL1 wykrytych w eksonie 13, były to zmiany o charakterze insercyjno-delecyjnym oraz substytucje pojedynczego nukleotydu. Jednoczesne występowanie 2 zmian zachodzących w sekwencji nukleotydowej badanych genów (mutacji somatycznych) stwierdzono u 6 chorych, którzy stanowili 30% całej badanej grupy. U pozostałych pacjentów wykrywano tylko 1 nieprawidłowość genetyczną w analizowanych genach. Zestawienie wyników analiz molekularnych przedstawiono w tabeli IV. Analizowane parametry kliniczno-laboratoryjne w chwili rozpoznania i w trakcie trwania choroby pozwoliły na kwalifikację pacjentów do 4 grup ryzyka: niskiego, pośredniego – 1, pośredniego – 2 oraz wysokiego według międzynarodowych wskaźników prognostycznych: IPSS, DIPSS oraz MIPSS. Według skali IPSS i DIPSS większość pacjentów zostało zakwalifikowanych do grupy ryzyka pośredniego – 1 (odpowiednio 40% i 60%). Na podstawie analizy tej samej grupy chorych przy pomocy skali MIPSS, uwzględniającej wyniki badań molekularnych, większość badanych (55%) zakwalifikowano do grupy ryzyka pośredniego – 2 (Tab. V). W grupie tej najczęściej występowały mutacje somatyczne (58%) w porównaniu z pozostałymi grupami: ryzyka pośredniego – 1 (34%) oraz niskiego (8%) (Tab. VI). Żaden chory nie spełniał kryteriów kwalifikujących do grupy wysokiego ryzyka według MIPSS. Analiza porównująca ustalone kategorie ryzyka wykazała, że w przypadku odpowiednio 30% oraz 40% pacjentów ich klasyfikacja do poszczególnych grup ryzyka według IPSS oraz DIPSS pokryła się z zaszeregowaniem do odpowiedniej kategorii ryzyka według MIPSS. Do wyższej kategorii ryzyka według MIPSS (pośredniego – 2) zakwalifikowano odpowiednio 25% oraz 35% pacjentów kwalifikowanych przy pomocy wskaźników IPSS oraz DIPSS do niższej kategorii. Odpowiednio 15% i 23% pacjentów zmieniło kategorię ryzyka z pośredniego – 1 według IPSS i DIPSS na ryzyko pośrednie – 2 według MIPSS. Do niższej kategorii

**Tabela IV. Występowanie zmian mutacji w genach JAK2, MPL, CALR oraz ASXL1 u chorych na PMF. Obecność mutacji JAK2V617F przedstawiono jako odsetek obciążenia nieprawidłowym zmutowanym allelem**

**Table IV. Presence of mutations in the JAK2, MPL, CALR and ASXL1 genes in patients with PMF. The presence of the JAK2V617F mutation is shown as a percentage of the mutant allele burden**

Nr pacjenta	JAK2V617F	CALR	MPL	ASXL1	Współwystępowanie mutacji
1	–	–	c.1543_1544delTGinsAA, Trp515Lys	c.2113delG, p.Glu705SerfsTer20	TAK
2	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	–	–
3	TAK (10,1%)	–	–	–	–
4	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	–	–
5	TAK (68,2%)	–	–	–	–
6	TAK (20,7%)	–	–	–	–
7	TAK (33,7%)	–	–	–	–
8	TAK (0,3%)	–	c.1544G>T p.Trp515Lys	–	TAK
9	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	–	–
10	TAK (0,7%)	–	–	c.2302C>T p.Gln768Ter	TAK
11	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	–	–
12	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	c.1934dupG p.Gly646Trpfs12 c.2957A>G p.Asn986Ser	TAK
13	–	c.1154_1155insTTGTC p.Lys385AsnfsTer47	–	c.2338C>T p.Gln780Ter	TAK
14	–	c.1099_1150del p.Leu367ThrfsTer46	–	–	–
15	TAK (41,2%)	–	–	–	–
16	TAK (92,8%)	–	–	–	–
17	TAK (90,2%)	–	–	c.3306G>T p.Glu1102Asp	TAK
18	TAK (33,5%)	–	–	–	–
19	TAK (65,2%)	–	–	–	–
20	TAK (53,3%)	–	–	–	–

**Tabela V. Stratyfikacja ryzyka analizowanych pacjentów według IPSS, DIPSS oraz MIPSS**

**Table V. Risk stratification of analyzed patients according to IPSS, DIPSS and MIPSS**

Ryzyko	IPSS	DIPSS	MIPSS
Niskie, n (%)	2 (10%)	2 (10%)	2 (10%)
Pośrednie – 1, n (%)	8 (40%)	12 (60%)	7 (35%)
Pośrednie – 2, n (%)	5 (25%)	4 (20%)	11 (55%)
Wysokie, n (%)	5 (25%)	2 (10%)	0

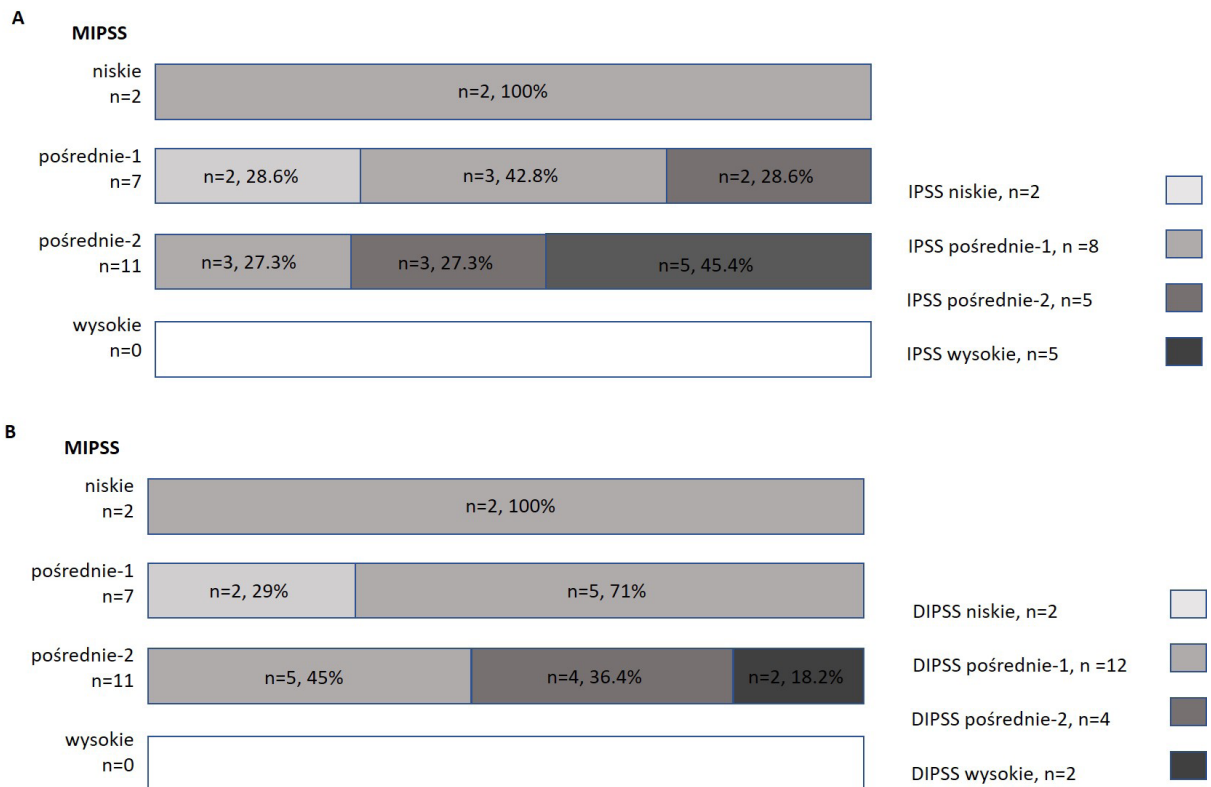
ryzyka według MIPSS (niskiej, pośredniej – 1 lub pośredniej – 2) przydzielono w sumie 45% pacjentów z kategorii większego ryzyka [odpowiednio pośredniego – 1 (10%), pośredniego – 2 (10%) oraz wysokiego (25%)] według skali IPSS i 20% pacjentów z kategorii większego ryzyka [z wysokiego ryzyka do ryzyka pośredniego – 2 (10%) oraz z ryzyka pośredniego – 1 do niskiego (10%)] ocenionych przy użyciu skali DIPSS (Ryc. 1).

## Dyskusja

Skale prognostyczne używane do oceny rokowania u chorych na PMF (IPSS, DIPSS oraz MIPSS) pozwalają na zakwalifikowanie chorych do 4 różniących się istotnie czasem przeżycia grup ryzyka: niskiego, pośredniego – 1, pośredniego – 2 oraz wysokiego. Skala IPSS została opracowana w celu prognozowania przebiegu choroby w chwili jej rozpoznania [3], dlatego nie uwzględnia możliwości zmiany czynników rokowniczych w trakcie leczenia i tym samym ich wpływu na zmianę całkowitego czasu przeżycia [4]. Stało się to powodem modyfikacji wskaźnika IPSS i opracowania skali DIPSS, uwzględniającej zasadniczo te same jak w skali IPSS parametry kliniczno-laboratoryjne, których ocena jest wykonywana w trakcie trwania choroby. W modelu DIPSS szczególną uwagę zwrócono na niekorzystne znaczenie prognostyczne niedokrwistości (przypisany współczynnik ryzyka ma dwukrotnie wyższą wartość niż w skali IPSS), która istotnie skraca przeżycie u pacjentów chorych na PMF, a dodatkowo, pojawiając się w trakcie leczenia, może wskazywać na progresję choroby (co jednak nie zawsze dotyczy chorych leczonych inhibitorami JAK2) [4]. Porównanie skali IPSS z DIPSS przeprowadzone w niniejszej pracy wykazało

**Tabela VI. Występowanie mutacji i liczba zgonów w poszczególnych grupach ryzyka MIPSS oraz u chorych z mutacją ASXL1**  
**Table VI. Mutations occurrence and number of deaths within MIPSS risk groups and in patients with the ASXL1 mutation**

Ryzyko wg MIPSS	JAK2V617F	CALR	MPL	ASXL1 (zgon, n)	Współwystępowanie mutacji	Zgon
Niskie, n	0	2	0	0	0	0
Pośrednie – 1, n	4	2	1	2 (1)	2	3
Pośrednie – 2, n	8	3	1	3 (3)	4	6
Wysokie, n	–	–	–	–	–	–



**Ryc. 1. Stratyfikacja ryzyka u pacjentów według wskaźników MIPSS, IPSS (A) i DIPSS (B)**  
**Fig. 1. Risk stratification in patients according to MIPSS, IPSS (A) and DIPSS (B) scores**

różnice w odsetku pacjentów klasyfikowanych do grup ryzyka pośredniego – 1, pośredniego – 2 i wysokiego, przy braku różnic w kwalifikacji do grupy ryzyka niskiego. Ocena ryzyka w oparciu o DIPSS pozwoliła na zaszeregowanie 60% chorych do grupy ryzyka pośredniego – 1 z medianą przeżycia wynoszącą 14,2 roku. Do wyższych grup ryzyka wg DIPSS (pośredniego – 2 i wysokiego) zakwalifikowano 30% wszystkich chorych, co stanowiło 60% pacjentów klasyfikowanych do tych grup ryzyka według wskaźnika IPSS. Powyższe różnice wynikają ze wspomnianej powyżej innej wartości punktów przypisanych niedokrwistości oraz z możliwej zmiany punktacji pod wpływem pojawienia się w trakcie trwania choroby oraz leczenia nowych czynników ryzyka ocenianych według DIPSS. Stosowane dotychczas metody terapii farmakologicznej PMF nie dają możliwości trwałego wyleczenia. Opracowanie i wdrożenie do leczenia PMF inhibitorów kinazy JAK2 zapoczątkowało nową erę w terapii tej jednostki chorobowej, znacznie poprawiając rokowanie chorych. Leki te wykazują skuteczność niezależnie od

obecności zmiany V617F w genie JAK2 oraz mutacji somatycznych należących do grupy HMR [18]. U większości chorych prowadzą do znacznego zmniejszenia nasilenia objawów choroby i istotnej poprawy jakości życia, a także redukcji wielkości śledziony. Wciąż jednak istnieje potrzeba potwierdzenia, obserwowanego w badaniach COMFORT I i II, przedłużenia przeżycia pacjentów leczonych inhibitorem w porównaniu z chorymi otrzymującymi placebo lub najlepszą dostępną terapię, inną niż inhibitor JAK2 w odpowiednio zaplanowanych badaniach 3 fazy, obierających analizę czasu przeżycia jako cel pierwszorzędowy [19]. Leczeniem, które daje szansę na wydłużenie czasu przeżycia i wyleczenie, jest allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych [20, 21, 22]. Jednak ze względu na istotne ryzyko okołoprzeszczepowe zagrażające życiu pacjenta, procedura ta jest rekomendowana w leczeniu młodszych chorych o przewidywanym krótkim czasie przeżycia charakterystycznym dla grupy pośredniego – 2 lub wysokiego ryzyka oszacowanego według np. skali DIPSS [23]. Wykorzystanie



wskaźników prognostycznych ułatwia podjęcie decyzji o rodzaju stosowanej terapii [24]. Według zaleceń IWG-MRT, z powodu dobrego rokowania chorych z grupy niskiego i pośredniego – 1 ryzyka bez objawów ogólnych, postępowanie powinno być ograniczone jedynie do obserwacji, przy braku wskazań do leczenia. U chorych w tej grupie ryzyka z objawową splenomegalią lub znaczną niedokrwistością rekomendowane jest stosowanie leków konwencjonalnych oraz allo-HSCT [19]. Analiza ryzyka i prognozowanie przebiegu PMF na podstawie dotychczas używanych parametrów kliniczno-laboratoryjnych niesie ze sobą jednak ryzyko nieprecyzyjnej oceny i nie tłumaczy niekorzystnego przebiegu choroby u wielu pacjentów z grupy niskiego lub pośredniego – 1 ryzyka. Powiązanie danych klinicznych oraz profilu genetycznego pacjenta znajduje coraz większe zastosowanie w prognozowaniu całkowitego przeżycia i czasu wolnego od progresji. Zaburzenia molekularne kształtują fenotyp choroby i znacznie go modyfikują, przez co utrudniają wstępną ocenę ryzyka. Dlatego opracowano nowe modele prognostyczne uwzględniające nieprawidłowości genetyczne. Skala MIPSS uwzględniła jako czynnik rokowniczy występowanie nieprawidłowych wariantów DNA warunkujących wysokie ryzyko molekularne [25]. W badanej grupie chorych wykryto mutacje somatyczne w genach *JAK2*, *CALR* oraz *MPL*, którym zgodnie z publikowanymi danymi, w części przypadków towarzyszyły inne zmiany, m.in. w genie *ASXL1* należące do kategorii HMR [9, 26, 27, 28, 29]. Przeprowadzona przy pomocy modelu MIPSS ocena ryzyka chorych na PMF pozwoliła na zakwalifikowanie 55% wszystkich pacjentów do grupy ryzyka pośredniego – 2. Różnica w odsetku pacjentów przypisanych do poszczególnych grup (Tab. V) wynikała najprawdopodobniej z oceny innych niż w pozostałych skalach parametrów klinicznych i używanej niezależnej od IPSS i DIPSS punktacji. Dodatkowo obecność nabytych aberracji molekularnych spowodowała przesunięcie części chorych z grupy ryzyka niskiego i pośredniego – 1 do kategorii ryzyka pośredniego – 2, wskazując na niekorzystne znaczenie tych zaburzeń genetycznych [9, 10, 30, 31], czego wyrazem może być duży odsetek zgonów (45%) odnotowany w tej grupie pacjentów. Występowanie mutacji somatycznych w genie *ASXL1* znacząco przyczynia się do skrócenia czasu przeżycia u chorych na PMF we wszystkich grupach ryzyka [2, 10]. W badanej grupie spośród chorych, u których wykryto obecność mutacji w genie *ASXL1*, 80% pacjentów zmarło. Dodatkowo wśród wszystkich odnotowanych zgonów, 44% dotyczyło pacjentów z potwierdzoną zmianą w eksonie 13 genu *ASXL1*. Uwzględnienie nieprawidłowości w genie *ASXL1* wraz z możliwymi aberracjami w genie *SRSF2* w analizie ryzyka przy pomocy wskaźnika MIPSS może poprawić trafność w typowaniu pacjentów obciążonych gorszym rokowaniem, u których po dokładnej ocenie ryzyka związanego z przeszczepem (np. przy pomocy indeksu Sorror) należy przeprowadzić procedurę allo-HSCT [32]. Dotyczy to przede wszystkim pacjentów zaszeregowanych przy użyciu wskaźnika IPSS lub DIPSS do grupy

ryzyka pośredniego – 1, u których zmiana kwalifikacji do wyższej grupy ryzyka może pociągnąć za sobą istotną modyfikację leczenia. Zastosowanie przedstawionych modeli prognostycznych wykazało, iż w oparciu o skalę MIPSS do grupy ryzyka pośredniego – 2 trafiło o 10% więcej pacjentów w odniesieniu do skali IPSS i o 5% mniej niż sklasyfikowanych według DIPSS. Na podwyższenie kategorii ryzyka według MIPSS mógł wpłynąć fakt wykrycia mutacji z grupy HMR, natomiast obniżenie grupy ryzyka mogło być związane z innymi parametrami klinicznymi ocenianymi w skali MIPSS oraz fakt, że w badanej populacji nie było możliwości przeprowadzenia analizy wykrywania mutacji somatycznych w genie *SRSF2*. Zmiana przynależności do grupy wyższego ryzyka obliczonego na podstawie MIPSS w stosunku do ryzyka skalkulowanego według IPSS oraz DIPSS może ułatwić bardziej miarodajną ocenę narażenia na ryzyko transformacji do ostrej białaczki szpikowej i zgonu (co miało miejsce w przypadku 1 pacjentki z tej grupy). Poszerzenie diagnostyki molekularnej u chorych na PMF o możliwość wykrywania mutacji HMR może przyczynić się do bardziej precyzyjnej oceny ryzyka, lepiej odzwierciedlającej rzeczywisty przebieg choroby. Nowe modele prognostyczne, opracowane w oparciu o odkrycia ostatnich lat w dziedzinie biologii molekularnej, mogą poprawić nie tylko wartość i miarodajność oceny ryzyka oraz trafność prognozowania, ale także stworzyć możliwość optymalnego leczenia dopasowanego do indywidualnego profilu ryzyka u poszczególnych chorych.

#### **Wkład autorów/Authors' contributions**

DL-L – opracowanie koncepcji przeprowadzonych badań, wykonanie analiz molekularnych, zebranie danych, analiza wyników, przeprowadzenie testów statystycznych, napisanie manuskryptu oraz współredagowanie manuskryptu; TS – udział w opracowaniu koncepcji przeprowadzonych badań, zbieranie danych klinicznych, poprawa i współredagowanie manuskryptu oraz konsultacje i opieka merytoryczna.

#### **Konflikt interesu/Conflict of interest**

Nie występuje.

#### **Finansowanie/Financial support**

Nie występuje.

#### **Etyka/Ethics**

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

#### **Piśmiennictwo/References**

- [1] Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8520–30.
- [2] Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol* 2016;91(12):1262–1271.

- [3] Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. A New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113(13):2895–901.
- [4] Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010;115(9):1703–8.
- [5] Vannucchi AM, Barbui T, Cervantes F, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *ESMO Guidelines Committee Ann Oncol* 2015;26:v85–99.
- [6] Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* 2010;24(6):1128–38.
- [7] Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123(14):2220–8.
- [8] Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28(9):1804–10.
- [9] Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv* 2016;1(2):105–111.
- [10] Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27(9):1861–9.
- [11] Vannucchi AM, Guglielmelli P, Rotunno G, et al. Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System (MIPSS) for Primary Myelofibrosis: An AGIMM & IWG-MRT Project. *Blood* 2014;124(21):405.
- [12] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114(5):937–51.
- [13] Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol* 2007;136(5):745–51.
- [14] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013;19:2379–90.
- [15] Boyd EM, Bench AJ, Goday-Fernández A. Clinical utility of routine MPL exon 10 analysis in the diagnosis of essential thrombocythaemia and primary myelofibrosis. *Br J Haematol* 2010;149(2):250–7.
- [16] Furtado LV, Weigelin HC, Elenitoba-Johnson KS, Betz BLJ. Detection of MPL mutations by a novel allele-specific PCR-based strategy. *Mol Diagn* 2013;15(6):810–8.
- [17] Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol* 2012;5:12.
- [18] Verstovsek S., et al. "Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-1." *Haematologica* 2015;100(4): 479–488.
- [19] Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia* 2015;29(11):2126–33.
- [20] Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2003;102(12):3912–8.
- [21] Kröger N, Mesa RA. Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. *Leukemia* 2008;22(3):474–86.
- [22] Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2005;105:4115–4119.
- [23] Scott BL, Gooley TA, Sorrow ML, et al. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2012;119(11):2657–64.
- [24] Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol* 2011;29(5):573–82.
- [25] Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol* 2018;36(4):310–318.
- [26] Cross NC. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:208–14.
- [27] Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* 2014;124(7):1062–1069.
- [28] Caires dos Santos L, Corrêa da Costa Ribeiro JC, Silva NP, Cerutti J, Regis da Silva MR, Chauffaille MLLF. Cytogenetics, JAK2 and MPL mutations in polycythemia vera, primary myelofibrosis and essential thrombocythemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33(6):417–424.
- [29] Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51(8):743–55.
- [30] Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* 2014;28(7):1494–500.
- [31] Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia* 2014;28(7):1472–7.
- [32] Sorrow ML, Maris MB, Storb R, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005;106(8):2912–9.