

**Д.Ф. Глузман<sup>1</sup>, Л.М. Склярєнко<sup>1</sup>, М.П. Завелевич<sup>1</sup>,  
С.В. Коваль<sup>1</sup>, Т.С. Іванівська<sup>1</sup>, Л.Ю. Полудненко<sup>1</sup>, Н.І. Українська<sup>1</sup>,  
Г.Д. Телегєєв<sup>2</sup>, М.В. Дибков<sup>2</sup>, Л.О. Поліщук<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

<sup>2</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

## **КОМПЛЕКСНА ДІАГНОСТИКА МІЄЛОЇДНИХ НОВОУТВОРЕНЬ В ОБЛАСНИХ ОНКОЛОГІЧНИХ ЦЕНТРАХ**



Запропонована система комплексної діагностики із залученням цитоморфологічного, цитохімічного, імуноцитохімічного та молекулярно-генетичного дослідження. Система апробована і підтвердила свою ефективність при діагностуванні хворих в Україні.

*Ключові слова:* мієлоїдні новоутворення, хронічний мієлолейкоз, справжня поліцитемія, первинний мієлофіброз, есенціальна тромбоцитемія, цитоморфологічна діагностика, зворотно-транскриптна полімеразна ланцюгова реакція.

До групи мієлоїдних новоутворень (МН) належать клональні патологічні процеси, які виникають внаслідок трансформації поліпотентної гемопоетичної стовбурової клітини (ПГСК). Характерною для них є проліферація клітин однієї чи кількох ліній мієлопоезу (гранулоцитів, мегакаріоцитів, еритроїдних елементів).

МН виявляються переважно у дорослих людей на 5–7-ому десятиріччі життя, проте можуть діагностуватись і у дітей. У цілому частота всіх типів МН за даними ВООЗ становить 6–10 на 100 тис. населення щорічно. Різні форми МН (хронічний мієлолейкоз, справжня поліцитемія, первинний мієлофіброз, есенціальна тромбоцитемія, мієлопроліферативне новоутворення неklasифіковане) мають морфологічні і клініко-гематологічні ознаки, які є спільними і часто-густо перекриваються, на

відміну від хронічного нейтрофільного лейкозу і мастоцитозу, які не є складними для цитоморфологічної та цитохімічної діагностики.

Використання в комплексних діагностичних дослідженнях цитологічних та імуноцитохімічних методів дослідження клітин крові та кісткового мозку в поєднанні із сучасними молекулярно-генетичними методами дає можливість виділити різні форми МН і проводити диференційну діагностику з мієлодиспластичними синдромами та захворюваннями, які супроводжуються лейкемоїдними реакціями мієлоїдного типу. Згідно з сучасною класифікацією ВООЗ 2008 р. для підтвердження діагнозу, (наприклад хронічний мієлоїдний лейкоз – ХМЛ), використовуються не тільки цитоморфологічні і цитохімічні методи дослідження, але й визначення характерної цитогенетичної аномалії – філадельфійської хромосоми (Ph) чи молекулярно-генетичного продукту цієї аномалії – злитого гена *BCR-ABL1*.

Для ряду *BCR-ABL*-негативних МН встановлено значення набутих мутацій гена *JAK2*

на хромосомі 9p24. Найчастіша з мутацій гена *JAK2* – V617F викликає активацію сигнальних шляхів трансдуктора сигналів та активатора транскрипції (STAT), мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК) і фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), що спричинює трансформацію і проліферацію гемопоетичних клітин-попередників. Мутації V617F гена *JAK2* виявляються практично у всіх хворих на справжню поліцитемію (СП) та майже у 50 % хворих з первинним мієлофіброзом (ПМФ) та есенціальною тромбоцитемією (ЕТ). У деяких хворих на СП при відсутності *JAK2* V617F може визначитися мутація в екзоні 12 активованого *JAK2*. Іноді у хворих на ПМФ та ЕТ визначається мутація W515L або W515K гена *MPL*.

Тому поєднання цитоморфологічних, цитохімічних та молекулярно-генетичних методик діагностики МН є умовою сучасної класифікації цієї групи захворювань, без застосування якої не можна призначати ефективне лікування.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА КЛАСИФІКАЦІЯ МІЄЛОЇДНИХ НОВОУТВОРЕНЬ

Різні форми МН мають подібні морфологічні і клініко-гематологічні ознаки. Згідно з новою класифікацією ВООЗ [1] виділяють такі форми МН (табл. 1).

Базисна діагностика МН включає дані цитоморфологічного та цитохімічного досліджень патологічних клітин в препаратах-мазках периферичної крові та кістковомозкового пунктату. В основі уточненої діагностики різних форм МН лежить виявлення специфічних генетич-

них аномалій (напр., злитого гена *BCR-ABL1*, гена при ХМЛ і мутацій гена *JAK2* V617F при певних формах МН – СП, ПМФ і ЕТ, з обов'язковим урахуванням клініко-лабораторних даних хворих) [2].

Оскільки патогенез захворювання невизначений майже у половини хворих з обґрунтованою підозрою на МН, то й діагностика захворювань цієї групи повинна бути комплексною, із застосуванням як цитоморфологічного і цитохімічного дослідження, так і даних молекулярно-генетичних досліджень, особливо для диференційної діагностики МН.

#### ОБСЯГ ДОСЛІДЖЕНЬ, МЕТОДОЛОГІЯ, ВПРОВАДЖЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Комплексна цитоморфологічна, цитохімічна, імуноцитохімічна та молекулярно-генетична діагностика МН здійснена у 113 хворих України. Розподіл хворих за статтю був майже рівним. Середній вік хворих – 62 роки.

Для проведення цитоморфологічної діагностики МН використовували нативні мазки периферичної крові та пунктати кісткового мозку, пофарбовані за Папенгеймом.

Цитохімічні реакції (МПО, КФ, КНЕ, ЛФ) з виявлення активності ферментів у клітинах були виконані за стандартними методиками. Використовувалися цитоцентрифужні препарати і цитопрепарати типу «сухої краплі» для виконання імуноцитохімічної реакції з визначення експресії поверхневих антигенів клітин різних ліній мієло- та лімфопоезу, а також суспензії відмитих у забуференому фізіологічному розчині клітин для подальшого виділення з них РНК, проведення реакції ЗТ і подальшої детекції ампліфікованих генів.

Молекулярно-генетична діагностика МН полягала у виявленні злитого гена *BCR-ABL1* для верифікації ХМЛ і цитологічних варіантів бластної кризи (БК) ХМЛ; мутації V617F в гені *JAK2* за допомогою алейспецифічної тетрапраймерної ПЛР (Т-ARMS ПЛР) та мутацій в 12-ому екзоні гена *JAK2* та гені *MPL* за допомогою методу ЗТ-ПЛР, що було важли-

Таблиця 1

#### Форми мієлоїдних новоутворень згідно з класифікацією ВООЗ (2008)

Хронічний нейтрофільний лейкоз (ХНЛ)
Справжня поліцитемія (СП)
Первинний мієлофіброз (ПМФ)
Есенціальна тромбоцитемія (ЕТ)
Хронічний еозинофільний лейкоз, неспецифікований іншим чином
Мастоцитоз
Мієлопроліферативне захворювання некласифіковане

вим для діагностики ряду форм МН (СП, ПМФ і ЕТ).

Пацієнти з попереднім діагнозом МН знаходилися на обстеженні і лікуванні в Київській міській клінічній лікарні № 9, Київській обласній клінічній лікарні № 1, Головному військовому клінічному шпиталі МО України, Національному Інституті раку, Центрі трансплантації кісткового мозку, Науковому центрі радіаційної медицини АМН України та в гематологічних відділеннях клінічних лікарень обласних центрів України (Житомир, Черкаси, Чернігів, Харків, Миколаїв, Полтава, Херсон, Вінниця, Дніпропетровськ).

**ЦИТОМОРФОЛОГІЧНА, ЦИТОХІМІЧНА  
ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДІАГНОСТИКА ХМЛ  
У ХРОНІЧНІЙ ФАЗІ, ФАЗІ АКСЕЛЕРАЦІЇ  
ЗАХВОРЮВАННЯ ТА БЛАСТНОЇ КРИЗИ**

**Цитоморфологічна  
та цитохімічна діагностика ХМЛ**

У периферичній крові хворих відмічають нейтрофільний лейкоцитоз ( $12\text{--}100 \times 10^9/\text{л}$ ). Важливою гематологічною ознакою за наявності зсуву лейкоцитарної формули вліво є збільшення вмісту базофілів до 3–4 %, нерідко з одночасним підвищенням кількості еозинофілів – так звана *базофільно-еозинофільна асоціація* (рис. 1, див. кольорову вклейку).

При підрахунку лейкограми паличкоядерні і сегментоядерні нейтрофіли складають від 35 до 70 %, вміст метамієлоцитів і мієлоцитів (останніх більше) коливається від 5 до 40 %, промієлоцитів – від 10 до 15 %. Кількість тромбоцитів у межах норми або вище  $1000 \times 10^9/\text{л}$ .

Серед цитохімічних ознак для клітин при ХМЛ характерною є виражена позитивна реакція на мієлопероксидазу (рис. 2, див. кольорову вклейку). А для точної верифікації і диференціації ХМЛ від мієлоїдних проліферацій (так званих *лейкемоїдних реакцій*) використовують реакцію на лужну фосфатазу, яка у випадку ХМЛ буде негативною.

Клітиною, яка індукує розвиток хронічної фази (ХФ) ХМЛ, є *BCR-ABL1*-позитивна ПГСК.

Набуті мутації відповідальні за виживаність і аберантне диференціювання ПГСК, що, в свою чергу, веде до експансії популяції пухлинних клітин, які зберігають здатність до диференціювання. Завдяки цьому в ХФ ХМЛ в периферичній крові виявляються незрілі клітини (бласти, промієлоцити, метамієлоцити), але переважають зрілі елементи гранулоцитарного ряду.

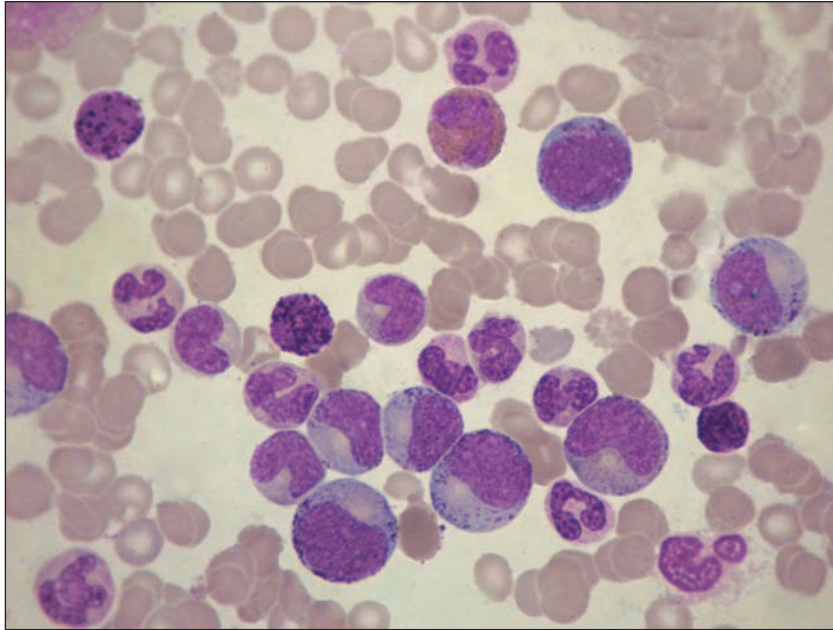
Прогресуюче погіршення клінічного стану хворих поєднується з розвитком взаємопов'язаних якісних і кількісних гематологічних аномалій. Це фаза акселерації (ФА) ХМЛ. Середня її тривалість – 12–24 місяців. Для верифікації ФА ХМЛ використовуються такі клініко-лабораторні критерії:

- 1) вміст мієлобластів в периферичній крові або в кістковому мозку – в межах 10–19 %;
- 2) кількість базофілів в периферичній крові – 20 % і більше;
- 3) не пов'язана з терапією стійка тромбоцитопенія ( $<100 \times 10^9/\text{л}$ ) або тромбоцитоз ( $>1000 \times 10^9/\text{л}$ ), що стійко утримується, незважаючи на терапію;
- 4) нечутливе до терапії тривале збільшення кількості лейкоцитів в крові ( $>10 \times 10^9/\text{л}$ ) і розмірів селезінки;
- 5) і/або цитогенетичні докази клональної еволюції.

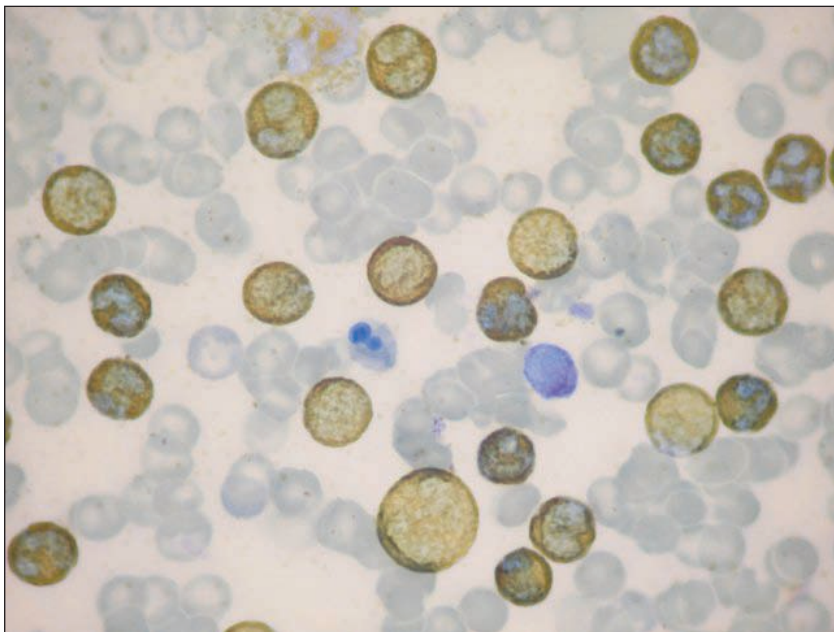
В ФА відмічаються виражені ознаки дистгранулоцитопоезу.

Спостерігаються й інші прояви дизмієлопоезу, включаючи виявлення кільцевих сидеробластів, набуття пельгерівської аномалії нейтрофілів або еозинофілів, появу мегакаріоцитів з малими округлими ядрами. Відмічаються виражені ознаки дизеритропоезу: поява мегалобластоїдних елементів, нерідко оточених фіброзною тканиною.

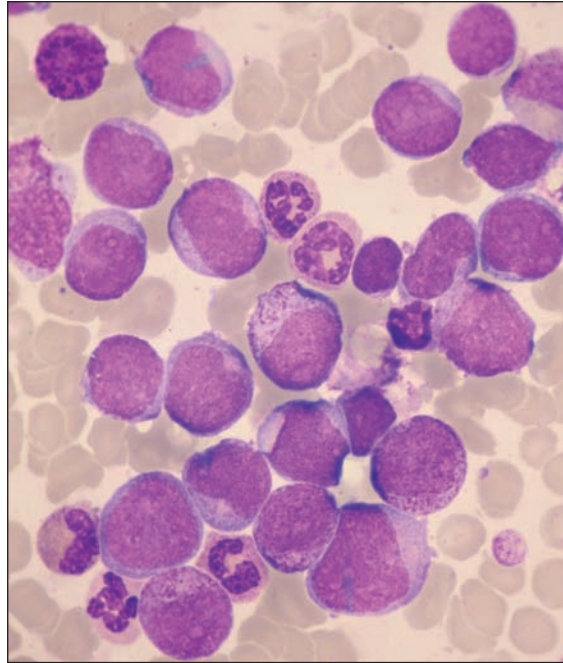
У багатьох хворих на ХМЛ в середньому через 4 роки після початку захворювання в результаті прогресу захворювання відбувається перехід в гостру фазу з розвитком бластної кризи (БК). У фазі мієлоїдної БК ХМЛ властивості стовбурових лейкемічних клітин в результаті активації  $\beta$ -катеніну можуть набувати



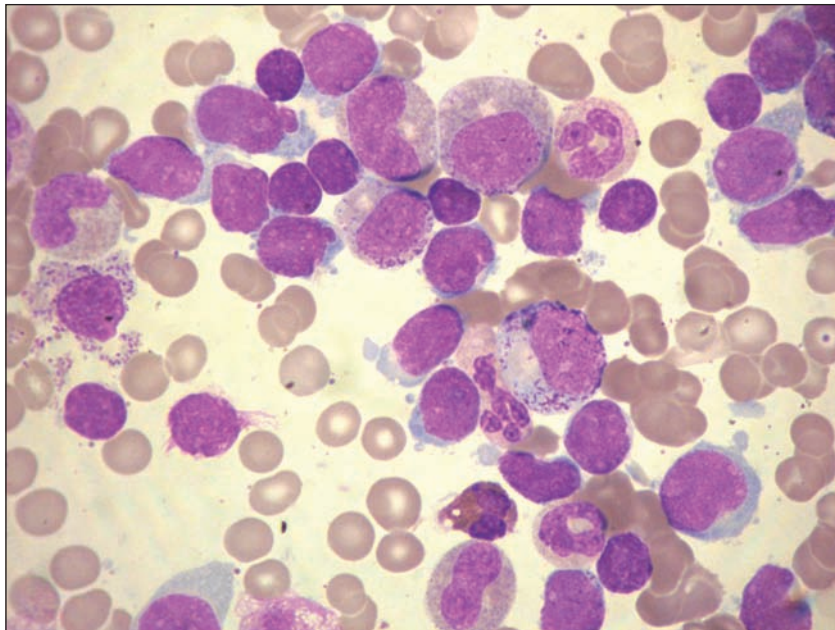
**Рис. 1.** Картина кісткового мозку при ХМЛ в хронічній фазі (зabarвлення за Папенгеймом)



**Рис. 2.** Позитивна реакція на мієлопероксидазу в клітинах при ХМЛ



**Рис. 3.** Бластна криза ХМЛ за мієлоїдним типом (забарвлення за Папенгеймом)



**Рис. 4.** Бластна криза ХМЛ за лімфоїдним типом (забарвлення за Папенгеймом)

клітини з підвищеною здатністю до самовідновлення, які відносяться до популяції гранулоцитарно-макрофагальних клітин-попередників.

У клінічній картині у пацієнтів при розвитку БК відмічається лихоманка, слабкість, пітливість, зниження маси тіла, болі в області селезінки і в кістках, наявність вираженої гепатоспленомегалії. Вирішальним для діагностики БК вважається:

1) виявлення 20 % і більше бластів в периферичній крові і кістковому мозку;

2) наявність екстрамедулярних вогнищ лейкемічної інфільтрації, що складаються виключно з бластних клітин, в шкірі, лімфатичних вузлах, ЦНС і інших тканинах та органах;

3) виявлення при гістологічному вивченні трепанобіоптатів кісткового мозку великих агрегатів і кластерів бластних клітин.

Реакція на терапію, що проводиться, при БК ХМЛ багато в чому обумовлена природою домінуючого клона бластних клітин. Встановлено, що при БК ХМЛ у 70 % хворих субстратні клітини мають мієлоїдну природу і представлені трансформованими клітинами-попередниками гранулоцитарного або еритробластичного і мегакаріоцитарного ряду, або клітинами цих паростків мієлопоєзу в різному поєднанні (рис. 3, див. кольорову вклейку).

При найбільш поширеному мієлоїдному підваріанті БК в лейкемічних клітинах визначається позитивна реакція при виявленні активності мієлопероксидази (МПО) і нафтол-AS-D-хлорацетатестерази, слабке дифузне пофарбування цитоплазми клітин при визначенні активності кислій фосфатази (КФ) і негативна реакція при виявленні активності кислій неспецифічної естерази (КНЕ). Проте у ряді випадків в найменш диференційованих бластах при цитохімічному дослідженні активність МПО не виявляється. У цих випадках для підтвердження мієлоїдної природи бластів проводиться імуноцитохімічне дослідження з використанням моноклональних антитіл (мкАТ) до МПО. Встановлення мієлоїдної або моноцитарної спрямованості диференціювання блас-

тних клітин можливе також на основі виявлення експресії антигенів: CD13, CD14, CD15, CD33 та ін.

При лімфоїдному варіанті БК ХМЛ клітини мають цитоморфологічні ознаки лімфобластів з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, з ядрами неправильного контуру (розщеплені і складчасті) з однією нуклеолою (рис. 4, див. кольорову вклейку) У помірно базофільній цитоплазмі клітин відсутня азурофільна зернистість. Активність МПО у бластних клітинах не виявляється, а при PAS-реакції відмічають відкладення глікогену у вигляді великих гранул або блоків. У більшості випадків лімфоїдної БК ХМЛ лейкемічні клітини представлені трансформованими клітинами-попередниками В-лімфоцитів. На поверхневих мембранах бластних клітин виявляється експресія антигенів CD10, CD19 і CD20, в ядрах клітин визначається термінальна дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT), в окремих випадках в цитоплазмі синтезовані важкі  $\mu$ -ланцюги Ig.

Медіана виживаності хворих з лімфоїдним варіантом БК ХМЛ складає 12 міс., тоді як за наявності бластів мієлоїдного типу — лише 3–9 місяців.

### Молекулярно-генетична діагностика ХМЛ

У 95 % хворих на ХМЛ визначається характерна цитогенетична аномалія —  $t(9;22)(q34;q11)$ , що призводить до утворення філадельфійської хромосоми (Ph-хромосоми). Ph-хромосома утворюється в результаті реципрокної транслокації (взаємного переносу генетичного матеріалу) між хромосомами 9 і 22. При цитогенетичному дослідженні це визначають як  $t(9;22)(q34.1;q11.21)$ . Результатом транслокації є утворення злитого гена *BCR-ABL1*. У хворих, в клітинах яких визначається цей злитий ген, відмічається висока ступінь дозрівання клітин гранулоцитарного ряду і /або тромбоцитоз.

Ph-хромосома у хворих на ХМЛ виявляється в клітинах гранулоцитарного, моноцитарно-макрофагального, еритробластичного, мегака-

ріоцитарного ряду, в еозинофілах і базофілах, але відсутня в клітинах інших тканин і органів, в фібробластах кісткового мозку, в Т-лімфоцитах. Молекулярно-генетична верифікація злитного химерного гена *BCR-ABL1* здійснюється як для первинної діагностики ХМЛ, так і для ідентифікації цитологічних варіантів БК ХМЛ. Застосування ЗТ-ПЛР для уточнення діагнозу ХМЛ проілюструємо на прикладі.

*Хворий Н-ко, 30 років. Реєстраційний № 57716.*

Цитоморфологічні дослідження мазків периферичної крові та кісткового мозку: значний нейтрофільний лейкоцитоз в периферичній крові із зсувом лейкоформули вліво, базофільно-еозинофільна асоціація, значна мієлоїдна гіперплазія кісткового мозку.

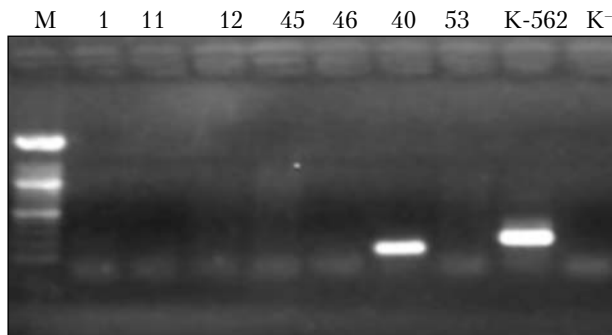
Цитохімічні дослідження клітин крові та кісткового мозку: пероксидаза — виражена позитивна реакція в більшості мієлоїдних клітин та негативна в лімфоцитах крові; лужна фосфатаза — негативна.

Молекулярно-генетичне дослідження клітин крові: виявлення транскрипту злитого гена *BCR-ABL1* у хворого на ХМЛ за допомогою ЗТ-ПЛР (рис. 5).

**ДІАГНОСТИКА СПРАВЖНЬОЇ ПОЛІЦИТЕМІЇ (СП),  
ПЕРВИННОГО МІЄЛОФІБРОЗУ (ПМФ)  
ТА ЕСЕНЦІАЛЬНОЇ ТРОМБОЦИТЕМІЇ (ЕТ)  
НА ОСНОВІ РЕЗУЛЬТАТІВ ЦИТОМОРФОЛОГІЧНИХ  
ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Цитоморфологічна  
діагностика СП, ПМФ, ЕТ**

Діагностика таких форм МН, як СП, ПМФ, ЕТ, потребує комплексного підходу. Потрібно враховувати загальноклінічні дані хворого, тривалість розвитку процесу, ретроспективні результати аналізів периферичної крові (від моменту, коли відмічено суб'єктивне погіршення загального стану) та обов'язково дані пункції та трепанобіопсії кісткового мозку для оцінки стану системи гемопоезу. В основі патогенезу цих форм МН лежить трансформація ПГСК. Цим пояснюється ураження клітин всіх паростків кровотворення [2, 3], що й зумовлює бага-



**Рис. 5.** Виявлення транскрипту злитого гена *BCR-ABL1* у хворого на ХМЛ за допомогою ЗТ-ПЛР: М — маркер молекулярної маси; 40 — матеріал від хворого на ХМЛ; К-562 — лінія клітин ХМЛ (позитивний контроль); К<sup>-</sup> — негативний контроль

тосимптомність захворювання (анемія, цитопенія, тромбози, інфекційні і вірусні ускладнення).

**Справжня поліцитемія (СП)** (еритремія, синдром Вакеза–Ослера) — МН, що характеризується надмірним утворенням еритроцитів, незалежним від механізмів, що регулюють еритропоез в нормі. Частота захворюваності — 0,5–1,0 на 100 тис. населення на рік. Співвідношення чоловіків і жінок складає 1,2 : 1. Середній вік хворих — 60–70 років. Етіологія захворювання залишається нез'ясованою. Значення генетичної схильності підтверджують випадки сімейної СП.

Практично усі хворі на СП є носіями мутації V617F в гені *JAK2* або іншої функціонально подібної мутації *JAK2*, що призводить до проліферації не лише клітин еритробластичного ряду, але й гранулоцитів і мегакаріоцитів [4–5].

У розвитку СП виділяють три послідовні стадії: *продромальну передполіцитемічну фазу*, основною ознакою якої є збільшення маси еритроцитів;

*фазу стабільного перебігу* захворювання, що асоціюється зі значним збільшенням маси еритроцитів;

*фазу постполіцитемічного мієлофіброзу*, при якій розвиток цитопенії, включаючи анемію, обумовлений неефективним гемопоезом, гіперспленізмом і появою вогнищ екстрамедулярного кровотворення.



Основним лабораторним критерієм для встановлення діагнозу СП є збільшення маси клітин червоної крові. Збільшення кількості еритроцитів ( $6-7 \times 10^{12}/\text{л}$ ) і рівня гемоглобіну (180–220 г/л) супроводжується зростанням показників гематокриту. У першій, передполіцитемічній, стадії захворювання на нормобластичну еритроїдну гіперплазію кісткового мозку вказує виявлення в периферичній крові нормохромних і нормоцитарних еритроцитів. У периферичній крові більш ніж у 80 % хворих на СП відзначається нейтрофільний лейкоцитоз з невеликим зсувом лейкоцитарної формули вліво. Помірна базофілія спостерігається у 60–70 % хворих. Частою є еозинфілія. Кількість тромбоцитів підвищена у 50–80 % хворих. У периферичній крові при СП можуть виявлятися великі тромбоцити і фрагменти ядер мегакаріоцитів. У мазках із стерильного пунктата кісткового мозку визначається значна гіперплазія.

СП діагностують, керуючись такими критеріями (А, В), запропонованими експертами ВООЗ [1]: **A1** – збільшення маси циркулюючих еритроцитів більше ніж на 25 % ( $\geq 36$  мл/кг у чоловіків, 32 мл/кг у жінок) або вмісту гемоглобіну ( $>185$  г/л у чоловіків, 165 г/л у жінок); **A2** – наявні мутації V617F гена *JAK* або в екзоні 12 активованого *JAK2* [6]; **A3** – виключення причин, що викликають вторинний еритроцитоз; **A4** – спленомегалія; **A5** – утворення ендогенних еритроїдних колоній *in vitro*; **B1** – тромбоцитоз ( $> 400 \times 10^9/\text{л}$ ); **B2** – кількість лейкоцитів ( $> 12 \times 10^9/\text{л}$ ); **B3** – при трепанобіопсії кісткового мозку виявляється панмієлоз з вираженою проліферацією клітин еритробластичного і мегакаріоцитарного ряду; **B4** – низькі рівні еритропоєтину в сироватці крові.

Діагноз СП встановлюється при A1 і A2 і наявності будь-якої іншої ознаки з категорії А або при A1 і A2 і будь-яких двох ознак з категорії В. Тривалість початкової і стабільної фаз СП складає від 5 до 20 років. Приблизно у 10–20 % хворих спостерігається перехід у фазу постполіцитемічного мієлофіброзу, для якої є

характерними зменшення маси клітин червоної крові, збільшення міри спленомегалії, посилення фіброзу кісткового мозку, розвиток цитопенії, поїкілоцитоз, анізоцитоз.

Диференційна діагностика СП проводиться з рядом захворювань і станів, що супроводжуються вторинним (симптоматичним) еритроцитозом. Розрізняють вторинні абсолютні і відносні еритроцитози. В онкогематологічній практиці особливо важливим є диференціальна діагностика СП у стабільній фазі захворювання і вторинних абсолютних еритроцитозів, що зустрічаються у хворих з гіпернефромою, пухлинами нирок, ендокринних органів.

**Первинний мієлофіброз** (хронічний ідіопатичний мієлофіброз, агногенна мієлоїдна метаплазія, ідіопатичний мієлофіброз, мієлофіброз/склероз з мієлоїдною метаплазією) – клональне МН, в основі розвитку якого лежить трансформація стовбурових кровотворних клітин кісткового мозку.

Щорічна захворюваність ПМФ в різних країнах складає 0,5–1,5 на 100 тис. населення. Зустрічається переважно в осіб літнього віку (60–70 років), але буває зрідка і у дітей.

**Характерні ознаки захворювання:** переважна проліферація клітин мегакаріоцитарного і гранулоцитарного ряду в кістковому мозку, що супроводжується розвитком фіброзу і остеосклерозу, спленомегалія, поява вогнищ екстрамедулярного гемопоезу, анемія, зміни в формулі крові.

При розвитку ПМФ відзначається еволюція – від початкової передфібротичної стадії захворювання до стадії вираженого колагенового фіброзу і остеосклерозу.

При рутинному аналізі периферичної крові виявляється анемія, лейкоцитоз і/або тромбоцитоз, наявність ядромісних клітин еритробластичного ряду. У більшості хворих анемія нормохромна. У 50 % пацієнтів рівень гемоглобіну не перевищує 100 г/л, а у 20 % – він нижче 80 г/л. Відмічають анізоцитоз і поїкілоцитоз еритроцитів, наявність поїкілоцитів у формі сльозинки (*tear-drop*). Кількість рети-



кулоцитів помірно збільшена і може коливатися в залежності від стадії захворювання.

Кількість лейкоцитів у 40 % хворих ПМФ коливається в межах  $10\text{--}25 \times 10^9/\text{л}$ . У крові зустрічаються гіпер- і гіпосегментовані лейкоцити, невеликий відсоток незрілих клітин гранулоцитарного ряду. Може визначатися збільшена кількість тромбоцитів (до  $500 \times 10^9/\text{л}$ ). Виявляються атипові, великі і гіпогранулярні тромбоцити, аномальні мегакаріоцити (мікромегакаріоцити, промегакаріоцити, голі ядра мегакаріоцитів).

Аналіз мієлограми при вивченні мазків кісткового мозку не є показовим. Результати багато в чому залежать від того, чи потрапила голка у вогнище мієлоїдної гіперплазії або в ділянку з вираженим фіброзом і остеосклерозом. Більш інформативним при встановленні діагнозу ПМФ є гістологічне вивчення трепанобіоптатів кісткового мозку.

Ступінь вираженості фіброзу коливається. У ранній стадії захворювання у більшості хворих визначається збільшена кількість волокон ретикуліну. При розвитку інтенсивного фіброзу і виникненні вогнищ склерозу клітинність кісткового мозку в окремих ділянках знижується. У деяких ділянках кісткового мозку кровотворні клітини майже повністю відсутні, фіброзна тканина цілком заповнює міжтрабекулярні простори. Вогнища екстрамедулярного гемопоезу у хворих на ПМФ розвиваються в селезінці і печінці.

Приблизно у 50 % хворих на ПМФ виявляються мутації V617F гена JAK2. Наявність цієї мутації, виявленої також при СП і ЕТ, підтверджує клональну природу процесу проліферації, але не дозволяє відрізнити ПМФ від вказаних форм МН [6–7].

Тривалість виживаності хворих на ПМФ коливається від декількох місяців до десятиліть. В основному прогноз залежить від стадії, в якій захворювання було діагностоване. У хворих, у яких ПМФ був розпізнаний у стадії фіброзу, медіана виживаності складає від 3 до 7 років. У пацієнтів, у яких діагноз ПМФ був

встановлений в ранній передфіброзній стадії, показники 10-річної виживаності складають 72 %, а 15-річної — 59 %.

**Есенціальна тромбоцитемія** (ЕТ) (синоніми: первинний тромбоцитоз, ідіопатичний тромбоцитоз, геморагічна тромбоцитемія) — клональне МН, що характеризується переважним ураженням клітин мегакаріоцитарного ряду і збільшенням кількості тромбоцитів у периферичній крові ( $\geq 450 \times 10^9/\text{л}$ ).

Показники щорічної захворюваності складають 0,6–2,5 на 100 тис. населення. Хворіють переважно люди у віці 50–60 років. Але відзначається й інший пік захворюваності — у жінок до 30 років.

Етіологія і механізми розвитку захворювання недостатньо вивчені. Майже у половини хворих на ЕТ спостерігається безсимптомний перебіг захворювання, а зміни виявляються при виконанні рутинного загальноклінічного аналізу крові. У інших пацієнтів у клінічній картині на перший план виступають ускладнення, обумовлені тромбозом судин і крововиливами. У 50 % хворих визначається спленомегалія, у 15–20 % — ознаки гепатомегалії.

Кількість тромбоцитів у периферичній крові хворих значно збільшена і нерідко перевищує  $1000 \times 10^9/\text{л}$ . Мінімальним для встановлення діагнозу ЕТ раніше вважався стійкий впродовж тривалого часу рівень тромбоцитів, рівний  $600 \times 10^9/\text{л}$ . У 4-му виданні класифікації ВООЗ пухлин кровотворної і лімфоїдної тканин (2008) цей поріг знижений до  $450 \times 10^9/\text{л}$ . Характерні ознаки анізоцитозу тромбоцитів — нерідко виявляються великі атипові форми і агранулярні тромбоцити.

Рівень гемоглобіну у хворих на ЕТ коливається в межах 100–188 г/л. Еритроцити нормоцитарні і нормохромні. Середня кількість лейкоцитів у периферичній крові складає  $11,5 \times 10^9/\text{л}$ . Відсутня характерна для ХМЛ базофілія. Активність лейкоцитарної лужної фосфатази у клітинах — в межах норми.

У більшості хворих на ЕТ при гістологічному вивченні визначається нормоклітинність

або помірна гіперклітинність кісткового мозку. Відзначається виражена проліферація великих або велетенських форм клітин мегакаріоцитарного ряду з гіперчасточковими ядрами і великою цитоплазмою. Атипові мегакаріоцити, характерні для ПМФ, не виявляються при ЕТ. У 40–50 % хворих на ЕТ визначаються мутації V617F гена *JAK2*. Ці мутації, як відомо, виявляються також при СП і ПМФ, але не визначаються при реактивному тромбоцитозі.

Перебіг ЕТ індолентний, характеризується тривалими безсимптомними інтервалами, що чергуються з епізодами тромбоемболічних або геморагічних проявів. Трансформація ЕТ в ГМЛ або МДС часто пов'язана з попередньою цитотоксичною терапією і відбувається у менш ніж 5 % хворих. Медіана виживаності – 10–15 років.

Основні диференційно-діагностичні цитоморфологічні критерії діагностики СП, ПМФ і ЕТ при початковому аналізі препаратів периферичної крові і кісткового мозку наведено в табл. 2.

Диференційна діагностика перелічених вище форм МН базується в основному на результатах цитологічного дослідження препаратів периферичної крові та кісткового мозку. Ми доповнили

існуючу модель диференційної діагностики цих форм МН від подібних за цитоморфологічною картиною крові та кісткового мозку мієлодиспластичних синдромів (МДС) цитохімічною реакцією визначення активності кислій неспецифічної естерази (КНЕ). Цей фермент дозволяє більш точно ідентифікувати клітини системи мононуклеарних фагоцитів, кількість яких є збільшеною при різних формах МДС.

Результати ензимохімічного виявлення КНЕ в клітинах кісткового мозку хворих з підозрою на МН або МДС ілюструються прикладами.

**Приклад 1.** Хвора М. 1951 р.н. Попередній клініко-гематологічний діагноз – МДС, що супроводжується цитопенією і анемією в периферичній крові. Для встановлення точного діагнозу мазки-препарати були попередньо досліджені за допомогою цитоморфологічного методу. За результатами дослідження пунктату кісткового мозку встановлена гіперклітинність кісткового мозку, мультилінійна дисплазія клітин декількох ліній мієлопоезу (зменшення кількості гранул у сегментоядерних нейтрофілах і псевдопельгерівська аномалія нейтрофілів, збільшення кількості молодих і незрілих

Таблиця 2

Основні диференційно-діагностичні цитоморфологічні критерії мієлоїдних новоутворень

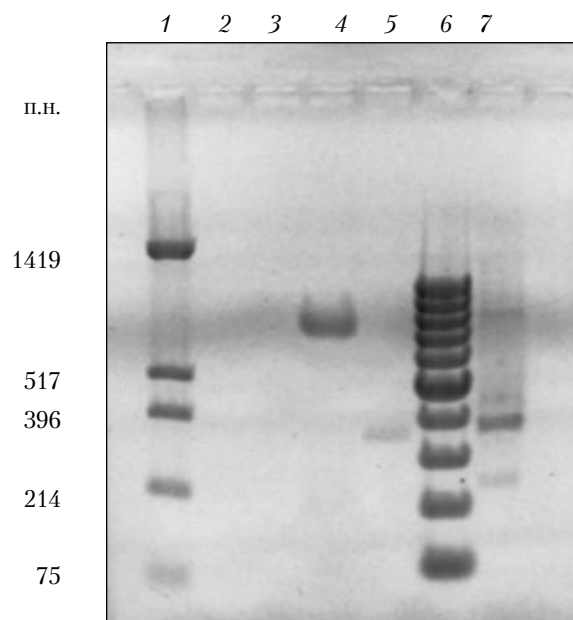
Мієлоїдні новоутворення	Критерії
Справжня поліцитемія	Збільшення кількості еритроцитів, рівня гемоглобіну, показника гематокриту. Гіпохромні і/або мікроцитарні еритроцити. Тромбоцитоз. Лейкоцитоз (до $20 \times 10^9/\text{л}$ ); помірна базофілія; еозинофілія. Еритроїдна гіперплазія кісткового мозку. Кластери мегакаріоцитів. Підвищена кількість ретикулінових волокон. Прогресія фіброзу кісткового мозку.
Первинний мієлофіброз	Анемія; анізоцитоз і пойкилоцитоз еритроцитів. Тромбоцитоз (атипові, крупні, гіпогранулярні тромбоцити). Аномальні мегакаріоцити (мікромегакаріоцити, промегакаріоцити, голі ядра мегакаріоцитів). Лейкоцитоз; помірна базофілія. Лімфоцитопенія. Ядровмісні клітини еритроїдного ряду. Картина мієлоїдної гіперплазії або фіброзу і остеосклерозу.
Есенціальна тромбоцитемія	Тромбоцитоз (анізоцитоз, атипові крупні форми, агранулярні тромбоцити). Ядровмісні фрагменти мегакаріоцитів. Можливий лейкоцитоз. Нормоклітинність або гіперклітинність кісткового мозку (крупні або гігантські форми мегакаріоцитів з гіперчасточковими ядрами і широкою цитоплазмою).

клітин еритробластичного ряду з ядрами неправильної форми і багатолопастними, гіпочасочковість ядер мегакаріоцитів і наявність мікроформ мегакаріоцитів), менш ніж 5 % бластних клітин мієлоїдної природи і морфологічно визначені клітини (до 15 % всіх мієлокаріоцитів кісткового мозку), що належать до СМФ. Проведена цитохімічна реакція визначення активності КНЕ в клітинах демонструє інтенсивне забарвлення в клітинах, що належать до СМФ. Ці дані, враховуючи клініко-гематологічні дані хворої, дозволяють діагностувати рефрактерну цитопенію з мультигілінійною дисплазією (РЦМД), яка є однією з форм МДС.

**Приклад 2.** Хвора 1939 р.н. Попередній клініко-гематологічний діагноз – МН нез'ясованого генезу на тлі анемії, лейкоцитозу, тромбоцитозу і наростаючої спленомегалії. Для встановлення точного діагнозу мазки крові та кісткового мозку були досліджені за допомогою цитоморфологічного методу. За результатами дослідження пунктату кісткового мозку встановлена гіперклітинність кісткового мозку з переважною проліферацією клітин мегакаріоцитарного і гранулоцитарного паростків гемопоєзу, анізоцитоз і пойкилоцитоз еритроцитів. Проведення цитохімічних реакцій з визначення активності мієлопероксидази, PAS-позитивних речовин і кислоти фосфатази дозволило встановити попередній діагноз хронічного мієлопроліферативного процесу, а саме первинного мієлофіброзу, що характеризується анемією, лейкоцитозом і тромбоцитозом. Проведення цитохімічної реакції визначення активності КНЕ в клітинах дозволило виключити діагноз МДС, а виявлення початкової стадії фіброзу кісткового мозку в результаті трепанобіопсії підтвердило діагноз первинного мієлофіброзу з анемією, лейкоцитозом і наростаючою спленомегалією, зумовленою розвитком в ній екстрамедулярного гемопоєзу.

**Молекулярно-генетична діагностика СП, ПМФ, ЕТ** [8].

У 2005 р. одночасно кілька груп авторів [4–7] описали мутацію в 14-ому екзоні гена *JAK2*, що призводила до заміни валіну на фенілаланін у

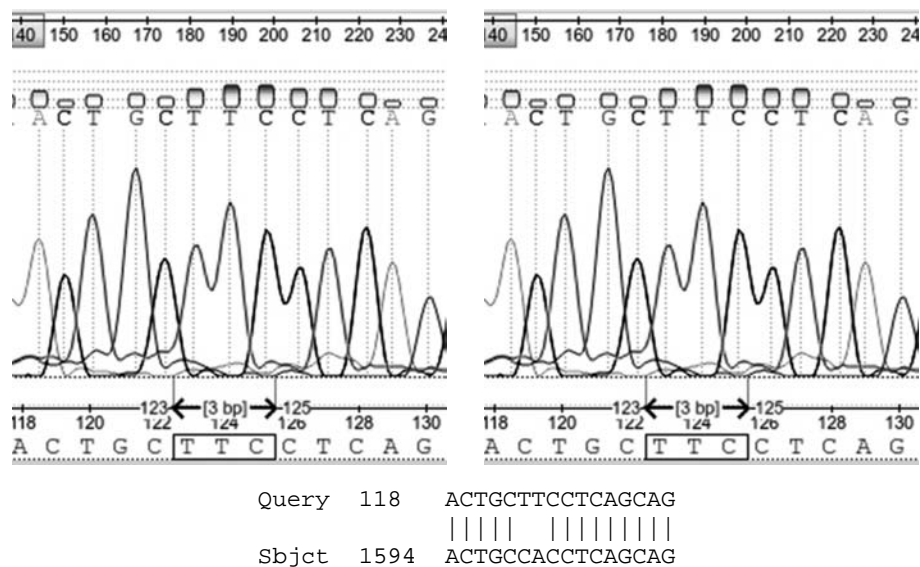


**Рис. 6.** Електрофореграма розділення ампліфікатів ЗТ-ПЛР аналізу зразка крові хворого С.: 1 – маркер молекулярної маси pUC19/Hinfl; 2 – виявлення p190 *BCR/ABL* (суміш № 1–2); 3 – виявлення p210 *BCR/ABL* (суміш № 2–2); 4 – ампліфікат, що містить фрагмент гена *JAK2*; 5 – ампліфікат, що містить фрагмент гена *MPL*; 6 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas); 7 – ампліфікати після проведення альельспецифічної тетрапраймерної полімеразної ланцюгової реакції

позиції 617. Мутація V617F виявляється у 95 % хворих на СП, у 50 % хворих на ЕТ та ПМФ. І хоча функціональна роль цієї мутації не встановлена, її виявлення відноситься до головних критеріїв при встановленні діагнозів СП, ПМФ та ЕТ [1], а її наявність виключає вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку, що є важливим для диференційної діагностики захворювань.

Ще одним генетичним маркером у діагностиці МН є мутації в гені *MPL* (Homo sapiens myeloproliferative leukemia virus oncogene). Ці мутації (переважно W515K та W515L) виявляються в 5–10 % випадків захворювання на ПМФ та в 1–5 % захворювання на ЕТ.

Приклад аналізу електрофореграм, отриманих з використанням запропонованих тест-систем для виявлення химерних генів.



**Рис. 7.** Фрагмент сиквенсу (а) послідовності продукту ПЛР, що був отриманий при дослідженні крові хворого С. Рамкою виділено ділянку послідовності, яка відповідає мутації W515K гена *MPL*; фрагмент результатів пошуку (б) за допомогою сервера BLAST (нумерацію наведено згідно з NM\_005373.2 Homo sapiens myeloproliferative leukemia virus oncogene (*MPL*), mRNA)

Таблиця 3

**Впровадження комплексної діагностики мієлоїдних новоутворень в обласних онкологічних центрах**

Медичний заклад	Кількість хворих
Київська міська клінічна лікарня № 9 (гематологічні відділення №1 і №2)	63
Київський обласний онкологічний диспансер	9
Головний військовий клінічний шпиталь МО України	3
Національний інститут раку МОЗ України	3
Науковий центр радіаційної медицини НАМН України	2
ДУ «Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака» НАМН України	2
Житомирська обласна клінічна лікарня ім. О.Ф. Гербачевського	2
Черкаський обласний онкологічний диспансер	8
Чернігівський обласний онкологічний диспансер	3
Хмельницька обласна лікарня	2
Кримська республіканська установа «Онкологічний клінічний диспансер»	2
Міська клінічна багатопрофільна лікарня №25 м. Харкова	2
Миколаївська обласна лікарня	3
Комунальна установа «Одеська обласна клінічна лікарня»	1
Севастопольська міська лікарня №1 ім. М.І. Пирогова	2
Полтавська обласна клінічна лікарня ім. М.В. Скліфосовського	1
Херсонська обласна лікарня	2
Міська клінічна лікарня м. Вінниці	1
Міська клінічна лікарня м. Дніпропетровська	2
<b>Разом</b>	<b>113</b>

Зі зразка РНК хворого С. (50 років, підозра на ПМФ) було отримано кДНК та проведено: виявлення можливих транскриптів злитих генів *BCR/ABL*; виявлення мутації V617F гена *JAK2*; виявлення мутацій в 12–16 екзонах гена *JAK2*; виявлення мутацій в гені *MPL*. За результатами електрофоретичного розділення отриманих ампліфікатів (рис. 6.) не було виявлено злитого гена *BCR/ABL*, оскільки відсутні ампліфікати в доріжках 1 та 2; у пацієнта не виявлено мутації V617F в гені *JAK2*, оскільки на доріжці 7 виявлено ампліфікати розміром 355 (позитивний контроль) та 226 п.н. (нормальний алель) і не виявлено ампліфікату розміром 184 п.н.

Для ампліфікатів з доріжок 4 та 5 було визначено нуклеотидну послідовність за допомогою прямого секвенування (рис. 7). Не було встановлено відмінностей в первинній послідовності, яка відповідає 12–16 екзонам гена *JAK2*. При аналізі ж ампліфіката, який відповідає фрагменту гена *MPL*, виявлено мутацію W515K.

Виявлення мутацій в гені *MPL* (за відсутності химерного гена *BCR/ABL*) є одним із діагностичних критеріїв встановлення діагнозу «первинний мієлофіброз», тобто є всі підстави для підтвердження початкового діагнозу.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, комплексна діагностика із залученням цитоморфологічного, цитохімічного, імуноцитохімічного та молекулярно-генетичного методів дозволяє більш точно верифікувати випадки МН, які мають подібні клініко-гематологічні ознаки, схожі морфологічні та цитохімічні ознаки патологічних клітин крові та кісткового мозку.

Запропоновано процедури виявлення прогностично важливих мутацій у хворих з деякими формами МН: злитого гена *BCR-ABL* при ХМЛ та мутації V617F гена *JAK2* для під-

твердження моноклональної мієлоїдної проліферації при СП, ПМФ і ЕТ.

Розроблено протоколи робочої діагностичної методики для виявлення химерних генів *BCR/ABL* (e1/a3, e1/a4, e13-14/a3 та e13-14/a4 типів) за допомогою ЗТ-ПЛР аналізу; мутацій в 12–16 екзонах гена *JAK2* та мутацій в гені *MPL* за допомогою ЗТ-ПЛР аналізу та прямого секвенування отриманих ампліфікатів; мутації V617F гена *JAK2* за допомогою алельспецифічної тетрапраймерної полімеразної ланцюгової реакції (Т-ARMS ПЛР).

Запропонована система комплексної діагностики була апробована і впроваджена в клінічну практику онкогематологічних відділень м. Києва і ряду обласних центрів України (табл. 3).

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues // Lyon: IARC Press. – 2008. – 439 p.
2. *Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman Y.W.* Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues // Lyon: IARC Press. – 2001. – 351 p.
3. *Murati A., Brecqueville M., Devillier R. et al.* Myeloid malignancies: mutations, models and management // BMC Cancer. – 2012. – V. 12. – P. 304.
4. *Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J. et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // Lancet 2005. – V. 365, N9464. – P. 1054–1061.
5. *Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S. et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // N Engl J Med. – 2005. – V. 352, N 17. – P. 1779–1790.
6. *Zhao R., Xing S., Li Z. et al.* Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // J Biol. Chem. 2005. – V. 280, N 24. – P. 22788–22792.
7. *Levine R.L., Wadleigh M., Cools J. et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // Cancer Cell 2005. – V. 7, N 4. – P. 387–397.
8. *Дибков М.В., Гартювська І.Р., Телегеев Г.Д., Малюта С.С.* Розробка тест-системи для виявлення мутації V617F гена *jak2* у хворих на хронічні мієлопроліферативні захворювання // Наука та інновації. – 2009. – Т. 5, № 6. – С. 59–63.

Д.Ф. Глузман, Л.М. Скляренко, М.П. Завелевич,  
С.В. Коваль, Т.С. Ивановская, Л.Ю. Полудненко,  
Н.И. Украинская, Г.Д. Телегеев,  
М.В. Дыбков, Л.А. Полищук

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА  
МИЕЛОИДНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ  
В ОБЛАСТНЫХ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕНТРАХ

Предложена система комплексной диагностики с привлечением цитоморфологического, цитохимического, иммуноцитохимического и молекулярно-генетического исследования. Система апробирована и подтвердила свою эффективность при диагностировании больных в Украине.

*Ключевые слова:* миелоидные новообразования, хронический миелолейкоз, истинная полицитемия, первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия, цитоморфологическая диагностика, обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция.

D.F. Gluzman, L.M. Sklyarenko, M.P. Zavelevich, S.V. Koval,  
T.S. Ivanovskaya, L.Yu. Poludnenko, N.I. Ukrainskaya,  
G.D. Telegееv, M.V. Dybkov, L.A. Polischuk

COMPLEX DIAGNOSIS  
OF MYELOID NEOPLASMS IN REGIONAL  
ONCOLOGICAL CENTERS

The complex diagnostic system involving cytomorphological, cytochemical, immunocytochemical and molecular genetic study was evaluated and proved to be effective in examining the patients of oncological centers in Ukraine.

*Key words:* myeloid neoplasms, chronic myelogenous leukemia, polycythemia vera, primary myelofibrosis, essential thrombocythemia, cytomorphological diagnosis, reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Стаття надійшла до редакції 29.04.13