

# АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* И *EGLN1*, АССОЦИИРОВАННЫХ С СЕМЕЙНЫМИ ЭРИТРОЦИТОЗАМИ ЕСУТ1-4, СРЕДИ *JAK2*- И *CALR*-НЕГАТИВНЫХ БОЛЬНЫХ С ЭРИТРОЦИТОЗАМИ НЕЯСНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Субботина Т.Н.<sup>1,2,\*</sup>, Шалева А.А.<sup>1,2</sup>, Ходос Г.А.<sup>1</sup>, Орешкова Н.В.<sup>1</sup>, Михалев М.А.<sup>3</sup>, Васильев Е.В.<sup>3</sup>, Дзирквелишвили Г.О.<sup>4</sup>, Дунаева Е.А.<sup>5</sup>, Миронов К.О.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», 660037, г. Красноярск, Российская Федерация

<sup>3</sup> КГБУЗ «Краевая клиническая больница», 660022, г. Красноярск, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 660022, г. Красноярск, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Российская Федерация

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** В патогенезе эритроцитоза помимо клональных процессов могут играть роль герминальные мутации в генах белков, обуславливающих развитие семейных наследуемых эритроцитозов (*EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *EGLN1* и др.).

**Цель:** выполнить анализ мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ассоциированных с семейными эритроцитозами ЕСУТ1-4, среди *JAK2*- и *CALR*-негативных больных.

**Материалы и методы.** В исследование включено 50 *JAK2*- и *CALR*-негативных больных с эритроцитозами неясной этиологии. Анализ мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ответственных за развитие семейных эритроцитозов, проводили с помощью секвенирования по Сэнгеру, у 12 больных дополнительно было выполнено секвенирование следующего поколения.

**Результаты.** При секвенировании по Сэнгеру генов *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1* какие-либо генетические варианты обнаружены у 22 из 50 обследованных больных. Среди вариантов, выявленных в кодирующих областях обследованных генов и приводящих к аминокислотным заменам, интерес представляли: 1) две мутации в гене *VHL* (rs28940298 и rs5030821), ассоциированные с развитием чувашской полицитемии (ЕСУТ2); 2) вариант rs12097901 в гене *EGLN1*, ассоциированный с адаптацией к высоте и повышающий концентрацию гемоглобина, но не имеющий патогенетической значимости для эритроцитозов; 3) одна мутация в гене *EPOR*, не описанная ранее. По результатам исследования методом секвенирования нового поколения у 5 из 12 больных были выявлены 12 соматических и 4 предположительно герминальных варианта.

**Заключение.** Возможность проведения комплексного молекулярно-генетического исследования по выявлению уже описанных или новых мутаций в генах, ассоциированных с семейными эритроцитозами, может внести существенный вклад в диагностику больных с абсолютными эритроцитозами.

**Ключевые слова:** семейные эритроцитозы, герминальные мутации, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование следующего поколения, соматические мутации

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Субботина Т.Н., Шалева А.А., Ходос Г.А., Орешкова Н.В., Михалев М.А., Васильев Е.В., Дзирквелишвили Г.О., Дунаева Е.А., Миронов К.О. Анализ мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ассоциированных с семейными эритроцитозами ЕСУТ1-4, среди *JAK2*- и *CALR*-негативных больных с эритроцитозами неясной этиологии. Гематология и трансфузиология. 2023; 68(4):498–510. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-4-498-510>

# ANALYSIS OF MUTATIONS IN *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* AND *EGLN1* GENES ASSOCIATED WITH THE FAMILIAL ERYTHROCYTOSIS ECYT1-4 AMONG *JAK2*- AND *CALR*-NEGATIVE PATIENTS WITH THE ERYTHROCYTOSIS OF UNCLEAR ETIOLOGY

Subbotina T.N.<sup>1,2,\*</sup>, Shalyova A.A.<sup>1,2</sup>, Khodos G.A.<sup>1</sup>, Oreshkova N.V.<sup>1</sup>, Mikhalev M.A.<sup>3</sup>, Vasiliev E.V.<sup>3</sup>, Dzirkvelishvili G.O.<sup>4</sup>, Dunaeva E.A.<sup>5</sup>, Mironov K.O.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency, 660037, Krasnoyarsk, Russia

<sup>3</sup> Regional Clinical Hospital, 660022, Krasnoyarsk, Russia

<sup>4</sup> Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, 660022, Krasnoyarsk, Russia

<sup>5</sup> Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 111123, Moscow, Russia

## ABSTRACT

**Introduction.** In addition to the clonal nature of the development of erythrocytosis, there are other causes, such as germinal mutations in genes of proteins responsible for the development of familial inherited erythrocytosis (*EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *EGLN1*, etc.).

**Aim.** To conduct the analysis of mutations in the *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* and *EGLN1* genes associated with the familial erythrocytosis ECYT1-4 among *JAK2*- and *CALR*-negative patients.

**Materials and methods.** The study included 50 *JAK2*- and *CALR*-negative patients of Krasnoyarsk Krai with erythrocytosis of unclear etiology. Analysis of mutations in the *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* and *EGLN1* genes, responsible for the development of familial erythrocytosis was conducted with the use of the Sanger sequencing. A mass parallel sequencing study was also performed for 12 patients.

**Results.** The Sanger sequencing analysis of *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* and *EGLN1* revealed any of the genetic variants in 22 of the 50 patients studied. Of all the variants identified in the coding regions of the genes surveyed that result in amino acid substitutions, the following were of biggest interest: 1) two mutations in the *VHL* gene (rs28940298 and rs5030821) associated with the development of Chuvash polycythemia (ECYT2); 2) rs12097901 variant in the *EGLN1* gene associated with altitude adaptation and increasing haemoglobin levels, but with no pathogenetic relevance for erythrocytosis according to ClinVar; and 3) one mutation in the *EPOR* gene not previously described in literature. According to the results of the NGS study, 12 somatic and 4 putative germinal variants were identified in 5 out of 12 patients.

**Conclusion.** The possibility of conducting a comprehensive molecular genetic study in order to identify new mutations or those already described in the literature in genes associated with familial erythrocytosis could make a significant contribution to the diagnosis of patients with absolute erythrocytosis.

**Keywords:** familial erythrocytosis, germinal mutations, Sanger sequencing, NGS, somatic mutations

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial disclosure:** the study had no sponsorship.

**For citation:** Subbotina T.N., Shalyova A.A., Khodos G.A., Oreshkova N.V., Mikhalev M.A., Vasiliev E.V., Dzirkvelishvili G.O., Dunaeva E.A., Mironov K.O. Analysis of mutations in *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* and *EGLN1* genes associated with the familial erythrocytosis ECYT1-4 among *JAK2*- and *CALR*-negative patients with the erythrocytosis of unclear etiology. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (*Gematologiya i transfuziologiya*). 2023;68(4):498–510 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-4-498-510>

## Введение

Эритроцитозом называют патологическое состояние, характеризующееся увеличением количества эритроцитов, концентрации гемоглобина и величины гематокрита. В зависимости от механизмов развития эритроцитозы делят на абсолютные (увеличение количества эритроцитов в периферической крови в связи с активацией эритропоэза в костном мозге) и относительные (увеличение количества эритроцитов в периферической крови вследствие дефицита объема плазмы) [1]. Причины абсолютных эритроцитозов разнообразны, и они могут быть разделены на первичные, вызванные молекулярным дефектом на уровне эритроидного ростка, которые имеют эритропоэтин-независимый характер, и вторичные, при которых молекулярный дефект находится вне эритроцитов и имеет эритропоэтин-зависимый механизм, связанный с воздействием непосредственно на эритроциты. В свою очередь, первичные и вторичные эритроцитозы делят на врожденные и приобретенные, внутри которых выделяют также несколько групп семейных эритроцитозов [2–4].

Среди больных с эритроцитозами, у которых исключена вторичная приобретенная природа эритроцитоза, представительную группу составляют больные истинной полицитемией (ИП). ИП является первично приобретенным эритроцитозом и относится к Ph-миелопролиферативным новообразованиям (Ph-МПН). Ph-МПН представляют собой гетерогенную группу заболеваний, характеризующуюся гиперпролиферацией клеток миелопоэза. Предполагается, что молекулярный дефект происходит из мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки, а именно, имеет клональный характер возникновения. В группу Ph-МПН входят ИП, эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ) и миелофиброз (МФ). В формировании того или иного фенотипа Ph-МПН участвуют соматические мутации в генах *JAK2* (96 % при ИП, 55 % при ЭТ и 45–68 % при МФ), *MPL* (4 % при ЭТ и 8 % при ПМФ) и в *CALR* (20 % при ЭТ и 25 % при МФ) [5]. Встречаются сообщения о случаях выявления мутаций в гене *CALR* в отсутствие мутаций в гене *JAK2* на момент установки диагноза у больных ИП либо идиопатического эритроцитоза (ИЭ) [6, 7].

Развитие эритроцитоза может быть вызвано как клональным процессом (вследствие соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR*), так и герминальными мутациями в генах белков, участвующих в ответе на гипоксию, в дифференцировке и созревании эритроидных предшественников (*EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, *EGLN1* и др.), обуславливающих семейные (наследственные) эритроцитозы. Мутации в гене рецептора эритропоэтина (*EPOR*), вызывающие длительную активацию рецептора, влияя на дифференцировку и созревание эритроидных предшественников, приводят к развитию первичного врожденного эритроцитоза

(ЕСУТ1) [8]. Группа вторичных врожденных эритроцитозов с разным типом наследования характеризуется большим разнообразием генетических нарушений и подразделяется на типы (ЕСУТ2–8) в зависимости от гена, в котором возникла мутация. ЕСУТ2–4 обусловлены, как правило, миссенс-мутациями, ведущими к aberrантному контролю синтеза эритропоэтина из-за дефектов в кислород-чувствительном пути: ЕСУТ2, в том числе чувашская полицитемия, связан с мутациями в гене опухолевого супрессора фон Гиппеля — Линдау (*VHL*), ЕСУТ3 — с мутациями в гене пролингидроксилазы 2 (*EGLN1* или *PHD2*), ЕСУТ4 — с мутациями в гене фактора, индуцируемого гипоксией *EPAS1* (*HIF2-α*) [9]. В гене эритропоэтина (*EPO*) было обнаружено несколько однонуклеотидных делеций, приводящих к синтезу белка с альтернативного транскрипта, данный тип относят к ЕСУТ5 [10]. Эритроцитоз также может возникнуть как компенсаторный эффект при повышенном сродстве кислорода к гемоглобину в результате дефектов в генах альфа (*HBA1* и *HBA2*) и бета (*HBB*) глобинов, соответствуя типам ЕСУТ7 и ЕСУТ6 [11]. При ЕСУТ8 герминальные мутации в гене бисфосфолипидат мутаза (*BPGM*) также могут воздействовать на связь кислорода с гемоглобином вследствие снижения уровня 2,3-дифосфоглицерата [12].

Многие клинические состояния могут привести к приобретенному вторичному эритроцитозу. Гипоксия тканей, развивающаяся вследствие болезни легких, сердца, курения или пребывания на больших высотах, ведет к усиленному производству эритропоэтина [2].

Информации о частоте и распространенности различных типов эритроцитозов нет, так как это заболевание имеет множество причин, которые часто остаются неизвестными. Они редко встречаются в клинической практике, хотя истинная частота может быть недооценена из-за того, что некоторые больные никогда не обращались за медицинской помощью или недостаточно обследовались [3].

Используется определенный алгоритм обследования больных с абсолютным эритроцитозом [2, 13]. На первом этапе исключают вторичную приобретенную природу эритроцитоза, затем проводят анализ на наличие мутаций в 14-м экзоне гена *JAK2* с целью исключения клонального заболевания, а именно ИП. Далее измеряют концентрацию эритропоэтина в сыворотке крови; если значения эритропоэтина низкие, проводят исследование на наличие мутаций в 12-м экзоне гена *JAK2* и в гене *EPOR*, ответственном за развитие первичного семейного эритроцитоза первого типа (ЕСУТ1). Следующим этапом является исследование показателя сродства гемоглобина к кислороду (P50), при его уменьшении проводят исследование на наличие му-

таций в генах *HBB*, *HBA* и *BPGM*, обуславливающих ЕСУТ5-8. При нормальных либо повышенных значениях P50 проводят исследование на наличие мутаций в генах *EPAS1*, *EGLN1* и *VHL*, ответственных за развитие вторичных семейных эритроцитозов (ЕСУТ2-4). При этом концентрация эритропоэтина в сыворотке может быть повышена при хронических кровопусканиях и поэтому является ненадежным показателем для диагностики эритроцитоза.

ЕСУТ2-4 преимущественно связаны с нормальными значениями P50, но у некоторых больных может наблюдаться незначительное снижение показателя P50 (21–23 мм рт. ст.; нормальный диапазон 24–30 мм рт. ст.), обычно это происходит при PHD2-ассоциированном эритроцитозе (*EGLN1*) и очень редко *EPOR*-ассоциированном. Помимо этого, нормальные значения P50 не позволяют исключить мутацию в гене *BPGM* [13].

В Красноярском крае более половины больных с эритроцитозами после проведения диагностических процедур, включающих, в том числе, анализ мутаций в гене *JAK2* для дифференциальной диагностики ИП, остаются без установленного типа эритроцитоза.

Возможность проведения комплексного молекулярно-генетического исследования по выявлению уже описанных в литературе или новых мутаций в генах, ассоциированных с семейными эритроцитозами, может внести существенный вклад в диагностику больных с абсолютными эритроцитозами.

**Цель** исследования — провести анализ генов *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ассоциированных с семейными эритроцитозами ЕСУТ1-4, среди *JAK2*- и *CALR*-негативных больных с эритроцитозами неясной этиологии.

## Материалы и методы

Объектом исследования явилась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови 50 больных с эритроцитозами неясной этиологии, поступивших на консультативный прием к гематологам в городскую клиническую больницу № 7 и краевую клиническую больницу г. Красноярска в период с 2013 по 2022 г. Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании. В состав 50 обследуемых вошли 2 группы больных, являющихся между собой кровными родственниками: одна группа из 4 больных

и вторая группа — из 2. Все родственники были обследованы по поводу наличия эритроцитоза.

Больные были отобраны согласно следующим критериям: повышенные значения гемоглобина (для женщин > 160 г/л, для мужчин > 165 г/л) и/или повышенные значения гематокрита (>48 % у женщин, >49 % у мужчин), а также отсутствие соматических мутаций в 12-м и 14-м экзонах гена *JAK2* и в 9-м экзоне гена *CALR*, ассоциированных с Ph-МПН. Анализ данных мутаций был ранее проведен специалистами научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ и сотрудниками ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора [14–17]. Клинико-гематологические показатели больных представлены в таблице 1. Среди больных был 41 мужчина (82 %) и 9 женщин. Средний возраст мужчин составил 48 лет (от 33 до 63 лет на момент обследования), средний возраст женщин составил 59 лет (от 45 до 73 лет на момент обследования), медиана возраста у мужчин составила 59 лет, у женщин — 58 лет.

Информация о размерах селезенки, наличии тромбозов и семейном характере эритроцитоза была доступна не для всех больных. Среди тех больных, информация по которым была доступна, спленомегалии ни у кого выявлено не было, случаи тромботических событий в анамнезе — единичны, случаи семейного характера эритроцитозов также были единичны.

Согласно приведенному ранее алгоритму диагностики больных с эритроцитозами для дифференциации между клональным и врожденным характером заболевания необходимо проводить измерение концентрации эритропоэтина в крови, а для уточнения типа врожденного эритроцитоза — величину P50. Однако, поскольку измерение показателей эритропоэтина и p50, а также анализ генов, ассоциированных с врожденными случаями эритроцитозов, не включены в перечень услуг, выполняемых по ОМС, то такие исследования врачами зачастую не назначаются либо если и назначаются, то очень немногие больные их выполняют. Среди обследуемых 50 больных измерение концентрации эритропоэтина в крови проводилось в единичных случаях, а показатель P50 не был измерен никому из обследуемых. Анализ генов, ассоциированных с врожденными случаями эритроцитозов, также никому из 50 больных ранее не проводился.

**Таблица 1.** Клинико-гематологические показатели больных  
**Table 1.** Clinical and hematological parameters of the patients

Показатель Parameter	Среднее значение [мин-макс] Mean value [min-max]
Нб, г/л / Hb, g/L	189,4 [161,0–258,0]
Нсг, % / Hct, %	50,9 [48,0–79,5]
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ / RBC $\times 10^{12}/л$	6,82 [4,98–9,68]
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ / Platelets, $\times 10^9/L$	235,7 [62,0–486,0]
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ / WBC, $\times 10^9/L$	7,74 [3,90–18,80]



**Таблица 2.** Последовательность праймеров для амплификации участков генов *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1***Table 2.** Primer sequences for amplification of *EPOR*, *VHL*, *EPAS1*, and *EGLN1* gene segments

Праймер Primer	Последовательность (5'–3') Sequence (5'–3')	Длина фрагмента, п.о. Fragment size, bp
<b>EPOR 8 exon Forward</b>	CAGAGAGCGGTTTGAAGGC	810
<b>EPOR 8 exon Reverse</b>	GCCATCCCTGTTCCATAAGTC	
<b>VHL 1 exon Forward</b>	CCCGGGTGGTCTGGATCG	489
<b>VHL 1 exon Reverse</b>	CTGGATGTGTCCTGCCTCAAG	
<b>VHL 2 exon Forward</b>	GAGGTTTACCACGTTAGCC	486
<b>VHL 2 exon Reverse</b>	AGCCCCAAAGTGCTTTTGAGA	
<b>VHL 3 exon Forward</b>	CAGAGGCATGAACACCATGA	462
<b>VHL 3 exon Reverse</b>	AAGGAAGGAACCAAGTCCTGT	
<b>EPAS1 9 exon Forward</b>	CCATGCATCTAGGGGAGCAGA	343
<b>EPAS1 9 exon Reverse</b>	AACTCTTCCCAGCCCCAACG	
<b>EPAS1 12 exon Forward</b>	TCTGCAGGAGCTGAGTTG	631
<b>EPAS1 12 exon Reverse</b>	CTTACTAGTGGGTGCCTCT	
<b>EGLN1 1a exon Forward</b>	CAGTAACGGCCCCCTATCTCTC	714
<b>EGLN1 1a exon Reverse</b>	TGCACGGCAGCATGTACT	
<b>EGLN1 1b exon Forward</b>	CATCGCTGTTCCAGGAGAA	529
<b>EGLN1 1b exon Reverse</b>	GGAATGCTGCTTCTCAGCCTA	
<b>EGLN1 2 exon Forward</b>	TGAAGCAGAATTCACCAGTCC	479
<b>EGLN1 2 exon Reverse</b>	CCACTCCTAATACCTGAGACTGAAA	
<b>EGLN1 3 exon Forward</b>	TTGTCCTTGCATCAGTGCAT	410
<b>EGLN1 3 exon Reverse</b>	GGCAGGAAAATACTCATTAGAAAGC	

Взятие крови для проведения молекулярно-генетических исследований осуществляли из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови проводили двумя методами: для секвенирования по Сэнгеру — с использованием набора «ДНК-сорб-В» («АмплиСенс®», Россия), для секвенирования методом секвенирования нового поколения (new generation sequencing — NGS) — с использованием набора «GeneJET™» («Thermo Fisher Scientific», США). Концентрацию ДНК измеряли с использованием набора «dsDNA HS Assay Kit» на флуориметре Qubit («Thermo Fisher Scientific», США).

Последовательности праймеров для секвенирования по Сэнгеру генов *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1* были заимствованы из статьи [2] (табл. 2). Праймеры для анализа 8-го экзона гена *EPOR* были подобраны самостоятельно с использованием программы «Vector NTI» и программы «Primer3web» (версия 4.1.0).

Анализ мутаций в генах *EPOR* (8 экзон), *VHL* (1, 2 и 3-й экзоны), *EPAS1* (9-й и 12-й экзоны) и *EGLN1* (1, 2 и 3-й экзоны) проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500» («Thermo Fisher Scientific», США).

У 12 из 50 больных дополнительно было проведено исследование методом NGS с применением панели «Myeloid Solution™ by SOPHiA GENETICS» («SOPHiA GENETICS», Швейцария), включающей анализ мутаций в 30 генах (в скобках указаны анализируемые экзоны), ассоциированных с онкогематологическими заболеваниями, в частности: *ABL* (4–9), *ASXL1* (9, 11, 12), *BRAF* (15), *CALR* (9), *CBL* (8, 9), *CEBPA*

(весь ген), *CSF3R* (весь ген), *DNMT3A* (весь ген), *ETV6* (весь ген), *EZH2* (весь ген), *FLT3* (13–15, 20), *HRAS* (2, 3), *IDH1* (4), *IDH2* (4), *JAK2* (весь ген), *KIT* (2, 8–11, 13, 17, 18), *KRAS* (2, 3), *MPL* (10), *NPM1* (10, 11), *NRAS* (2, 3), *PTPN11* (3, 7–13), *RUNX1* (весь ген), *SEPTBP1* (4), *SF3B1* (10–16), *SRSF2* (1), *TET2* (весь ген), *TP53* (весь ген), *U2AF1* (2, 6), *WT1* (6–10), *ZRSR2* (весь ген). Возможность проведения данного исследования была любезно предоставлена компанией ООО «Альгимед». Библиотеки для массового параллельного секвенирования были приготовлены с использованием наборов для пробоподготовки KAPA Library Amplification Kit («Roche», Швейцария) и SOPHiA DNA Library Prep Kit I (QIAseq FX DNA Library Kit по OEM-лицензии QIAGEN, Германия). Секвенирование проводили на платформе MiSeq с использованием набора «MiSeq Reagent Kit v3» («Illumina», США). Поскольку была возможность проведения данного анализа только для 12 образцов, то из 50 были выбраны 12 больных на основании более молодого возраста (средний возраст 42 года) и, как следствие, большей перспективности для получения благоприятного исхода в случае потенциального выявления какого-либо генетического маркера клонального процесса и возможной последующей терапии.

**Статистический анализ.** Биоинформатический анализ выполняли на платформе SOPHiA DDM («SOPHiA GENETICS», Швейцария). Аллельную нагрузку определяли исходя из показателя Variant allele fraction (%).

## Результаты

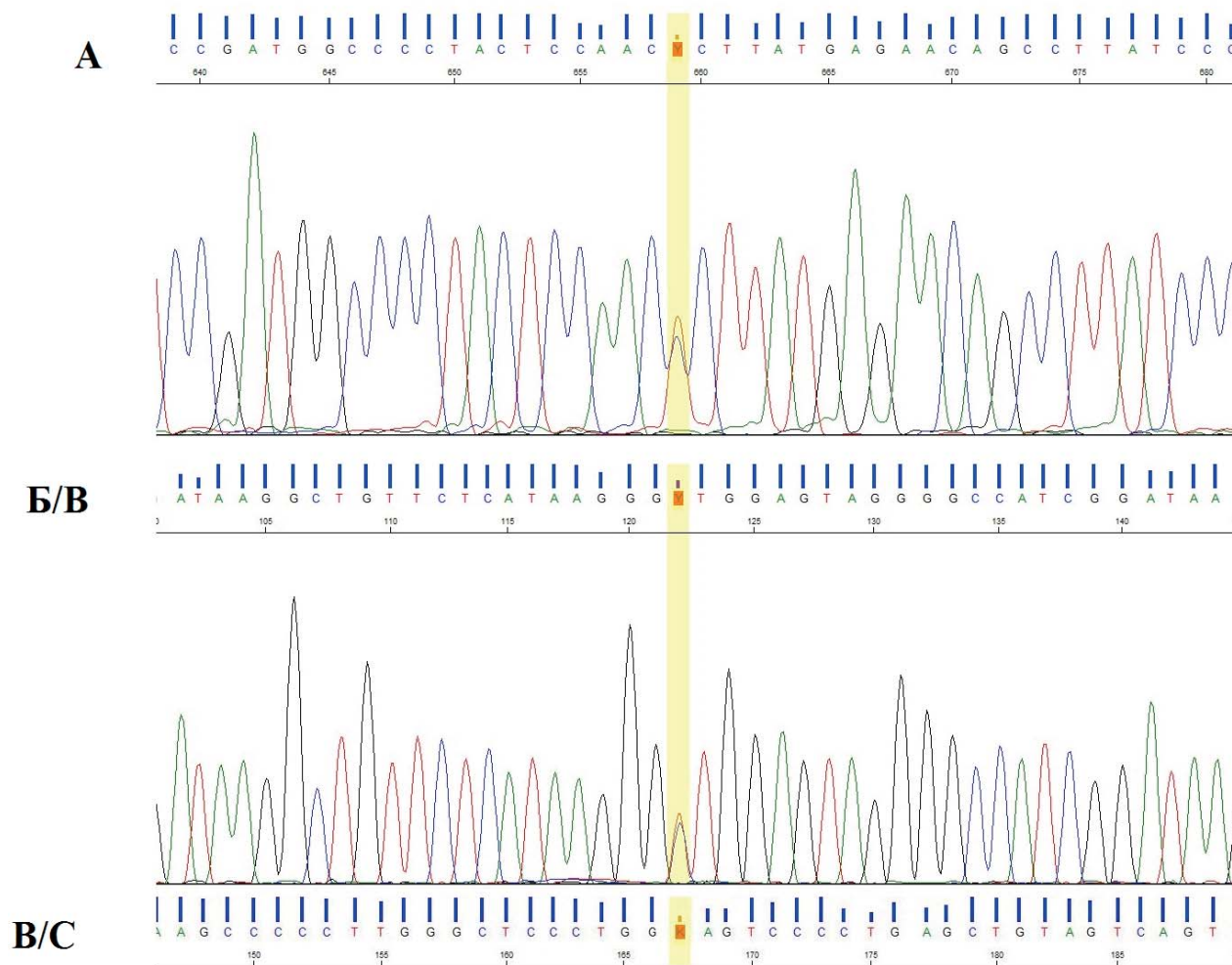
На первом этапе работы 50 *JAK2*- и *CALR*-негативным больным с эритроцитозами был проведен анализ на наличие мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ответственных за развитие семейных эритроцитозов ЕСУТ1-4. Генетические варианты в гене *EPOR* были обнаружены у 3 (6 %) больных (рис. 1).

В результате исследования ДНК 50 больных на наличие мутаций в 1, 2 и 3-м экзонах гена *VHL*, ответственных за развитие вторичного врожденного семейного эритроцитоза 2-го типа (ЕСУТ2) или чувашской полицитемии, были выявлены различные варианты только в 3-м экзоне. У 2 (4 %) человек были обнаружены мутации в кодирующей области 3-го экзона гена *VHL*, которые приводят к вторичному врожденному семейному эритроцитозу второго типа (ЕСУТ2), причем у одного больного обнаружена самая распространенная мутация, ответственная за развитие чувашской полицитемии, — с.598С>Т (rs28940298) (рис. 2).

По результатам анализа мутаций в гене *EGLN1*, ответственном за развитие вторичного врожденного семейного эритроцитоза третьего типа (ЕСУТ3), различные варианты были выявлены у 15 (30 %) из 50 обследованных больных, все варианты — в гетерозиготном состоянии (табл. 3).

Среди выявленных вариантов интерес представляет мутация rs12097901 в 1-м экзоне, которая, согласно данным dbSNP [19], влияет на адаптацию к высоте.

При анализе мутаций в гене *EPAS1*, ответственном за развитие вторичного врожденного семейного эритроцитоза четвертого типа (ЕСУТ4), у 3 из 50 больных были выявлены синонимичные варианты в кодирующей области 12-го экзона (рис. 3): у 2 (4 %) больных был выявлен вариант с.1833С>Т (rs41281469) p.Ala611=, у одного (2 %) — вариант с.1737G>A (rs184760160) p.Pro579=. В 9-м экзоне гена *EPAS1* и его близлежащих интронных областях генетические варианты не обнаружены.



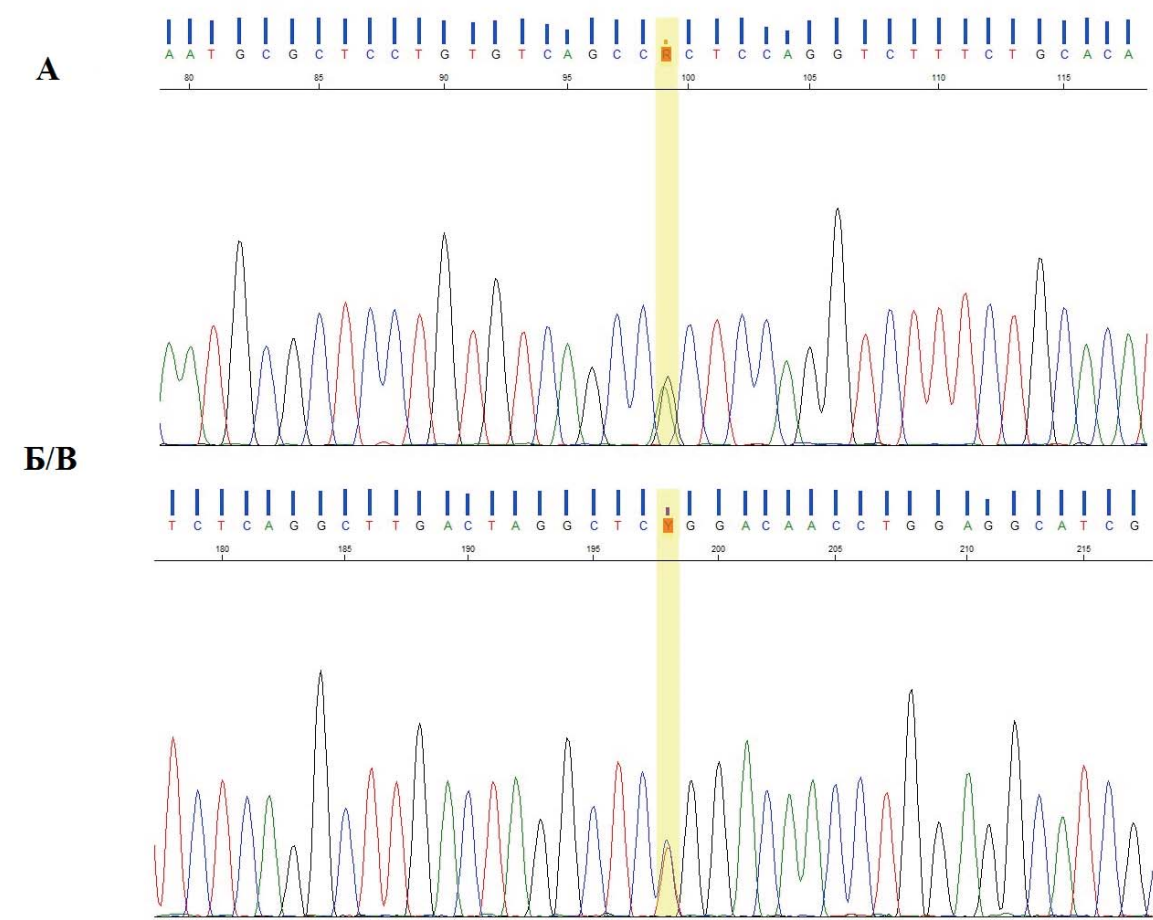
**Рисунок 1.** Результаты анализа мутаций в гене *EPOR* секвенированием по Сэнгеру: А. Однуклеотидная замена (ОНЗ) с.1462С>Т (rs142094773) p.Pro488Ser, с обратного праймера. Б. ОНЗ с.1460А>G (rs62638745) p.Asn487Ser, с прямого праймера. В. ОНЗ с.1418С>А, p.Ser473Tyr, с обратного праймера.

**Figure 1.** Results of mutation analysis in the *EPOR* gene by Sanger sequencing: A. SNP c.1462C>T (rs142094773) p.Pro488Ser, reverse. B. SNP c.1460A>G (rs62638745) p.Asn487Ser, forward. C. SNP c.1418C>A, p.Ser473Tyr, reverse.

На втором этапе работы проведено исследование NGS с использованием панели «Myeloid Solution». Для секвенирования гематологами были отобраны 12 больных с наибольшей клинико-гематологической вероятностью присутствия клонального гематологического заболевания. Несмотря на то что у всех больных предварительно был проведен поиск основных, ассоциированных с Ph-МГПН драйверных мутаций в генах *JAK2* и *CALR*, было предложено, что в ходе анализа 30 генов с использованием предоставленной панели могут быть выявлены какие-либо редкие мутации, которые также могут быть ответственны за развитие кло-

нального гематологического заболевания (например, мутации в 13 экзоне гена *JAK2*). В результате исследования, в соответствии с указанными выше критериями, у 5 из 12 больных были выявлены 12 соматических (табл. 4) и 4 предположительно герминальных (табл. 5) варианта. Далее приведены варианты, для которых частоты встречаемости в общей популяции по данным GnomAD [20] не превышают 1 %, а величина покрытия составила не менее 1000.

Варианты, найденные в областях NC\_000002.11:198267762–198267783 в 13-м экзоне гена *SF3B1*, NC\_000007.13:148543693–148543705 в 4-м экзо-



**Рисунок 2.** Результаты анализа мутаций в гене *VHL* секвенированием по Сэнгеру: А. Мутация с.598С>Т (rs28940298), с обратного праймера. Б. Мутация с.500G>А (rs5030821), с обратного праймера.

**Figure 2.** Results of mutation analysis in the *VHL* gene by Sanger sequencing: A. Mutation c.598C>T (rs28940298), reverse; B. Mutation c.500G>A (rs5030821), reverse.

**Таблица 3.** Выявленные варианты в гене *EGLN1*

**Table 3.** Identified variants in the *EGLN1* gene

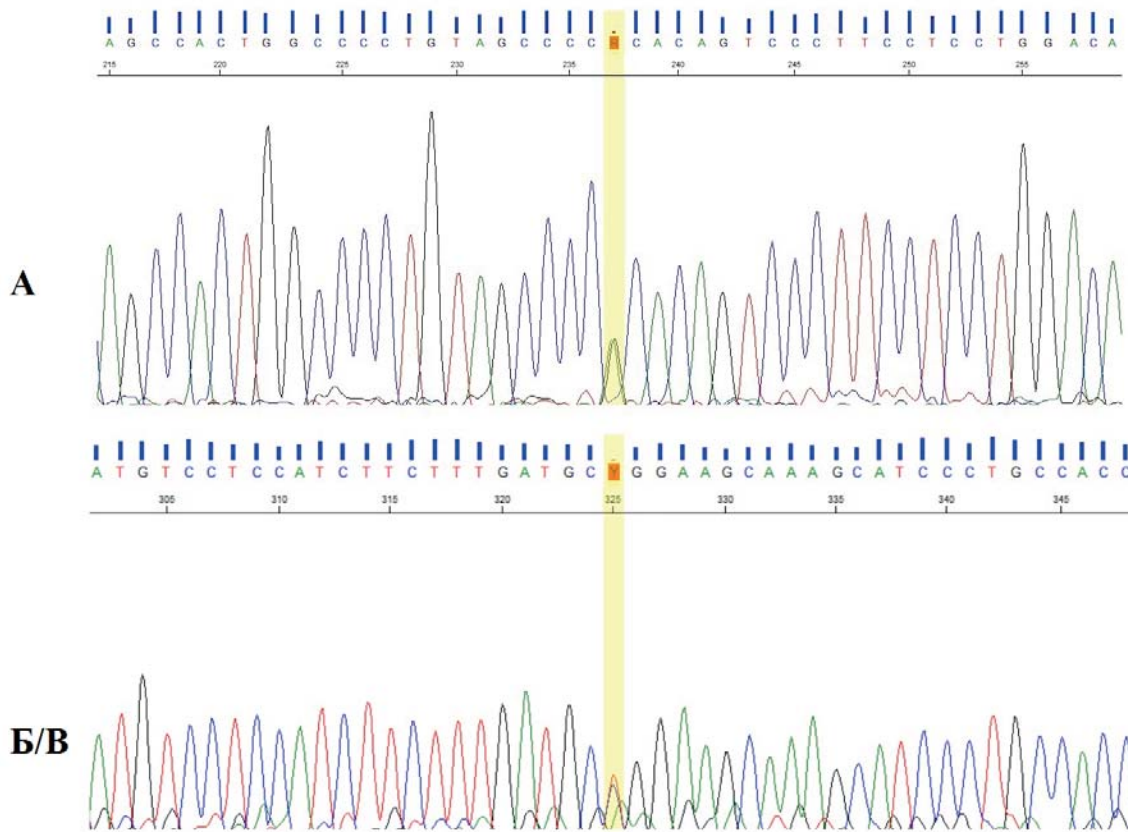
Вариант Variant	Участок Region	Число больных Number of patients	Влияние на развитие ЕСУТЗ* Influence on development of the ECYT3 *
rs12097901 (c.380G>C, p.Cys127Ser)	1 exon	10 (20 %)	Доброкачественный / Benign
rs61750991 (c.471G>C, p.Gln157His)	1 exon	3 (6 %)	Доброкачественный / Benign
rs141850369 (c.892-168C>G)	1 intron	1 (2 %)	Предположительно доброкачественный / Likely benign
rs143991968 (c.1113C>T, Arg371=)	3 exon	1 (2 %)	Доброкачественный / Benign

Примечание: \* по данным ClinVar [18].

Note: \* According ClinVar [18].

не гена *EZH2*, NC\_000011.9:119149355–119149373 в 9-м экзоне гена *CBL* и в 1 экзоне гена *CEBPA* NC\_000019.9: (33792754–33792775, 33793007–33793041, были исключены из анализа, т.к., согласно инструкции к панели, выявленные в них варианты с величиной аллельной на-

грузки менее 10 % с большой вероятностью могут быть артефактами секвенирования, в связи с чем результаты анализа данных участков нельзя было считать достоверными. Величина аллельной нагрузки найденных в этих областях вариантов не превышала 5,6 %.



**Рисунок 3.** Результаты анализа мутаций в гене *EPAS1* секвенированием по Сэнгеру: А. ОНЗ c.1737G>A (rs184760160), с прямого праймера; Б. ОНЗ c.1833C>T (rs41281469), с прямого праймера.

**Figure 3.** Results of mutation analysis in the *EPAS1* gene by Sanger sequencing: A. SNP c.1737G>A (rs184760160), forward; B. SNP c.1833C>T (rs41281469), forward.

**Таблица 4.** Соматические варианты, выявленные методом NGS, среди 12 больных с эритроцитозом

**Table 4.** Somatic variants detected by NGS among 12 patients with erythrocytosis

Ген / Gene	Вариант, кДНК Nucleotide change, cDNA	Изменение в белке Changes in protein	rsid	gnomAD	№ больного № of patient	ЧВА VAF, %	Покрывтие Coverage
<i>CSF3R</i>	c.2212A>G	p.Thr738Ala	–	–	9	1,05	2289
<i>DNMT3A</i>	c.1510delC	p.Leu504Trpfs*147	–	–	4	1,14	3082
<i>DNMT3A</i>	c.1667+1G>A	p.?	rs776844136	<0,001 %	4	1,32	2872
<i>DNMT3A</i>	c.1914dupT	p.Leu639Serfs*3	–	–	4	1,79	3415
<i>JAK2</i>	c.2761+21T>C	–	–	–	4	1,18	3213
<i>JAK2</i>	c.3060-12A>G	–	rs1299460315	0,003 %	7	1,29	1316
<i>KIT</i>	c.120_123delTCCA	p.His40Glnfs*6	–	–	4	1,03	3300
<i>TET2</i>	c.138A>T	p.Pro46=	–	–	4	1,08	3514
<i>TET2</i>	c.4393C>T	p.Arg1465*	rs1235228377	0,001 %	2	4,28	1331
<i>ZRSR2</i>	c.1094A>G	p.Glu365Gly	–	–	4	1,37	2043
<i>ZRSR2</i>	c.371A>G	p.Gln124Arg	–	–	4	1,45	1175
<i>ZRSR2</i>	c.621G>A	p.Thr207=	rs76231584	0,007 %	4	1,10	1821

**Примечание:** ЧВА — частота встречаемости различных вариантных аллелей, кДНК — комплементарная ДНК.

Note: VAF — variant allele frequency, cDNA — complementary DNA.



**Таблица 5.** Герминальные варианты, выявленные методом NGS, среди 12 больных с эритроцитозом**Table 5.** Germline variants detected by NGS among 12 patients with erythrocytosis

Ген Gene	Вариант, кДНК Nucleotide change, cDNA	Изменение в белке Changes in protein	rsid	gnomAD	№ больного № of patient	ЧВА VAF, %	Покрывтие Coverage
ASXL1	c.3513G>A	p.Arg1171=	rs150391716	0,583 %	8	49,96	2468
ASXL1	c.3513G>A	p.Arg1171=	rs150391716	0,583 %	9	44,99	2265
ASXL1	c.3745A>G	p.Met1249Val	rs146141075	0,226 %	7	47,12	2812
ETV6	c.1032C>T	p.Tyr344=	rs372141414	0,005 %	4	47,36	3448
JAK2	c.3188G>A	p.Arg1063His	rs41316003	0,470 %	4	46,77	2756

Примечание: ЧВА — частота встречаемости различных вариантных аллелей, кДНК — комплементарная ДНК.

Note: VAF — variant allele frequency, cDNA — complementary DNA.

## Обсуждение

По результатам анализа мутаций в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1* у 50 *JAK2*- и *CALR*-негативных больных уточнить диагноз удалось у 2 (4 %) человек, а именно у больных с патогенными по данным ClinVar мутациями c.598C>T (rs28940298) и c.500G>A (rs5030821) в гене *VHL*, которые приводят к развитию чувашской полицитемии (ЕСУТ2). Исследования *in vitro* показали, что мутация c.598C>T приводит к уменьшению образования убиквитинлигазы E3 и, соответственно, к ослаблению взаимосвязи с молекулой HIF2, что приводит к перепроизводству HIF — мишени эритропоэтина. Кроме того, мутации в гене *VHL* вызывают конформационные изменения, приводящие к чрезмерному связыванию с SOCS1 белком, которое ингибирует связывание и деградацию фосфорилированного JAK2. В результате белок JAK2 способствует гиперактивации JAK2-STAT5 сигнального пути в предшественниках эритроцитов, вызывая гиперчувствительность к эритропоэтину и, следовательно, к первичной полицитемии [21]. Частота встречаемости c.598C>T (rs28940298), по данным GnomAD [20], составляет 0,021 %. Мутация c.500G>A (rs5030821) встречается у больных синдромом фон Хиппеля — Линдау, характеризующимся эндокринными опухолями, эритроцитоз в этих случаях обусловлен опухолевым процессом [22]. Больной (мужчина, 1986 г.р.), в образце ДНК которого была выявлена мутация c.500G>A (rs5030821), умер в 2019 г. В анамнезе у него были удаления гемангиобластомы мозжечка в 2008 и 2011 гг., а также удаление феохромоцитомы в 2016 г. Распространенность c.500G>A (rs5030821) составляет 0,0004 % по данным GnomAD, что делает ее крайне редкой мутацией.

Среди остальных выявленных вариантов большей интерес представляет однонуклеотидная замена (ОНЗ) c.380G>C (rs12097901) в 1-м экзоне гена *EGLN1*, которая была выявлена у 10 (20 %) больных, из которых 3 больных являлись кровными родственниками. Вариант rs12097901 ассоциирован с адаптацией к высоте, вызывая повышение концентрации гемоглобина крови, и тем самым, возможно, способен обуславливать состояние эритроцитоза [23]. Однако, по данным

ClinVar [18], данный вариант не имеет патологического значения при развитии эритроцитоза типа ЕСУТ3. Среди подгруппы из 3 родственников с данным полиморфизмом при выполнении настоящей работы был генетически обследован четвертый кровный родственник, также имеющий эритроцитоз, но у него не было выявлено никаких вариантов в анализируемых генах. В связи с этим можно предположить, что в данном семейном случае основной генетической причиной эритроцитоза является иная мутация, однако это не дает оснований отрицать, что ОНЗ rs12097901 все же может вносить дополнительный вклад в развитие эритроцитоза. Встречаемость rs12097901, по данным GnomAD [20], составляет 15,191 % для общей популяции. Также у 3 (6 %) больных в гене *EGLN1* был выявлен полиморфизм c.471G>C (rs61750991) p.Gln157His, предположительно способный изменять эпигенетический ландшафт, который вследствие этого становится более предпочтительным для накопления приобретенных мутаций, таких как *JAK2* p.V617F. Таким образом, возможно, данный полиморфизм повышает вероятность развития *JAK2*(p.V617F)– МПН [24, 25]. Двое из этих 3 больных являются кровными родственниками. Распространенность варианта rs61750991 составляет 1,829 % по данным GnomAD [20].

Редкие полиморфизмы, выявленные в гене *EPOR*, по данным ClinVar [18], не имеют патогенетической значимости для развития эритроцитоза и носят статус «доброкачественных». Тем не менее, согласно L. Sokol и соавт. [26], нельзя отрицать возможность того, что вариант c.1462C>T (rs142094773) p.Pro488Ser хоть и не влияет напрямую на чувствительность к эритропоэтину, теоретически может взаимодействовать с какой-либо другой приобретенной или врожденной аномалией при формировании фенотипа полицитемии, хотя бы в силу того, что данный вариант (как и вариант c.1460A>G (rs62638745) p.Asn487Ser) расположен в отрицательном регуляторном домене белка EPOR. Об обоих данных вариантах сообщалось в связи с детской полицитемией, хотя больные не имели в анамнезе семейный эритроцитоз [27]. Распространенность

вариантов с.1462C>T (rs142094773) и с.1460A>G (rs62638745) составляет, по данным GnomAD [20], 0,768 и 0,625 % соответственно. Помимо данных вариантов в гене *EPOR* также была выявлена мутация с.1418C>A, p.Ser473Tyr у одного больного, не описанная в литературе и не представленная в базе dbSNP [19]. Однако в этой позиции существует ОНЗ с.1418C>T (rs1277913272) p.Ser473Phe, для которой нет данных о клинической значимости.

Выявленные в результате анализа мутаций в гене *EPAS1* варианты с.1833C>T (rs41281469) p.Ala611= и с.1737G>A (rs184760160) p.Pro579= являются относительно редкими синонимичными заменами и, по данным ClinVar [18], не имеют патогенной значимости. Их частота встречаемости составляет 1,014 % для с.1833C>T (rs41281469) и 0,339 % для с.1737G>A (rs184760160) по данным GnomAD [20].

Анализ результатов проведенного NGS позволил выявить у некоторых больных соматические (табл. 4) и, предположительно, герминальные (табл. 5) варианты. Выявленные варианты с величиной аллельной нагрузки менее 2,5 % требуют дополнительной проверки другими методами, т.к. могут быть ложноположительными. Аллельную нагрузку более 2,5 % имел вариант p.Arg1465\* (rs1235228377) в гене *TET2* (4,28 %, покрытие 1331) в пробе больного № 2. Данный вариант встречался у больных с ИП [28] и является драйверной мутацией у больных с парциальной красноклеточ-

ной аплазией костного мозга, поражающей предшественники эритроцитов [29].

У 2 родственных больных из 12 обследованных был выявлен вариант p.Arg1063His (rs41316003) в гене *JAK2*. Указанный вариант ранее выявлялся у больных ИП [30] и хроническим лимфолейкозом [31]. Сообщается, что данный герминальный вариант вызывает слабую конститутивную активацию JAK2/STAT5 сигнального пути у больных наследственными эритроцитозами [32].

Данных о вариантах с.3513G>A (rs150391716) в гене *ASXL1* и с.1032C>T (rs372141414) в гене *ETV6* в литературе не найдено. В связи с тем что обе данные замены являются синонимичными, можно предположить, что они не ассоциированы с развитием эритроцитоза.

Таким образом, согласно результатам проведенного исследования, анализ герминальных вариантов в генах *EPOR*, *VHL*, *EPAS1* и *EGLN1*, ответственных за развитие семейных эритроцитозов типов ЕСУТ1-4, является актуальным для больных с эритроцитозами неясного генеза, у которых не выявлены какие-либо маркеры клонального процесса. По некоторым обнаруженным при проведении данной работы вариантам в литературе либо отсутствует, либо недостаточно представлена информация, на основании которой можно было бы однозначно сделать вывод о патогенетической значимости данных вариантов в развитии эритроцитоза.

## Литература

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. 3-е изд., М.: Ньюдиамед; 2003. 247 с.
2. Bento C., Cario H., Gardie B., et al. Congenital Erythrocytosis and Hereditary Thrombocythosis. Clinical presentation, diagnosis, treatment and follow-up. A practical guide with clinical cases. 2015.
3. Mallik N., Das R., Malhotra P., et al. Congenital erythrocytosis. Eur J Haematol. 2021; 107(1): 29–37. DOI: 10.1111/ejh.13632.
4. McMullin M.F. Congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2016; 38: 59–65. DOI: 10.1111/ijlh.12506.
5. Меликян А.Л., Ковригина А.М., Суборцева И.Н. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и терапии Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) (редакция 2018 г.). Гематология и трансфузиология. 2018; 63(3): 275–315. DOI: 10.25837/HAT.2019.51.88.001.
6. Broséus J., Ji-Park H., Carillo S., et al. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. Blood. 2014; 124(26): 3964–6. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583161.
7. Chauveau A., Nibourel O., Tondeur S., et al. Absence of CALR mutations in JAK2-negative polycythemia. Haematologica. 2017; 102(1): e15–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.154799.
8. Percy M.J., Rumi E. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocythosis. Am J Hematol. 2009; 84(1): 46–54. DOI: 10.1002/ajh.21313.
9. McMullin M.F. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. Hematology. 2009; 2009(1): 629–35. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.629.

## References

1. Vorobyov, A.I. (Ed.). Manual of Hematology. 3rd ed., revised and supplemented. Moscow: Newdiamed; 2003. 247 p. (In Russian)
2. Bento C., Cario H., Gardie B., et al. Congenital Erythrocytosis and Hereditary Thrombocythosis. Clinical presentation, diagnosis, treatment and follow-up. A practical guide with clinical cases. 2015.
3. Mallik N., Das R., Malhotra P., et al. Congenital erythrocytosis. Eur J Haematol. 2021; 107(1): 29–37. DOI: 10.1111/ejh.13632.
4. McMullin M.F. Congenital erythrocytosis. Int J Lab Hematol. 2016; 38: 59–65. DOI: 10.1111/ijlh.12506.
5. Melikyan A.L., Kovrigina A.M., Subortseva I.N., et al. National clinical recommendations for diagnosis and therapy of Ph-negative myeloproliferative neoplasms (polycythemia vera, essential thrombocythemia, primary myelofibrosis) (edition 2018). 2018; 63(3): 275–315 (In Russian). DOI: 10.25837/HAT.2019.51.88.001.
6. Broséus J., Ji-Park H., Carillo S., et al. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. Blood. 2014; 124(26): 3964–6. DOI: 10.1182/blood-2014-06-583161.
7. Chauveau A., Nibourel O., Tondeur S., et al. Absence of CALR mutations in JAK2-negative polycythemia. Haematologica. 2017; 102(1): e15–6. DOI: 10.3324/haematol.2016.154799.
8. Percy M.J., Rumi E. Genetic origins and clinical phenotype of familial and acquired erythrocytosis and thrombocythosis. Am J Hematol. 2009; 84(1): 46–54. DOI: 10.1002/ajh.21313.
9. McMullin M.F. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. Hematology. 2009; 2009(1): 629–35. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.629.

10. Zmajkovic J., Lundberg P., Nienhold R., et al. A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2018; 378(10): 924–30. DOI: 10.1056/NEJMoa1709064.
11. González Fernández F.A., Villegas A., Ropero P., et al. Haemoglobinopathies with high oxygen affinity. Experience of Erythropathology Cooperative Spanish Group. *Ann Hematol.* 2009; 88(3): 235–8. DOI: 10.1007/s00277-008-0581-x.
12. Petousi N., Copley R.R., Lappin T.R.J., et al. Erythrocytosis associated with a novel missense mutation in the BPGM gene. *Haematologica.* 2014; 99(10): e201–4. DOI: 10.3324/haematol.2014.109306.
13. Oliveira J.L. Algorithmic evaluation of hereditary erythrocytosis: Pathways and caveats. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41(S1): 89–94. DOI: 10.1111/ijlh.13019.
14. Субботина Т.Н., Дунаева Е.А., Миронов К.О. и др. Использование метода пиросеквенирования для выявления и количественной оценки аллельной нагрузки мутаций в 12-м экзоне гена JAK2. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 196–200. DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200.
15. Дунаева Е.А., Миронов К.О., Субботина Т.Н. и др. Разработка и сравнительная апробация методик для повышения чувствительности определения мутации V617F в гене JAK2 методом пиросеквенирования. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(2): 125–128. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-2-125-128.
16. Субботина Т.Н., Харсекина А.Е., Дунаева Е.А. и др. Использование гетеродуплексного анализа и пиросеквенирования в алгоритме диагностики истинной полицитемии, ассоциированной с соматическими мутациями в 12 экзоне гена JAK2. *Лабораторная служба.* 2017; 6(1): 29. DOI: 10.17116/labs20176129-33.
17. Субботина Т.Н., Курочкин Д.В., Маслюкова И.Е. и др. Использование гетеродуплексного анализа для скринингового выявления соматических мутаций в экзоне 9 гена CALR у пациентов с Ph-миелопролиферативными новообразованиями. *Онкогематология.* 2021; 16(2): 48–55. DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55.
18. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M., et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D1062–7. DOI: 10.1093/NAR/GKX1153.
19. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(1): 308–11. DOI: 10.1093/NAR/29.1.308.
20. Karczewski K.J., Francioli L.C., Tiao G., et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nat* 2020 5817809. 2020; 581(7809): 434–43. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7.
21. Russell R.C., Sufan R.I., Zhou B., et al. Loss of JAK2 regulation via a heterodimeric VHL-SOCS1 E3 ubiquitin ligase underlies Chuvash polycythemia. *Nat Med.* 2011; 17(7): 845–53. DOI: 10.1038/nm.2370.
22. Lin G., Zhao Y., Zhang Z., et al. Clinical diagnosis, treatment and screening of the VHL gene in three von Hippel-Lindau disease pedigrees. *Exp Ther Med.* 2020; 20(2): 1237–44. DOI: 10.3892/etm.2020.8829.
23. Heinrich E.C., Wu L., Lawrence E.S., et al. Genetic variants at the EGLN1 locus associated with high-altitude adaptation in Tibetans are absent or found at low frequency in highland Andeans. *Ann Hum Genet.* 2019; 83(3): 171–6. DOI: 10.1111/ahg.12299.
24. Ladroue C., Hoogewijs D., Gad S., et al. Distinct deregulation of the hypoxia inducible factor by PHD2 mutants identified in germline DNA of patients with polycythemia. *Haematologica.* 2012; 97(1): 9–14. DOI: 10.3324/haematol.2011.044644.
25. Albiero E., Ruggeri M., Fortuna S., et al. Analysis of the oxygen sensing pathway genes in familial chronic myeloproliferative neoplasms and identification of a novel EGLN1 germ-line mutation. *Br J Haematol.* 2011; 153(3): 405–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08551.x.
10. Zmajkovic J., Lundberg P., Nienhold R., et al. A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2018; 378(10): 924–30. DOI: 10.1056/NEJMoa1709064.
11. González Fernández F.A., Villegas A., Ropero P., et al. Haemoglobinopathies with high oxygen affinity. Experience of Erythropathology Cooperative Spanish Group. *Ann Hematol.* 2009; 88(3): 235–8. DOI: 10.1007/s00277-008-0581-x.
12. Petousi N., Copley R.R., Lappin T.R.J., et al. Erythrocytosis associated with a novel missense mutation in the BPGM gene. *Haematologica.* 2014; 99(10): e201–4. DOI: 10.3324/haematol.2014.109306.
13. Oliveira J.L. Algorithmic evaluation of hereditary erythrocytosis: Pathways and caveats. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41(S1): 89–94. DOI: 10.1111/ijlh.13019.
14. Subbotina T.N., Dunaeva E.A., Mironov K.O., et al. Using of pyrosequencing method for the detection and quantitative determination of mutant JAK2 exon 12 allele burden. *Gematologiya I Transfusiologiya.* 2016; 61(4): 196–200 (In Russian). DOI: 10.18821/0234-5730-2016-61-4-196-200
15. Dunaeva E.A., Mironov K.O., Subbotina T.N., et al. The development and comparative approbation of methods of increasing sensitivity of detection of mutation V617F in gene JAK2 by pyrosequencing *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika.* 2017;62(2): 125–128. (In Russian). DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-2-125-128.
16. Subbotina T.N., Harsekina A.E., Dunaeva E.A., et al. Heteroduplex analysis and pyrosequencing in the diagnostic algorithm of polycythemia vera associated with JAK2 exon 12 mutations. *Laboratornaya Slugba.* 2017; 6(1): 29–33 (In Russian). DOI: 10.17116/labs20176129-33.
17. Subbotina T.N., Kurochkin D.V., Maslyukova I.E., et al. Application of heteroduplex analysis for CALR mutation screening detection in patients with Ph-myeloproliferative neoplasms. *Onkogematologiya.* 2021; 16(2): 48–55 (In Russian). DOI: 10.17650/1818-8346-2021-16-2-48-55.
18. Landrum M.J., Lee J.M., Benson M., et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D1062–7. DOI: 10.1093/NAR/GKX1153.
19. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(1): 308–11. DOI: 10.1093/NAR/29.1.308.
20. Karczewski K.J., Francioli L.C., Tiao G., et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nat* 2020 5817809. 2020; 581(7809): 434–43. DOI: 10.1038/s41586-020-2308-7.
21. Russell R.C., Sufan R.I., Zhou B., et al. Loss of JAK2 regulation via a heterodimeric VHL-SOCS1 E3 ubiquitin ligase underlies Chuvash polycythemia. *Nat Med.* 2011; 17(7): 845–53. DOI: 10.1038/nm.2370.
22. Lin G., Zhao Y., Zhang Z., et al. Clinical diagnosis, treatment and screening of the VHL gene in three von Hippel-Lindau disease pedigrees. *Exp Ther Med.* 2020; 20(2): 1237–44. DOI: 10.3892/etm.2020.8829.
23. Heinrich E.C., Wu L., Lawrence E.S., et al. Genetic variants at the EGLN1 locus associated with high-altitude adaptation in Tibetans are absent or found at low frequency in highland Andeans. *Ann Hum Genet.* 2019; 83(3): 171–6. DOI: 10.1111/ahg.12299.
24. Ladroue C., Hoogewijs D., Gad S., et al. Distinct deregulation of the hypoxia inducible factor by PHD2 mutants identified in germline DNA of patients with polycythemia. *Haematologica.* 2012; 97(1): 9–14. DOI: 10.3324/haematol.2011.044644.
25. Albiero E., Ruggeri M., Fortuna S., et al. Analysis of the oxygen sensing pathway genes in familial chronic myeloproliferative neoplasms and identification of a novel EGLN1 germ-line mutation. *Br J Haematol.* 2011; 153(3): 405–8. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08551.x.

26. Sokol L., Prchal J.F., D'Andrea A., et al. Mutation in the negative regulatory element of the erythropoietin receptor gene in a case of sporadic primary polycythemia. *Exp Hematol.* 1994; 22(5): 447–53.
27. Anbinselvam A., Sidharthan N., Vidyadharan G., et al. Mutation profile of JAK2, EPOR and CALR genes in polycythemia patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2020; 82:102414. DOI: 10.1016/J.BCMD.2020.102414.
28. Tefferi A., Pardanani A., Lim K.-H., et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia.* 2009; 23(5): 905–11. DOI: 10.1038/leu.2009.47.
29. Fujishima N., Kohmaru J., Koyota S., et al. Clonal hematopoiesis in adult pure red cell aplasia. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 2253. DOI: 10.1038/s41598-021-81890-5.
30. Härtl J., Hartberger J., Wunderlich S., et al. Exome-based gene panel analysis in a cohort of acute juvenile ischemic stroke patients: relevance of NOTCH3 and GLA variants. *J Neurol.* 2023; 270(3): 1501–11. DOI: 10.1007/s00415-022-11401-7.
31. Cumbo C., Tarantini F., Zagaria A., et al. Clonal Hematopoiesis at the Crossroads of Inflammatory Bowel Diseases and Hematological Malignancies: A Biological Link? *Front Oncol.* 2022; 12: 873896. DOI: 10.3389/fonc.2022.873896.
32. Kapralova K., Horvathova M., Pecquet C., et al. Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood.* 2016; 128(10): 1418–23. DOI: 10.1182/blood-2016-02-698951.

## Информация об авторах

**Субботина Татьяна Николаевна\***, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; заведующая научно-практической лабораторией молекулярно-генетических методов исследований ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; научный сотрудник Федерального сибирского научно-клинического центра ФМБА России,  
e-mail: stn.25@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>

**Шалева Александра Андреевна**, инженер-исследователь Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; младший научный сотрудник Федерального сибирского научно-клинического центра ФМБА России,  
e-mail: anellika@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>

**Ходос Георгий Александрович**, студент ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»,  
e-mail: georgy.khodos@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4726-3102>

**Орешкова Наталья Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры лесной геномики и биоинформатики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»; ведущий научный сотрудник лаборатории лесной геномики ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет»,  
e-mail: noreshkova@sfu-kras.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1435-5083>

## Information about the authors

**Tatiana N. Subbotina\***, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor at the Department of Medical Biology, Siberian Federal University; Head of the Scientific and Practical Laboratory for Molecular Genetic Research Methods, Siberian Federal University; Research Officer, Federal Siberian Research Clinical Centre under the Federal Medical Biological Agency,  
e-mail: stn.25@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>

**Alexandra A. Shalyova**, Research engineer, Scientific and Practical Laboratory for Molecular Genetic Research Methods, Siberian Federal University, Researcher, Federal Siberian Research Clinical Centre under the Federal Medical Biological Agency,  
e-mail: anellika@yandex.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>

**Georgy A. Khodos**, Student, Siberian Federal University,  
e-mail: georgy.khodos@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4726-3102>

**Natalya V. Oreshkova**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor at the Department of Genomics and Bioinformatics, Siberian Federal University; Leading researcher, Genome Research and Education Center, Siberian Federal University,  
e-mail: noreshkova@sfu-kras.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1435-5083>



**Михалев Михаил Алексеевич**, гематолог КГБУЗ «Краевая клиническая больница»,  
e-mail: orix-mma@ya.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>

**Васильев Евгений Владимирович**, гематолог КГБУЗ «Краевая клиническая больница»,  
e-mail: e.vasiyliyev@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-3758>

**Дзирквелишвили Глеб Олегович**, студент ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: glebdzirk@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0666-4061>

**Дунаева Елена Алексеевна**, научный сотрудник ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора,  
e-mail: ead82@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>

**Миронов Константин Олегович**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора,  
e-mail: mironov@pcr.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

**\* Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 12.07.2023

Принята к печати: 18.09.2023

**Mikhail A. Mikhalev**, Hematologist, Regional Clinical Hospital,  
e-mail: orix-mma@ya.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3769-3405>

**Evgenij V. Vasilyev**, Hematologist, Regional Clinical Hospital,  
e-mail: e.vasiyliyev@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3780-3758>

**Gleb O. Dzirkvelishvili**, Student of Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
e-mail: glebdzirk@gmail.com  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-0666-4061>

**Elena A. Dunaeva**, Researcher, Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology»,  
e-mail: ead82@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4477-8506>

**Konstantin O. Mironov**, Dr. Sci. (Med.), Senior Researcher Officer, Federal Budget Institute of Science «Central Research Institute of Epidemiology»,  
e-mail: mironov@pcr.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8207-9215>

**\* Corresponding author**

Received 12 July 2023

Accepted 18 Sept 2023