

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр гематологии»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

Трацевская Жанна Викторовна

**«Клинико-патоморфологическая характеристика вариантов истинной  
полицитемии и миелопролиферативных новообразований,  
неклассифицируемых, *JAK2*-позитивных»**

14.01.21 – гематология и переливание крови

14.03.02 – патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

д.б.н. Ковригина А.М.

д.м.н. Меликян А.Л.

МОСКВА – 2021 г.

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	7
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>13</b>
1.1. РЕГУЛЯЦИЯ ГЕМОПОЭЗА В НОРМЕ .....	13
1.2. КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА .....	16
1.3. ДРАЙВЕРНАЯ МУТАЦИЯ <i>JAK2</i> .....	18
1.3.1. Мутация <i>JAK2</i> V617F .....	18
1.3.2. Мутация <i>JAK2</i> экзон 12 .....	21
1.4. РН-НЕГАТИВНЫЕ МПН. ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ.....	21
1.4.1 Истинная полицитемия. История изучения. Клинические формы. Проблемы диагностики .....	23
1.4.2 МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОЕ НОВООБРАЗОВАНИЕ, НЕКЛАССИФИЦИРУЕМОЕ .....	27
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>30</b>
2.1. АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЯ. ФОРМИРОВАНИЕ ГРУПП ПАЦИЕНТОВ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ, <i>JAK2</i> + .....	30
2.2. ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ, ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ КОСТНОГО МОЗГА.....	32
2.2.1. Методика изготовления гистологических препаратов трепанобиоптатов костного мозга .....	32
2.2.2. Принципы описания кровяной ткани на основе гистологического исследования костного мозга .....	33
Клеточность костного мозга .....	33
Соотношение ростков миелопоэза в норме .....	33
Гистотопография эритроидного ростка в норме .....	33
Гистотопография и степень зрелости гранулоцитарного ростка в норме .....	34
Гистотопография мегакариоцитов в норме .....	34
Оценка морфологии мегакариоцитов.....	34
Другие компоненты гемопоэза .....	35
Строма костного мозга .....	35
Характеристика трабекулярной кости .....	36
2.3. ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.....	37
Методика гистохимического исследования .....	37
2.4. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.....	38
2.4.1. Методика иммуногистохимического исследования .....	39
2.5.1. ПЕРЕЧЕНЬ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ, ГИСТОХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ.....	39

2.5.2. МЕТОДИКА СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ .....	41
<b>ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>	<b>43</b>
3.1.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с ранней стадией истинной полицитемии .....	43
3.1.2. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с маскированной истинной полицитемией .....	52
3.1.3. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической истинной полицитемией .....	55
3.2.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с классической (развернутой) формой истинной полицитемии .....	61
3.2.2. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической и классической (развернутой) истинной полицитемией .....	63
3.3.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с вторичным эритроцитозом .....	69
3.3.2. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической, классической (развернутой) истинной полицитемией и вторичным эритроцитозом .....	74
3.4.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с МПН-Н, <i>JAK2</i> + .....	79
3.4.2. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической истинной полицитемией (ранней стадией) и МПН-Н, <i>JAK2</i> + .....	82
3.5. Динамика аллельной нагрузки мутации <i>JAK2</i> в группах пациентов с неклассической истинной полицитемией, МПН-Н, <i>JAK2</i> + без терапии и с применением циторедуктивной терапии .....	88
3.6. Клинический случай неклассической формы истинной полицитемии- маскированной формы .....	91
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>91</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>114</b>
Практические рекомендации .....	115
ВЫВОДЫ: .....	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	118
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	135

## Список используемых сокращений

АТФ-аденозинтрифосфат

аХМЛ - атипичный хронический миелоидный лейкоз

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения

ГСК - гемопоэтическая стволовая клетка

Г-КСФ - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ИГХ-исследование - иммуногистохимическое исследование (метод)

ИЛ - интерлейкин

ЛДГ - лактатдегидрогеназа

МДС - миелодиспластический синдром

МДС/МПН- новообразование из группы миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование

МПН–Н - миелопролиферативное новообразование, неклассифицируемое

Р – ЭПО - рецептор эритропоэтина

Р-ТПО - рецептор тромбопоэтина

СКФ - стволовой клеточный фактор (Stem Cell Factor- SCF)

ТПО –тромбопоэтин

УЗ-исследование- ультразвуковое исследование

ЭГДС-эзофагогастродуоденоскопия

ЭПО – сывороточный эритропоэтин

*ASXL1*- Additional Sex Combs Like 1, Transcriptional Regulator- дополнительный регулятор транскрипции половых комбинаций 1- ген, кодирующий белок группы Polycomb (PcG), участвующий в регуляции транскрипции ДНК

Bad- про-апоптотический Bcl-2-родственный белок

Bcl-2- B cell lymphoma/leukemia 2 – белок-регулятор апоптоза-2

*BCR-ABL1*- breakpoint cluster region protein- Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1- онкогенный химерный белок, состоящий из кластерного региона точечных разрывов (BCR) и гомолога 1 онкогена вируса мышиноного лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl)

*CALR* - ген, кодирующий кальретикулин

CD42b- Cluster of Differentiation 42b (тромбоцитарный гликопротеин Ib, альфа цепь)

CD71- Cluster of Differentiation 71 (рецептор трансферина 1)

IFN $\alpha$ - интерферон-альфа

*FLT3*- fms-подобная тирозинкиназа 3 (13q12) – ген, кодирующий рецептор тирозинкиназы

*GATA2*- ген, кодирующий белок-фактор транскрипции, регулирующий экспрессию многих генов в эмбриогенезе и участвующий в самоподдержании стволовых клеток различных тканей и систем, играющий ключевую роль в их развитии

Hb- гемоглобин

Ht- гематокрит

*JAK2*- ген, кодирующий тирозинкиназу- янус-ассоциированную киназу 2

KIT (c-Kit, CD117)- tyrosine-protein kinase- рецепторная тирозинкиназа

MPL- myeloproliferative leukemia protein (белок миелопролиферативного лейкоза), рецептор тромбопоэтина

*MPL*- ген, кодирующий белок- рецептор тромбопоэтина

NK-клетки- Natural killer cells- натуральные клетки-киллеры

*NRAS*- Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog-, ген, кодирующий трансформирующий белок N-Ras.

Ph- филадельфийская хромосома, образуется в результате реципрокной транслокации между 9 и 22 хромосомами с образованием химерного гена *BCR-ABL1*

Ph-негативное МПН- миелопролиферативное новообразование без наличия филадельфийской хромосомы (Ph-хромосома)

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase- фосфатидилинозитол-3-киназы

PVSG- Polycythemia Vera Study Group- международная исследовательская группа по изучению истинной полицитемии

RCM- red blood cell mass- масса циркулирующих эритроцитов

*SETBP1*- SET Binding Protein 1- ген, кодирующий белок, связывающий ядерный онкоген SET, который участвует в репликации ДНК

*SF3B1*- Splicing factor 3B subunit 1- фактор сплайсинга 3b, субъединица 1- ген, кодирующий белок, участвующий в сплайсинге пре-мРНК

Src Homology 2 (SH2) - Src- сокращение от «sarcoma» (саркома)- комплекс белков в консервативном некаталитическом регионе цитоплазматических киназ семейства Src и Fps

*SRSF2*- Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2- фактор сплайсинга, богатый серином и аргинином-1- ген, кодирующий белок, участвующий в сплайсинге пре-мРНК

STAT- signal transducer and activator of transcription (преобразователь сигнала и активатор транскрипции)

*TET2*- Tet methylcytosine dioxygenase 2 - ген, кодирующий фермент метилцитозиндиоксигеназу, которая катализирует превращение метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин

*TP53*- Tumor Protein P53- - ген, кодирующий опухолевый белок-супрессор , содержащий домены активации транскрипции, связывания ДНК и олигомеризации

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Ph-негативные миелопролиферативные новообразования (Ph-негативные МПН) представляют собой группу клональных миелоидных неоплазий, характеризующихся избыточной пролиферацией одного или нескольких ростков миелопоэза с цитозами в крови, и включают в себя классические формы: истинную полицитемию, эссенциальную тромбоцитемию, первичный миелофиброз, и миелопролиферативное новообразование, неклассифицируемое (МПН-Н). МПН-Н занимает особое место среди Ph-негативных МПН, и характеризуется клиническими, лабораторными и морфологическими признаками, присущими миелопролиферативным новообразованиям, но не соответствующими по главным и малым критериям какой-либо определенной нозологии данной группы [35, 68, 110]. К МПН-Н относят случаи ранних стадий миелопролиферативных новообразований, первичной диагностики миелопролиферативных новообразований на этапе миелофиброза/остеосклероза или бластной трансформации, а также миелопролиферативные новообразования, ассоциированные с опухолевыми или воспалительными заболеваниями. МПН-Н в среднем составляет 10-15% случаев, но имеет широкий диапазон частоты диагностики: от 5% до 15-30% от всех Ph-негативных МПН [20, 25, 71], главным образом, вследствие недостаточно разработанных критериев ранних стадий заболевания, представляющих особую трудность.

При диагностике миелопролиферативных новообразований в большинстве случаев определяются драйверные мутации *JAK2*, *CALR*, *MPL*, обладающие онкогенным потенциалом, которые происходят на уровне стволовой или коммитированной клетки-предшественницы и определяют клинические проявления миелопролиферативного новообразования [82, 108, 193]. Мутация *JAK2V617F* встречается в 96% случаев истинной полицитемии, в 50-65% случаев эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза. В 4% наблюдений при истинной полицитемии отмечается мутация *JAK2* (exon 12) [47, 138]. Около 10-15% случаев Ph-негативных МПН являются трипл-негативными (без наличия мутаций *JAK2*, *MPL*, *CALR*) [99]. Мутация *JAK2* имеет определяющее значение для активации рецепторов эритропоэтина, тромбопоэтина и гранулоцитарного ростового фактора, а аллельная нагрузка мутированного гена характеризует пролиферативный потенциал миелопролиферативных новообразований. Низкая плотность рецепторов эритропоэтина (Р-ЭПО), особенности конформационной структуры образованного после связи с ЭПО димера предопределяют низкий ответ на невысокую аллельную нагрузку [82]. В отличие от Р-ЭПО активация Р-ТПО вследствие мутации *JAK2* при всех трех нозологических формах Ph-негативных МПН является определяющей для появления пролиферации и атипичии мегакариоцитарного ростка в костном

мозге, что является «ключевым» морфологическим диагностическим признаком и обуславливает тромбоцитоз в дебюте заболевания. Вместе с тем, мутация *JAK2* не является патогномоничной для Ph-негативных МПН, и может встречаться при заболеваниях из группы миелодиспластический синдром/миелопролиферативное новообразование (МДС/МПН), составляя до 21% позитивных наблюдений [83, 122, 191], и миелодиспластических синдромах (МДС) [145, 166].

Формирование клинического и морфологического фенотипа при истинной полицитемии происходит при возрастании аллельной нагрузки мутантного клона *JAK2* и возникновении гомозиготного клона. Концепция постепенного формирования фенотипа Ph-негативных МПН с изменением нозологических форм существует на протяжении многих лет [71, 166]. Углубленное изучение молекулярного патогенеза миелопролиферативных новообразований, *JAK2*<sup>+</sup> возродило концепцию трансформации эссенциальной тромбоцитемии в истинную полицитемию [152, 171]. Вместе с тем, диагностика каждой нозологической формы базируется на сочетании комплекса клинических, лабораторных, гистологических, молекулярных признаков с выделением главных и малых критериев, в то время как учет исключительно молекулярных характеристик заболевания приводит к «размыванию» нозологических форм. Так, по мнению Barbui T. [22] истинная трансформация эссенциальной тромбоцитемии в истинную полицитемию при использовании критериев ВОЗ 2008 [191] не превышает 5%. Кроме того, клинический фенотип болезни и соответствующие ему нозологические формы формируются не только на основе имеющих онкогенный потенциал драйверных мутаций, их аллельной нагрузки, но и на основе комплекса возрастных, гендерных факторов, дополнительных молекулярных событий- соматических мутаций генов, к наиболее частым из которых при истинной полицитемии и эссенциальной тромбоцитемии относят мутации *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *SF3B1* [109, 169].

Гистологическое исследование трепанобиоптатов костного мозга было введено в главные критерии диагностики эссенциальной тромбоцитемии и первичного миелофиброза в классификации ВОЗ Опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей 2008 г. и отсутствовало для истинной полицитемии [191]. В новой редакции 4-го издания классификации ВОЗ Опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей 2017 года [192] исследование трепанобиоптата костного мозга введено в главные критерии диагностики истинной полицитемии. Кроме того, в ВОЗ 2017 изменены референсные значения для лабораторной диагностики истинной полицитемии: Hb >16.5 г/дл, Ht >49% - для мужчин и Hb > 16 г/дл, Ht >48% - для женщин. Помимо классической (развернутой) формы истинной полицитемии в литературе накапливаются данные о необходимости выделения вариантов неклассической (пре-



полицитемической) истинной полицитемии, а именно: ранней (начальной) стадии и маскированной (продромальной, латентной) формы, в том числе, протекающей с висцеральными тромбозами [6, 9, 23, 24, 27, 28, 93, 96]. Согласно литературным данным в настоящее время отсутствует четкое разделение на раннюю стадию и маскированную форму истинной полицитемии, нередко эти понятия используются как синонимы. Вместе с тем, ранняя стадия истинной полицитемии относится к начальным проявлениям Rh-негативных МПН и, возможно, чаще классифицируется как МПН-Н, в то время как маскированная форма истинной полицитемии, протекающая в части случаев с висцеральными тромбозами (вен портальной системы, мезентериальных вен, тромбозом собственных вен печени) спленомегалией, симптомами портальной гипертензии, кровотечениями из варикозно расширенных вен пищевода/желудка, является развернутой, но длительно и латентно протекающей истинной полицитемией с показателями Hb и Ht, не соответствующими референсным значениям для классической (развернутой) истинной полицитемии [29, 160].

Гистологические признаки неклассической истинной полицитемии на материале трепанобиоптатов костного мозга в настоящее время недостаточно изучены. При несоответствии морфологической картины трепанобиоптата костного мозга и данных гемограммы в патологоанатомической практике используется нозология МПН-Н. Так, патоморфологический диагноз «МПН-Н» в группе пациентов с маскированной истинной полицитемией, осложненной абдоминальными тромбозами, достигает 45% [91]. Совершенствование морфологических критериев ранних стадий различных нозологических форм Rh-негативных МПН, несомненно, позволит снизить частоту диагностики МПН-Н. В целях уточнения нозологической формы Rh-негативного МПН следует проводить трепанобиопсию костного мозга в дебюте заболевания, в то время как при исследовании трепанобиоптата костного мозга в динамике, в процессе проводимой по показаниям цитостатической терапии, верификация диагноза крайне затруднительна. К веским аргументам необходимости выполнения трепанобиопсии костного мозга на ранних стадиях миелопролиферативного новообразования, в том числе при истинной полицитемии, следует отнести необходимость оценки фиброза стромы в дебюте заболевания. Обнаружение фиброза стромы костного мозга на момент установления диагноза истинной полицитемии имеет особое неблагоприятное прогностическое значение с риском быстрой трансформации в пост-полицитемический миелофиброз. В целом частота трансформации в пост-полицитемический миелофиброз при истинной полицитемии составляет 17-20% при сроке наблюдения свыше 10 лет [30].

Таким образом, совершенствование критериев диагностики вариантов неклассической (ранней, маскированной) истинной полицитемии при исследовании трепанобиоптатов костного мозга необходимо для своевременного установления диагноза в целях стратификации пациентов по риску тромботических осложнений, разработки долгосрочной терапевтической тактики с учетом возраста пациента и соматического статуса. В свою очередь, разработка критериев морфологической диагностики неклассических форм истинной полицитемии в рамках ранних стадий миелопролиферативных новообразований позволит снизить частоту диагностики нозологии МПН-Н, что является актуальной задачей современной гематопатологии.

### **Цель исследования**

Разработка критериев диагностики неклассической истинной полицитемии, Ph-негативных миелопролиферативных новообразований, неклассифицируемых, *JAK2*<sup>+</sup> на основе исследования трепанобиоптатов костного мозга при сопоставлении с клиническими, лабораторными, инструментальными данными в дебюте заболевания.

### **Задачи исследования:**

1. Охарактеризовать и сопоставить клинические, лабораторные, морфологические признаки у пациентов с ранней и маскированной формами неклассической и классической (развернутой) истинной полицитемией, а также вторичным эритроцитозом.
2. Сопоставить характер экспрессии маркеров эритроидного и мегакариоцитарного ростков при ИГХ-исследовании на материале трепанобиоптатов костного мозга пациентов с неклассический, классической истинной полицитемией и вторичным эритроцитозом.
3. Охарактеризовать критерии дифференциальной диагностики МПН-Н с неклассической истинной полицитемией на материале трепанобиоптатов костного мозга, при сопоставлении с клинико-лабораторными, инструментальными данными.
4. Сопоставить данные молекулярного мониторинга аллельной нагрузки *JAK2V617F* у пациентов с неклассической истинной полицитемией, МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> без/ в процессе циторедуктивной терапии.

### **Положения выносимые на защиту**

1. Ранняя и маскированная формы неклассической истинной полицитемии характеризуются сходными патоморфологическими признаками с классической (развернутой) истинной полицитемией, но отличаются по лабораторным характеристикам - нормальным показателям Hb и Ht, изолированному тромбоцитозу, по частоте возникновения висцеральных венозных

тромбозов (19% против 5%). При маскированной форме истинной полицитемии, по сравнению с ранней стадией истинной полицитемии, чаще возникают тромбозы вен портальной системы (43% против 3,85%), у 14% пациентов диагностирован тромбоз собственных вен печени.

2. Иммуногистохимическое исследование, проведенное на парафиновом материале трепанобиоптатов костного мозга, при неклассической и классической истинной полицитемии позволило выявить признаки клазматоза клеток мегакариоцитарного ростка, что является дополнительным признаком при дифференциальной диагностике с реактивными изменениями миелопоэза (вторичным эритроцитозом).

3. На основе сопоставления морфологических, лабораторных и инструментальных параметров, с учетом критериев ВОЗ 2017, получены данные, позволяющие отнести раннюю стадию неклассической истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2+* к разным стадиям одного заболевания – истинной полицитемии.

### **Научная новизна**

При сопоставлении клинико-лабораторных, инструментальных и морфологических данных охарактеризованы ранняя и маскированная формы неклассической истинной полицитемии, выявлены различия по степени ретикулинового фиброза стромы костного мозга и частоте тромботических осложнений.

Данные сравнительного анализа морфологических, лабораторных и инструментальных параметров свидетельствуют в пользу того, что ранняя стадия истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2+*, с учетом выявленных различий по клеточности костного мозга и выраженности гранулоцитарного ростка, являются разными этапами одного заболевания – истинной полицитемии.

### **Теоретическое и практическое значение**

По клиническим, лабораторным данным и морфологическим признакам охарактеризованы ранняя стадия и маскированная форма неклассической истинной полицитемии, выявлены различия по степени ретикулинового фиброза стромы костного мозга, частоте возникновения тромбозов вен портальной системы, тромбозов собственных вен печени, что определяет особенности течения заболевания.

Использование результатов проведенной работы позволит на ранних этапах миелопролиферативного новообразования установить диагноз неклассической истинной полицитемии, своевременно оценить риск тромботических осложнений, разработать долгосрочные терапевтические подходы.

Установленные критерии дифференциальной клинико-морфологической диагностики МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> позволят уточнять диагноз в дебюте заболевания и сузить использование данной нозологии в практической работе врача-гематолога и врача-патологоанатома. Использование полученных данных о морфологии диагностически важных форм мегакариоцитарного ростка (ЭТ-подобных форм, клеток с «кольцевидными» ядрами) при сопоставлении неклассической, классической истинной полицитемии, МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> позволят усовершенствовать патоморфологическую дифференциальную диагностику.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Регуляция гемопоэза в норме

Гемопоэз- это система кроветворной ткани со сбалансированной продукцией, дифференцировкой и элиминацией всех типов клеток крови.

Гемопоэз следует рассматривать как иерархически организованную систему, имеющую во главе гематопозитическую стволовую клетку (ГСК) с дальнейшей коммитацией, мультилинейной дифференцировкой, что сопровождается утратой пролиферативного потенциала, способности к самоподдержанию [40]. Гемопоэз находится под контролем растворимых и мембраносвязанных факторов, механизм действия которых опосредованно регулируется с помощью специфических трансмембранных рецепторов, участвующих во внутриклеточных сигналах посредством рекрутирования и активации определенных цитоплазматических молекул [40, 84].

Дифференцирующиеся клетки в иерархии гематопозитической системы делятся на две основные линии: лимфоидную и миелоидную. Лимфоидная популяция включает в себя В-клетки, Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK-клетки). К миелопоэзу относятся гранулоцитопоэз, эритроцитопоэз, моноцитопоэз и тромбоцитопоэз – процесс созревания с продукцией зрелых клеток 4-х ростков миелопоэза. Процесс созревания клеток миелоидной линии начинается с мультипотентной гематопозитической стволовой клетки. Критическую роль в дифференцировке мультипотентной гематопозитической стволовой клетки играет транскрипция генов, однако не существует какого-либо единого транскрипционного фактора, который сам по себе действует как «главный» регулятор выбора миелоидной дифференцировки. Таким образом, миелопоэз контролируется комбинированными эффектами нескольких ключевых факторов транскрипции.

Участвующие в миелопоэзе цитокины можно разделить по строению рецепторов на 4 основные группы:

- 1-Гематопозитиновые рецепторы I класса (ТПО-Р, ЭПО-Р, Г-КСФ и другие);
- 2- рецепторы с внутриклеточной тирозинкиназной активностью (FLT3, с-KIT);
- 3-рецепторы с общей  $\beta$ -субъединицей (ИЛ-3, ИЛ-5 и другие);
- 4-рецепторы с общей  $\gamma$ -субъединицей (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15, ИЛ-21) [14].

Несмотря на наличие комплексного взаимодействия регуляторных факторов, для большинства клеточных линий был идентифицирован главный регулятор цитокинов:

тромбопоэтин (ТПО) - для тромбоцитов, эритропоэтин (ЭПО)- для эритроидных клеток, ИЛ-15 для НК-клеток, Г-КСФ - для гранулоцитов [84, 123]. При этом необходимо отметить, что важную роль эти цитокины играют на стадии коммитированных клеток-предшественниц и более зрелых форм, но не в регуляции ГСК и мультипотентных клеток-предшественниц.

В ряде исследований была обнаружена причинно-следственная связь, показывающая, что цитокины ИЛ-6, ИЛ-3, ИЛ-11, *fms*-подобная тирозинкиназа 3 (FLT3), фактор стволовых клеток (СКФ) и ТПО, могут способствовать как пролиферации, так и ограничению самообновления, и увеличению количества ГСК [123, 128, 134, 149, 168]. Вместе с тем, ГСК не имеют специфических рецепторов к большинству цитокиновых лигандов или рецепторных нокаутов, и, таким образом, цитокиновая регуляция ГСК происходит в случае избытка цитокинов [56, 98].

Для поддержания существования и дальнейшей дифференцировки ГСК требуется система активации и ингибирования апоптоза. В эксперименте предотвращение апоптоза путем принудительной экспрессии Bcl-2 приводит к увеличению числа ГСК, что косвенно свидетельствует в пользу того, что гибель клеток обладает реципрокной связью в регуляции гомеостаза [53, 54]. Семейство Bcl-2 регулируется цитокинами и другими сигнальными молекулами, поддерживающими транскрипцию некоторых генов, необходимых для поддержания гомеостаза [103], но для дальнейшего поддержания жизнедеятельности ГСК необходима посттрансляционная регуляция, в которой участвуют Bad (про-апоптотный Bcl-2-родственный белок) [211], продукт фосфорилирования которого предотвращает ингибирование Bcl-xL [213], воздействуя на его мишени [43].

Белок гена KIT является рецептором тирозинкиназы, которая играет важную роль в клеточном росте и делении. Мутация в гене KIT (C-Kit, CD117) быстро приводит к развитию аномально ускоренной пролиферации клеток, несущих мутантный белок C-kit. Существуют две различные формы сплайсинга лиганда C-kit, также называемые стволовыми клеточными факторами (СКФ): трансмембранно связанная и растворимая формы. Согласно результатам исследований стимуляция трансмембранно связанной формы, лишенной точки протеолитического расщепления, приводит к устойчивой активации рецептора C-kit, тогда как стимуляция растворимой формы приводит к быстрой активации и аутофосфорилированию рецептора [112, 129].

Рецептор C-kit является ключевым контрольным рецептором для различных клеточных популяций, включая гемопоэтические стволовые клетки, мастоциты, меланоциты и герминальные клетки [146]. Мутации, снижающие функционирование рецепторов C-kit, у людей приводят к пиебальдизму (неполному альбинизму) [162], с аномальной пигментацией волос и кожи, глухотой и мегаколоном. Мутации, связанные с усилением функционирования

рецепторов C-kit, были обнаружены при различных опухолевых новообразованиях человека, таких как стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта (ГИСТ), опухоли яичников и мелкоклеточный рак легкого [75, 92]. Роль C-kit в регулировании ГСК связана с высоким уровнем экспрессии рецепторов на ГСК [78, 119, 146], способностью функционировать как фактор выживаемости ГСК [86, 102], в том числе, в синергизме с другими цитокинами, опосредующими жизнедеятельность ГСК [112]. Стоит отметить, что у людей с дефицитом C-kit не обнаружено дефектов гемопоэтической ткани [112], следовательно, мутация C-kit может играть менее значимую роль в гемопоэзе, чем предполагалось ранее.

ТПО-рецептор c-MPL относится к семейству рецепторов гемопоэтического фактора роста I типа [85]. Первоначально сообщалось, что ТПО является эксклюзивным регулятором продукции мегакариоцитов и тромбоцитов, также как ЭПО - для клеток эритроидного ростка [50, 72, 84, 85]. Важная роль ТПО в регуляции ГСК была предположена на основе высокого уровня экспрессии c-MPL на ГСК [34, 159]. В более поздних и детальных исследованиях было показано, что мыши с дефицитом ТПО или c-MPL, имеют сниженное количество и/или снижение функций ГСК [61, 90, 157], что свидетельствует о решающей роли ТПО в регулировании ГСК. Необходимо отметить, что у пациентов с врожденной амегакариоцитарной тромбоцитопенией с отсутствием функциональных мутаций в рецепторе c-MPL, развивается многоуровневый дефицит ранних гемопоэтических клеток и, как следствие, апластическая анемия в течение 2 лет после рождения [21, 159].

Рецепторные белки-тирозинкиназы FLT3 и C-kit, имеют сходную структуру. Стимуляция c-Kit его лигандом приводит к димеризации рецепторов, активации внутренней активности тирозинкиназы и фосфорилированию ключевых остатков тирозина в рецепторе. Эти фосфорилированные остатки тирозина служат сайтами стыковки для ряда молекул сигнальной трансдукции, содержащих домены Src Homology 2 (SH2), которые многократно активируются посредством фосфорилирования рецептора. Как следствие, различные внутриклеточные сигнальные молекулы активируют различные внутриклеточные сигнальные пути, например, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt), Janus kinases (JAK-STAT), что приводит к пролиферации ГСК [104, 112, 158].

Семейство гемопоэтического рецептора типа I, включая c-MPL, не обладает собственной активностью тирозинкиназ в отличие от семейства рецепторных тирозинкиназ, и поэтому зависит от ассоциации с несколькими членами различных семейств цитоплазматических тирозинкиназ [85]. В случае передачи сигналов от ТПО-рецепторов связывание ТПО с c-MPL приводит к гомодимеризации рецептора и последующей активации JAK-киназ, которые, в свою

очередь, активируют молекулы, которые способствуют пролиферации клеток, включая STAT, PI3K и другие [50]. Таким образом, регуляция гемопоэза - сложная и многоуровневая система.

## 1.2. Клональный гемопоэз неопределенного потенциала

Клональный гемопоэз неопределенного потенциала (КГНП)- это феномен, ассоциированный со старением организма, при котором дополнительные соматические мутации в коммитированных клетках-предшественницах гемопоэза приводят к формированию нескольких минорных клонов, экспансия которых постепенно может вытеснить нормальный миелопоэз [210]. Это явление, по предварительным оценкам, практически отсутствует у детей, но встречается более чем у 10% возрастной группы людей 70 лет и старше [210]. КГНП не характеризуется какими-либо клиническими проявлениями и может персистировать в течение многих лет. Кроме того, наличие в анамнезе лучевой терапии коррелирует с развитием клонального гемопоэза, а при условии продолжительного применения цитотоксической химиотерапии приобретенные мутации с онкогенным потенциалом способствуют пролиферации аномальных клонов, что может привести к последующему клональному заболеванию системы крови [156].

Понятие КГНП основано на наличии, по крайней мере, одной соматической мутации (чаще *TET2*, *SF3B1*) при отсутствии гематологического заболевания, цитопении или морфологических признаков дисплазии, то есть при отсутствии критериев для установления диагноза какой-либо нозологической формы миелоидной неоплазии [165]. Необходимо подчеркнуть, что аллельная нагрузка обнаруженных соматических мутаций должна составлять не менее 2% [198].

В настоящее время выделяют следующие основные группы генов, участвующие и определяющие патогенез миелоидных опухолей:

1. гены, участвующие в эпигенетической регуляции: *TET2*, *ASXL1* и другие [51, 64, 100, 116].

Мутации в генах этой группы являются распространенными факторами клонального гемопоэза у лиц старшей возрастной группы без клинических проявлений гематологического заболевания. Полученные клинические и экспериментальные данные подтверждают то, что эти мутации коррелируют с частотой возникновения предопухолевых клонов, которые часто появляются у людей старшей возрастной группы, а также после воздействия химиолучевой терапии [45, 64, 81, 154].



2. Гены, участвующие в сплайсинге РНК- *SF3B1*, *SRSF2* и другие.

Мутации *SF3B1*, *SRSF2* встречаются у более 50% пациентов, страдающих миелоидными новообразованиями с миелодисплазией [62, 137], и часто являются ранними событиями. Аллельная нагрузка обычно составляет от 40% до 50%. Мутации *SF3B1* чаще определяются у пациентов с МДС с кольцевыми сидеробластами. Кроме этого, была обнаружена корреляция между аномальным сплайсингом генов-мишеней и патофизиологией заболевания [114, 115]. Мутации *SRSF2* были обнаружены приблизительно у половины пациентов с ХММЛ [121, 212].

3. Гены-опухолевые супрессоры: *TP53*, транскрипционные факторы *GATA2* и другие.

Мутации *TP53* обнаруживаются почти во всех нозологиях миелоидных новообразований, ассоциированы со сложным кариотипом, предшествующей терапией, и неблагоприятным клиническим исходом [45, 69, 167].

4. Гены, участвующие в сигнальных путях: *NRAS*, *MPL*, *FLT3*, *KIT*, *JAK2* и другие.

В большинстве случаев- это субклональные генетические события, способствующие прогрессированию заболевания [73, 136, 204].

Пациенты с КГНП имеют повышенный риск развития клональных заболеваний гемопоэтической природы, примерно в 10 раз превышают популяционный риск, при этом совокупный риск прогрессии в опухоль гемопоэтической природы составляет приблизительно от 0,5% до 1% в год. КГНП также коррелирует с увеличением риска инфаркта миокарда, возможно, играет функциональную роль в патогенезе атеросклероза. Пациенты с КГНП, которые получают терапию по поводу солидных опухолей, имеют повышенный риск прогрессии КГНП в миелоидные неоплазии и повышенную общую смертность [52].

Пациенты с КГНП с мутацией *JAK2*, у которых не установлен диагноз миелопролиферативного новообразования, имеют повышенный (примерно 12-кратный) риск появления тромбозов [208]. В литературе присутствуют экспериментальные данные на мышиных моделях о корреляции мутации *JAK2* с прогрессией атеросклероза [205].

Необходимо отметить, что последние годы увеличивается частота обнаружения КГНП у беременных женщин. Это, в первую очередь, связано с увеличением среднего возраста рожениц как в популяции многих развитых стран, так и в Российской Федерации [11, 17, 62, 105, 206]. Одним из главных факторов нормального развития плода является наличие удовлетворительного кровотока в матке, физиологически достаточное развитие плаценты. Такие осложнения беременности как задержка внутриутробного развития, отслойка плаценты, преэклампсия и другие, непосредственно связаны с маточно-плацентарной дисфункцией [3, 4, 18], и являются причинами потерь плода у женщин с клинически манифестирующим *JAK2+*

миелопролиферативными новообразованиями [77]. Учитывая, что мутация *JAK2V617F* является одной из самых часто выявляемых при КГНП [176], нашими соотечественниками было проведено исследование, позволившее установить, что при отсутствии клинических признаков миелопролиферативного новообразования у 0,4% (6/1532) беременных женщин был обнаружен *JAK2*-КГНП. При этом результаты гемограммы не выходили за пределы нормальных значений, за исключением сниженного уровня гемоглобина (в среднем 111 г/л) [12]. При ретроспективном анализе медицинской документации у трех из шести пациенток данной группы диагностировали гестационную гипертензию или преэклампсию, что послужило причиной проведения операции кесарева сечения [12].

В одной из отечественных работ, посвященных КГНП, мутация *JAK2V617F* была выявлена у 0,7% (7/986) пациентов в рамках профилактического осмотра, то есть клинические проявления, которые могли бы послужить причиной для обращения за медицинской помощью, у данной когорты пациентов на момент скрининга отсутствовали. При этом возраст пациентов (986 человек), чьи образцы крови были использованы в данном исследовании, превышал 45 лет. Медиана возраста пациентов наличием *JAK2V617F*-КГНП составляла 58 лет, в 43% случаев (3/7 пациентов) показатели гемограммы были в пределах нормальных значений [13]. Таким образом, проведение скрининга на наличие КГНП, в частности на наличие мутации *JAK2*, способствовало бы выделению группы пациентов повышенного риска тромботических осложнений с возможностью тщательного мониторинга.

### **1.3. Драйверная мутация *JAK2***

#### **1.3.1. Мутация *JAK2V617F***

К 2005 году были опубликованы первые данные, описывающие мутацию *JAK2V617F* у пациентов с истинной полицитемией, эссенциальной тромбоцитемией, первичным миелофиброзом [66, 82, 101, 171].

Для понимания важности данного открытия следует остановиться на биологии фермента янус-киназа и рассмотреть ее подробнее. Тирозинкиназа является одним из важнейших звеньев в системе передачи внутриклеточных сигналов и представляет собой фермент, присоединяющий фосфат от АТФ к остаткам тирозина специфических клеточных белков-мишеней [73]. Поверхностные рецепторы, которые воспринимают внеклеточные факторы "информируют" клетку: возникающий на клеточной мембране импульс усиливается и передается внутрь клетки по определенным сигнальным цепям. За этим следует «ответ» клетки на сигнальный стимул,

что представляет собой все многообразие ответных реакций в зависимости от функции клетки в биологической иерархии. Таким образом, основными молекулярными принципами, на которых базируется механизм передачи сигналов в клетке, являются специфическая ассоциация белков и их фосфорилирование-дефосфорилирование.

Наиболее подробно из белков, вовлеченных в процессы фосфорилирования и регулирования клеточного роста и дифференцировки, исследованы тирозин-специфичные протеинкиназы. Семейство тирозин-специфических протеинкиназ относится к каталитическим белкам-рецепторам. Ген *JAK2* расположен на 9-й хромосоме (9p24) и кодирует протеиновую тирозинкиназу JAK2, которая, входит в группу янус-протеинкиназ (JAK1, JAK2, JAK3, JAK4). Отличительной чертой тирозинкиназы JAK2 от других JAK-киназ является отсутствие Src-гомологичных связывающих доменов (SH2/SH3) и наличие до семи доменов гомологии JAK (JH1-JH7), причем терминальные JH-домены сохраняют высокий показатель гомологии с доменами тирозинкиназы. Важно отметить, что только один из этих карбокси-концевых доменов (JH1) сохраняет полную киназную активность, тогда как другой - JH2, как ранее предполагалось не имеющий киназной активности и называемый доменом псевдокиназы, оказался каталитически активным, хотя и на уровне всего 10% по сравнению с доменом JH1 [129, 195]. Тирозинкиназы JAK оказывают влияние на дальнейшее фосфорилирование факторов транскрипции, которые называются STAT (преобразователь сигнала и активатор транскрипции) в сигнальном пути JAK-STAT. Путь JAK-STAT является одним из основных, с помощью которого факторы роста и рецепторы цитокинов передают внутриклеточные сигналы, посредством чего происходит регулирование пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза и выживания клеток [107]. При этом «выключение» только киназного домена JH1 уменьшало способность киназы к фосфорилированию STAT, тогда как инактивация домена JH2 вызывала повышенную ферментативную активность. Таким образом стало очевидным, что домен STAT SH2 необходим для взаимодействия с JAK2 и наличия домена JAK2 достаточно для кооперации JAK2-STAT [63].

Приобретенная мутация гена *JAK2*- *JAK2V617F* происходит в пределах псевдокиназного домена JH2 и вызывает аутоингибирование домена JH1, что приводит к конститутивному аутофосфорилированию, то есть самоактивации тирозинкиназы и постоянной передаче активирующих сигналов в рамках STAT-сигнального пути. Данная мутация в цитокин-зависимых гематопоетических клеточных линиях вызывает каскадную активацию JAK/STAT-сигнального пути посредством взаимодействия интактных областей домена SH2 с цитозольными доменами рецепторов цитокинов [63, 163], в частности, Р-ТПО и/или Р-ЭПО.

Таким образом, мутация *JAK2V617F* является важным фактором молекулярного патогенеза Ph-негативных миелопролиферативных новообразований.

Однако при всей значимости проведенных исследований в отношении молекулярного патогенеза Ph-негативных миелопролиферативных новообразований, мутация *JAK2* не является специфичной и может определяться при различных нозологиях [151, 197].

Первоначальные описания мутации *JAK2V617F* при миелопролиферативных новообразованиях показали, что существуют их различные профили. Применение секвенирования по Сэнгеру позволило установить, что у некоторых пациентов наблюдается полное исчезновение аллеля дикого типа (гомозиготная мутация), в то время как у других пациентов наблюдаются гетерозиготные мутации [82]. Это можно объяснить митотической рекомбинацией [91]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что разные нозологии миелопролиферативных новообразований имели различные аллельные нагрузки [106, 142]. При этом у более половины пациентов с истинной полицитемией и фиброзной стадией первичного миелофиброза аллельная нагрузка *JAK2V617F* превышала 50%, а у большинства пациентов с эссенциальной тромбоцитемией и пре-фиброзной/ранней стадией первичного миелофиброза аллельная нагрузка составляла менее 50%. Анализ мутационного статуса, проведенный с помощью генотипирования колоний клеток, показал, что пациенты с истинной полицитемией имели смешанную популяцию клеток с гомозиготной и гетерозиготной мутацией, в то время как у пациентов с эссенциальной тромбоцитемией были почти исключительно клетки с гетерозиготной мутацией, что объясняет, почему аллельная нагрузка у данной когорты была в целом менее 50% [152]. Однако у некоторых пациентов с истинной полицитемией с гомозиготной мутацией аллельная нагрузка *JAK2V617F* была менее 50%, что указывает на то, что термин «гетерозиготный», иногда используемый для обозначения мутационного статуса у подобных пациентов, неуместен. Следовательно, нагрузка *JAK2V617F* выше 50% указывает на то, что только часть исследованных клеток имеют гомозиготную мутацию.

Клональная эволюция истинной полицитемии в пост-полицитемический миелофиброз может быть обусловлена увеличением аллельной нагрузки *JAK2V617F* [19]. Показатель аллельной нагрузки *JAK2V617F* также может иметь прогностическое значение: больные с истинной полицитемией с высокой аллельной нагрузкой *JAK2V617F* с большей вероятностью будут прогрессировать в пост-полицитемический миелофиброз, иметь тромботические осложнения и более высокие уровни гемоглобина, количества лейкоцитов, но невысокий показатель количества тромбоцитов и не резко выраженную спленомегалию [199].

### 1.3.2. Мутация *JAK2* экзон 12

Мутация *JAK2V617F* определяется примерно в 96% случаев истинной полицитемии, но у небольшого процента пациентов, которые отвечают критериям диагностики истинной полицитемии, мутация *JAK2V617F* может отсутствовать. Исследование образцов крови этих пациентов выявило наличие нескольких различных мутаций в экзоне 12 гена *JAK2* [138, 151]. Данные мутации были обнаружены у пациентов с гиперплазией эритроидного ростка и сниженным уровнем ЭПО в сыворотке крови. Кроме того, эндогенные эритроидные колонии могут быть выращены из образцов крови пациента с данными мутациями в отсутствие ЭПО [151].

В научной литературе сообщалось о множестве мутаций в экзоне 12 гена *JAK2*, представляющих собой замены, делеции, вставки и дупликации, которые происходят в 44 нуклеотидной области гена *JAK2*. Наиболее часто встречающиеся мутации- это небольшие делеции в рамке из 3–12 нуклеотидов, причем делеция из шести нуклеотидов является наиболее частой [141]. Мутации *JAK2* экзона 12 локализованы в области, близкой к домену псевдокиназы. Дальнейшие исследования показали, что мутация *JAK2* экзона 12 вызывает пролиферацию клеточных линий, сходную с эффектом мутации *JAK2V617F*, и может блокироваться ингибиторами JAK с фенотипическими различиями между V617F и экзоном 12 гена *JAK2*, что приводит к различной активации передачи сигналов JAK-STAT сигнального пути. Пациенты с мутацией *JAK2* экзона 12- чаще молодого возраста, причем примерно в 40% случаев миелопролиферативных новообразований регистрируются в возрасте до 50 лет [141, 151].

### 1.4. Ph-негативные МПН. Историческая справка. Основные понятия

История изучения миелопролиферативных новообразований началась в 1951 году после публикации статьи Dameshek W. в журнале Blood [48], что послужило основой отдельного направления в гематологии. Уже известные к тому времени хронический миелолейкоз, истинная полицитемия (болезнь Вакеза-Ослера [202, 135], эритремия), эссенциальная тромбоцитемия [57] и идиопатический миелофиброз (миелофиброз с миелоидной метаплазией, агногенная миелоидная метаплазия, болезнь Хейка-Ассмана, остеомиелофиброз) [76] были объединены в одну группу, которая получила название миелопролиферативных заболеваний (в

настоящее время- миелопролиферативные новообразования). 50-е годы XX столетия– этап активного фенотипического изучения миелопролиферативных новообразований. В последующем установление клональной природы этих заболеваний позволило вести в научную литературу термин «миелопролиферативные новообразования».

В 1960 году Nowell P. C. и Hungerford D. A. при исследовании хромосом клеток крови пациентов, страдающих хроническим миелолейкозом, заметили аномально короткую 22 хромосому, которую впоследствии назвали Филадельфийской хромосомой (Ph) [133]. Так хронический миелоидный лейкоз получил свой цитогенетический маркер, что решило проблему дифференциальной диагностики данной нозологии и дало возможность заложить основы для разделения миелопролиферативных новообразований на Ph-позитивные (хронический миелоидный лейкоз) и Ph-негативные.

Истинная полицитемия, первичный миелофиброз и эссенциальная тромбоцитемия, впоследствии были названы «классическими» Ph-негативными МПН. Миелопролиферативные новообразования до сегодняшнего дня представляют важную диагностическую проблему как для врачей-гематологов, так и для врачей-патологоанатомов.

В 70-х годах прошлого столетия появились описания германских и скандинавских патологов изменений костного мозга при различных вариантах миелопролиферативных новообразований, в частности, была охарактеризована гистотопография и морфологии клеток мегакариоцитарного ростка, введено понятие «атипии» мегакариоцитов [32, 39, 187]. Так, в 1976 и 1980 году группа европейских патологов во главе с Thiele J. и Georgii A. опубликовала исследования по миелопролиферативным новообразованиям, в которых были выделены истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия и хронический мегакариоцитарно-гранулоцитарный миелоз– подтип хронического миелолейкоза [65]. Это, в свою очередь, послужило основой для создания Ганноверской классификации миелопролиферативных новообразований [177, 179]. В 80-х годах появились первые работы по классификации миелопролиферативных новообразований с применением комплексного подхода к диагностике с учетом клинических, лабораторных, гистологических данных, были заложены патоморфологические основы для уточнения критериев диагностики истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии и агногенной миелоидной метаплазии (идиопатического миелофиброза, позднее - первичного миелофиброза) [96, 124, 177, 180, 184, 186].

### 1.4.1 Истинная полицитемия. История изучения. Клинические формы. Проблемы диагностики

В 1892 году Vaquez H. первым описал заболевание крови «polycythaemia vera», или «polycythaemia rubra vera» на примере болезни 40-летнего мужчины, страдающего от хронического цианоза, расширенных вен, головокружения, одышки, гепатоспленомегалии, сердцебиения и выраженного эритроцитоза [202, 203]. А в 1903 году Osler W. первым высказал предположение о том, что в основе болезни, вероятно, лежит гиперпродукция клеток крови костным мозгом, и выделил заболевание в отдельную нозологическую форму [135].

В 70-х годах прошлого столетия попытки систематизировать накопленные знания об истинной полицитемии привели к созданию первых диагностических рекомендаций. Так диагностические критерии Исследовательской группы по изучению истинной полицитемии (PVSG) в 1975 году основывались, в первую очередь (критерии А), на повышенном общем объеме эритроцитов, который для мужчин должен был превышать 36 мл/кг, для женщин составлять более 32 мл/кг (А1), нормальной сатурации кислорода  $\geq 92\%$  (А2), спленомегалии (А3) [32]. Второстепенными критериями (критерии В) являлись тромбоцитоз  $>400 \times 10^9/\text{л}$  (В1), лейкоцитоз  $>12 \times 10^9/\text{л}$  (В2), повышенный уровень щелочной фосфатазы лейкоцитов (В3) и повышенный уровень В12 в сыворотке крови или повышение связывающей способности несвязанного витамина В-12 (В4). Согласно критериям PVSG для установления диагноза истинной полицитемии PVSG необходимо было наличие всех трех А-признаков или двух первых А-признаков и любых двух В-признаков. При этом гистологическое исследование костного мозга в рамках диагностики истинной полицитемии не рассматривалось. Позднее, в 1996 году Британская группа по стандартам в области гематологии (BHSG) использовала в главных критериях (А1) лабораторный показатель – Ht (коррелирующий с объемом циркулирующих эритроцитов), или измерение массы циркулирующих эритроцитов (RCM) как более объективный метод оценки эритропоэза. Гистологическое исследование костного мозга также не учитывалось в диагностике. В 2001 году в классификации ВОЗ Опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей вместо показателя Ht учитывался показатель Hb, при сохранении исследования RCM как альтернативного показателя эритропоэза. Однако измерение RCM и на сегодняшний день остается трудоемким и дорогостоящим исследованием, поэтому уже в 2001 году в малые критерии (В3) было вынесено морфологическое исследование трепанобиоптата костного мозга для оценки состояния эритроидного ростка [79]. К этому моменту уже начался активный этап формирования морфологических критериев, характерных для истинной полицитемии, результаты которого были отражены в классификации ВОЗ 2008

года, и были выделены две основные формы истинной полицитемии: развернутая (классическая) истинная полицитемия и пост-полицитемический миелофиброз [127, 161, 170, 175, 191]. В этой же классификации нашли отражение данные о мутации гена *JAK2* [82]. Таким образом, в классификации ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей в 2008 диагностика истинной полицитемии включала в себя два больших критерия и один малый, или первый - большой критерий и два малых критерия [191]:

Большие критерии:

1. Гемоглобин >185 г/л у мужчин и >165 г/л у женщин, или другие признаки повышения циркулирующих эритроцитов; Ht >52% у мужчин и >48% у женщин.
2. Мутация гена *JAK2V617F* или в экзоне 12.

Малые критерии:

1. В трепанобиоптате костного мозга костного мозга определяется трехростковая гиперплазия (панмиелоз): усиление пролиферативной активности элементов эритроидного, гранулоцитарного, мегакариоцитарного ростков миелопоэза.
2. Показатель эритропоэтина (ЭПО) сыворотки ниже референсных значений.
3. Формирование эндогенных эритроидных колоний в культуре костномозговых клеток больного без добавления ЭПО.

К 2014 году, в связи с появлением данных о гиподиагностике истинной полицитемии [23, 24, 27, 95], было предложено пересмотреть диагностические критерии с выделением маскированной формы истинной полицитемии. Больные с данной формой истинной полицитемии, как правило, имеют нормальные или пограничные значения Hb и Ht, мутацию гена *JAK2*, низкий показатель сывороточного ЭПО в сыворотке крови [6, 82].

В новой редакции ВОЗ опухолей кроветворной и лимфоидной тканей 2017 года диагностические критерии истинной полицитемии претерпели следующие изменения:

- пороговый показатель гемоглобина у мужчин с 185 г/л снизился до 165 г/л, для женщин- со 165 г/л до 160 г/л;
- установлены пороговые значения гематокрита для мужчин (> 49%) и женщин (>48%);
- проведение трепанобиопсии костного мозга вынесено в большие критерии с сохранением тех же особенностей гистоархитектоники: выявление трехлинейной гиперплазии с пролиферацией эритроидного, гранулоцитарного и мегакариоцитарного ростков;
- наличие мутации *JAK2V617F* или *JAK2* в 12 экзоне.



-в малые критерии был вынесен низкий относительно нормальных значений показатель сывороточного ЭПО [192].

Клинические проявления истинной полицитемии неспецифичны, определяются у большинства больных. Пациенты предъявляют жалобы на усталость (88%), кожный зуд (62%), ночную потливость (52%), боли в костях (50%), повышение температуры тела (18%), снижение массы тела (31%) [8]. Данные жалобы объединяются в два основных синдрома: плеторический синдром (кожный зуд и синюшный оттенок кожи) и миелопролиферативный синдром (слабость, потливости, слабости, лихорадка, боли в костях). Зуд и утомляемость-наиболее частые симптомы, которые объективно снижают качество жизни пациентов [7, 60, 155]. Кожный зуд-это субъективное неприятное ощущение, характеризуемое пациентами как генерализованное чувство жжения, покалывания или пощипывания кожи, чаще возникающие после контакта с водой (аквагенный зуд). Зуд возникает вследствие раздражения нервных рецепторов кожи биологически активными веществами- цитокинами (фактор некроза опухолей  $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-3 [31], ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-11 [150] и др.), которые продуцируются у больных с истинной полицитемией в гораздо большем количестве. Ощущение зуда возникает на коже и слизистых оболочках, которые иннервируются центростремительными соматическими нервами с немиелиновыми и миелиновыми волокнами, берущими начало от дорсальных ганглиев спинного мозга. Оттуда импульс передается в вентрокаудальную часть медиального ядра, от которого идут восходящие пути к коре головного мозга [164].

У 35–45% пациентов определяется увеличение размеров селезенки (спленомегалия), которая приводит к появлению вторичных симптомов, таких как боль в животе, тяжесть в левом подреберье, чувство быстрого насыщения, тошнота, потеря массы тела. Спленомегалия может являться причиной сдавления органов брюшной полости, портальной гипертензии [171]. Тромбозы наблюдаются у 39% больных при установлении диагноза истинной полицитемии. Склонность пациентов с истинной полицитемией к портальной гипертензии, является следствием тромбозов воротной или собственных печеночных вен [1, 89, 132, 144, 214]. Однако портальная гипертензия может развиться и при отсутствии тромбозов. Основными причинами принято считать внутripеченочную непроходимость, являющуюся следствием экстрамедуллярного кроветворения в синусоидах или повышения портального кровотока, вторичного по отношению к спленомегалии [207].

Склонность больных с истинной полицитемией к кровотечениям и тромбозам является характерной особенностью данной нозологической группы [15]. Геморрагический синдром у этих больных может проявляться кровоточивостью десен (без каких-либо объективных причин), носовыми и другими кровотечениями. Геморрагический инсульт является причиной

смерти больных с истинной полицитемией в 39,6% наблюдений [10, 44, 174]. Склонность к кровотечениям объясняется преимущественно за счет приобретенного дефицита фактора Виллебранда, что является следствием повышения уровня тромбоцитов, на мембране которых и адсорбируются молекулы фактора Виллебранда, тем самым снижая его биодоступность в плазме крови [132].

Больные с истинной полицитемией имеют высокий риск прогрессирования заболевания с исходом в пост-полицитемический миелофиброз, что коррелирует с аллельной нагрузкой [173], а также во вторичный острый миелоидный лейкоз [42]. У больных с истинной полицитемией риск смерти в 1,6 раза выше, чем в общей популяции [201]. Частота трансформации истинной полицитемии в МДС/ вторичный острый лейкоз составляет от 5 до 15% в течение 10 лет заболевания. Пожилой возраст, женский пол, применение алкилирующих препаратов, лучевой или комбинированной терапии также являются факторами риска развития вторичного острого миелоидного лейкоза [59]. У больных с истинной полицитемией за этот же 10-летний период течения заболевания риск развития вторых опухолей составляет около 8% [140]. Все вышеперечисленное имеет чрезвычайно важное значение для медикаментозной тактики ведения пациентов.

При истинной полицитемии следует выделить следующие терапевтические подходы:

Для профилактики тромботических осложнений, в первую очередь, применяются антиагреганты, например, ацетилсалициловая кислота в дозе 40-325 мг/сут, тикагрелор- 90 мг/сут, клопидогрел- 75 мг/сут.

Для снижения избыточного количества циркулирующих эритроцитов применяют:

-физические методы: гемозекфузии (кровопускания) или эритроцитаферез (ручной или аппаратный);

-лекарственные средства: циторедуктивная терапия: гидроксикарбамид, препараты IFN $\alpha$ , пегилированный IFN $\alpha$ , бусульфан, руксолитиниб [58, 70, 88, 117, 200].

Критериями для оценки степени риска тромботических осложнений при истинной полицитемии являются возраст >60 лет, наличие в анамнезе тромбозов и сердечно-сосудистые факторы риска [7, 46]. Эти данные обосновывают необходимость установления диагноза у данной группы пациентов на ранней стадии заболевания с последующим назначением необходимой терапии.

### 1.4.2 Миелопролиферативное новообразование, неклассифицируемое

Данная нозологическая форма существовала самостоятельно уже в классификации ВОЗ 2008 [191], но при всем богатстве накопленных знаний в отношении миелопролиферативных новообразований в классификации ВОЗ опухолей гемопозитической и лимфоидной тканей 2017 года она все еще присутствует [28, 192].

Диагностические критерии МПН-Н в редакции классификации ВОЗ 2017 года [192] в сравнении с классификацией 2008 [191] года претерпели изменения, и на них необходимо более детально остановиться, так как в связи с изменившимися критериями диагностики истинной полицитемии, появляется высокая вероятность пересмотра диагноза МПН-Н у части пациентов.

Диагноз МПН-Н по классификации ВОЗ опухолей гемопозитической и лимфоидной тканей 2017 года может быть установлен в следующих случаях:

У данного пациента наблюдаются клинические, лабораторные, молекулярные и морфологические признаки миелопролиферативного новообразования, но отсутствуют критерии для установления какой-либо определенной нозологической формы. К данной категории диагнозов следует отнести случаи с маскированной формой истинной полицитемии, ранними стадиями первичного миелофиброза и эссенциальной тромбоцитемии, а также случаи со спленомегалией в дебюте. В эту же группу входят первичный миелофиброз, диагностированный на стадии фиброза стромы (MF-2 и более) без предшествующей диагностики первичного миелофиброза, а также случаи, где, наряду с доказанным миелопролиферативным новообразованием, присутствуют другие онкологические или воспалительные заболевания, имеющие схожие клинические или морфологические черты.

По данным классификации опухолей гемопозитической и лимфоидной тканей ВОЗ 2017 года [192] МПН-Н наблюдаются в 10-15% всех случаев миелопролиферативных новообразований, однако в повседневной диагностической работе диагностируются в широком диапазоне 5-30% от всех случаев Ph-негативных МПН [20, 25, 71].

Из всего вышесказанного следует предположение, что диагноз МПН-Н, несмотря на свою нозологическую характеристику, может быть впоследствии переклассифицирован в одну из других существующих нозологий Ph-негативных МПН (истинную полицитемию, первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию). Это может быть обусловлено, в частности, изменением гистологической картины заболевания, динамики гематологических показателей, особенностей течения заболевания, или выявлением/возрастанием аллельной нагрузки какой-либо специфической соматической мутации.

Данное положение подкрепляют результаты научного исследования 2013 года, авторы которого делают вывод о том, что среди нозологий Ph-негативных МПН истинная полицитемия характеризуется самой высокой мутационной аллельной нагрузкой в гене *JAK2*, составившей в крови- 56,88%, в костном мозге- 72,66% [139]. Эти данные позволяют оценивать возрастание в динамике мутационной аллельной нагрузки в гене *JAK2* как значимый фактор диагностики истинной полицитемии

Изменения в классификации ВОЗ 2017 года [192], уточняющие диагнозы истинной полицитемии и первичного миелофиброза, позволяют более четко использовать критерии для нозологии МПН-Н и сузить использование данной нозологии. Несмотря на высокий показатель совпадения диагнозов и воспроизводимости критериев диагностики нозологий Ph-негативных МПН (65-84%, в среднем 76% для всех нозологий группы миелопролиферативных новообразований), при сопоставлении экспертной и персональной оценки патологами при истинной полицитемии выявлен значительный уровень расхождения 40% [187] по критериям ВОЗ 2008 [191].

Таким образом, когорта пациентов с классической (развернутой) истинной полицитемией, для которой референсный показатель Hb соответствовал критериям ВОЗ 2008, пополнится пациентами с пониженными референсными показателями Hb согласно редакции классификации ВОЗ 2017 года [192], по сравнению с ВОЗ 2008 [191].

Диагностика первичного миелофиброза в новой редакции классификации ВОЗ 2017 [192] имеет целый ряд изменений: выделены 2 варианта– пре-фиброзная/ранняя и фиброзная стадия первичного миелофиброза с соответствующими большими и малыми критериями. Кроме того, гистологическое исследование костного мозга введено в главные критерии диагностики. В рамках исторической справки следует указать, что пре-фиброзная стадия первичного миелофиброза не была упомянута в критериях исследовательской группы по изучению истинной полицитемии (PVSG), а случаи с тромбоцитозом в дебюте заболевания относились к эссенциальной тромбоцитемии или истинной полицитемии. Учитывая сходство клинико-лабораторной манифестации эссенциальной тромбоцитемии, истинной полицитемии, пре-фиброзной и фиброзной стадий первичного миелофиброза, это создавало условия для смешения этих нозологий и неправильной диагностики. Так, по данным Thiele J. и Kvasnicka H. при пересмотре 839 случаев эссенциальной тромбоцитемии по критериям PVSG была диагностирована в 57,6% случаев, но лишь в 21,9% диагноз был подтвержден по критериям ВОЗ 2001 [182], в остальных случаях был диагностирован первичный миелофиброз [185]. Аналогичные данные были получены Gianelli U. с соавторами, так при пересмотре 116 случаев, диагностированных по критериям PVSG как эссенциальная тромбоцитемия, лишь в 19%

диагноз был подтвержден по критериям ВОЗ 2001 [66], в остальных случаях диагностирован первичный миелофиброз [113]. Вместе с тем, дискуссия по воспроизводимости морфологической диагностики Ph-негативных МПН, критериев диагностики ранних стадий миелопролиферативных новообразований продолжалась вплоть до выхода редакции 4-го издания классификации ВОЗ 2017 [20, 26, 36, 38, 66, 181, 188]. Так, группа европейских патологов (Buhr T. с соавторами) опубликовала данные, согласно которым МПН-Н, диагностируется гистологически более чем в половине случаев при отсутствии клинических и лабораторных данных на момент исследования трепанобиоптатов костного мозга. При комплексной диагностики с предоставлением клинических, анамнестических, лабораторных и молекулярных данных – МПН-Н диагностируется патологоанатомами в 23% случаев, в то время как обоснованность выделения пре-фиброзной стадии первичного миелофиброза отражается только в риске лейкемической трансформации [38]. Патологи из Франции во главе с Brousseau M., используя в своей работе критерии ВОЗ 2008 [36, 191], с учетом трудностей стандартизации критериев дифференциальной диагностики пре-фиброзной стадии первичного и эссенциальной тромбоцитемии, высказывали точку зрения о едином континууме *JAK2*-позитивных миелопролиферативных новообразований, фенотип которых определяется аллельной нагрузкой [80].

В диагностике эссенциальной тромбоцитемии в классификации ВОЗ 2017 [192] кардинальных изменений не произошло, но было уточнено, что ретикулиновый фиброз костного мозга должен быть менее grade 1 (<MF-1). В связи с этим в настоящее время актуальной задачей является диагностика и уточнение критериев ранних стадий истинной полицитемии. Снижение пороговых значений Hb и выделение маскированной истинной полицитемии позволили ввести в главные критерии гистологическое исследование трепанобиоптата костного мозга, а критерии гистологической диагностики миелопролиферативных новообразований были признаны воспроизводимыми в 78% [190].

Таким образом, критерии диагностики МПН-Н нуждаются в дальнейшем уточнении. Кроме того, в литературе отсутствуют данные по детальной характеристике группы пациентов с *JAK2*+ МПН-Н и их взаимоотношению с мало изученными ранними формами истинной полицитемии. Это является недостаточно разработанной проблемой и актуальной задачей настоящего исследования.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Алгоритм исследования. Формирование групп пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, *JAK2+*

Для формирования групп пациентов был отобран материал трепанобиоптатов 462 пациентов, обследованных и проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России за период с 2014 года по июнь 2017 года с обнаруженной мутацией *JAK2V617F* и диагнозом «Миелопролиферативное новообразование», установленным на основании критериев Классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2008 года [191]. В дальнейшем, при сопоставлении клинического течения заболевания, анамнестических данных, лабораторных данных и гистологического исследования, был исключен материал трепанобиоптатов костного мозга пациентов с *JAK2+* первичным миелофиброзом, пре-фиброзной/ранней и фиброзной стадией, *JAK2+* эссенциальной тромбоцитемией, а также с классической (развернутой) истинной полицитемией, с учетом новых пороговых значений Hb и Ht в соответствии с Классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей ВОЗ 2017 [192]. В результате пересмотра исследуемая когорта пациентов с наличием мутации *JAK2V617F*, пороговыми значениями Hb и Ht не соответствующими нозологии истинной полицитемии и при отсутствии клинико-лабораторных, анамнестических и морфологических признаков, характерных для других нозологий миелопролиферативных новообразований, составила 52 пациента. Среди 52-х пациентов были выделены группы с двумя формами неклассической полицитемии, включающие в себя раннюю стадию и маскированную форму. К ранней стадии истинной полицитемии были отнесены случаи с гистологической картиной в костном мозге, характерной для истинной полицитемии, но с клеточностью, не превышающей +20% от возрастной нормы [93, 96]. К маскированной форме истинной полицитемии были отнесены случаи с гиперклеточным костным мозгом, имеющие гистологические признаки истинной полицитемии, но лабораторными данными, не соответствующими по показателям Hb и Ht референсным значениям, установленным в классификации ВОЗ 2017 [192]. К группе пациентов с МПН-Н были отнесены случаи с обнаруженной мутацией *JAK2*, морфологической картиной миелопролиферативного новообразования без четких признаков, отвечающих какой-либо нозологической форме в рамках Ph-негативных МПН по критериям классификации ВОЗ 2017 [192].

Таким образом, при клинико-патоморфологическом сопоставлении из когорты 52 больных были сформированы следующие группы:

Группа 1- с неклассической истинной полицитемией- ранней стадией истинной полицитемии (28 пациентов).

Группа 2 - с неклассической истинной полицитемией- маскированной формой истинной полицитемии (14 пациентов).

Группа 3 - с миелопролиферативным новообразованием, неклассифицируемым, *JAK2+* (МПН-Н, *JAK2+*) (10 пациентов).

Для проведения сравнительного анализа в исследование были включены дополнительные 2 группы пациентов:

Группа 4- с классической (развернутой) формой истинной полицитемии (20 пациентов).

Группа 5- с вторичным (реактивным) эритроцитозом (10 пациентов, с отсутствием мутаций *JAK2V617F* и *JAK2* exon 12).

Дизайн исследования, включавший в себя материал трепанобиоптатов 82-х пациентов, входящих в состав 5 групп, представлен на схеме 1.

#### Дизайн исследования:



Схема 1. Дизайн исследования, с учетом клиничко-лабораторных, молекулярных данных, гистологического исследования трепанобиоптатов костного мозга.

Молекулярные исследования проведены в лаборатории молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. лаб. д.б.н. А.Б. Судариков). Выявление мутации *JAK2V617F* проводили с использованием метода количественной полимеразной цепной

реакции с обратными аллель-специфическими праймерами и единственным *mismatch*-нуклеотидом по разработанной методике Real-time [2].

## **2.2. Гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптатов костного мозга**

Гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследования выполнены на срезах с парафиновых блоков трепанобиоптатов костного мозга 82 больных в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. отд. д.б.н. А.М. Ковригина). Для проведения гистологического исследования использовалось окрашивание гематоксилином и эозином. Для оценки степени ретикулинового фиброза стромы костного мозга применялось гистохимическое окрашивание с использованием импрегнации серебром по Gomori.

### **2.2.1. Методика изготовления гистологических препаратов трепанобиоптатов костного мозга**

Материал трепанобиоптатов костного мозга фиксировался в 10% забуференном формалине в течение 12 часов. Последующая декальцинация проводилась в течение 10-12 часов в растворе муравьиной кислоты с дистиллированной водой и формальдегидом. Поэтапная проводка материала состояла из этапов обезвоживания в спиртах и насыщения формалином с использованием аппаратов автоматической обработки тканей TP1020 (Leica) и Logos J (Milestone). Далее биологический материал погружался в парафин с использованием модульного заливочного центра EG1160. Микротомия проводилась с использованием микротомов Leica RM2235, толщина среза составляла 3 мкм. Стандартная окраска гематоксилином и эозином была проведена с использованием аппарата Leica ST5020. Заключение гистологических стекол с окрашенными срезами под покровное стекло производилось в аппарате Leica CV5030. Микроскопическое исследование гистологических, гистохимических и иммуногистохимических препаратов проводилась на световом микроскопе Leica 4000.



## **2.2.2. Принципы описания кроветворной ткани на основе гистологического исследования костного мозга**

### **Клеточность костного мозга**

Клеточность костного мозга оценивалась по соотношению кроветворной и жировой ткани не менее чем в 5 костномозговых полостях, с учетом возраста пациента. Субкортикальные костномозговые полости (первые 2-3 костномозговых полости, располагающиеся непосредственно у кортикальной пластинки) для оценки клеточности костного мозга мало пригодны, поскольку в старших возрастных группах (>50 лет) выполнены жировой тканью, что является вариантом возрастной нормы, при условии, что у пациента отсутствует клональное заболевание системы крови [87, 118, 130, 194].

Костный мозг относится к нормоклеточному, если клеточность кроветворной ткани удовлетворяет критериям расчета по формуле: «100%-возраст пациента» (диапазон допустимых отклонений составляет +/-10%).

Костный мозг относится к гипоклеточному, если клеточность кроветворной ткани ниже порогового значения с учетом формулы: «100% - возраст пациента - 10%» или клеточность костного мозга менее 20% во всех возрастных группах.

Костный мозг относится к гиперклеточному, если клеточность кроветворной ткани превышает пороговое значение с учетом формулы: «100% - возраст пациента +10%».

Например, у пациента 60 лет нормоклеточным костный мозг считается в случае, если клеточность кроветворной ткани составляет 30-50% по отношению ко всей площади среза костномозговой полости (Приложение 1: рисунок 1); гипоклеточным- если клеточность составляет менее 30%; гиперклеточным- если клеточность кроветворной ткани более 50% [87, 118, 130, 194].

### **Соотношение ростков миелопоэза в норме**

В костном мозге соотношение гранулоцитарного и эритроидного ростков в норме составляет 3-4:1 (Приложение 1: рисунок 2).

При диспропорции в сторону увеличения, или снижения количества клеточных элементов гранулоцитарного или эритроидного ростков, используются термины «расширение» или «сужение», соответственно.

### **Гистотопография эритроидного ростка в норме**

Элементы эритроидного ростка в норме располагаются в виде довольно плотных кластеров (эритроидных островков) в костномозговых пространствах, видны часто рядом с синусоидными

сосудами. В кластерах преобладают элементы нормобластического типа на разных стадиях дифференцировки, эритробласты немногочисленны, мегалобластоидные формы обычно отсутствуют, или единичны (Приложение 1: рисунок 3).

### **Гистотопография и степень зрелости гранулоцитарного ростка в норме**

Элементы гранулоцитарного ростка у зон эндоста представлены незрелыми клетками (миелобластами) и промежуточными (промиелоциты) формами, располагающимися в 4-5 рядов. Отмечается периваскулярное расположение клеток промежуточного пула в так называемой средней линии вне зон эндоста. Ближе к центру костномозговой полости располагаются клеточные элементы зрелого пула. В норме соотношение зрелых форм гранулоцитов и элементов промежуточного пула составляет 4:1 (Приложение 1: рисунок 4).

### **Гистотопография мегакариоцитов в норме**

В норме количество мегакариоцитов в костномозговой полости составляет 6-8 клеток; если костномозговая полость большая, то допустимо количество 10 клеток на костномозговую полость. При изменении количества мегакариоцитов свыше 10-12 клеток на полость используется термин «пролиферация» мегакариоцитарного ростка. В норме мегакариоциты располагаются межтрабекулярно и разрозненно.

В случае, если мегакариоциты располагаются группой 3 и более клеток, в описании трепанобиоптата костного мозга используется термин «кластер» - рыхлый или плотный. К рыхлому кластеру относят группу мегакариоцитов из 3-х и более клеток при наличии между мегакариоцитами хотя бы одной клетки другой линии гемопоэза. К плотному кластеру относят группу мегакариоцитов из 3-х и более клеток, если мегакариоциты плотно прилегают друг к другу по типу «булыжной мостовой», и между ними нет ни одной клетки другой линии гемопоэза.

Если мегакариоциты располагаются вплотную к костной балке, такую гистотопографию относят к паратрабекулярному расположению мегакариоцитов.

Если мегакариоцит располагается рядом с костной балкой, но между ними располагается несколько клеток другого ростка миелопоэза, используется термин «тенденция к паратрабекулярному расположению» (Приложение 1: рисунок 5).

### **Оценка морфологии мегакариоцитов**

Мегакариоциты с обычной/нормальной морфологией – это клетки среднего размера (30-70 мкм, в зависимости от степени зрелости) с количеством сегментов ядра от 4 до 6, с ядерно-цитоплазматическим соотношением, сдвинутым в пользу цитоплазмы не менее чем 1:2. В

норме мегакариоциты расположены разрозненно межтрабекулярно, часть из них – вблизи синусов.

Понятие «дисмегакариоцитопоз» включает в себя такие особенности морфологии мегакариоцитов как монолобулярное, билобулярное или фрагментированное ядро, микроформы (Приложение 1, рисунок 6). Размер клеток при этом чаще небольшой. Ядерно-цитоплазматическое соотношение, как правило, нарушено в пользу ядра. Подобная морфология мегакариоцитов как признак дисмегакариоцитопоза характерен для МДС.

Понятие «атипии» мегакариоцитов характеризуется гипер- или гиполобулярностью ядра, часто крупными или гигантскими размерами клеток со сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу ядра. Мегакариоциты с подобной морфологией встречаются у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями, МДС/МПН (Приложение 1: рисунок 7, рисунок 8).

Ядро мегакариоцитов может иметь форму в виде «рогов оленя», что относилось к патогномичным признакам при эссенциальной тромбоцитемии (Приложение 1: рисунок 9) [209] или кольцевидную форму, что считалось характерным для истинной полицитемии (Приложение 1: рисунок 10) [125, 127, 183].

Эмпериопоз мегакариоцитов- это включение в цитоплазме мегакариоцита клетки другой гемопоэтической линии (чаще, зрелых гранулоцитов (Приложение 1: рисунок 11).

### **Другие компоненты гемопоэза**

При описании гемопоэза учитывается количество и расположение клеток лимфоидного ряда. В норме мелкие лимфоидные клетки определяются в небольшом количестве, располагаются интерстициально разрозненно. Зрелые плазматические клетки определяются также в небольшом количестве, расположенные разрозненно и в виде периваскулярных скоплений. В старшей возрастной группе количество лимфоидных клеток увеличивается. Вариантом нормы считается наличие отдельных компактных четко очерченных лимфоидных очажков реактивного характера, состоящих из мелких лимфоидных клеток с примесью плазмоцитов, располагающихся межтрабекулярно, с неширокими или без светлых центров размножения, в центре определяется «питающий» сосуд капиллярного типа (Приложение 1: рисунок 12).

### **Строма костного мозга**

Костный мозг хорошо васкуляризирован. При описании костного мозга учитываются состояние сосудов капиллярного и синусоидного типа, артериолярных сосудов. Синусы в норме могут быть спавшимися или расширенными, полнокровными или пустыми. При

миелопролиферативном новообразовании, в синусах могут присутствовать мегакариоциты (Приложение 1: рисунок 13).

При описании стромы используются такие параметры как признаки отека, серозной атрофии, наличие гемосидероза (отложение гранул гемосидерина), и степень ретикулинового (коллагенового) фиброза.

### **Характеристика трабекулярной кости**

В описании трепанобиоптата костного мозга необходимо оценить состояние трабекулярной кости, что имеет для пациентов разных возрастных групп важное диагностическое значение. У пациентов молодого возраста (женщины в среднем- 18-21 года, мужчины в среднем- 18-25 лет) формирование костной ткани не завершено, это выражается в выявлении признаков новообразования кости- напластование остеоида на эндост с увеличенным количеством остеобластов. В норме толщина костной балки не должна быть менее размера двух жировых клеток (липоцитов) костного мозга. При уменьшении толщины костных балок следует говорить о признаках остеопении. Если костные балки не имеют «связи» между собой и как бы «подвешены» в костном мозге (так называемые висячие балки)- следует высказываться о признаках остеопении. При оценке состояния костных балок учитываются признаки резорбции («рассасывания») костной ткани (очаговой или гладкой), признаки перестройки (напластование остеоида на эндост с участками утолщения костных балок). На светооптическом уровне можно определить также наличие остеосклероза и его степень, что выражается в «расслоении», «почковании» костной балки, формировании «выростов» и «крючков». В зависимости от степени выраженности подобных изменений степень остеосклероза оценивалась с учетом рекомендаций Европейского Консенсуса 2005 г [183] и результатов работы объединенной группы патологов во главе с Kvasnicka H. [94]:

Остеосклероз grade 0- костные трабекулы обычного гистологического строения, относительно возрастной нормы;

Остеосклероз grade 1- Очаговое «почкование», «крючки», «шипы» или напластование остеоида на эндост с признаками паратрабекулярного формирования новой кости;

Остеосклероз grade 2- Диффузное паратрабекулярное формирование новой кости с утолщением трабекул, иногда с их очаговыми соединениями с признаками сужения костномозговых полостей;

Остеосклероз grade 3- Обширная взаимосвязанная сеть новообразованной кости с выраженным очаговым или тотальным сужением костномозговых полостей.

### 2.3. Гистохимическое исследование

Для оценки степени ретикулинового фиброза стромы в трепанобиоптатах костного мозга применялось гистохимическое исследование с применением импрегнации серебром по Gomori.

#### Методика гистохимического исследования

Депарафинированный срез помещали в дистиллированную воду. Наносили по 5 капель раствора перманганата калия и активирующего кислотного буфера на 5 минут и промывали в дистиллированной воде. Наносили 10 капель раствора щавелевой кислоты на 3 минуты и затем промывали в дистиллированной воде. Наносили 10 капель раствора ферроаммония сульфата на 3 минуты и промывали в дистиллированной воде дважды. Наносили 10 капель раствора серебра в аммиаке на 3 минуты, промывали в дистиллированной воде. Наносили 5 капель нейтрального раствора формалина на 5 минут, промывали в дистиллированной воде дважды. Наносили 10 капель фиксирующего раствора гипосульфита натрия серебра в аммиаке на 5 минут. Промывали в водопроводной воде в течение 5 минут. Дегидратировали, просветляли, заключали под покровное стекло.

Критерии оценки степени ретикулинового фиброза:

Степень ретикулинового фиброза стромы оценивалась по критериям ВОЗ, 2017 [192], которые основываются на рекомендациях Европейского Консенсуса по оценке степени фиброза стромы костного мозга [183] и модифицированных критериях объединенной группы европейских патологов [94]:

Степень фиброза стромы MF-0 устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна отсутствовали, или имелись отдельные разрозненно расположенные тонкие ретикулиновые волокна. (Приложение 1: рисунок 14).

Степень фиброза стромы MF-0 с участками MF-1 <30% устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна располагались в увеличенном количестве, но не формировали перекрестов или «сетки». (Приложение 1: рисунок 15).

Степень фиброза стромы MF-1 устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна формировали перекресты или «нежную сетку» вокруг клеточных элементов (Приложение 1: рисунок 16).

Степень фиброза стромы MF-2 устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна формировали плотную диффузную «сетку» вокруг клеточных элементов. (Приложение 1: рисунок 17).

Степень фиброза стромы MF-2 с фокусами MF-3 <30% устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна формировали отчетливую «жесткую» сетку вокруг клеточных элементов с отдельными участками коллагенового фиброза в виде толстых желтоватых параллельных волокон и/или остеосклероза. (Приложение 1: рисунок 18).

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-3 устанавливалась в случае, если ретикулиновые волокна формировали диффузную и плотную «жесткую» сетку вокруг клеточных элементов с грубыми пучками коллагеновых волокон, обычно ассоциированных с остеосклерозом (Приложение 1: рисунок 19).

#### 2.4. Иммуногистохимическое исследование

Для объективизации гистоархитектоники и полуколичественной оценки элементов мегакариоцитарного ростка и эритроидного ростков было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b и CD71 с использованием иммуностейнера Leica Bond-Max. Характеристика антител представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика антител, примененных в исследовании.

Название антитела	Клон	Разведение	Производитель	Визуализация
CD42b	42C01	1:100	Thermo Fisher	Цитоплазма и мембрана мегакариоцитов, мегакариобластов
CD71	10F11	1:20	Thermo Fisher	Мембрана клеток эритроидного ряда, преимущественно незрелого пула

При ИГХ-исследовании с антителами к CD42b определяются мелкие фрагменты цитоплазмы мегакариоцитов – явления клазматоза.

### **2.4.1. Методика иммуногистохимического исследования**

С парафиновых блоков с помощью микротомы Leica RM2235 выполняли срезы толщиной 3 мкм и монтировали на предметные положительно заряженные стекла Leica Bond Plus Slides. Стекла высушивали при температуре 37°C в течение 12 часов, затем инкубировали при температуре 60°C в течение 30-60 мин. Окрашивание проводилось на иммуностейнере Leica Bond-Max по стандартной методике «IHC protocol F» с применением демаскировочного буфера Bond Epitope Retrieval Solution 1 (pH 6,0) и системы детекции Bond Polymer Refine Detection. Титр наносимых антител были определены опытным путем. Заключительная проводка проводилась поэтапно в этаноле и ксилоле. Заключение срезов под покровные стекла проводилось с использованием специальной среды Surgipath Sub-X Leica с помощью аппарата Leica CV5030.

### **2.5.1. Перечень гистологических, гистохимических и иммуногистохимических критериев**

Гистологическое, гистохимическое и иммуногистохимическое исследования проведены «слепым методом», исследовано 492 препарата, изготовленных из парафиновых блоков 82-х трепанобиоптатов костного мозга. Результаты были внесены в сводную таблицу. При микроскопировании известным был лишь возраст пациента/пациентки, что было необходимо для оценки клеточности костного мозга (относительно возрастной нормы).

Сводная таблица включала в себя следующие гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, клинико-лабораторные, инструментальные, молекулярно-биологические параметры:

Клеточность костного мозга: гипоклеточный/ нормоклеточный/ гиперклеточный;

Заполненность субкортикальных костномозговых полостей кроветворной тканью: не заполнены/ заполнены;

Распределение костного мозга: равномерное/неравномерное;

Эритроидный росток: сужен/ не превышает норму / расширен;

Гистоархитектоника эритроидного ростка: плотные кластеры/рыхлые кластеры/«рассыпающиеся» кластеры эритрокариоцитов;

Степень зрелости эритроидного ростка: нормобластический тип/нормобластический тип с признаками омоложения;

Гранулоцитарный росток: сужен/ не превышает норму / расширен.

Гистоархитектоника гранулоцитарного ростка: зональность сохранена/ зональность нарушена;

Степень зрелости гранулоцитарного ростка: преимущественно зрелый/ равное соотношение зрелых и промежуточных форм/ с дефицитом созревания;

Количество мегакариоцитов: в сниженном количестве/ не превышает норму / пролиферация;

Расположение элементов мегакариоцитарного ростка относительно костных балок: межтрабекулярно/ с тенденцией к паратрабекулярному расположению/ паратрабекулярно;

Расположение элементов мегакариоцитарного ростка: нет кластеров (разрозненно)/ кластеры плотные/ кластеры рыхлые;

Количество клеток в кластере: не более 3/ 3-5 клеток; 5-10 клеток/ более 10 клеток;

Размеры мегакариоцитов: небольшого размера/ обычного размера/ крупного размера;

Морфология мегакариоцитов: атипичная морфология/ обычная морфология/ дисмегакариоцитопоз.

Особенности цитоморфологии морфологии мегакариоцитов (отдельных/всех):

ЭТ-подобные формы (крупные клетки с широкой цитоплазмой- зрелая морфология со сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы, нормохромные ядра в виде "оленьих рогов");

Наличие голаядерных форм: да/ нет; Наличие безъядерных форм: да/ нет; Эмпериоплез: да/ нет.

Синусы: расширены, полнокровные/ расширены, пустые/ спавшиеся;

Наличие в синусах элементов миелопоэза (гранулоциты, эритрокариоциты, мегакариоциты): да/ нет;

Наличие и расположение лимфоидных очажков: да/нет, межтрабекулярно/ паратрабекулярно;

Гемосидероз: да/ нет;

Ретикулиновый фиброз по Gomori: MF-0/ MF-0 с фокусами MF-1 <30%/ MF-1/ MF-2/ MF-3;  
Наличие ретикулинового фиброза вокруг мегакариоцитов: да/ нет;



Остеосклероз; grade 0/ grade 1/ grade 2/ grade 3;

Количество CD71-позитивных клеток эритроидного ростка: мало/ достаточно/ много;

Эритроидные скопления: плотные (кластеры) / «рассыпающиеся»/ рыхлые;

Эритрокариоциты, расположение: межтрабекулярно/ паратрабекулярно;

Особенности гистоархитектоники эритрокариоцитов- формирование розеток вокруг мегакариоцитов или синусов: да/ нет;

Количество CD42b- позитивных мегакариоцитов: мало/ достаточно/ много;

Расположение CD42b- позитивных мегакариоцитов: разрозненно/ кластеры плотные/ кластеры рыхлые;

Расположение CD42b- позитивных мегакариоцитов относительно костных балок: межтрабекулярно/ с тенденцией к паратрабекулярному расположению/ паратрабекулярно;

Наличие клазматоза мегакариоцитов: да/ нет;

Наличие небольшого размера мегакариоцитов с узким ободком цитоплазмы.

Клинико-лабораторные и инструментальные данные внесены в сводную таблицу с указанием дат проведенных исследований:

Показатели аллельной нагрузки *JAK2V617F*, единицы измерения- проценты.

Показатели Hb (г/л), Ht (%), количество эритроцитов в 1 л ( $10^{12}/л$ ), количество лейкоцитов в 1 л ( $10^9/л$ ), количество тромбоцитов в 1 л ( $10^9/л$ ).

Активность ЛДГ (Е/л), показатель сывороточного ЭПО (мЕ/мл);

Размеры селезенки. Наличие венозных тромбозов: тромбозов вен портальной системы, тромбоз собственных вен печени, тромбоз нижних конечностей. Наличие артериальных тромбозов: наличие в анамнезе инсульта, инфаркта.

### 2.5.2. Методика статистического анализа данных

В процессе сбора клинико-лабораторных и анамнестических данных, в сводную таблицу вносили клинические анализы крови пациентов и данные молекулярного исследования (наличие и уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F*) на момент проведения трепанобиопсии костного мозга и в динамике (от нескольких месяцев до нескольких лет).

Несмотря на отсутствие строгого временного регламента выполнения исследований общего анализа крови и аллельной нагрузки *mut JAK2V617F*, в набор данных была внесена вся имеющаяся информация в диапазоне от 6 до 1 месяца после от даты диагностики заболевания в контрольных точках, когда были проведены измерения аллельной нагрузки *mut JAK2V617F*.

Статистический анализ проведен при содействии информационно-аналитического отдела ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (зав. отделом к.т.н. Куликов С.М.). В работе использованы классические методы статистического анализа: описательный, частотный, регрессионный, событийный. Для анализа динамики изменения показателей аллельной нагрузки были построены регрессионные зависимости с учетом повторных измерений.

Анализ проводился с использованием статистического пакета SAS 9.4.

## Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с ранней стадией истинной полицитемии

Группа пациентов, с диагнозом ранней стадии истинной полицитемии составила 28 пациентов, с медианой возраста 48,5 лет (возрастной диапазон 19- 69 лет) и соотношением М:Ж- 1:2,1. В группу ранней стадии истинной полицитемии были включены пациенты с показателями Hb и Ht ниже пороговых значений согласно классификации ВОЗ 2017 г.: мужчины с показателями Hb <165 г/л и Ht <49%, женщины с показателями Hb <160 г/л и Ht <48%. В общем анализе крови наблюдались следующие изменения (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал): Hb- 146,2 (143-155) г/л, Ht- 44,2 (42-47)%, количество эритроцитов составляло 5,4 (4,93-5,4) $\times 10^{12}$ /л, количество лейкоцитов- 8,0 (7,0-8,4) $\times 10^9$ /л, количество тромбоцитов- 658,1 (567-730) $\times 10^9$ /л. В биохимическом анализе крови (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) показатель ЛДГ составлял 436,6 (320-522) Е/л, показатель сывороточного ЭПО- 3,23 (1,1-8,0) МЕ/мл.

Показатель аллельной нагрузки *JAK2V617F* (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) составил 20,51 (9,0-25)%, медиана-12%.

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм наблюдалось у 18/28 (64,3%) (максимально до 182 мм), доплерометрия была проведена у 26/28 (93%). Тромбозы вен нижних конечностей были обнаружены у 1/26 (3,85%), тромбозы вен портальной системы- у 1/26 (3,85%) пациента (тромбоз воротной и селезеночной вен) без признаков тромбоза собственных вен печени.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов данной группы отмечались следующие изменения:

У 26/28 (93%) клеточность костного мозга была выше нормы, не превышала +20% от возрастной нормы, что обусловлено расширением эритроидного ростка 28/28 (100%), гранулоцитарного ростка 24/28 (86%), мегакариоцитарного ростка 27/28 (96%). Таким образом, повышение клеточности костного мозга обусловлено расширением трех ростков миелопоэза. В 2/28 (7%) случаев клеточность костного мозга не превышала возрастную норму, однако эритроидный росток был очагово расширен.

В 28/28 (100%) случаев субкортикальные костномозговые полости были заполнены кроветворной тканью.

Эритроидный росток был представлен в виде рыхлых скоплений 11/28 (39%), «рассыпающихся» скоплений 12/28 (43%) и в виде смешанного варианта- рыхлых и «рассыпающихся» скоплений 5/28 (18%). Плотных островков эритрокариоцитов не было обнаружено (рисунок 1).

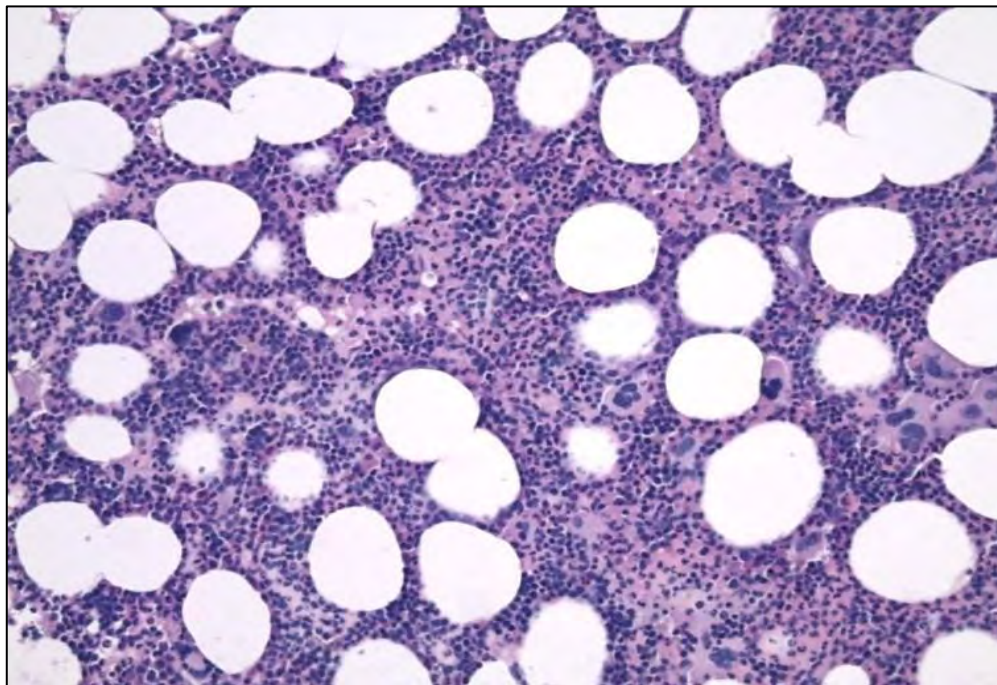


Рисунок 1. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет с ранней стадией истинной полицитемии. Гиперплазия эритроидного ростка представлена «рассыпающимися» скоплениями эритрокариоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

Эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами нормобластического ряда с признаками омоложения- 25/28 (89%), мегалобластоидные формы при этом встречались у 22/28 (79%) пациентов.

Гранулоцитарный росток был представлен преимущественно зрелыми формами 27/28 (96%), без признаков омоложения.

Элементы мегакариоцитарного ростка располагались межтрабекулярно в 27/28 (96%) случаев, клетки с тенденцией к паратрабекулярному расположению были обнаружены в 1/28 (4%). Мегакариоциты располагались разрозненно в 22/28 (79%) случаев. Кластеры мегакариоцитов определялись в 6/28 (21%), все из них - рыхлые; кластеры не более 3-х клеток определялись у 5/6 (83%), кластеры от 3 до 5 клеток были обнаружены у 1/6 (17%) (рисунок 2).

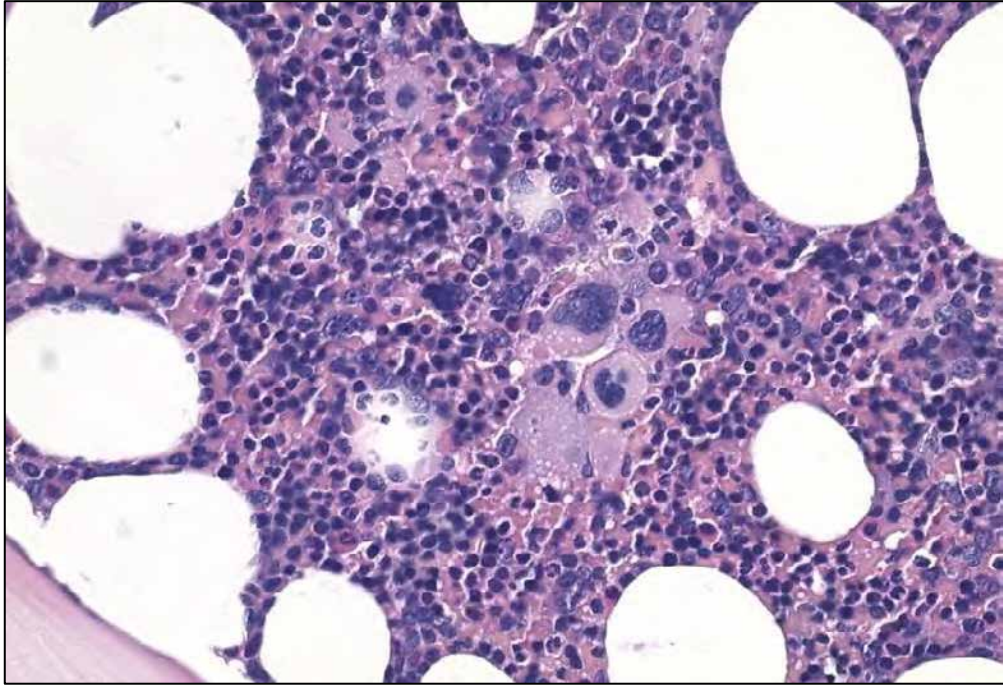


Рисунок 2. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет с ранней стадией истинной полицитемии. Рыхлый кластер мегакариоцитов из 5 клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

Размеры мегакариоцитов варьировали, в 26/28 (93%) случаев определялись клетки от небольших размеров до крупных форм (рисунок 3).

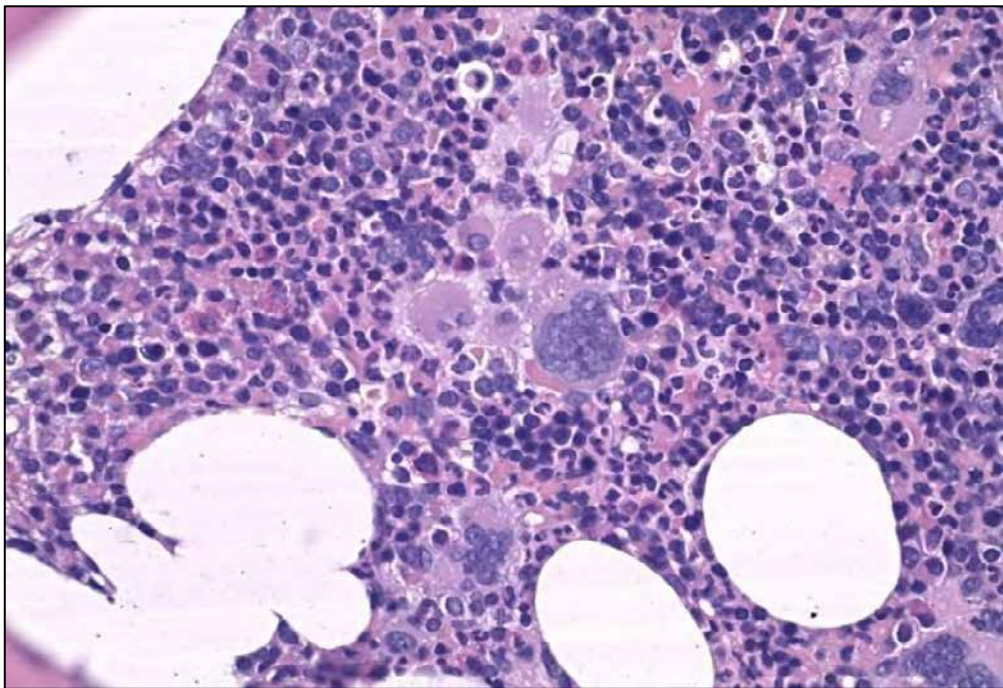


Рисунок 3. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Полиморфные по размеру мегакариоциты с атипичной морфологией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



Во всех случаях в значительном количестве определялись формы с атипичной морфологией (28/28- 100%), гиперлобулярными ядрами, сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы.

В 17/28 (61%) случаях были обнаружены ЭТ-подобные формы. В 27/28 (96%) присутствовали мегакариоциты с «кольцевидными» ядрами (рисунок 4).

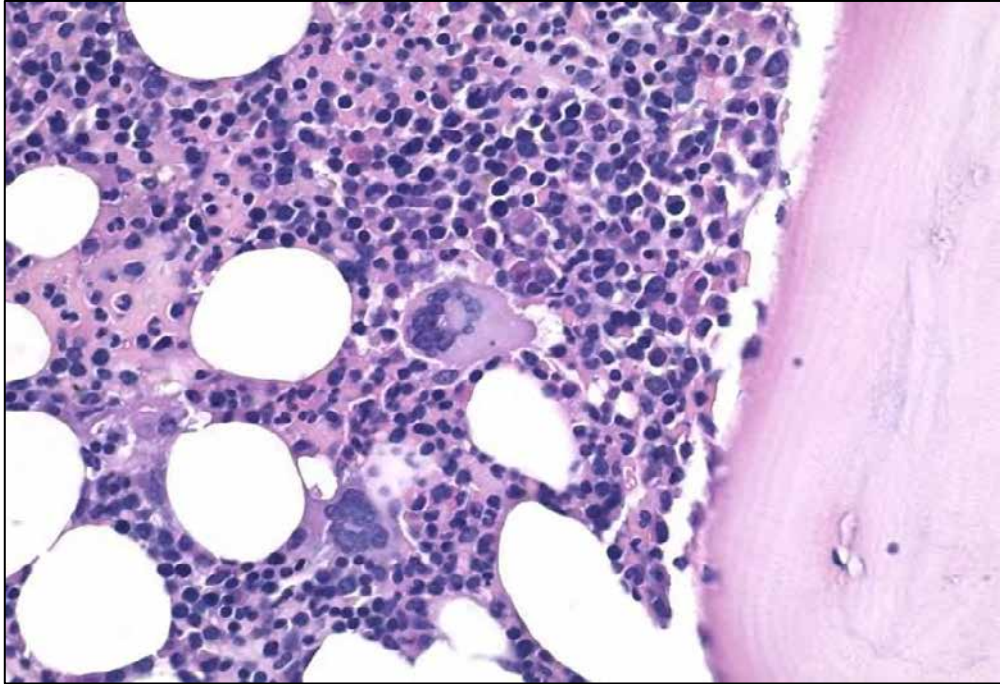


Рисунок 4. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. В центре крупный мегакариоцит с гиперсегментированным «кольцевидным» ядром. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

Увеличенное количество голаядерных форм было выявлено в 11/28 (39%) случаев (рисунок 5).

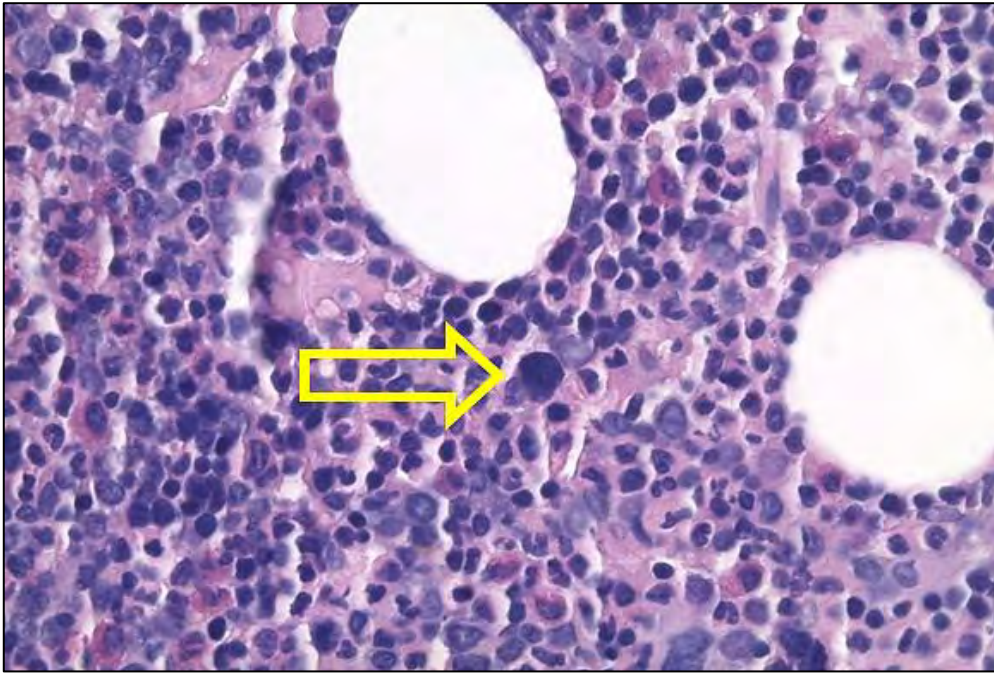


Рисунок 5. Трепанобиоптат костного мозга пациента 19 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Стрелкой указана голоядерная форма мегакариоцита. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

Многочисленные безъядерные формы были обнаружены в 15/28 (54%) случаев (рисунок 6).

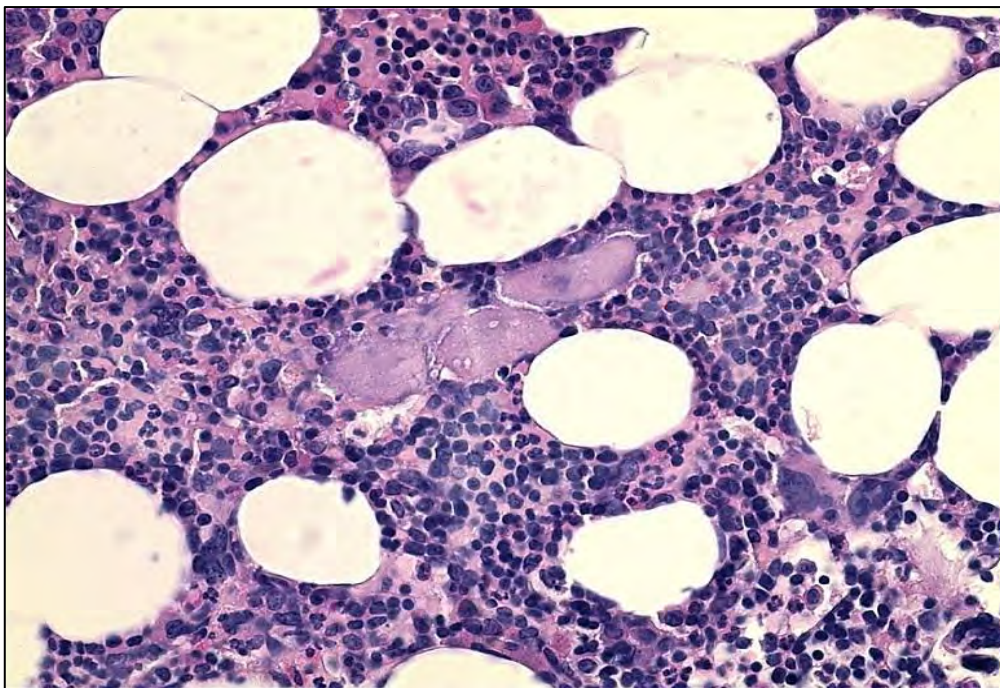


Рисунок 6. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. В центре - безъядерные формы мегакариоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



Синусы были расширены и полнокровны у 15/28 (54%) пациентов. При этом лишь в 3/28 (12%) случаев в синусах определялись элементы миелопоэза (рисунок 7).

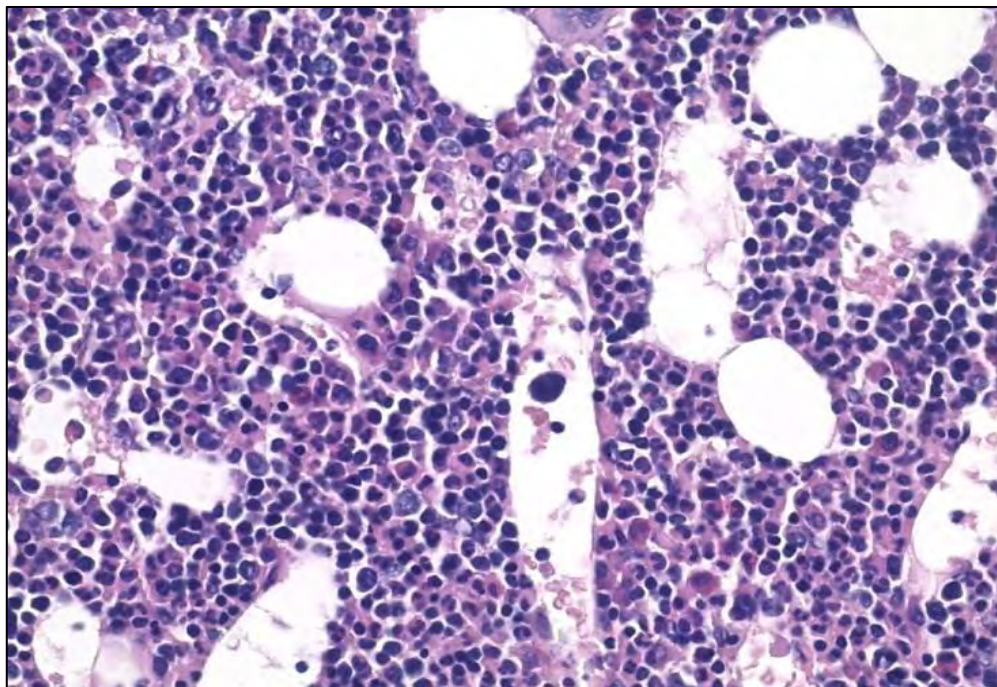


Рисунок 7. Трепанобиоптат костного мозга пациента 54 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Голаядерная форма мегакариоцита в просвете синуса. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

В 4/28 (15%) определялись лимфоидные очажки, из них в 3/4 (75%) имели межтрабекулярное расположение.

Морфологические признаки эмпериполеза, как и признаки гемосидероза стромы, не были обнаружены ни в одном из наблюдений.

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 (отсутствие фиброза) была обнаружена в 11/28 (39%), также как и MF-0 с фокусами MF-1 около 30%- 11/28 (39%). Фиброз MF-1 был обнаружен в 5/28 (18%). Степень ретикулинового фиброза MF-1 с фокусами MF-2 менее 30% была выявлена у 1/28 (4%) пациента. Ретикулиновый фиброз вокруг элементов мегакариоцитарного ростка был обнаружен в 9/28 (36%) случаев. Остеосклероз отсутствовал в 26/28 (93%), фокусы grade 1 менее 30% определялись у 2/28 (7%) пациентов.

При реакции с антителами к CD71 количество позитивных элементов эритроидного ряда превышало норму в 23/28 (82%) случаев. Эритрокарициты располагались виде плотных скоплений в 1/28 (4%) случае, рыхлых скоплений- в 10/28 (36%) наблюдениях, «рассыпающихся» скоплений- в 8/28 (29%) и при сочетании рыхлых и «рассыпающихся» скоплений- в 9/28 (32%) случаях. (рисунок 8).



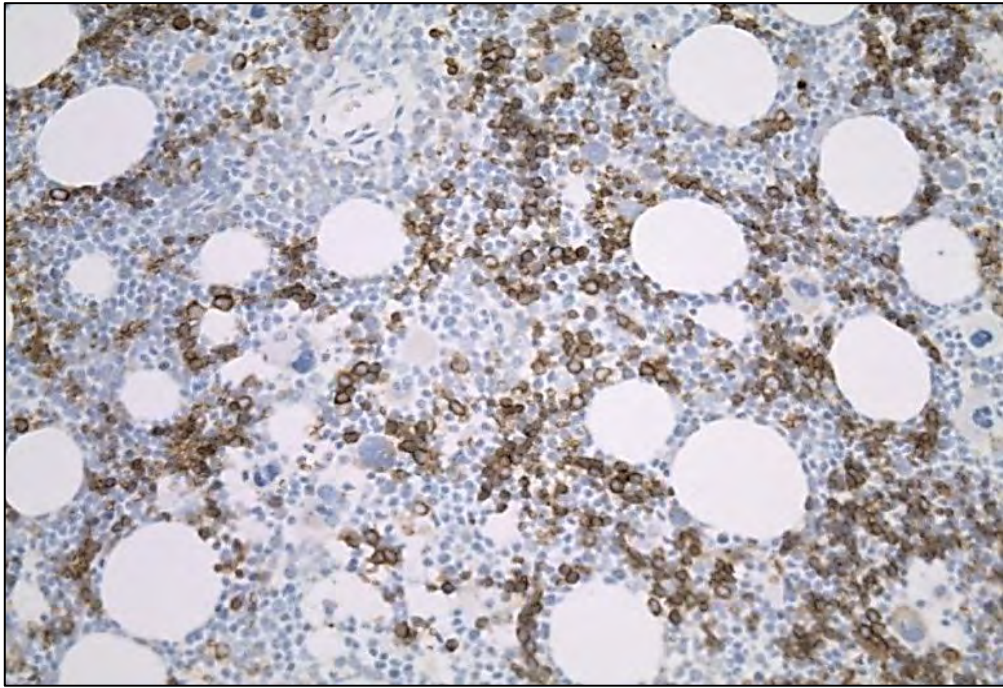


Рисунок 8. Трепанобиоптат костного мозга пациента 19 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Реакция с антителами к CD71. «Рассыпающиеся» скопления CD71+ эритрокариоцитов. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .

При реакции с антителами к CD42b количество мегакариоцитов превышало норму в 27/28 (96%) случаев. Мегакариоциты располагались межтрабекулярно в 27/28 (96%), разрозненно в 20/28 (71%) случаев, рыхлые кластеры определялись у 8/28 (29%) пациентов (рисунок 9).

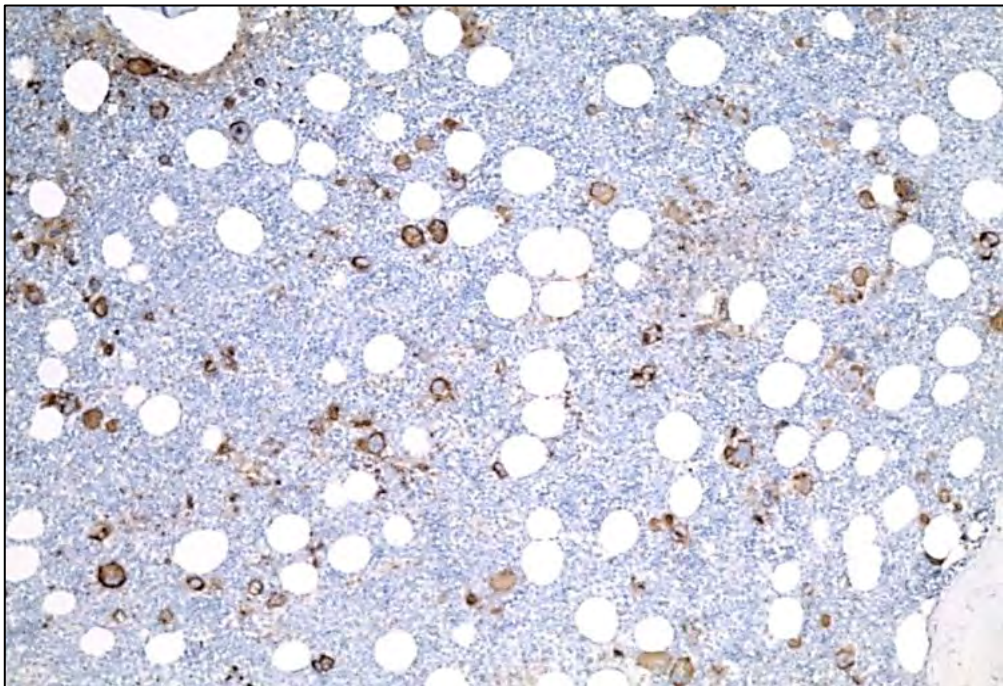


Рисунок 9. Трепанобиоптат костного мозга пациента 19 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Реакция с антителами к CD42b. Гиперплазия элементов мегакариоцитарного

ростка полиморфных по размеру, с признаками атипии. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .

При иммуногистохимическом исследовании с антителами к CD42b клазматоз мегакариоцитов определялся в 21/28 (75%) (рисунок 10).

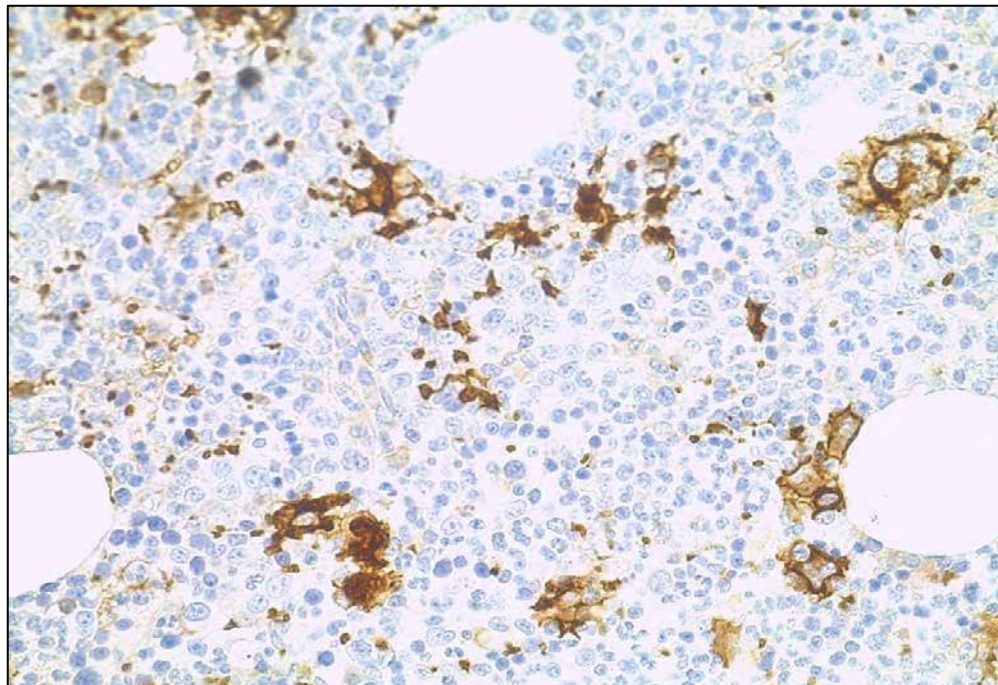


Рисунок 10. Трепанобиоптат костного мозга возраст пациента 19 лет, с ранней стадией истинной полицитемии. Реакция с применением антител к CD42b. Иммуногистохимические признаки клазматоза мегакариоцитов (фрагментация цитоплазмы мегакариоцитов). Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 400$ .

При реакции с антителами к CD42b в 5/28 (18%) случаев определялись мегакариоциты с узким ободком цитоплазмы, возможно, мегакариобласты.

В трепанобиоптатах костного мозга у пациентов с ранней стадией истинной полицитемии, при сопоставлении данных оценки гистоархитектоники эритроидного и мегакариоцитарного ростков с использованием только гистологического исследования, и с применением дополнительного иммуногистохимического исследования, были выявлены следующие отличия.

Расширение эритроидного ростка при гистологическом исследовании отмечалось в 28/28 (100%), тогда как при использовании ИГХ-метода расширение эритроидного ростка наблюдалось в 23/28 (82%) случаев, в 5/20 (18%) случаев количество эритрокариоцитов не превышало норму. Это обусловлено тем, что антитела к CD71 визуализируют преимущественно незрелый пул эритроидного ростка, по мере дифференцировки эритрокариоцитов снижается экспрессия CD71 [55].

Эритроидный росток при гистологическом исследовании был представлен в виде рыхлых скоплений в 11/28 (39%) случаев, «рассыпающихся» скоплений 12/28 (43%) и в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений – в 5/28 (18%) наблюдений. Плотных скоплений эритрокариоцитов не было обнаружено.

При реакции с антителами к CD71 элементы эритроидного ряда располагались в виде рыхлых скоплений и «рассыпающихся» скоплений соответственно в 10/28 (36%) и 8/28 (29%) случаях, с сочетанием рыхлых и «рассыпающихся» скоплений- в 9/28 (32%); в 1/28 (4%) случае определялись плотные скопления.

Расширение и гистотопография мегакариоцитарного ростка были идентичными как при гистологическом, так и при ИГХ-исследовании. В 21/28 (75%) случаях иммуногистохимически выявлены признаки клазматоза мегакариоцитов.

При оценке гистологических препаратов кластеры мегакариоцитов определялись в 6/28 (21%), все из них являлись рыхлыми. При ИГХ-исследовании у 8/28 (29%) пациентов определялись только рыхлые кластеры мегакариоцитов.

Обобщенные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика миелопоза у пациентов с ранней стадией истинной полицитемии. Сопоставление данных при гистологическом и ИГХ-исследовании.

<b>Параметры</b>	<b>Гистологическое исследование (N 28)</b>	<b>ИГХ-исследование: CD71, CD42b (N 28)</b>
Расширение эритроидного ростка	28 (100%)	CD 71: 23 (82%)
Рыхлые скопления эритрокариоцитов	11 (39%)	CD 71: 10 (36%)
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	12 (43%)	CD 71: 8 (29%)
Рыхлые и «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	5 (18%)	CD 71: 9 (32%)
Плотные скопления эритрокариоцитов	0	CD 71: 1 (4%)
Увеличение количества мегакариоцитов	27 (96%)	CD 42b: 27 (96%)
Межтрабекулярное расположение мегакариоцитов	27 (96%)	CD 42b: 27 (96%)



Продолжение таблицы 2

Параметры	Гистологическое исследование (N 28)	ИГХ-исследование: CD71, CD42b (N 28)
Мегакариоциты с тенденцией к паратрабекулярному расположению	1 (4%)	CD 42b: 1 (4%)
Кластеры (рыхлые) мегакариоцитов	6 (21%)	CD 42b: 8 (29%)
Клазматоз мегакариоцитов	-	CD 42b: 21 (75%)

Таким образом, при ранней стадии истинной полицитемии данные ИГХ-исследования позволили выявить значительное расширение незрелого пула эритроидного ростка, в 79% наблюдений были обнаружены иммуногистохимические признаки клазматоза.

### 3.1.2. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с маскированной истинной полицитемией

Группа пациентов, с диагнозом маскированной истинной полицитемии, включала в себя 14 пациентов (медиана возраста 38 лет (возрастной диапазон 22- 68 лет); соотношение М:Ж- 1:13). Группу маскированной формы истинной полицитемии составили пациенты с показателями Hb и Ht ниже пороговых значений, установленных в классификации ВОЗ 2017 г.: мужчины с показателями Hb <165 г/л и Ht <49%, женщины с показателями Hb <160 г/л и Ht <48% [192]. Разница показателей Hb (среднее) мужчин и женщин составила 1 г/л, что не позволило провести анализ данного показателя в зависимости от пола. Разницы показателей Ht у мужчин и женщин обнаружено не было [16].

В общем анализе крови наблюдались следующие изменения (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал): Hb- 131,5 (122-142) г/л, Ht- 40,7 (42-47)%, количество эритроцитов составило  $5,11 (4,63-5,55) \times 10^{12}/л$ , количество лейкоцитов-  $8,1 (5,2-10,4) \times 10^9/л$ , количество тромбоцитов-  $632 (502-813) \times 10^9/л$ . В биохимическом анализе крови (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) показатель ЛДГ составил 416,8 (264-619) Е/л, показатель сывороточного ЭПО- 7,17 (2,3-16,6) МЕ/мл.

Показатель аллельной нагрузки JAK2V617F (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) составил 20,19 (9,95-25)%, медиана-11,25%.

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм наблюдалось у 9/14 (64,3%) (максимально до 270 мм), тромбозы вен портальной системы обнаружены у 4/14 (29%) пациентов, у 2/14 (14%) пациентов наряду с тромбозами портальной системы были выявлены признаки тромбоза собственных вен печени.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов данной группы получены следующие данные:

У данной группы пациентов клеточность костного мозга составляла не менее +30% от возрастной нормы у 14/14 (100%) пациентов, что было обусловлено расширением эритроидного ростка в 14/14 (100%) случаев, гранулоцитарного ростка- в 10/14 (71%) случаев, мегакариоцитарного ростка- в 14/14 (100%) случаев.

Субкортикальные костномозговые полости были заполнены кроветворной тканью в 14/14 (100%) случаев.

Эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами, располагающимися в виде рыхлых скоплений в 4/14 (29%) случаев, «рассыпающихся» скоплений- в 6/14 (43%) и в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений в 4/14 (29%) случаев. Плотные скопления эритрокариоцитов отсутствовали.

Эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами нормобластического ряда с признаками омоложения-в 11/14 (79%) случаев, у 3/14 (21%) пациентов определялся нормобластический тип без признаков омоложения.

Мегалобластоидные формы определялись у 8/14 (57%) пациентов.

Гранулоцитарный росток был представлен преимущественно зрелыми формами 14/14 (100%), без признаков омоложения.

Мегакариоциты располагались межтрабекулярно в 13/14 (93%) случаев. В 1/14 (7%) случаев определялись отдельные разрозненно расположенные мегакариоциты с тенденцией к паратрабекулярному расположению.

Кластеры мегакариоцитов определялись в 4/14 (28%), из них в 3/4 (75%) случаях кластеры были рыхлыми (рисунок 11).

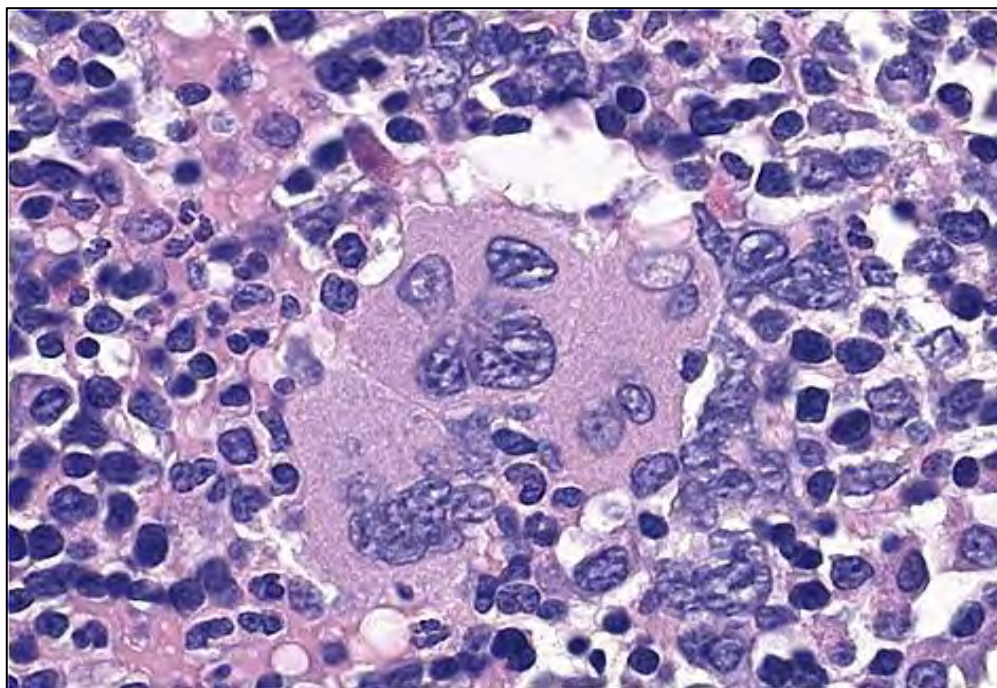


Рисунок 11. Трепанобиоптат костного мозга пациента 32 лет, с маскированной истинной полицитемией. В центре - плотный кластер из 3-х атипичных мегакариоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

Кластеры мегакариоцитов не более 3-х клеток определялись у 2/4 (50%), у такого же количества пациентов были обнаружены кластеры от 3 до 5 клеток (2/4- 50%).

Мегакариоциты были полиморфны по размеру во всех случаях, включали клетки от небольших до крупных размеров.

В 13/14 (93%) случаях в значительном количестве определялись формы с атипичной морфологией, гиперлобулярными ядрами, сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы. У 1/14 (7%) пациента мегакариоциты с обычной морфологией преобладали.

В 8/14 (57%) случаях среди клеток мегакариоцитарного ростка определялись ЭТ-подобные формы. Мегакариоциты с «кольцевидными» ядрами присутствовали в 13/14 (93%) случаев.

Голоядерные формы определялись в равном количестве случаев (8/14- 57%) с безъядерными формами (8/14- 57%).

Синусы были расширены и полнокровны у 9/14 (64%) пациентов; ни в одном из случаев в синусах не определялись элементы миелопоэза.

В 3/14 (21%) определялись лимфоидные очажки, которые имели межтрабекулярное расположение.

Эмпериополез был выявлен только в одном наблюдении (1/14 (7)). Признаков гемосидероза стромы не было обнаружено ни в одном случае.

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 была обнаружена в 2/14 (14%), степень MF-0 с фокусами MF-1 около 30% была выявлена у 5/14 (36%) пациентов. Ретикулиновый фиброз MF-1 и MF-2 определялись соответственно в 6/14 (43%) и 1/14 (7%) случаях. Ретикулиновый фиброз вокруг элементов мегакариоцитарного ростка был обнаружен в 5/14 (36%) случаях. Остеосклероз отсутствовал в 12/14 (86%) наблюдениях, фокусы grade 1 менее 30% определялись у 2/14 (14%) пациентов.

При реакции с антителами к CD71 количество позитивных элементов эритроидного ряда превышало норму в 11/14 (79%) случаев. Эритрокарициты располагались виде рыхлых скоплений- в 5/14 (36%), «рассыпающихся» скоплений- в 3/14 (21%) и в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений- в 6/14 (43%) наблюдений.

При реакции с антителами к CD42b количество позитивных элементов мегакариоцитарного ростка превышало норму во всех случаях- 14/14 (100%). Мегакарициты располагались разрозненно в 8/14 (57%) случаев, рыхлые кластеры определялись у 5/14 (36%) пациентов, плотные кластеры - в 1/14 (7%) случае. Элементы мегакариоцитарного ростка располагались межтрабекулярно во всех случаях.

При ИГХ-исследовании клазматоз мегакарицитов определялся в материале трепанобиоптатов костного мозга всех пациентов.

Мегакарициты с узким ободком цитоплазмы (возможно, мегакариобласты) определялись в 1/14 (7%) случаев.

### **3.1.3. Сравнительный клиничко-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической истинной полицитемией**

Исследуемые группы пациентов с диагнозами неклассической истинной полицитемии-ранней стадией (28 пациентов) и маскированной формой (14 пациентов) были сопоставлены и проанализированы по всем вышеописанным гистологическим и иммуногистохимическим параметрам, с учетом данных клиничко-лабораторных, инструментальных, молекулярных исследований. Данные приведены в таблицах 3, 4, 5, 6, 7, 8.

Таблица 3. Сопоставление клеточности костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии.

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 14)	p
<b>Клеточность костного мозга</b>	Повышенной клеточности ( $\leq +20\%$ от возрастной нормы) в 26 (93%); Не превышает норму в 2 (7%)	Гиперклеточный ( $\geq +30\%$ от возрастной нормы) в 14 (100%)	0.4343

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 4. Сопоставление гранулоцитарного роста костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии.

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 14)	p
<b>Гранулоцитарный росток</b>	Расширен в 24 (86%)	Расширен в 10 (71%)	0.2664
Степень зрелости гранулоцитарного ростка	Зрелые формы преобладают в 27 (96%)	Зрелые формы преобладают в 14 (100%)	0.4742

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 5. Сопоставление эритроидного ростка костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии.

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 14)	p
<b>Эритроидный росток</b>	Расширен- 28 (100%)	Расширен- 14 (100%)	1.000
Рыхлые скопления эритрокариоцитов	11 (39%)	4 (29%)	0.6703
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	12 (43%)	6 (43%)	
Рыхлые+»рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	5 (18%)	4 (29%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов	0	0	



Продолжение таблицы 5

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 14)	p
Признаки омоложения эритроидного ростка	25 (89%)	11 (79%)	0.3496
Мегалобластоидные форм	22 (79%)	8 (57%)	0.1473
Количество CD71-положительных клеток	Выше нормы в 23 (82%)	Выше нормы в 11 (79%)	0.5833
Рыхлые скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	10 (36%)	5 (36%)	0.8487
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	8 (29%)	3 (21%)	
Рыхлые+«рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	9 (32%)	6 (43%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	1 (4%)	0	

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 6. Сопоставление гистоархитектоники и морфологии клеток мегакариоцитарного ростка костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 14)	p
<b>Мегакариоцитарный росток</b>	Расширен в 27 (96%)	Расширен в 14 (100%)	0.5916
Расположение мегакариоцитов	Межтрабекулярно в 27 (96%)	Межтрабекулярно в 13 (93%)	0.6084
Разрозненное расположение	22 (79%)	10 (72%)	0.3566
Кластеры мегакариоцитов	6 (21%)	4 (28%)	
Рыхлые кластеры мегакариоцитов	5 (18%)	3 (21%)	
Плотные кластеры мегакариоцитов	0	1 (7%)	
Размеры мегакариоцитов	От небольших до крупных в 26 (93%)	От небольших до крупных в 14 (100%)	0.5916
Морфология мегакариоцитов: атипичная-гиперлобулярные ядра, сдвиг ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы	28 (100%)	14 (100%)	0.2231
ЭТ-подобные формы мегакариоцитов	17 (61%)	8 (57%)	0.8241
Формы мегакариоцитов с «кольцевидными» ядрами	27 (96%)	13 (93%)	0.6084
Голоядерные формы мегакариоцитов	11 (39%)	8 (57%)	0.2730
Безъядерные формы мегакариоцитов	15 (54%)	8 (57%)	0.8265
Эмпериопольез в мегакариоцитах	0	1 (7%)	0.6084
Клазматоз мегакариоцитов	21 (75%)	14 (100%)	0.0508

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было обнаружено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 7. Сопоставление стромы костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии.

Параметры	Ранняя стадия истинной полицитемии (N 28)	Маскированная форма истинной полицитемии (N 28)	p
Синусы, содержащие элементы миелопоэза	3 (12%)	0	0.2301
<b>Степень ретикулинового фиброза стромы:</b> MF-0	11 (39%)	2 (14%)	0.1560
MF-0 с фокусами MF-1 <30%	11 (39%)	5 (36%)	
MF-1	5 (18%)	6 (43%)	
MF-1 с фокусами MF-2 <30%MF-	1 (4%)	0	
MF-2	0	1 (7%)	
Ретикулиновый фиброз вокруг мегакариоцитов	9 (36%)	5 (36%)	
Остеосклероз	2 (7%)	2 (14%)	0.4231

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таким образом, при сопоставлении гистологических, гистохимических, иммуногистохимических параметров при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов с ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии статистически достоверных различий не было обнаружено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 8. Сопоставление данных инструментальных, клинико-лабораторных и молекулярных исследований в группах ранней стадией и маскированной формы истинной полицитемии.

Показатель	Ранняя стадия истинной полицитемии (Среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	Маскированная форма истинной полицитемии (Среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	p
Аллельная нагрузка JAK2V617F (%)	20,51 (9,0-25) % медиана- 12%	20,19 (9,95-25) % медиана- 11,25%	0,95
Hb (г/л)	146,2 (143-155) г/л	131,5 (122-142) г/л	0.0015
Ht (%)	44,2 (42-47)%	40,7 (42-47)%	0.0094
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	5,4 (4,93-5,4) $\times 10^{12}/л$	5,11 (4,63-5,55) $\times 10^{12}/л$	0.29
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	8,0 (7,0-8,4) $\times 10^9/л$	8,1 (5,2-10,4) $\times 10^9/л$	0.58
Тромбоциты ( $10^9/л$ )	658,1 (567-730) $\times 10^9/л$	632,0 (502-813) $\times 10^9/л$	0.95
ЛДГ (Е/л)	436,6 (320-522) Е/л	416,8 (264-619) Е/л	0.87
Сывороточный ЭПО (МЕ/мл)	3,23 (1,1-8,0) МЕ/мл	7,17 (2,3-16,6) МЕ/мл	0.12
<b>Увеличение размеров селезенки</b>	18/28 (64%)	9/14 (64,3%)	1.00
Тромбозы вен нижних конечностей	1/26 (3,85%)	0	1.00
Тромбозы вен портальной системы	1/26 (3,85%)	4/14 (29%)	0.0852
Тромбозы собственных вен печени	0	2/14 (14%)	1.00

Статистически достоверные различия при сравнении ранней стадии и маскированной формы истинной полицитемии были обнаружены только по показателям Hb ( $p=0.0015$ ) и Ht ( $p=0.0094$ ) (146,2 (143-155) г/л и 44,2 (42-47)% при ранней стадии истинной полицитемии против 131,5 (122-142) г/л и 40,7 (42-47)% при маскированной форме истинной полицитемии, соответственно).

Таким образом, группа неклассической истинной полицитемии включает в себя раннюю стадию и маскированную форму, характеризуется сходными патоморфологическими признаками, но, в отличие от ранней стадии истинной полицитемии, при маскированной форме

чаще отмечается степень ретикулинового фиброза MF-1 (18% против 43%), тромбозы вен портальной системы (3,5% против 29%) и собственных вен печени (0% против 14%), что обуславливает разницу в Hb и Ht. Так, при ранней стадии истинной полицитемии показатель Hb и Ht выше (146,2 (143-155) г/л и 44,2 (42-47)%, соответственно), чем при маскированной форме (131,5 (122-142) г/л и 40,7 (42-47)%, соответственно). Медиана возраста в группе маскированной истинной полицитемии на 10,5 лет меньше, чем в группе с ранней стадией истинной полицитемии (38 лет при маскированной форме и 48,5 лет при ранней стадии), при этом в обеих группах медиана возраста составляет менее 50 лет. Таким образом, неклассическая истинная полицитемия более характерна для пациентов молодого возраста.

### **3.2.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с классической (развернутой) формой истинной полицитемии**

Группа пациентов, с диагнозом истинной полицитемии (классическая, развернутая форма) составила 20 пациентов (медиана возраста 49 лет (27-71 лет), соотношение М:Ж - 1,86:1)

В общем анализе крови определялись следующие изменения (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал): показатель Hb составил 180,5 (169-195) г/л, Ht- 52,1 (49,4-56,2)%, количество эритроцитов в составило  $6,45 (5,97-6,8) \times 10^{12}/л$ , количество лейкоцитов составило  $10,31 (8,23-11,2) \times 10^9/л$ , тромбоцитов-  $547,4 (421-706) \times 10^9/л$ . В биохимическом анализе крови (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) показатель ЛДГ составил 488 (397,5-588,7) Е/л, сывороточного ЭПО- 1,69 (0,55-3,18) МЕ/мл.

Показатель аллельной нагрузки *JAK2V617F* (среднее  $\pm$  95% доверительный интервал) составил 36,7 (15-61,5)%, медиана- 26%.

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм наблюдалось у 10/20 (50%) (максимально до 230 мм). У 2/20 (10%) в анамнезе тромботические осложнения: у 1/20 (5%) пациента в анамнезе тромбоз вен нижних конечностей, у 1/20 (5%) пациента в анамнезе геморрагический инсульт.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов данной группы были выявлены следующие изменения:

Клеточность костного мозга выше нормы определялась у 20/20 (100%) пациентов, что было обусловлено за счет расширения эритроидного ростка в 20/20 (100%) случаев,

гранулоцитарного ростка- в 9/20 (45%) случаев, мегакариоцитарного ростка- в 20/20 (100%) случаев.

Субкортикальные костномозговые полости были заполнены кроветворной тканью в 14/20 (70%) случаев.

Эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами, располагающимися в виде «рассыпающихся» скоплений- в 14/20 (70%) и в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений в 6/20 (30%) случаев. Плотные скопления/ кластеры отсутствовали.

Эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами нормобластического ряда с признаками омоложения-в 20/20 (100%) случаев. Мегалобластоидные формы определялись у 20/20 (100%) пациентов.

Гранулоцитарный росток был представлен преимущественно зрелыми формами 20/20 (100%), с незначительными признаками омоложения.

Мегакариоциты располагались межтрабекулярно в 19/20 (95%) случаев. В 1/20 (5%) случаев определялись мегакариоциты с тенденцией к паратрабекулярному расположению. Кластеры мегакариоцитов определялись в 9/20 (45%), плотных кластеров при этом не обнаружено. Рыхлые кластеры не более 3-х клеток определялись в 3/9 (33%) случаев, рыхлые кластеры от 3 до 5 клеток были обнаружены у 6/9 (67%) пациентов.

Полиморфные по размеру мегакариоциты определялись в 20/20 (100%) случаев и были представлены клетками от небольших до крупных размеров.

В 20/20 (100%) случаях в значительном количестве определялись формы с атипичной морфологией, гиперлобулярными ядрами, сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы. В 5/20 (25%) случаев были выявлены отдельные ЭТ-подобные формы. Дисморфные формы мегакариоцитов не были обнаружены ни в одном из случаев. Мегакариоциты с «кольцевидными» ядрами были выявлены в 20/20 (100%) случаев.

Голоядерные формы определялись в 5/20 (25%) случаев, безъядерные формы обнаружены у 11/20 (55%) пациентов.

Синусы были расширены и полнокровны у 17/20 (85%) пациентов; ни в одном из случаев в синусах не определялись элементы миелопоэза.

В 2/20 (10%) были обнаружены довольно четко очерченные лимфоидные очажки, которые имели межтрабекулярное расположение.

Морфологические признаки эмпериполеза были обнаружены в 6/20 (30%) случаев. Признаков гемосидероза не было обнаружено ни в одном случае.

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 не была выявлена ни в одном из случаев, фиброз MF-0 с фокусами MF-1 около 30% был обнаружен у 13/20 (65%) пациентов. Фиброз MF-1 определялся в 6/20 (30%) случаев. Фиброз MF-1 с фокусами MF-2 около 30% был обнаружен у 1/20 (5%) пациентов. Фиброз вокруг элементов мегакариоцитарного ростка был обнаружен в 18/20 (90%) случаев. Остеосклероз отсутствовал в 19/20 (95%).

При реакции с антителами к CD71 количество позитивных элементов эритроидного ряда превышало норму в 20/20 (100%) случаев. Эритрокарициты располагались виде рыхлых скоплений- в 1/20 (5%), «рассыпающихся» скоплений- в 4/20 (20%), в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений- в 15/20 (75%); во всех случаях (20/20- 100%) элементы эритроидного ростка располагались межтрабекулярно и с выраженной тенденцией к паратрабекулярному расположению.

При реакции с антителами к CD42b количество позитивных элементов мегакариоцитарного ростка превышало норму во всех случаях- 20/20 (100%). Мегакарициты располагались разрозненно в 9/20 (45%) случаев, рыхлые кластеры определялись у 11/20 (55%) пациентов.

Элементы мегакариоцитарного ростка располагались межтрабекулярно и с тенденцией к паратрабекулярному расположению в 19/20 (95%) случаев.

При ИГХ-исследовании клазматоз мегакарицитов определялся в 20/20 (100%).

Мегакарициты небольших размеров с округлым компактным ядром и узким ободком цитоплазмы (возможно, мегакариобласты) определялись в 10/20 (50%) случаев.

### **3.2.2. Сравнительный клинко-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической и классической (развернутой) истинной полицитемией**

Морфологические и иммуногистохимические параметры групп пациентов с диагнозом неклассической истинной полицитемии (с ранней стадией и маскированной формой) были сопоставлены, с учетом данных клинко-лабораторных и инструментальных исследований, результатов молекулярного исследования с соответствующими данными группы пациентов с классической (развернутой) формой истинной полицитемии. Данные суммарно приведены в таблицах 9, 10, 11, 12, 13, 14.

Таблица 9. Сопоставление клеточности костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) формой истинной полицитемии.

<b>Параметры</b>	<b>Неклассическая истинная полицитемия (N 42)</b>	<b>Классическая (развернутая) истинная полицитемия (N 20)</b>	<b>p</b>
<b>Клеточность костного мозга.</b>	Выше нормы в 40 (95%)	Гиперклеточный в 20 (100%)	0.7955

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 10. Сопоставление параметров гранулоцитарного ростка костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) формой истинной полицитемии.

<b>Параметры</b>	<b>Неклассическая истинная полицитемия (N 42)</b>	<b>Классическая (развернутая) истинная полицитемия (N 20)</b>	<b>p</b>
<b>Гранулоцитарный росток</b>	Расширен в 34 (81%)	Расширен в 9 (45%)	0.0504
Степень зрелости гранулоцитарного ростка	Зрелые формы преобладают в 41 (98%) (без признаков омоложения)	Зрелые формы преобладают в 20 (100%) (с признаками омоложения)	0.5196

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было выявлено ( $p > 0.05$ ).



Таблица 11. Сопоставление параметров эритроидного ростка костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) формой истинной полицитемии.

Параметры	Неклассическая истинная полицитемия (N 42)	Классическая (развернутая) истинная полицитемия (N 20)	p
<b>Эритроидный росток</b>	Расширен в 42 (100%)	Расширен в 20 (100%)	1.000
Рыхлые скопления эритрокариоцитов	17 (40%)	0	0.0552
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	18 (43%)	14 (70%)	
Рыхлые+ «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	9 (21%)	6 (30%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов	0	0	
Признаки омоложения эритроидного ростка	36 (86%)	20 (100%)	0.0699
Мегалобластоидные формы	30 (71%)	20 (100%)	0.0943
Количество CD71-позитивных клеток	Выше нормы в 34 (81%)	Выше нормы в 20 (100%)	0.0878
Рыхлые скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	15 (36%)	1 (5%)	0.0513
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	11 (26%)	4 (20%)	
Рыхлые+ «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	15 (36%)	15 (75%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	1 (2%)	0	

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 12. Сопоставление параметров мегакариоцитарного роста костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) формой истинной полицитемии.

Параметры	Неклассическая истинная полицитемия (N 42)	Классическая (развернутая) истинная полицитемия (N 20)	p
<b>Мегакариоцитарный росток</b>	Расширен в 41 (98%)	Расширен в 20 (100%)	0.6536
Расположение мегакариоцитов	Межтрабекулярно в 40 (95%)	Межтрабекулярно в 19 (95%)	0.1992
Разрозненное расположение	32 (76%)	11 (55%)	0.1638
Кластеры мегакариоцитов	10 (24%)	9 (45%)	0.0982
Морфология мегакариоцитов: атипичная-гиперлобулярные ядра, сдвиг ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы	41 (98%)	20 (100%)	0.5200
ЭТ-подобные формы мегакариоцитов	25 (60%)	5 (25%)	0.0061
Формы мегакариоцитов с «кольцевидными» ядрами	40 (95%)	20 (100%)	0.3558
Голоядерные формы мегакариоцитов	19 (45%)	5 (25%)	0.1087
Безъядерные формы мегакариоцитов	23 (55%)	11 (55%)	0.7073
Клазматоз мегакариоцитов	32 (76%)	20 (100%)	0.0542

При анализе вышеперечисленных параметров мегакариоцитарного роста статистически достоверных различий в сравниваемых группах неклассической и классической истинной полицитемии, не было выявлено ( $p > 0.05$ ). Вместе с тем, ЭТ-подобные формы чаще определялись при неклассической истинной полицитемии (60% при неклассической против 25% при классической (развернутой) истинной полицитемии ( $p=0.0078$ )).

Таблица 13. Сопоставление параметров стромы костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) формой истинной полицитемии.

Параметры	Неклассическая истинная полицитемия (N 42)	Классическая (развернутая) истинная полицитемия (N 20)	p
Синусы, содержащие элементы миелопоэза	3 (7%)	0	0.2149
<b>Степень ретикулинового фиброза стромы:</b> MF-0	13 (31%)	0	0.0984
MF-0 с фокусами MF-1 <30%	16 (38%)	13 (65%)	
MF-1	11 (26%)	6 (30%)	
MF-1 с фокусами MF-2 <30%MF-	1 (2%)	1 (5%)	
MF-2	1 (2%)	0 (0%)	
Ретикулиновый фиброз вокруг мегакариоцитов	13 (31%)	18 (90%)	0.0501
Остеосклероз	4 (10%)	1 (5%)	0.6047

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было установлено ( $p > 0.05$ ).

При сравнении клинико-лабораторных данных и результатов молекулярного исследования уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* в исследуемых группах с не классической истинной полицитемией и классической (развернутой) форме истинной полицитемией отмечались следующие особенности.

Средний показатель  $\pm$  95% доверительный интервал аллельной нагрузки в группе неклассической истинной полицитемии составлял 21,46 (10,0-24,0)%, в группе классической (развернутой) формы истинной полицитемии - 36,7(15-61,5)%; медиана показателя аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе с неклассической истинной полицитемией составлял 14%, в группе с классической (развернутой) истинной полицитемией - 26%. Таким образом, медиана уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* в дебюте классической (развернутой) формы истинной полицитемией в 1,9 раза выше, чем в группе неклассической истинной полицитемии.

Среднее значение показателей общего анализа крови  $\pm$  95% доверительный интервал: показатель Hb в группе пациентов с неклассической истинной полицитемией составлял 139,8 (138-148) г/л. В группе с классической (развернутой) формы истинной полицитемией значение Hb в среднем составило 180,5 (169-195) г/л. Показатель Ht в группе с неклассической истинной полицитемией составлял 42,3(41,6-44,2)%, в группе классической (развернутой) истинной полицитемией - 52,1(49,4-56,2)%. Количество эритроцитов в группе с неклассической истинной

полицитемией в среднем составляло  $5,25 (4,9-5,4) \times 10^{12}/л$ , в группе классической (развернутой) истинной полицитемией -  $6,45 (5,97-6,8) \times 10^{12}/л$ . Количество лейкоцитов в группе с неклассической истинной полицитемией составляло в среднем  $7,79 (7,03-8,49) \times 10^9/л$ , в группе классической (развернутой) формы истинной полицитемии-  $10,31 (8,23-11,2) \times 10^9/л$ . Количество тромбоцитов в группе пациентов с неклассической истинной полицитемией составляло  $603,5 (553-715) \times 10^9/л$ , в группе с классической (развернутой) истинной полицитемией -  $547,4 (421-706) \times 10^9/л$ . Показатель ЛДГ в сыворотке крови в группе с неклассической истинной полицитемией составлял  $415 (320-494) Е/л$ . В группе классической (развернутой) истинной полицитемии показатель ЛДГ в сыворотке крови составлял  $488 (397,5-588,7) Е/л$ . Показатель сывороточного ЭПО в группе с неклассической истинной полицитемией составил  $8,6 (2,3-13,0) МЕ/мл$ , в группе с классической (развернутой) истинной полицитемией показатель ЭПО в сыворотке крови составил  $1,69 (0,55-3,18) МЕ/мл$ . Данные суммарно представлены в таблице 14.

Таблица 14. Сопоставление данных инструментальных, клинико-лабораторных и молекулярных данных у пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической (развернутой) истинной полицитемией.

Показатель	Неклассическая истинная полицитемия (Среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	Классическая (развернутая) истинная полицитемия (Среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	p
Аллельная нагрузка mut JAK2V617F (%)	21,46 (10-24)% медиана- 14%	36,7 (15-61,5)% медиана- 26%	0.036
Hb (г/л)	139,8 (138-148) г/л	180,5 (169-195) г/л	<0.0001
Ht (%)	42,3 (41,6-44,2)%	52,1 (49,4-56,2)%	<0.0001
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	$5,25 (4,9-5,4) \times 10^{12}/л$	$6,45 (5,97-6,8) \times 10^{12}/л$	<0.0001
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	$7,79 (7,03-8,49) \times 10^9/л$	$10,31 (8,23-11,2) \times 10^9/л$	0.0089
Тромбоциты ( $10^9/л$ )	$603,5 (553-715) \times 10^9/л$	$547,4 (421-706) \times 10^9/л$	0.25
ЛДГ (Е/л)	415 (320-494) Е/л	488 (397,5-588,7) Е/л	0.22
Сывороточный ЭПО (МЕ/мл)	8,6 (2,3-13,0) МЕ/мл	1,69 (0,55-3,18) МЕ/мл	0.0062
<b>Увеличение размеров селезенки (число пациентов)</b>	27/42 (64%)	10/20 (50%).	0.6724
Артериальные тромбозы	0	1/20 (5%)	0.0378
Тромбозы вен нижних конечностей	1/42 (2%)	1/20 (5%)	
Тромбозы вен портальной системы	7/42 (17%)	0	
Тромбозы собственных вен печени	2/42 (5%)	0	

Таким образом, неклассическая истинная полицитемия при анализе трепанобиоптатов костного мозга характеризуется сходными патоморфологическим признаками с классической (развернутой) истинной полицитемией, отличаясь по частоте встречаемости ЭТ-подобных форм (60% при неклассической истинной полицитемии против 25% при классической (развернутой) истинной полицитемии ( $p=0.0078$ ), частоте возникновения венозных тромбозов (24% при неклассической истинной полицитемии против 5% при классической истинной полицитемии,  $p=0.0378$ ) Кроме того, для неклассической истинной полицитемии характерны тромбоцитоз, отсутствие лейкоцитоза, показатели Hb, Ht, эритроцитов и сывороточного ЭПО в пределах нормы, невысокий уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F*.

### **3.3.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с вторичным эритроцитозом**

Группа пациентов, с диагнозом вторичного эритроцитоза включала в себя 10 пациентов с медианой возраста 37 лет (возрастной диапазон 25- 49 лет), все пациенты были мужского пола.

В общем анализе крови выявлены следующие изменения (среднее  $\pm 95\%$  доверительный интервал): Hb составил 179 (169-189) г/л, Ht- 49,8 (45,1-56)%, количество эритроцитов- 5,89 (5,4-6,9) $\times 10^{12}$ /л), количество лейкоцитов составило 6,4 (5,12-8,12)  $\times 10^9$ /л, количество тромбоцитов- 230,1 (136-384) $\times 10^9$ /л. В биохимическом анализе крови (среднее  $\pm 95\%$  доверительный интервал) показатель ЛДГ составил 362(287-425) Е/л, показатель сывороточного ЭПО- 9,73 (3,09-14,7) МЕ/мл.

Мутации *JAK2V617F*, а также мутации *JAK2* экзон 12, не было обнаружено ни в одном из случаев.

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм не наблюдалось ни у одного пациента. Допплерометрия не проводилась.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов данной группы отмечаются следующие изменения: клеточность костного мозга выше нормы определялась у 3/10 (30%) пациентов, нормоклеточный костный мозг у 2/10 (20%) пациентов, ниже нормы- 5/10 (50%) (рисунок 12).

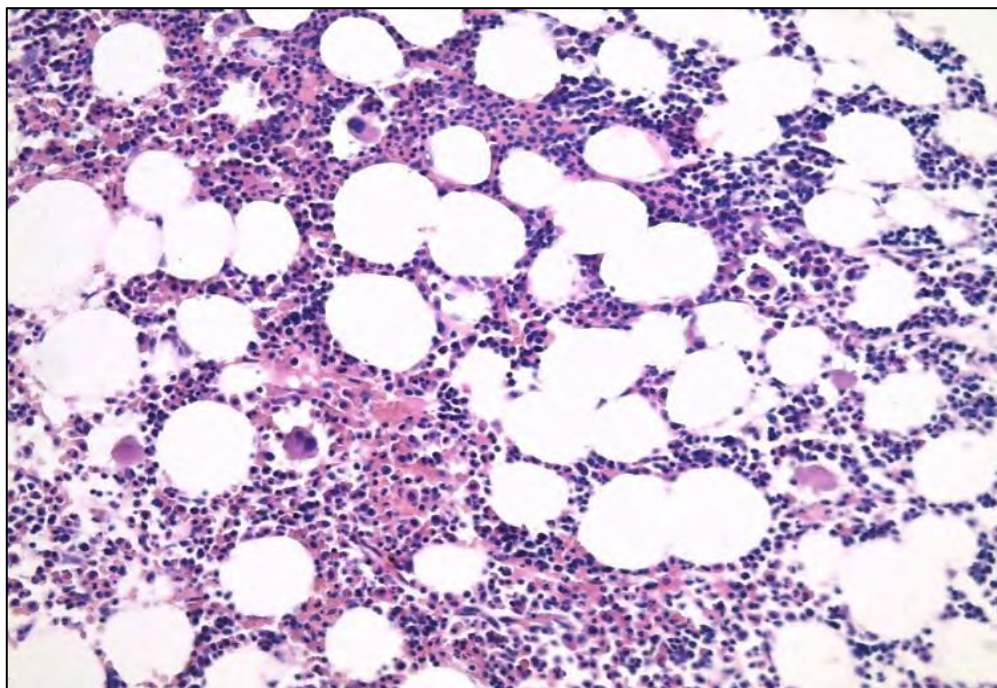


Рисунок 12. Трепанобиоптат костного мозга пациента 43 лет, с вторичным эритроцитозом. Нормоклеточный костный мозг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ .

Расширение эритроидного ростка отмечалось в 7/10 (70%) случаев, у 3/10 (30%) эритроидный росток в умеренном количестве (рисунок 13).

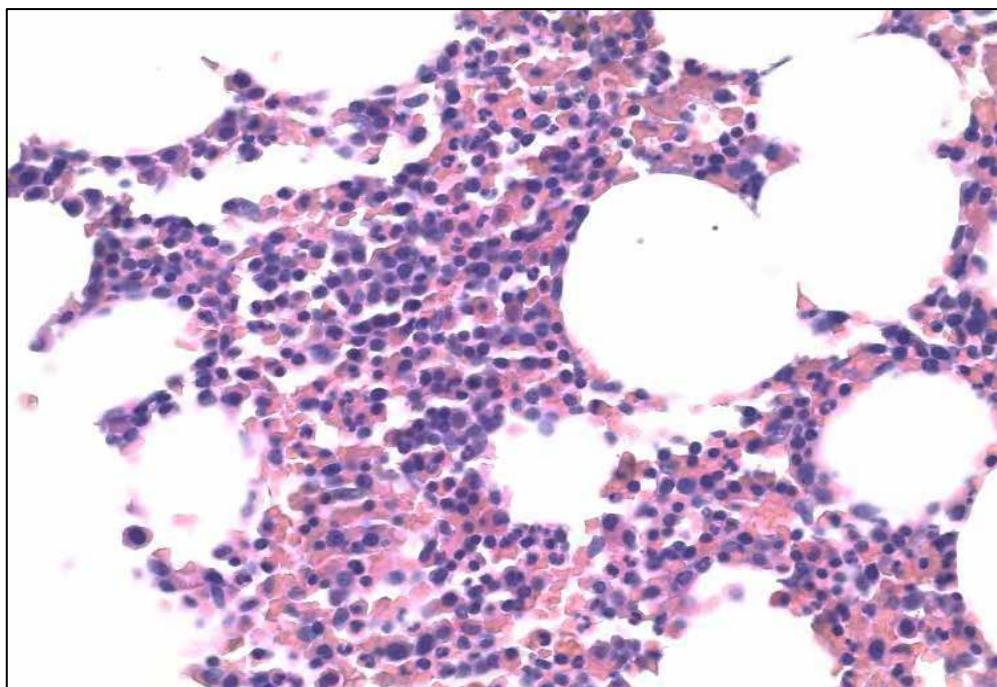


Рисунок 13. Трепанобиоптат костного мозга пациента 43 лет, с вторичным эритроцитозом. Расширение эритроидного ростка. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

Субкортикальные костномозговые полости были заполнены кроветворной тканью в 6/10 (60%) случаев.

Гранулоцитарный росток в достаточном количестве определялся в 9/10 (90%) случаев, в 1/10 (10%) случаев был сужен, во всех случаях был представлен 10/10 (100%) преимущественно зрелыми формами, без признаков омоложения.

Гистоархитектоника эритроидного ростка была представлена в виде рыхлых скоплений - в 1/10 (10%), в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений - в 2/10 (20%) случаев, в виде смешанного варианта плотных и рыхлых скоплений в 7/10 (70%) случаев.

Во всех случаях эритроидный росток был представлен эритрокариоцитами нормобластического ряда без выраженных признаков омоложения и обнаружения мегалобластOIDных форм.

Количество мегакариоцитов в 8/10 (80%) случаев не было увеличено, в 2/10 (20%) случаях количество мегакариоцитов было снижено. Мегакариоциты располагались межтрабекулярно в 10/10 (100%) случаев.

Кластеры мегакариоцитов не были обнаружены ни в одном случае, во всех исследованных трепанобиоптатах костного мозга мегакариоциты располагались разрозненно.

Небольшого размера мегакариоциты преобладали у 4/10 (40%) пациентов. У 6/10 (60%) пациентов мегакариоциты были небольшого и обычного размеров.

В 10/10 (100%) случаях мегакариоциты имели нормолобулярные ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение в пользу цитоплазмы не менее 1:2. ЭТ-подобные формы или «кольцевидные» ядра случаев не были выявлены ни в одном из случаев, присутствовали лишь отдельные крупные формы с гиперлобулярными ядрами. Голоядерные формы и безъядерные формы не определялись.

Синусы были расширены и полнокровны у 7/10 (70%) пациентов; лимфоидные очажки, морфологические признаки эмperiоплеза и гемосидероза отсутствовали.

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 была выявлена в 9/10 (90%) (рисунок 14), фиброз MF-0 с фокусами MF-1 около 30% был обнаружен у 1/10 (10%) пациентов.



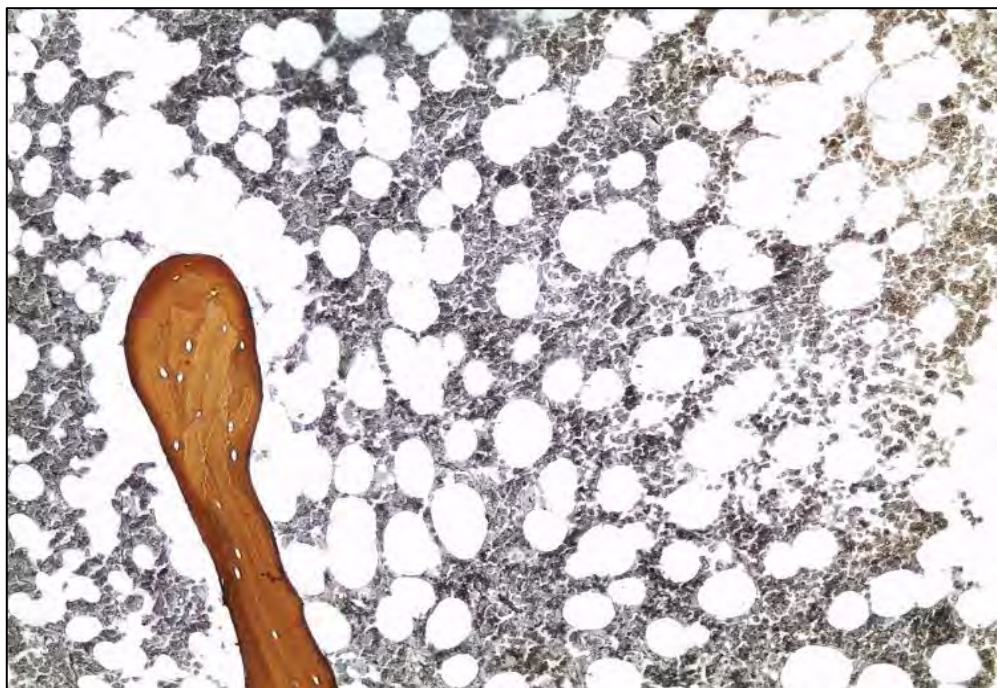


Рисунок 14. Трепанобиоптат костного мозга пациента 43 лет, с вторичным эритроцитозом. Степень ретикулинового фиброза MF-0. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 100$ .

Фиброз вокруг элементов мегакариоцитарного ростка не был обнаружен ни в одном из случаев. Остеосклероз отсутствовал.

При реакции с антителами к CD71 в 6/10 (60%) было обнаружено расширение эритроидного ростка, у одного пациента - ниже нормы (с учетом возрастной нормы клеточности костного мозга и соотношения гранулоцитарного и эритроидного ростков), в остальных 3-х случаях – не отличалось от нормы. Эритрокариоциты располагались в виде плотных и рыхлых скоплений в 7/10 (70%) случаев (рисунок 15), в виде плотных скоплений- в 3/10 (30%) случаев. Во всех случаях элементы эритроидного ростка располагались межтрабекулярно.



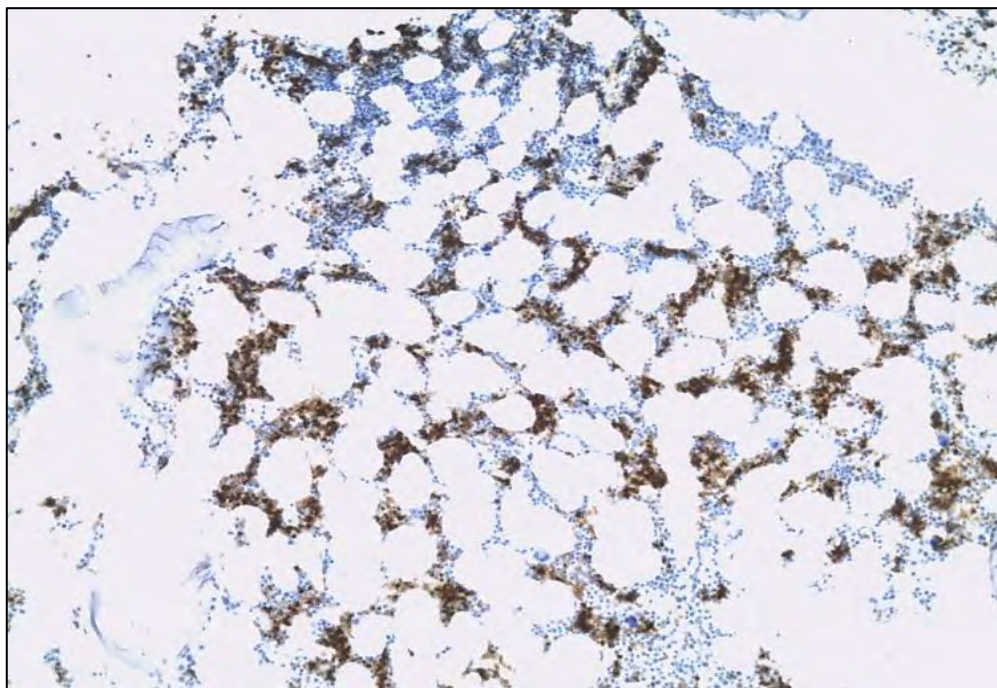


Рисунок 15. Трепанобиоптат костного мозга пациента 67 лет, с вторичным эритроцитозом. Иммуноферментный метод. Реакция с антителами к CD71. Плотные (компактные) кластеры CD71+ эритрокариоцитов. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 100$ .

При реакции с антителами к CD42b количество позитивных элементов мегакариоцитарного ростка было определено в достаточном количестве (не превышало норму) в 8/10 (80%) случаев (рисунок 16), в 2/10 (20%) случаев количество мегакариоцитов было ниже нормы.

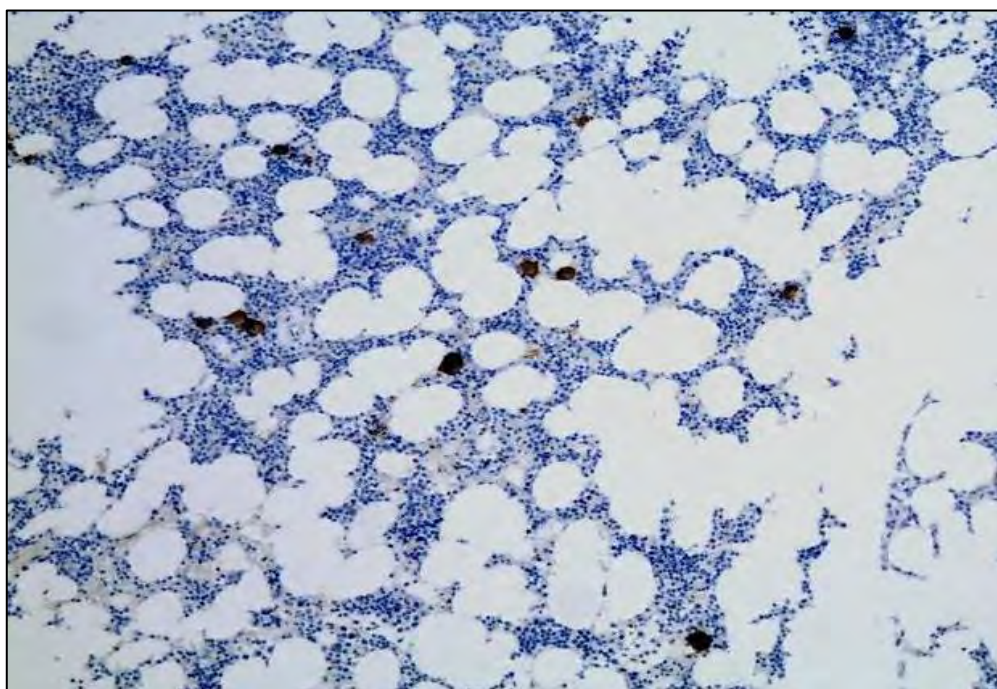


Рисунок 16. Трепанобиоптат костного мозга пациента 46 лет с вторичным эритроцитозом. Иммуноферментный метод. Реакция с антителами к CD42b. Мегакариоциты обычных размеров

и морфологии, расположены разрозненно межтрабекулярно. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 100$ .

Мегакариоциты располагались разрозненно и межтрабекулярно во всех случаях

При иммуногистохимическом исследовании с антителами к CD42b клазматоз мегакариоцитов не выявлен ни в одном из случаев (рисунок 17).

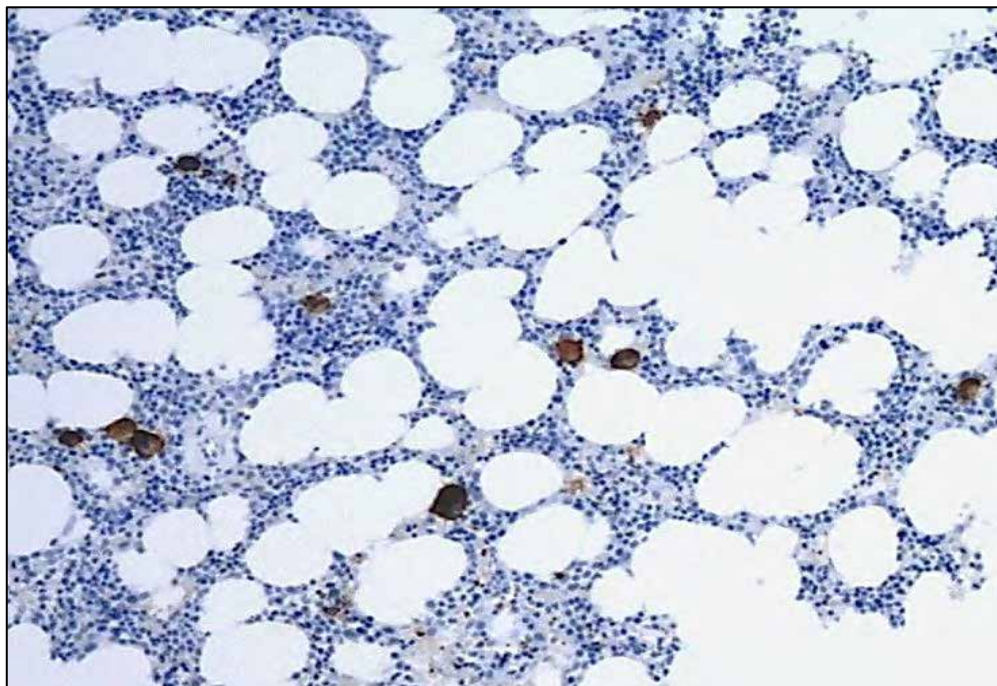


Рисунок 17. Трепанобиоптат костного мозга пациента 46 лет, с вторичным эритроцитозом. Иммуноферментный метод. Реакция с антителами к CD42b. Отсутствие клазматоза мегакариоцитов. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 400$ .

Мегакариоциты с узким ободком цитоплазмы (возможно, мегакариобласты) не определялись.

### **3.3.2. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической, классической (развернутой) истинной полицитемией и вторичным эритроцитозом**

Сравнительный анализ был проведен между группами пациентов с вторичным эритроцитозом и истинной полицитемией, объединяющей в себе 60 пациентов (медиана возраста 41 год, возрастной диапазон 19-71 года, соотношение М:Ж - 1:1,72) с неклассической и классической (развернутой) истинной полицитемией.

Статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) по морфологическим и иммуногистохимическим параметрам кроветворной ткани при сопоставлении групп пациентов с неклассической, классической (развернутой) формой истинной полицитемии и вторичным эритроцитозом суммарно представлены в таблицах 15, 16, 17, 18, 19.

Таблица 15. Сопоставление клеточности костного мозга пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формой) и пациентов с вторичным эритроцитозом.

Параметры	Истинная полицитемия (неклассическая и классическая формы) N-60	Вторичный эритроцитоз N-10	p
Клеточность костного мозга	Гиперклеточный в 57 (95%)	Повышенной клеточности- 3 (30%) Нормоклеточный-2 (20%); Гипоклеточный 5 (50%)	<0.0001

Выявлены статистически достоверные различия в исследуемых группах пациентов по клеточности костного мозга ( $p < .0001$ ).

Таблица 16. Сопоставление параметров гранулоцитарного ростка костного мозга пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формой) и пациентов с вторичным эритроцитозом.

Параметры	Истинная полицитемия (неклассическая и классическая формы) N-60	Вторичный эритроцитоз N-10	p
Гранулоцитарный росток	Расширен в 42- 70%); Не превышает норму в 18 (30%)	Не превышает норму в 9- (90%); Сужен в 1 (10%)	<0.0001

При оценке гранулоцитарного ростка в исследуемых группах пациентов были выявлены статистически достоверные различия ( $p < .0001$ ).

Таблица 17. Сопоставление параметров эритроидного роста костного мозга пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формой) и пациентов с вторичным эритроцитозом.

Параметры	Истинная полицитемия (неклассическая и классическая формы) N-60	Вторичный эритроцитоз N-10	p
<b>Эритроидный росток</b>			
Рыхлые скопления эритрокариоцитов	13 (22%)	1 (10%)	<0.0001
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	32 (53%)	0	
Рыхлые+ «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	15 (25%)	2 (20%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов	0 (0%)	7 (70%)	
Признаки омоложения эритроидного роста	54 (90%)	0	<0.0001
Мегалобластоидные формы	49 (82%)	0	<0.0001
Количество CD71-положительных клеток	Выше нормы в 53 (88%); Достаточное количество- 7 (12%)	Выше нормы в 6 (60%); Достаточное количество- 3 (30%); Меньше нормы- 1 (10%)	0.0092
Рыхлые скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	10 (17%)	0	<0.0001
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	15 (25%)	0	
Рыхлые+ «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	29 (48%)	0	
Плотные+ рыхлые кластеры эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	5 (8%)	7 (70%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	1 (2%)	3 (30%)	

При оценке параметров эритроидного роста в исследуемых группах пациентов были выявлены статистически достоверные различия ( $p < 0.05$ ).

Таблица 18. Сопоставление параметров мегакариоцитарного роста костного мозга пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формой) и пациентов с вторичным эритроцитозом.

Параметры	Истинная полицитемия (неклассическая и классическая формы) N-60	Вторичный эритроцитоз N-10	p
<b>Мегакариоцитарный росток</b>	Расширен в 59 (98%); В сниженном количестве- 1 (2%)	Не превышает норму в 8 (80%); В сниженном количестве- 2 (20%)	<0.0001
Размеры мегакариоцитов	От небольших до крупных в 58 (97%)	Небольшого размера в 4 (40%); Небольшого и обычного размеров в 6 (60%)	<0.0001
Морфология: атипичная- гиперлобулярные ядра, сдвиг ядерно-цитоплазматического соотношения в пользу цитоплазмы	59 (98%)	0	<0.0001
ЭТ-подобные форм	29 (48%)	0	0.0041
Формы с «кольцевидными» ядрами	58 (97%)	0	<0.0001
Голоядерные формы	23 (38%)	0	0.0169
Безъядерные формы	32 (53%)	0	0.0017
Количество CD42b-положительных клеток	Превышает норму в 58 (96%); Не превышает норму- 1 (2%); Меньше нормы- 1 (2%)	Не превышает норму- 8 (80%); Меньше нормы- 2 (20%)	<0.0001
Клазматоз мегакариоцитов	51 (85%)	0	<0.0001

При оценке параметров мегакариоцитарного роста в исследуемых группах пациентов были выявлены статистически достоверные различия ( $p < 0.05$ ).

Таблица 19. Сопоставление параметров стромы костного мозга пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формой) и пациентов с вторичным эритроцитозом.

Параметры	Истинная полицитемия (неклассическая и классическая формы) N-60	Вторичный эритроцитоз N-10	p
Степень ретикулинового фиброза стромы: MF-0	11 (18%)	9 (90%)	0.0002
MF-0 с фокусами MF-1 <30%	28 (47%)	1 (10%)	
MF-1	17 (28%)	0	
MF-1 с фокусами MF-2 <30%MF-	3 (5%)	0	
MF-2	1 (2%)	0	
Ретикулиновый фиброз вокруг мегакариоцитов	32 (58%)	0	0.0007

При оценке стромы костного мозга пациентов в исследуемых группах пациентов были выявлены статистически достоверные различия ( $p < 0.05$ ).

Вывод: В отличие от неклассической и классической истинной полицитемии для вторичного эритроцитоза характерны плотные кластеры эритрокариоцитов (70% против 0% при истинной полицитемии), отсутствие омоложения и мегалобластоидных форм эритроидного ростка (0% против 90% и 82% соответственно при истинной полицитемии), пролиферация и нетипичные формы мегакариоцитарного ростка (0% против 98% при истинной полицитемии), отсутствие клазмотоза мегакариоцитов (0% против 85%) ретикулинового фиброза стромы ((максимально MF-0 с фокусами MF-1 <30%)- 10% против 47% при истинной полицитемии). Обнаруженные различия статистически значимы ( $p < 0.05$ ).

При сравнении клинико-лабораторных данных пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формами) и вторичным эритроцитозом отмечаются особенности, суммарно представленные в таблице 20.



Таблица 20. Сопоставление клинико-лабораторных данных пациентов с истинной полицитемией (неклассической и классической (развернутой) формами) и вторичным эритроцитозом.

Показатель	Неклассическая истинная полицитемия (среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	Классическая (развернутая) истинная полицитемия (среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)	Вторичный эритроцитоз (среднее $\pm$ 95% доверительный интервал)
Нв (г/л)	139,8 (138-148) г/л	180,5 (169-195) г/л	179 (169-189)г/л
Нт (%)	42,3 (41,6-44,2)%	52,1 (49,4-56,2)%	49,8 (45,1-56)%
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	5,25 (4,9-5,4) $\times 10^{12}/л$	6,45 (5,97-6,8) $\times 10^{12}/л$	5,89 (5,4-6,9) $\times 10^{12}/л$
Лейкоциты ( $10^9/л$ )	7,79 (7,03-8,49) $\times 10^9/л$	10,31 (8,23-11,2) $\times 10^9/л$	6,4 (5,12-8,12) $\times 10^9/л$
Тромбоциты ( $10^9/л$ )	603,5 (553-715) $\times 10^9/л$	547,4 (421-706) $\times 10^9/л$	230,1 (136-384) $\times 10^9/л$
ЛДГ (Е/л)	415 (320-494) Е/л	488 (397,5-588,7) Е/л	362 (287-425) Е/л
Сывороточный ЭПО (МЕ/мл)	8,6 (2,3-13,0) МЕ/мл	1,69 (0,55-3,18) МЕ/мл	9,73 (3,09-14,7) МЕ/мл

Вывод: При анализе лабораторных данных было установлено, что для вторичного эритроцитоза характерны высокие показатели Нв (среднее 179 г/л) и Нт (среднее 49,8%), что сопоставимо с соответствующими показателями для классической (развернутой) формы истинной полицитемии, при отсутствии тромбоцитоза (среднее  $230 \times 10^9/л$ ) и снижения сывороточного ЭПО (среднее 9,73 МЕ/мл).

По сравнению с вторичным эритроцитозом в группе пациентов с неклассической истинной полицитемией показатели Нв и Нт были достоверно ниже ( $p=0.0007$ ;  $p=0.018$ ), отмечался тромбоцитоз ( $p < 0.0001$ ), без различий по показателю сывороточного ЭПО ( $p=0.135$ ).

#### 3.4.1. Клинико-патоморфологическая характеристика пациентов с МПН-Н, *JAK2*+

Группа МПН-Н, *JAK2*+, составила 10 пациентов, с медианой возраста 40 лет (возрастной диапазон 24- 64 лет), соотношением М:Ж- 1:4.

В общем анализе крови наблюдались следующие изменения (приведены средние значения  $\pm 95\%$  доверительный интервал): Нв- 136,5 (113-161)г/л, Нт- 40,9 (37-46)%, количество

эритроцитов-  $4,7 (3,8-5,27) \times 10^{12}/л$ , количество лейкоцитов составило  $8,6 (3,24-13,4) \times 10^9/л$ , тромбоцитов-  $615,1 (286-876) \times 10^9/л$ . В биохимическом анализе крови (среднее  $\pm 95\%$  доверительный интервал) показатель ЛДГ составил  $394,4 (182-513)$  Е/л, показатель сывороточного ЭПО исследован у двоих пациентов и составил  $5,5 (5,2-5,8)$  МЕ/мл.

Средний показатель аллельной нагрузки *JAK2V617F* (среднее  $\pm 95\%$  доверительный интервал) составил  $18,0\% (3,0-33,9\%)$ , медиана-  $12\%$ .

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм наблюдалось у  $6/10 (60\%)$  (максимально до 198 мм), при доплерометрии у  $3/10 (30\%)$  обнаружены тромбозы вен портальной системы, без признаков тромбоза собственных вен печени.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов данной группы отмечались следующие изменения: клеточность костного мозга выше нормы определялась у  $6/10 (60\%)$  пациентов, нормоклеточный костный мозг у  $4/10 (40\%)$ . Гиперклеточность была обусловлена расширением эритроидного ростка в  $10/10 (100\%)$ , гранулоцитарного ростка- в  $3/10 (30\%)$  случаев, мегакариоцитарного ростка в  $10/10 (100\%)$  случаев. Субкортикальные костномозговые полости заполнены кроветворной тканью в  $9/10 (90\%)$  случаев.

Эритроидный росток представлен эритрокариоцитами, располагающимися в виде рыхлых скоплений в  $3/10 (30\%)$  случаев, «рассыпающихся» скоплений- в  $4/10 (40\%)$ , рыхлые и «рассыпающиеся»  $3/10 (30\%)$ .

Эритроидный росток представлен эритрокариоцитами нормобластического ряда с признаками омоложения-в  $10/10 (100\%)$  случаев. Мегалобластоидные формы определялись у  $10/10 (100\%)$  пациентов.

Гранулоцитарный росток представлен преимущественно зрелыми формами в  $10/10 (100\%)$  случаев, без признаков омоложения.

Мегакариоциты располагаются межтрабекулярно в  $10/10 (100\%)$  случаев, разрозненно в  $7/10 (70\%)$  случаев, кластеры мегакариоцитов обнаружены в  $3/10 (30\%)$  случаев, все из них рыхлые, количество клеток в кластере не превышает 3-х.

Размеры мегакариоцитов различны в  $9/10 (90\%)$  случаев и представлены клетками от небольших до крупных форм, в  $1/10 (10\%)$  случаев мегакариоциты представлены клетками обычных и крупных размеров.

Во всех случаях отмечалось наличие атипичных форм мегакариоцитов: в  $4/10 (40\%)$  случаев определялись ЭТ-подобные формы, в  $10/10 (100\%)$  случаев определялись клетки с «кольцевидными» ядрами. Признаки дисмегакариоцитопоза не обнаружены ни в одном из



случаев. Голоядерные формы мегакариоцитов определяются в 4/10 (40%) случаев, безъядерные формы обнаружены у 5/10 (50%) случаев.

Синусы расширены и полнокровны у 4/10 (40%) пациентов. Спавшиеся- у 2/10 (20%); пациентов, у 5/10 (50%) пациентов наравне со спавшимися синусами присутствуют расширенные и полнокровные/пустые синусы, у 2/10 (20%) Ни у одного из пациентов не обнаружены в просвете синусов элементы миелопоэза. Лимфоидные очажки обнаружены у 1/10 (10%) пациентов. Эмпериоплез мегакариоцитов был обнаружен в 1/10 (10%) случаев. Признаки гемосидероза определялись у 1/10 (10%) пациента.

Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 определена у 1/10 (10%) пациентов, MF-0 с фокусами MF-1 около 30% была обнаружена у 6/10 (60%) пациентов, фиброз MF-1 определялся у 3/10 (30%) пациентов. Фиброз вокруг элементов мегакариоцитарного ростка обнаружен в 6/10 (60%) случаев.

Остеосклероз отсутствовал в 8/10 (80%) случаев, grade 0 с фокусами grade 1 <30% определялся в 2/10 (20%) случаев.

При реакции с антителами к CD71 количество позитивных элементов эритроидного ряда превышало норму в 8/10 (80%) случаев. При оценке иммуногистоархитектоники эритрокарициты располагались в виде рыхлых скоплений- в 1/10 (10%), «рассыпающихся» скоплений- в 4/10 (40%), в виде смешанного варианта рыхлых и «рассыпающихся» скоплений- в 5/10 (50%); во всех случаях (10/10- 100%) элементы эритроидного ростка были расположены межтрабекулярно и с выраженной тенденцией к паратрабекулярному расположению.

При реакции с антителами к CD42b количество позитивных элементов мегакариоцитарного ростка превышало норму во всех случаях- 10/10 (100%). Мегакариоциты были расположены разрозненно в 6/10 (60%) случаях, рыхлые кластеры определялись в 3/10 (30%) случаях, у одного пациента в трепанобиоптате костного мозга были обнаружены плотные кластеры - 1/10 (10%).

При оценке иммуногистоархитектоники элементы мегакариоцитарного ростка располагаются межтрабекулярно во всех случаях. При ИГХ-исследовании клазматоз мегакариоцитов определялся во всех случаях. Мегакариоциты с узким ободком цитоплазмы (возможно, мегакариобласты) определялись в 2/10 (20%) случаев.

### 3.4.2. Сравнительный клинико-патоморфологический анализ групп пациентов с неклассической истинной полицитемией (ранней стадией) и МПН-Н, *JAK2+*

Одной из важных задач исследования являлось возможное выявление ранних признаков истинной полицитемии в группе пациентов с МПН-Н, *JAK2+*. Для этого было проведено сопоставление морфологических характеристик в группах неклассической истинной полицитемии (ранней стадии) и МПН-Н, *JAK2+* (с учетом исключения других нозологий миелопролиферативных новообразований). Результаты представлены в таблицах 21, 22, 23, 24.

Таблица 21. Сопоставление клеточности костного мозга при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов из групп МПН-Н, *JAK2+* и неклассической истинной полицитемии (ранней стадией).

Параметры	МПН-Н, <i>JAK2+</i> N-10	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N-28	p
<b>Клеточность костного мозга.</b>	Гиперклеточный в 6 (60%)  Не превышает норму в 4 (40%)	Гиперклеточный в 26 (93%)  Не превышает норму 2 (7%)	0.0203

По клеточности костного мозга были выявлены статистически достоверные различия в исследуемых группах пациентов ( $p < 0.05$ ).

Таблица 22. Сопоставление параметров гранулоцитарного роста при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов из групп МПН-Н, *JAK2+* и неклассической истинной полицитемии (ранней стадией).

Параметры	МПН-Н, <i>JAK2+</i> N-10	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N-28	p
<b>Гранулоцитарный росток</b>	Расширен в 3 (30%) Не превышает норму в 7 (70%)	Расширен в 24 (86%) Не превышает норму в 4 (14%)	0.0009
Степень зрелости гранулоцитарного ростка	Зрелые формы преобладают в 10 (100%)	Зрелые формы преобладают в 27 (96%)	0.5448

При анализе были выявлены статистически достоверные различия в исследуемых группах пациентов ( $p < 0.05$ ).

Таблица 23. Сопоставление параметров эритроидного ростка костного мозга при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов из групп МПН-Н, *JAK2+* и неклассической истинной полицитемии (ранней стадией).

Параметры	МПН-Н, <i>JAK2+</i> N-10	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N-28	p
<b>Эритроидный росток</b>	Расширен в 10 (100%)	Расширен в 28 (100%)	0.7495
Рыхлые скопления эритрокариоцитов	3 (30%)	11 (39%)	0.7037
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	4 (40%)	12 (43%)	
Рыхлые+«рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов	3 (30%)	5 (18%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов	0	0	
Признаки омоложения эритроидного ростка	10 (100%)	25 (89%)	0.2808
Мегалобластоидные формы	10 (100%)	22 (79%)	0.1107
Количество CD71-позитивных клеток	Выше нормы в 8 (80%)	Выше нормы в 23 (82%)	0.6850
Рыхлые скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	1 (10%)	8 (29%)	0.5434
«Рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	4 (40%)	8 (29%)	
Рыхлые+ «рассыпающиеся» скопления эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	5 (50%)	9 (32%)	
Плотные кластеры эритрокариоцитов (при окраске с антителами к CD71)	0	1 (4%)	

Статистически достоверных различий по морфологическим и иммуногистохимическим параметрам эритроидного ростка в исследуемых группах пациентов не было выявлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 24. Сопоставление параметров мегакариоцитарного роста костного мозга при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов из групп МПН-Н, *JAK2+* и неклассической истинной полицитемии (ранней стадией).

Параметры	МПН-Н, <i>JAK2+</i> N-10	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N- 28	p
<b>Мегакариоцитарный росток</b>	Расширен в 10 (100%)	Расширен в 27 (96%)	0.6859
Расположение мегакариоцитов	Межтрабекулярно в 10 (100%)	Межтрабекулярно в 27 (96%)	0.6859
Разрозненное расположение	7 (70%)	22 (79%)	0.5842
Кластеры мегакариоцитов	3 (30%)	6 (21%)	0.5842
Рыхлые кластеры мегакариоцитов	3 (30%)	5 (18%)	0.5371
Размеры мегакариоцитов	От небольших до крупных в 9 (90%)	От небольших до крупных в 26 (93%)	0.6243
Морфология мегакариоцитов: атипичная- гиперлобулярные ядра, сдвиг ядерно- цитоплазматическог о соотношения в пользу цитоплазмы	10 (100%)	28 (100%)	0.9654
ЭТ-подобные формы мегакариоцитов	4 (40%)	17 (61%)	0.2581
Формы мегакариоцитов с «кольцевидными» ядрами	10 (100%)	27 (96%)	0.5448
Голоядерные формы мегакариоцитов	4 (40%)	11 (39%)	0.9684
Безъядерные формы мегакариоцитов	5 (50%)	15 (54%)	0.8460
Эмпериоплез в мегакариоцитах	1 (10%)	1 (4%)	0.4345
Количество CD42b- позитивных клеток	Превышает норму в 10 (100%)	Превышает норму в 27 (96%)	0.6859

Продолжение таблицы 24

<b>Параметры</b>	<b>МПН-Н, JAK2+ N-10</b>	<b>Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N-28</b>	<b>p</b>
Мегакариоциты располагаются разрозненно (при окраске с антителами к CD42b)	6 (60%)	20 (71%)	0.3383
Рыхлые кластеры мегакариоцитов (при окраске с антителами к CD42b)	3 (30%)	8 (29%)	
Плотные кластеры мегакариоцитов (при окраске с антителами к CD42b)	1 (10%)	0	
Расположение мегакариоцитов межтрабекулярно (при окраске с антителами к CD42b)	10 (100%)	27 (96%)	0.5448
Расположение мегакариоцитов паратрабекулярно (при окраске с антителами к CD42b)	0	1 (4%)	
Клазматоз мегакариоцитов	10 (100%)	21 (75%)	0.0800
Синусы, содержащие элементы миелопоэза	0	3 (12%)	0.3041

По морфологическим и иммуногистохимическим параметрам мегакариоцитарного роста статистически достоверных различий в исследуемых группах пациентов не было установлено ( $p > 0.05$ ).

Таблица 25. Сопоставление параметров стромы костного мозга при исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов из групп МПН-Н, *JAK2+* и неклассической истинной полицитемии (ранней стадией).

Параметры	МПН-Н, <i>JAK2+</i> N-10	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) N-28	p
<b>Степень ретикулинового фиброза стромы: MF-0</b>	1 (10%)	11 (39%)	0.3104
MF-0 с фокусами MF-1 <30%	6 (60%)	11 (39%)	
MF-1	3 (30%)	5 (18%)	
MF-1 с фокусами MF-2 <30%	0	1 (4%)	
Ретикулиновый фиброз вокруг мегакариоцитов	6 (60%)	9 (36%)	0.1121
Остеосклероз	2 (20%)	2 (7%)	0.2218

Статистически достоверных различий в сравниваемых исследуемых группах пациентов не было обнаружено ( $p > 0.05$ ).

Кроме этого проведен сравнительный анализ клинико-лабораторных, инструментальных и молекулярных данных в группах МПН-Н, *JAK2+* (10 пациентов) и ранней стадии истинной полицитемии (28 пациентов). Результаты сравнительного анализа представлены в таблице 26.

Таблица 26. Сопоставление клинико-лабораторных, инструментальных и молекулярных данных групп пациентов с МПН-Н, *JAK2+* и с неклассической истинной полицитемии, ранней стадией.

Показатель	МПН-Н, <i>JAK2+</i> (Среднее $\pm 95\%$ доверительный интервал)	Неклассическая истинная полицитемия (ранняя стадия) (Среднее $\pm 95\%$ доверительный интервал)	p
Аллельная нагрузка <i>mut JAK2V617F</i> (%)	18,0 (3,0-33,9)% медиана- 12,0%	20,51 (9,0-25) % медиана- 12%	0.72
Hb (г/л)	136,5 (113-161) г/л	146,2 (143-155) г/л	0.55
Ht (%)	40,9 (37-46)%	44,2 (42-47)%	0.20
Эритроциты ( $10^{12}/л$ )	4,7 (3,8-5,27) $\times 10^{12} /л$	5,4 (4,93-5,4) $\times 10^{12}/л$	0.051

Продолжение таблицы 26

Лейкоциты ( $10^9/\text{л}$ )	8,6 (3,24-13,4) $\times 10^9/\text{л}$	8,0 (7,-8,4) $\times 10^9/\text{л}$	0.34
Тромбоциты ( $10^9/\text{л}$ )	615,1 (286-876) $\times 10^9/\text{л}$	658,1 (567-730) $\times 10^9/\text{л}$	0.79
ЛДГ (Е/л)	394,4 (182-513) Е/л	436,6 (320-522) Е/л	1.00
Сывороточный ЭПО (МЕ/мл)	5,5 (5,2-5,8) МЕ/мл	3,23 (1,1-8,0) МЕ/мл	0.33
<b>Увеличение размеров селезенки (число пациентов)</b>	6/10 (60%)	18/28 (64%)	0.0985
Тромбозы вен портальной системы	3/10 (30%)	1/26 (3,85%)	0.0841

Вывод: статистически достоверных различий между клинико-лабораторными, инструментальными и молекулярными данными в группах МПН-Н и ранней стадией истинной полицитемией не было выявлено ( $p > 0.05$ ). Статистически достоверные различия при оценке морфологических параметров обнаружены только по клеточности костного мозга ( $p=0.0203$ ) и расширению гранулоцитарного ростка ( $p=0.0009$ ): при МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> клеточность костного мозга чаще в пределах нормы, как и гранулоцитарный росток. В группе МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> клеточность костного мозга чаще не превышает норму (40% против 7% при ранней стадии истинной полицитемии), как и гранулоцитарный росток (70% против 14% при ранней стадии истинной полицитемии). В совокупности клинико-лабораторных показателей статистически значимых отличий обнаружено не было.

Отсутствие значимых различий в наборе морфологических и клинико-лабораторных параметров в группах пациентов с МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> и ранней стадии истинной полицитемии следует интерпретировать с большой осторожностью. Так нельзя исключить, что отсутствие обнаружения статистически достоверных связей свидетельствует лишь о нехватке эмпирических данных и малом объеме исследованных групп. С другой стороны, фактом является то, что из более чем 50 сопоставленных морфологических, клинико-лабораторных, инструментальных, молекулярных параметров, достаточно полно описывающих морфологические особенности ранней стадии истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup>, не было найдено характеристик, уверенно отличающих одну нозологию от другой. Это факт может свидетельствовать в пользу единой нозологии, диагностируемой на разных этапах заболевания.

### 3.5. Динамика аллельной нагрузки мутации *JAK2* в группах пациентов с неклассической истинной полицитемией, МПН-Н, *JAK2*+ без терапии и с применением циторедуктивной терапии

Общая группа пациентов с диагнозами неклассической истинной полицитемией и МПН-Н, *JAK2*+ была разделена на две подгруппы в зависимости от того, применялась ли циторедуктивная терапия (гидроксикарбамид или IFNa).

Учитывая нерегулярность проведения молекулярного исследования, в качестве стартовой точки исследования была принята дата исследования, наиболее близкая к началу терапии, при условии, что она находилась во временном промежутке: от 6 месяцев до проведения трепанобиопсии костного мозга до +1 месяца после даты проведения трепанобиопсии, без применения циторедуктивной терапии в анамнезе (гидроксикарбамид или IFNa). Данному условию соответствовали 38 пациентов.

Динамическое наблюдение с повторным молекулярным исследованием уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* осуществлялось с интервалом от 2 недель (минимально) до 3 лет и 7 месяцев (максимально) у разных пациентов.

Циторедуктивная терапия не проводилась у 20 пациентов. Динамика изменения уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* суммарно представлена в таблице 27.

Таблица 27. Динамика изменения уровня аллельной нагрузки мутации *JAK2V617F* в группе пациентов с неклассической истинной полицитемией и МПН-Н, *JAK2*+ без применения циторедуктивной терапии.

Пациент	<i>JAK2V617F</i> % 1 исследование	<i>JAK2V617F</i> % 2 исследование
С.А.М	9	35
Н.Н.Е	12	19
Д.З.С	15	26
Щ.О.С	3,18	5,05

Циторедуктивная терапия (гидроксикарбамид или IFNa) проводилась у 18 пациентов. Динамика изменения уровня аллельной нагрузки суммарно представлена в таблице 28.



Таблица 28. Динамика изменения уровня аллельной нагрузки мутации *JAK2* V617F в группе пациентов с неклассической истинной полицитемией (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*+ с применением циторедуктивной терапии.

Пациент	<i>JAK2</i> V617F% 1 исследование	<i>JAK2</i> V617F% 2 исследование	<i>JAK2</i> V617F% 3 исследование	<i>JAK2</i> V617F% 4 исследование	<i>JAK2</i> V617F% 5 исследование	<i>JAK2</i> V617F% 6 исследование
Т.А.В	0,28	25	10	55	-	-
Г.Л.М	2	15,8	-	-	-	-
А.Н.С	8	14	-	-	-	-
Д.А.А	9	15	27	15	-	-
И.В.В	9	18	20,6	-	-	-
П.В.Б	10	7	11,7	6	4	1,3
З.А.А	10,6	9,9	1	-	-	-
Ф.О.С	10,7	26	20	32	-	-
А.Н.И	22,03	31,8	26	20,5	-	-
Г.А.А	24	31	33	-	-	-
С.Е.Ю	25	19,5	16	-	-	-
С.А.С	29	42	-	-	-	-
Б.А.А	50	19	57	9,5	7,4	26

Динамика изменения уровня аллельной нагрузки в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемии (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*+ без циторедуктивной терапии представлена на графике 1.

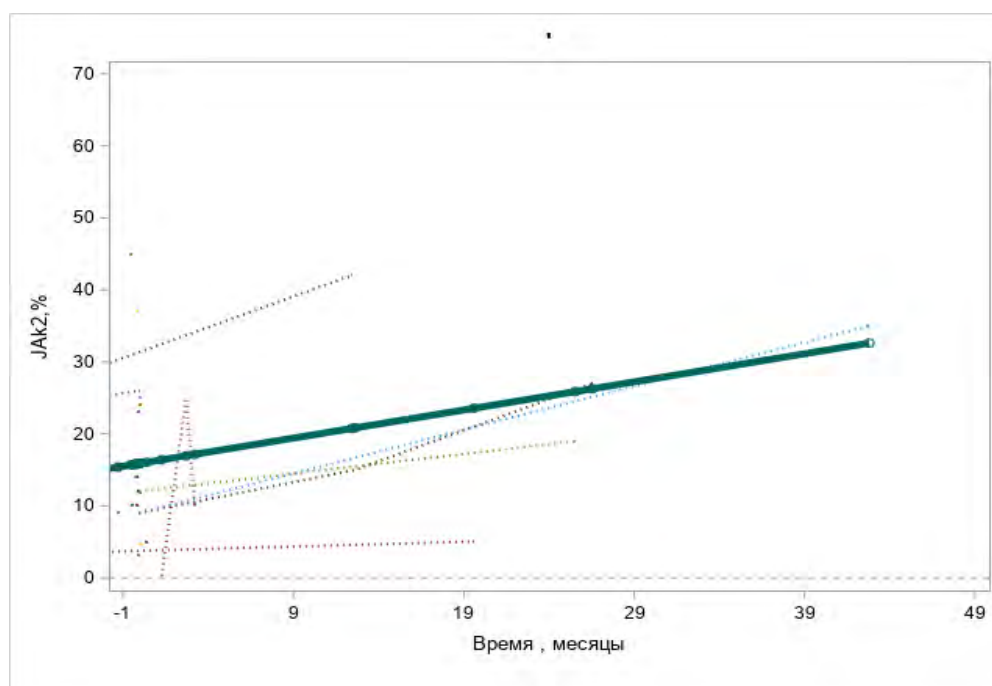


График 1. Динамика аллельной нагрузки *JAK2*V617F в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемии (ранняя стадия и

маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> без циторедуктивной терапии. Повышение уровня аллельной нагрузки составило +0,39% в месяц (+4,68% в год).

Циторедуктивная терапия (гидроксикарбамид или IFNa) проводилась у 18 пациентов, с началом от 0 дней после проведения трепанобиопсии (в день проведения трепанобиопсии) до 1255 дней (около 3,5 лет). Динамика аллельной нагрузки в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемии (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> с применением циторедуктивной терапии (гидроксикарбамид или IFNa) представлена на графике 2.

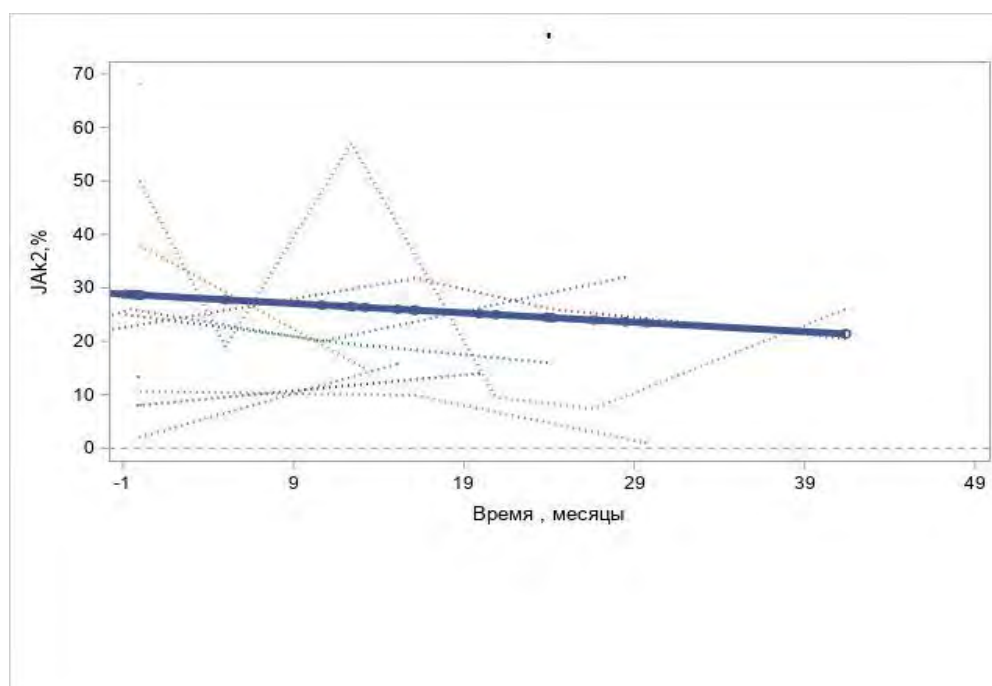


График 2. Динамика аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемии (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> с применением циторедуктивной терапии (гидроксикарбамид или IFNa). Снижение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* составило -0,18% в месяц (-2,16% в год).

Сопоставление изменений аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемией (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> без терапии, и с применением циторедуктивной терапии, продемонстрировано на графике 3.

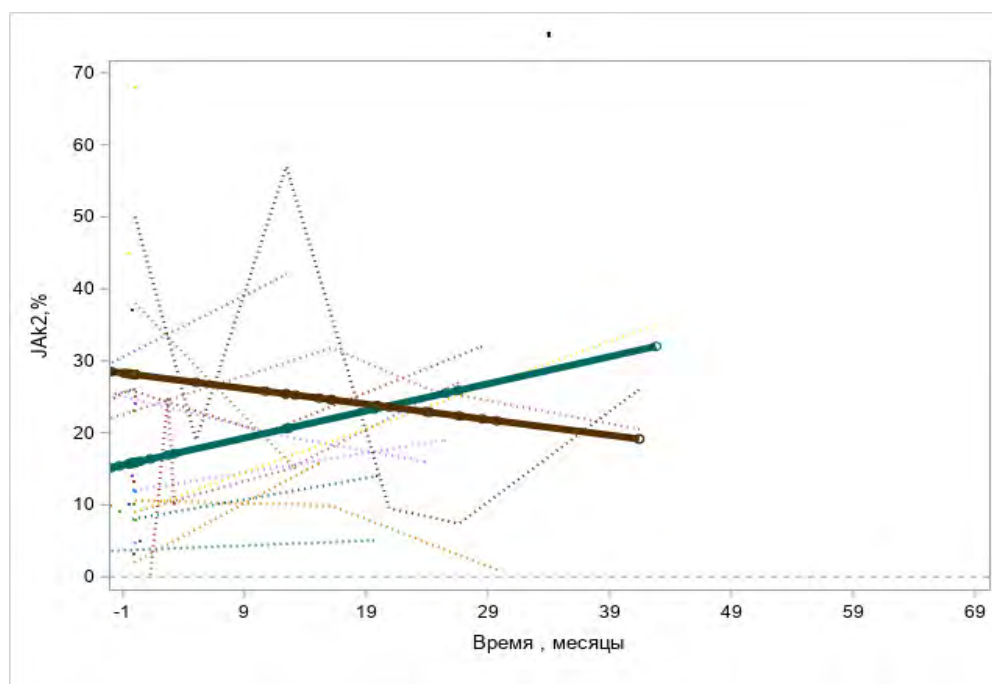


График 3. Динамика аллельной нагрузки *JAK2V617F* в группе пациентов с патоморфологическим диагнозом неклассической истинной полицитемии (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2+* без терапии (кривая зеленого цвета) и с применением циторедуктивной терапии (кривая коричневого цвета).

**Вывод:** У пациентов с неклассической истинной полицитемией (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2+* без применения циторедуктивной терапии отмечается повышение уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* в среднем в 2,17 раза быстрее в месяц, по сравнению с динамикой снижения уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* у пациентов с неклассической истинной полицитемией (ранняя стадия и маскированная форма) и МПН-Н, *JAK2+* с применением циторедуктивной терапии.

### 3.6. Клинический случай неклассической формы истинной полицитемии-маскированной формы

В конце мая 2016 года на консультацию в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России обратилась пациентка Г. 22 лет. Из предоставленной медицинской документации стало известно, что с 2013 года пациентка наблюдается у гинеколога в центре репродукции по поводу вторичного бесплодия. При обследовании у пациентки в возрасте 19 лет была выявлена массивная спленомегалия: пальпаторно размеры селезенки определялись как +8 см из-под края реберной дуги и по данным УЗ-исследования составляли 220×100 мм, также были выявлены

признаки, характерные для портально-селезеночных тромбозов. В общем анализе крови от сентября 2013 года показатель Hb составлял 142 г/л, количество эритроцитов- $5,6 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов- $9,3 \times 10^9/л$ , тромбоцитов- $420 \times 10^9/л$ . Специфического лечения пациентка не получала.

В феврале 2014 года при обследовании по месту жительства размеры селезенки по данным УЗ-исследования составляли  $240 \times 120$  мм, определялось множество сосудистых структур (анастомозы) с кавернозной сосудистой трансформацией. При проведении эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС) были выявлены признаки варикозно расширенных вен пищевода 2 степени. В общем анализе крови показатель Hb составлял 135 г/л, эритроцитов- $4,5 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов- $6,8 \times 10^9/л$ , тромбоцитов- $261 \times 10^9/л$ . Применения специфической терапии не было.

В сентябре 2015 года, на сроке 34-35 недели беременности пациентка поступила в городскую клиническую больницу, где было проведено оперативное родоразрешение путем кесарева сечения. В общем анализе крови отмечалась анемия: Hb-105 г/л, количество лейкоцитов составляло  $8,6 \times 10^9/л$ , тромбоцитов- $219 \times 10^9/л$ . Проводилась симптоматическая терапия.

В начале мая 2016 года пациентке в хирургическом отделении было выполнено лигирование варикозно расширенных вен пищевода. При УЗ-исследовании размеры селезенки достигали  $277 \times 98$  мм, в проекции ствола воротной вены и долевых ответвлений визуализировались извитые сосуды с портальной формой кровотока, селезеночная вена не определялась. В общем анализе крови показатель Hb составил 105 г/л, количество эритроцитов составляло  $4,37 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов-  $2,7 \times 10^9/л$ ; тромбоцитов- $144 \times 10^9/л$ . Пациентке была дана рекомендация обратиться на консультацию в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

При обследовании в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России в мае 2016 года была выполнена трепанобиопсия костного мозга, материал был доставлен в патологоанатомическое отделение ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Трепанобиоптат костного мозга был большого объема, очагово- с явлениями механической деформации. В широких костномозговых полостях определялся повышенной клеточности (относительно возрастной нормы) костный мозг, что было обусловлено расширением трех ростков миелопоэза (рисунок 18).



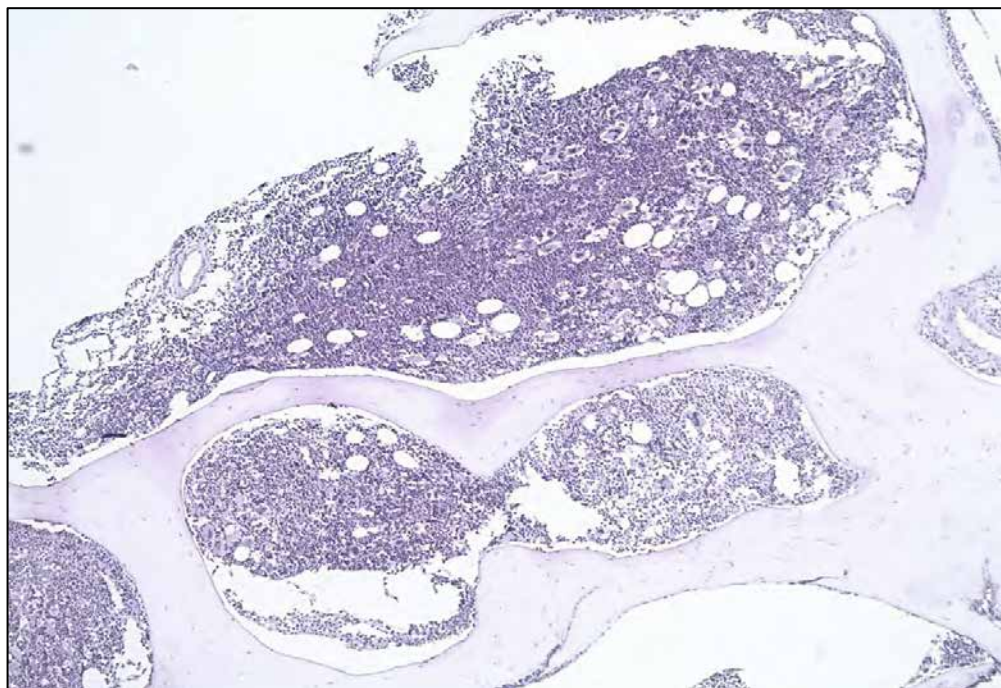


Рисунок 18. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 22 лет. Костный мозг повышенной клеточности (относительно возрастной нормы). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 50$ .

Мегакариоциты располагались разрозненно и в виде отдельных рыхлых кластеров, представлены разного размера клетками с атипичной морфологией (рисунок 19).

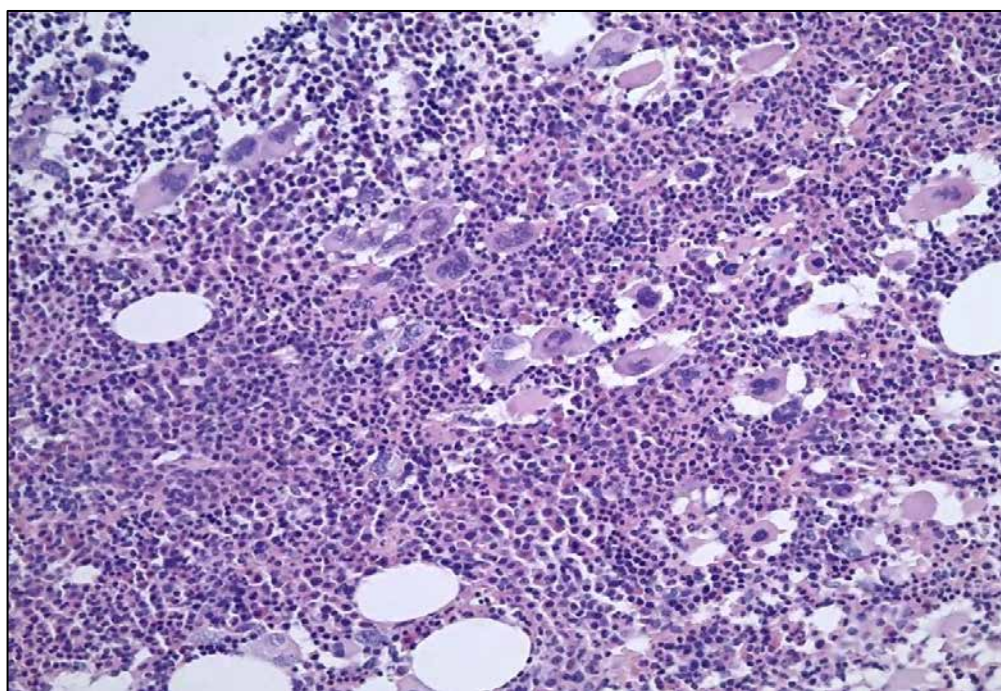


Рисунок 19. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 22 лет. Полиморфные по размеру мегакариоциты с атипичной морфологией расположены разрозненно и в виде отдельных рыхлых кластеров. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .



Присутствовали единичные крупные формы мегакарицитов с ЭТ-подобной морфологией (рисунок 20).

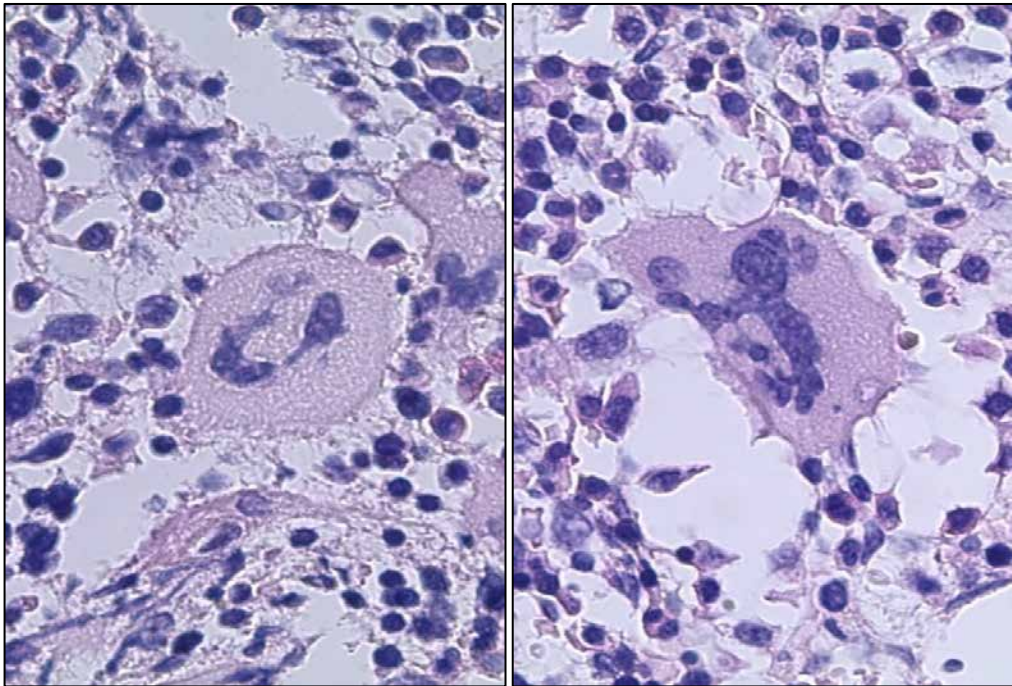


Рисунок 20. Крупные формы мегакарицитов с ЭТ-подобной морфологией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

Эритроидный росток был расширен и представлен рыхлыми, очагово рассыпающимися скоплениями эритрокарицитов нормобластического ряда (рисунок 21).

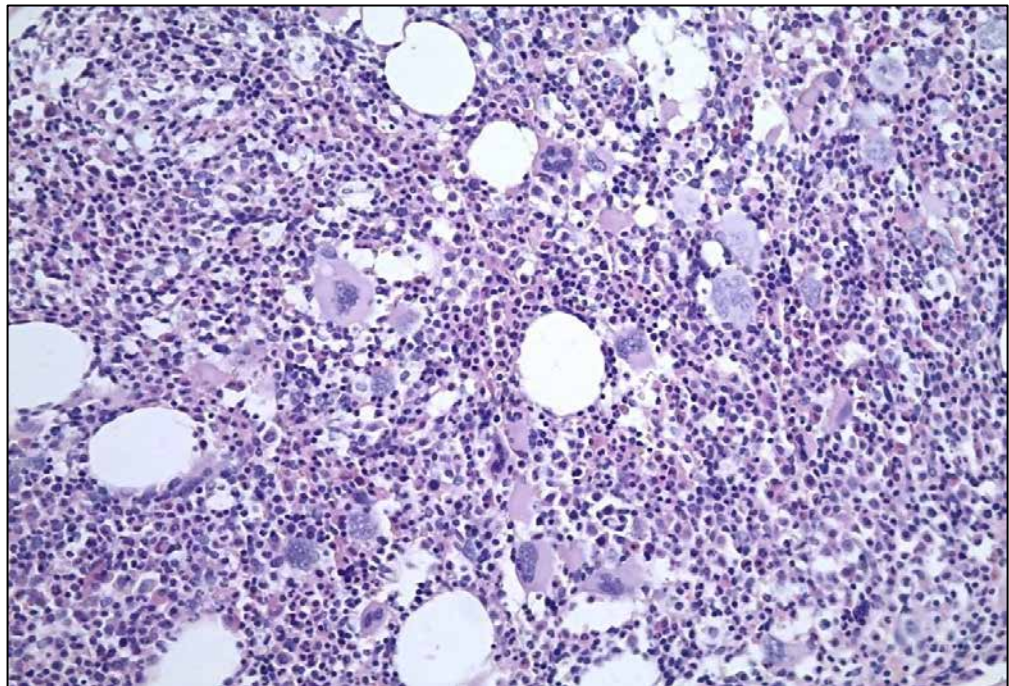


Рисунок 21. Рыхлые, очагово рассыпающиеся скопления эритроидного ростка нормобластического ряда. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

Необходимо подчеркнуть, что в отличие от вторичных эритроцитозов, анемического синдрома, возникающего, в том числе при кровотечениях, при истинной полицитемии эритроидный росток характеризуется «рассыпным» типом гистоархитектоники. Иными словами, при анемических синдромах и вторичных эритроцитозах, несмотря на увеличение количества клеток эритроидного ряда, меж- и паратрабекулярное их расположение, эритрокарициты, независимо от степени зрелости, остаются в тесном расположении друг относительно друга, то есть не утрачивают «островкового принципа» расположения в виде плотных кластеров/скоплений. Напротив, при истинной полицитемии, независимо от варианта (классическая или неклассическая форма) эритроидный росток утрачивает «островковость», клетки эритроидного ростка не имеют тесной связи между собой и «перемешиваются» с элементами других ростков миелопоэза.

Степень ретикулинового фиброза стромы при окраске по Gomori MF-0 (рисунок 22).

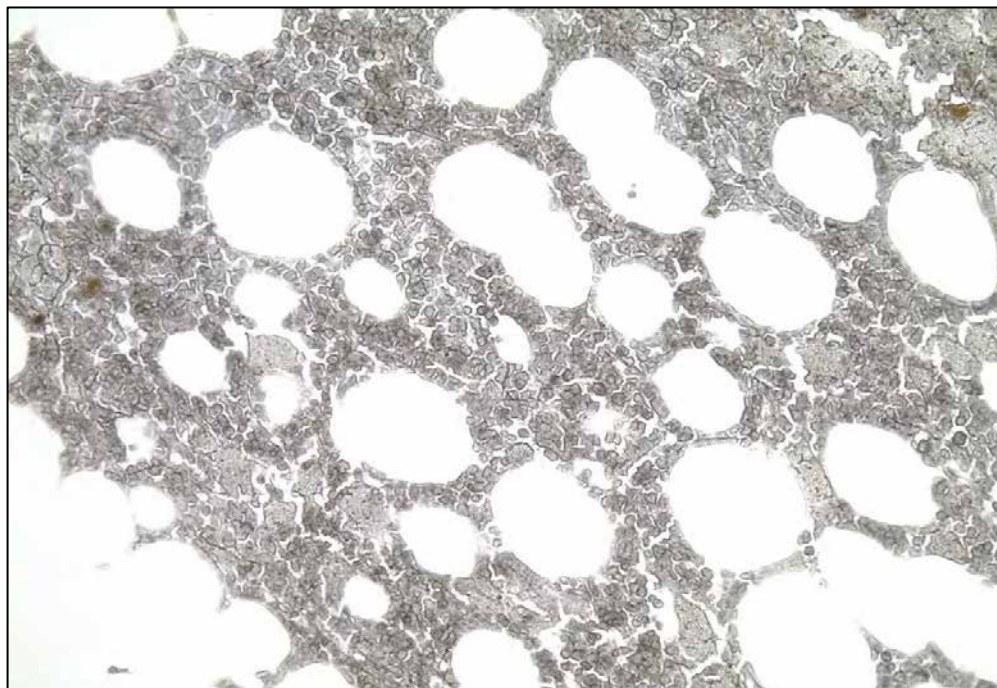


Рисунок 22. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 22 лет. Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 200$ .

При проведении ИГХ-исследования с антителами к CD42b определялись многочисленные мегакарициты с атипичной морфологией, кламатоз мегакарицитов (рисунок 23).



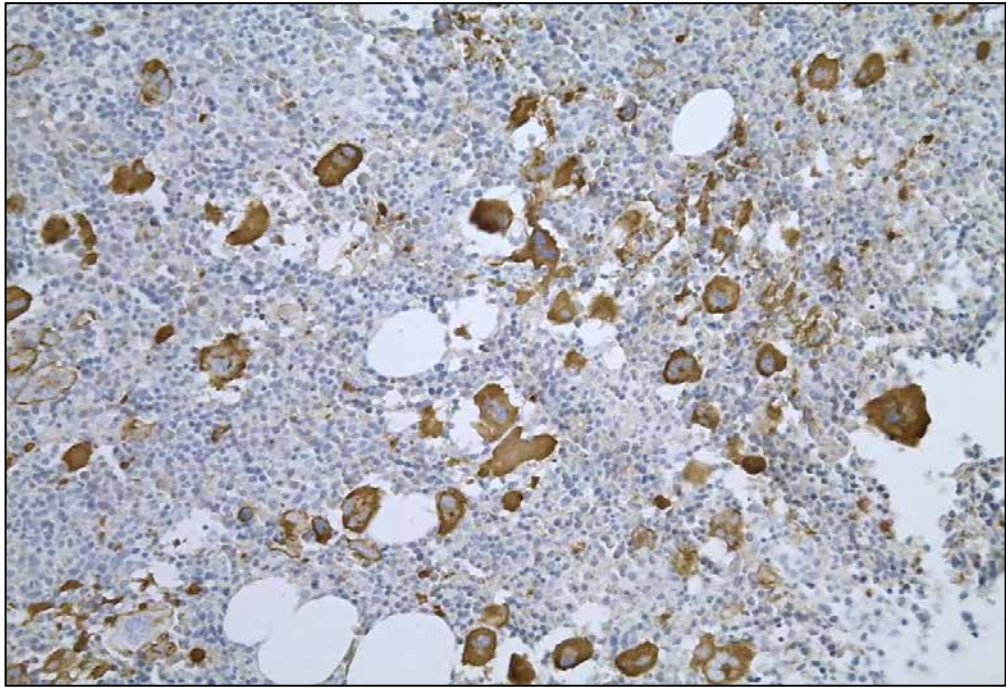


Рисунок 23. Атипичные мегакарициты, клазмотоз мегакарицитов. Реакция с применением антител к CD42b. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .

При проведении ИГХ-исследования с антителами к CD71 (маркер незрелого и созревающего пула эритроидного ростка) визуализировались элементы эритроидного ростка, представленные в виде рыхлых и рассыпающихся скоплений эритрокарицитов (рисунок 24).

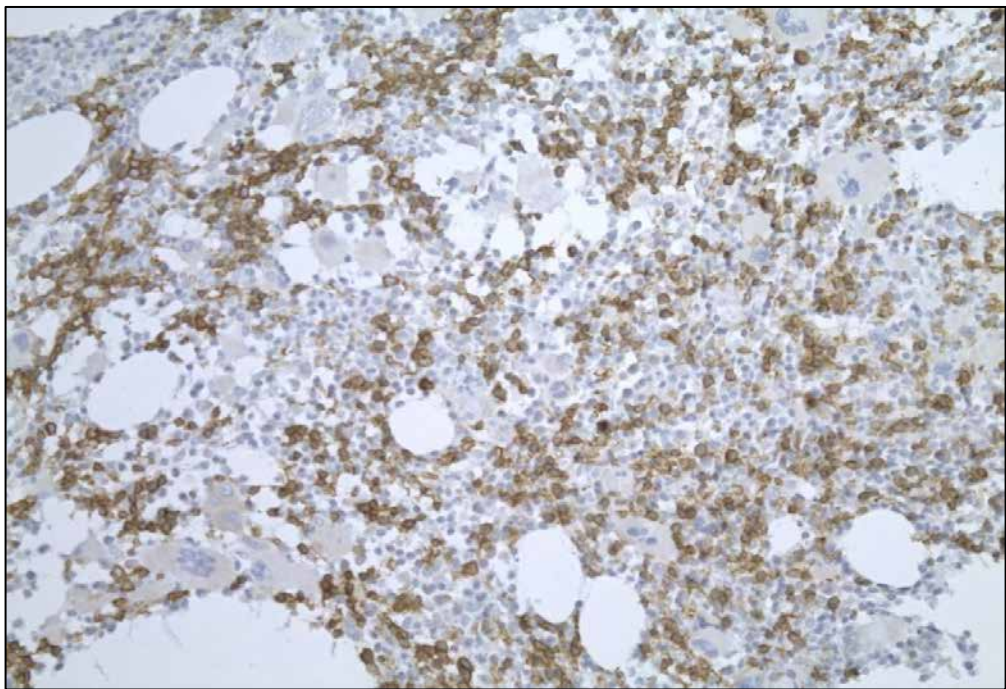


Рисунок 24. Рыхлые и рассыпающиеся скопления эритрокарицитов. Реакция с применением антител к CD71. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .



Исходя из представленных особенностей гистологического исследования трепанобиоптата костного мозга, морфологическая картина характеризовала миелопролиферативное новообразование. С учетом особенностей гистоархитектоники мегакариоцитарного и эритроидного ростков, морфологии мегакариоцитов была заподозрена истинная полицитемия, маскированная форма, протекающая с абдоминальными тромбозами (согласно данным УЗ-исследования). Кроме этого, у пациентки при молекулярном исследовании была выявлена мутация *JAK2V617F* с аллельной нагрузкой 24%.

На основании полученных данных был сформулирован клинический диагноз: Rh-негативное миелопролиферативное заболевание - истинная полицитемия, *JAK2*-позитивная. Неблагоприятная группа риска развития тромбозов. Пациентке была назначена циторедуктивная терапия гидроксикарбамидом, рекомендован прием ривароксабана (ингибитор фактора Ха).

В начале декабря 2017 года в связи с угрозой кровотечения пациентка вновь поступила в хирургическое отделение для повторного лигирования варикозно расширенных вен пищевода. Эпизодов желудочно-кишечных кровотечений за все время наблюдения зарегистрировано не было. При обследовании по данным УЗ-исследования нарастала спленомегалия, размеры селезенки составляли 262×104мм. В общем анализе крови показатель Hb составил 115 г/л, количество эритроцитов- $4,09 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов- $4,8 \times 10^9/л$ , тромбоцитов- $108 \times 10^9/л$ . В послеоперационном периоде применялась симптоматическая терапия, был продолжен прием гидроксикарбамида, ривароксабана.

В середине декабря 2017 года пациентка вновь была консультирована в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. В общем анализе крови показатель Hb составлял 113 г/л, эритроцитов- $4,29 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов- $4,75 \times 10^9/л$ , тромбоцитов- $147 \times 10^9/л$ . Аллельная нагрузка *JAK2V617F* составила 31% клеток. По данным компьютерной томографии брюшной полости не дифференцировались разветвления воротной вены в паренхиме печени, селезеночная вена также не визуализировалась, в области ворот селезенки выявлялся "клубок" извитых, расширенных сосудов, размеры селезенки составляли 250×200 мм. Пациентке вновь была проведена трепанобиопсия костного мозга.

В патологоанатомическое отделение ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России доставлен трепанобиоптат костного мозга был небольшого объема, на некотором протяжении с явлениями механической деформации. В сохранных костномозговых полостях определялся повышенной клеточности (относительно возрастной нормы) костный мозг, что было обусловлено расширением трех ростков миелопоэза (рисунок 25).

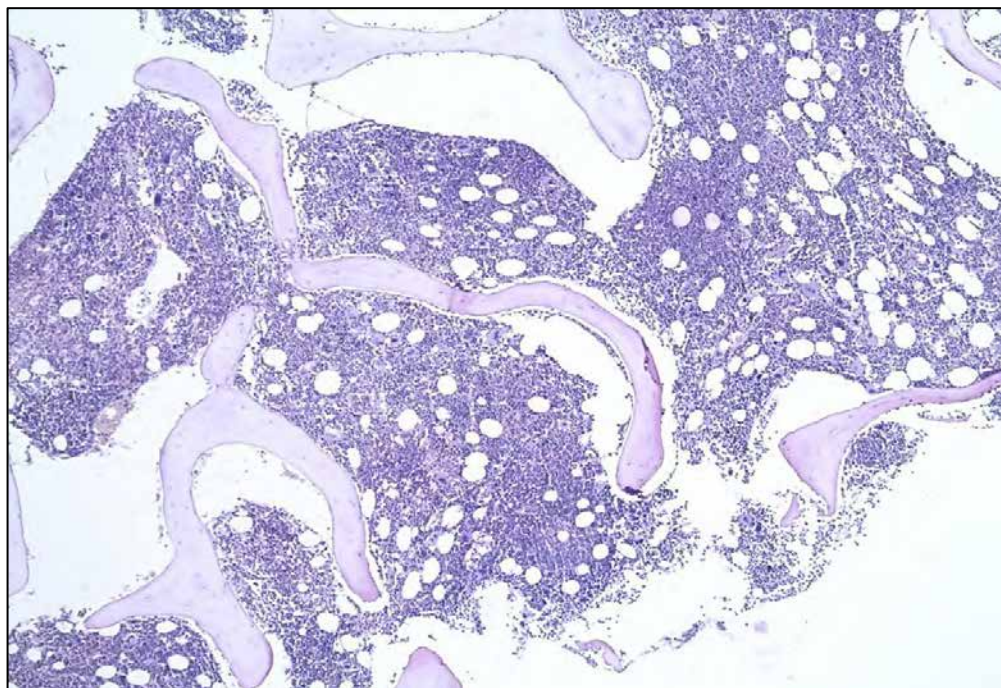


Рисунок 25. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 23 лет. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 50$ .

Определялась пролиферация мегакариоцитов, которые располагались разрозненно и в виде рыхлых кластеров, были представлены клетками разного размера с атипичной морфологией (рисунок 26).

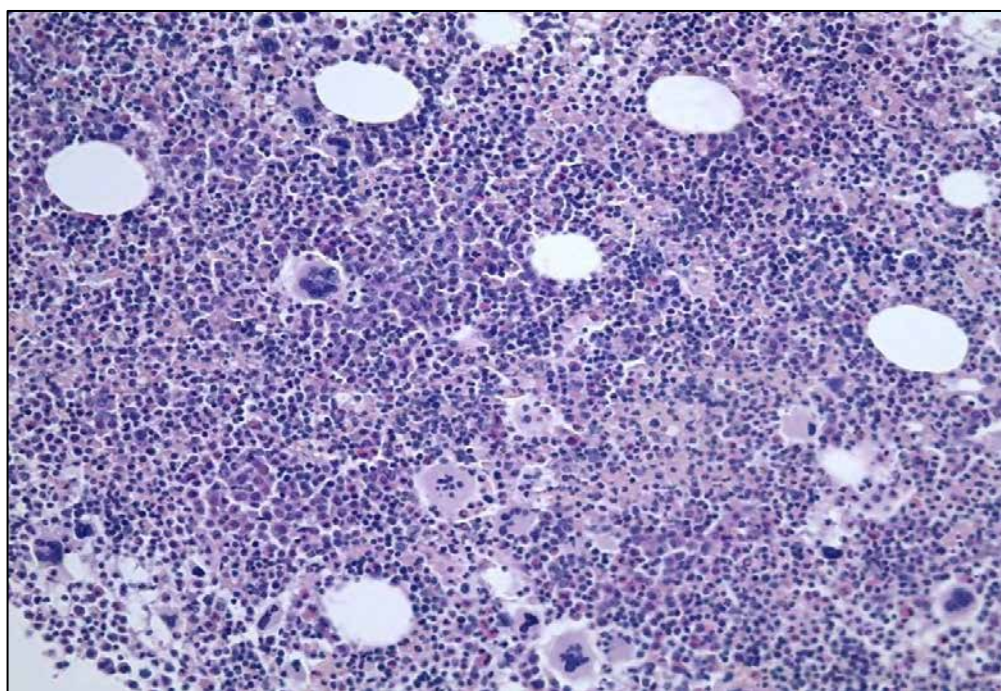


Рисунок 26. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 23 лет. Разного размера многочисленные мегакарициты с признаками атипичности. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .



Как и в предыдущем гистологическом исследовании от 2016 года, присутствовали крупные формы мегакарицитов с ЭТ-подобной морфологией (рисунок 27).

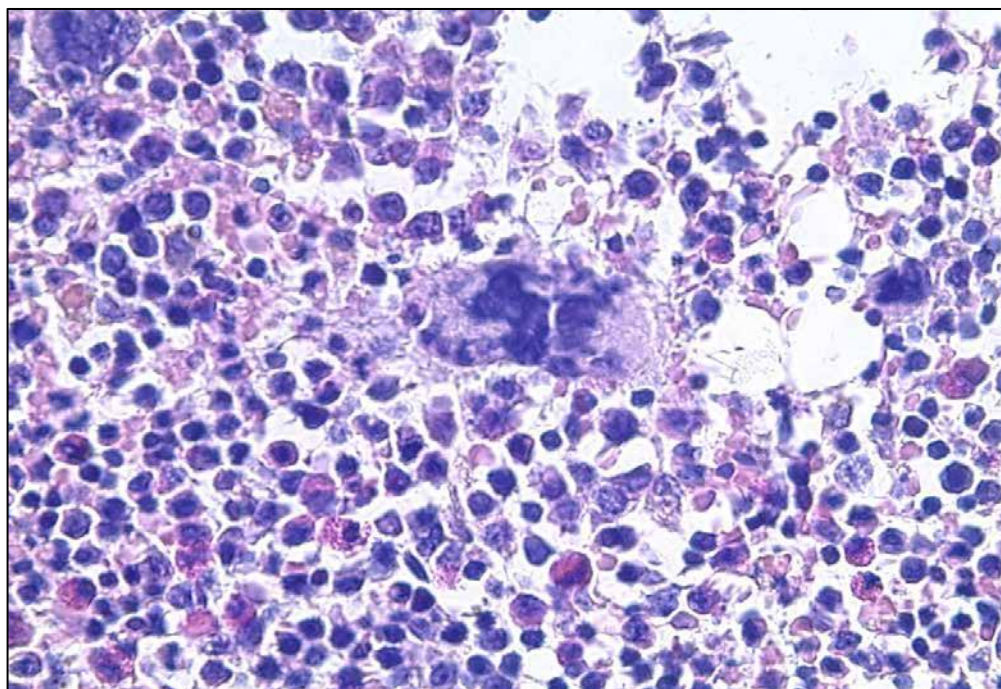


Рисунок 27. Крупные формы мегакарицитов с ЭТ-подобной морфологией. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

Эритроидный росток был представлен рыхлыми, «рассыпающимися» скоплениями эритрокарицитов нормобластического ряда с признаками омоложения (рисунок 28).

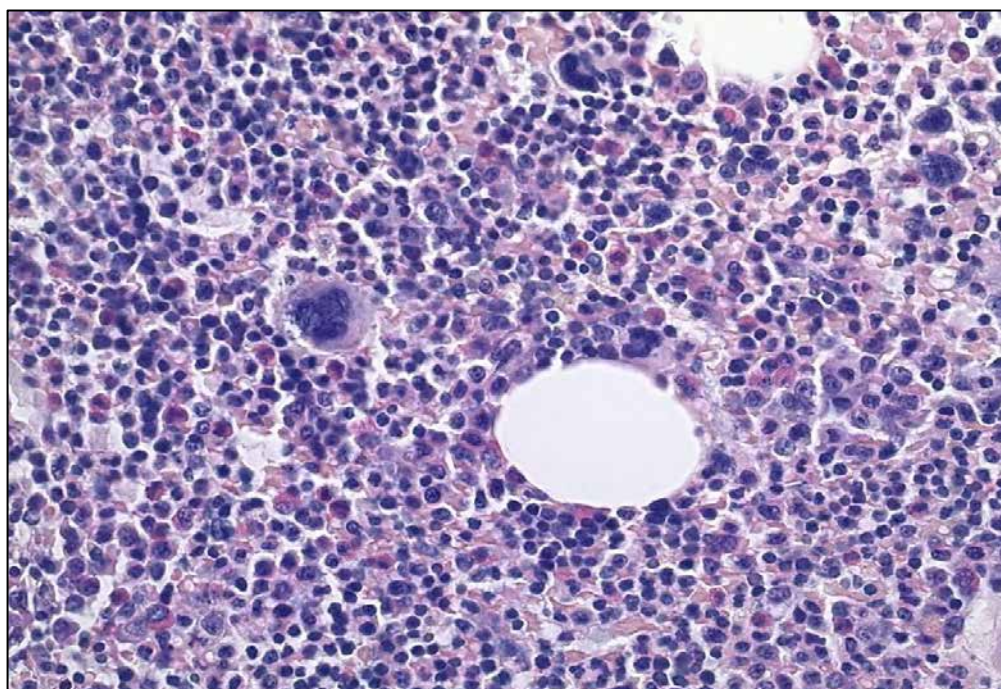


Рисунок 28. Рыхлые, «рассыпающиеся» скопления эритроидного ростка нормобластического ряда с признаками омоложения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



Степень ретикулинового фиброза стромы при окраске по Gomori на большом протяжении - MF-1 (рисунок 29).

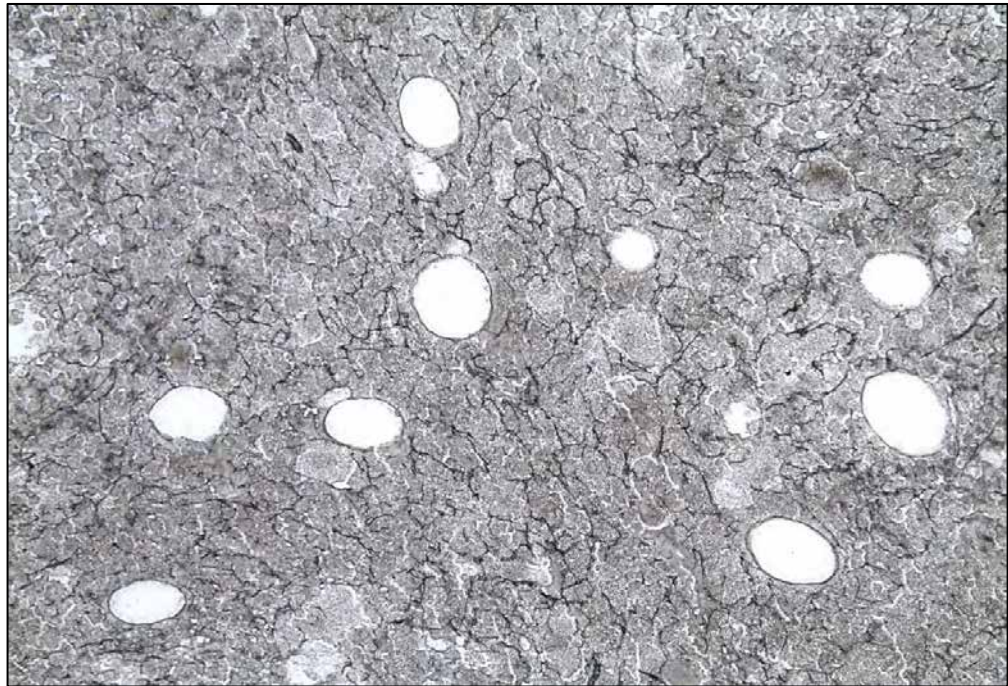


Рисунок 29. Трепанобиоптат костного мозга пациентки 24 лет. Степень ретикулинового фиброза MF-1. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 200$ .

При проведении ИГХ-исследования с антителами к CD42b определялись многочисленные атипичные мегакариоциты с признаками клазматоза (рисунок 30).

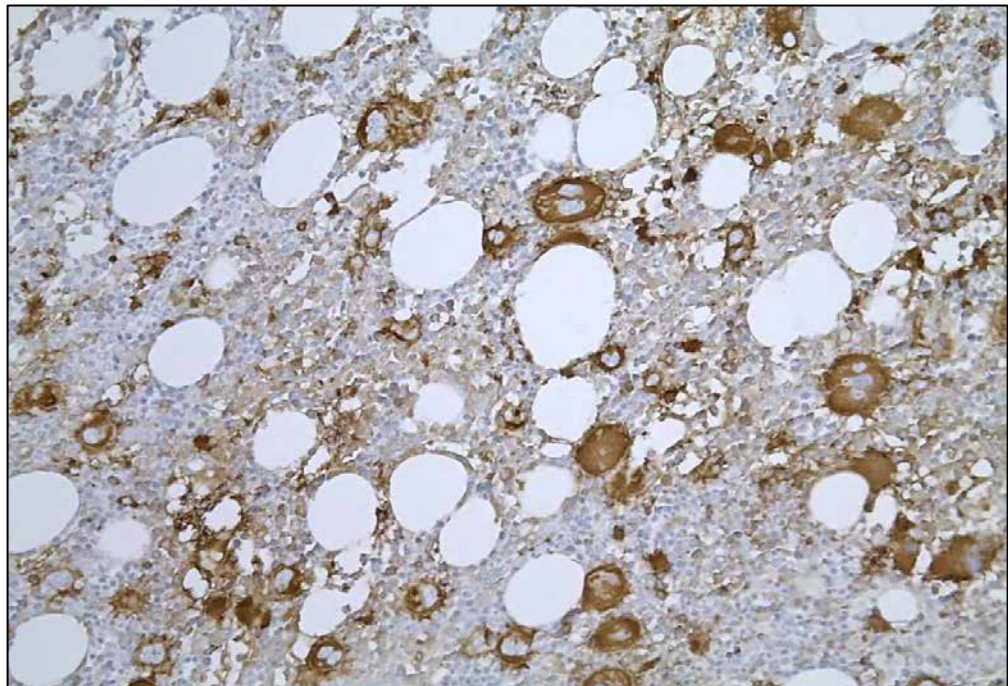


Рисунок 30. Атипичные мегакариоциты с признаками клазматоза. Реакция с применением антител к CD42b. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .

При ИГХ-исследования с антителами к CD71 визуализировались элементы эритроидного ростка, располагавшиеся в виде рыхлых и рассыпающихся скоплений (рисунок 31).

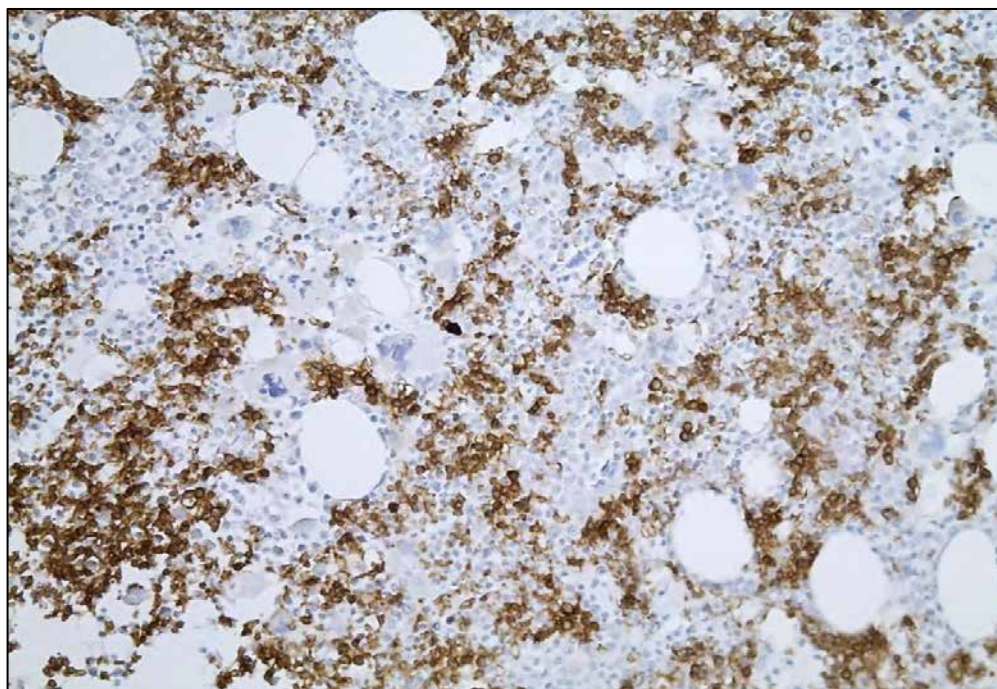


Рисунок 31. Рыхлые и рассыпающиеся скопления эритрокариоцитов. Реакция с применением антител к CD71. Иммуноферментный метод. Увеличение  $\times 200$ .

Таким образом, в трепанобиоптатах костного мозга 2016 и 2017 гг. по гистоархитектонике и морфологии ростков миелопоэза морфологическая картина была сходна и характеризовала миелопролиферативное новообразование- истинную полицитемию, маскированную форму, протекающую с абдоминальными тромбозами, с фиброзом стромы костного мозга MF-1 в 2017 году.

С февраля 2018 года прием гидроксикарбамида был отменен гематологом по месту жительства (со слов пациентки).

При динамическом наблюдении пациентки в 2018 году размеры селезенки увеличились и составляли по данным УЗ-исследования  $262 \times 104$  мм. В общем анализе крови показатель Hb составлял 113 г/л, количество эритроцитов составляло  $4,42 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов-  $3,71 \times 10^9/л$ , тромбоцитов-  $177 \times 10^9/л$ . Рекомендована консультация в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России для решения вопроса о возобновлении циторедуктивной терапии. При молекулярном исследовании уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* составлял 33% клеток.

В апреле 2019 года пациентка вновь обратилась для консультации в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. При дообследовании в общем анализе крови показатель Hb составлял 114 г/л, количество эритроцитов-  $4,4 \times 10^{12}/л$ , лейкоцитов-  $3,67 \times 10^9/л$ , тромбоцитов-



$141 \times 10^9$ /л. Учитывая планирование пациенткой беременности, от возобновления приема циторедуктивной терапии принято решение отказаться.

Через 7 месяцев (декабрь 2019 года) пациентка вновь была консультирована в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. В общем анализе крови показатель Hb-113 г/л, количество эритроцитов составляло  $4,28 \times 10^{12}$ /л, лейкоцитов-  $4,88 \times 10^9$ /л, тромбоцитов-  $141 \times 10^9$ /л. По данным УЗ-исследования размеры селезенки увеличились до  $270 \times 107$  мм. Рекомендовано возобновить прием гидроксикарбамида.

В августе 2020 года пациентка снова была проконсультирована в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. В общем анализе крови показатель Hb составлял 115 г/л, количество эритроцитов составляло  $4,28 \times 10^{12}$ /л, лейкоцитов-  $43,83 \times 10^9$ /л, тромбоцитов-  $134 \times 10^9$ /л. По данным УЗ-исследования размеры селезенки сократились до  $258 \times 85$  мм. Вместе с тем, при проведении молекулярного исследования уровень аллельной нагрузки *JAK2V617F* повысился до 52%.

Таким образом, у молодой пациентки в течение 7 лет прогрессирует миелопролиферативное заболевание: неклассическая форма истинной полицитемии- маскированная форма, протекающая с абдоминальными тромбозами, нарастающей спленомегалией и выявленным в 2017 году фиброзом стромы костного мозга MF-1. При обследовании в 2013 году по поводу вторичного бесплодия у пациентки в возрасте 19 лет впервые была выявлена спленомегалия и признаки тромбозов сосудов портальной системы. В связи с этим пациентка была направлена на консультацию к хирургу для дообследования и принятия решения о тактике лечения. К этому моменту у пациентки были выражены все признаки тромбоза вен портальной системы, диагностированы варикозно расширенные вены пищевода. Только в 2016 году пациентка была направлена на консультацию к гематологу и ей впервые было проведено молекулярное исследование на наличие драйверных мутаций при миелопролиферативных новообразованиях, в результате которого была обнаружена мутация *JAK2V617F*. Вместе с тем, обнаружение у пациентки абдоминальных тромбозов, которые не являются патогномичным признаком для какой-либо нозологической формы миелопролиферативного новообразования, но обуславливают анемию и нередко тромбоцитопению, не позволяло ориентироваться на показатели клинического анализа крови в рамках дифференциальной диагностики миелопролиферативных новообразований. Анемия, снижение количества лейкоцитов и отсутствие тромбоцитоза не соответствовали критериям какой-либо нозологии *JAK2+* миелопролиферативного новообразования. Пациентке была проведена трепанобиопсия костного мозга. Гистологическое исследование костного мозга, при сопоставлении с клинико-

лабораторными данными, результатами молекулярного и инструментального исследований, позволило установить диагноз маскированной формы истинной полицитемии.

Данный клинический пример демонстрирует длительное латентное течение истинной полицитемии, протекающей с клиническими «масками». У пациентки молодого возраста клиническая манифестация заболевания была сопряжена со спленомегалией, тромбозами вен портальной системы и показаниями для хирургического лечения – лигирования варикозно расширенных вен пищевода. В подобных клинических ситуациях необходимо взаимодействие врачей различных специальностей, выполнение трепанобиопсии костного мозга в целях своевременной диагностики заболевания и разработки долгосрочной терапевтической тактики. Представляется важным еще раз подчеркнуть, что в новой реакции классификации ВОЗ 2017 года Опухолей гемопоэтический и лимфоидной тканей гистологическое исследование костного мозга является одним из главных критериев диагностики истинной полицитемии. Динамическое наблюдение с возможностью повторного гистологического исследования костного мозга позволило оценить динамику изменений морфологического субстрата заболевания у пациентки с длительным анамнезом, обнаружить возникновение фиброза стромы костного мозга.

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

После выхода в печать в 2008 году классификации ВОЗ «Опухолей кроветворной и лимфоидной тканей» в научной литературе появились данные, свидетельствующие о гиподиагностике истинной полицитемии при использовании установленных референсных показателей Hb [23, 24, 27, 95]. При этом субнормальный уровень сывороточного ЭПО, определяющийся не более чем в 85% случаев истинной полицитемии [23, 24, 27, 111], а показатель эритроцитарной массы (RCM), составляющий >25% от нормального значения при истинной полицитемии, позволили переклассифицировать 46,5% случаев из группы эссенциальной тромбоцитемии в маскированную форму истинной полицитемии [189]. Так в практическую деятельность врачей-гематологов вернулся термин «маскированная истинная полицитемия» [23], впервые появившийся в 1994 году для обозначения трудных для диагностики случаев истинной полицитемии, сопровождавшихся в дебюте заболевания тромбозами или кровотечениями [49, 126, 143]. Эти данные послужили основанием для пересмотра и дальнейшего уточнения критериев диагностики классической (развернутой) истинной полицитемии, что позволило снизить пороговые значения Hb и Ht, в новой редакции классификации ВОЗ 2017 [192]. Тем не менее, понятие «маскированная истинная полицитемия» остается размытым, и включает в себя случаи с отсутствием референсных значений Hb/Ht и морфологической картиной истинной полицитемии, а также ранние морфологические проявления истинной полицитемии наряду с классической (развернутой) истинной полицитемией, протекающей с тромбозами, спленомегалией, или с возникшими кровотечениями при манифестации заболевания. Характеристика и уточнение критериев своевременной диагностики неклассических случаев истинной полицитемии являются актуальными задачами современной гематологии и гематопатологии.

Одной из насущных задач патоморфологической диагностики является максимально точное определение нозологической формы миелопролиферативного новообразования, с учетом всех анамнестических, клинико-лабораторных, инструментальных, молекулярных данных. Разработка и уточнение патоморфологических критериев ранних стадий миелопролиферативных новообразований необходимы для снижения частоты диагностики МПН-Н в патологоанатомической практике.

Базовым критерием проведенного исследования явилось наличие мутации *JAK2V617F* у больных с диагнозом миелопролиферативного новообразования, установленным по критериям ВОЗ 2008 г. [191]. Данная мутация встречается при разных нозологических формах Ph-негативных МПН: первичном миелофиброзе, эссенциальной тромбоцитемии или МПН-Н, и



является обязательной для диагностики истинной полицитемии (mut *JAK2V617F* или *JAK2* экзон 12). При морфологической картине истинной полицитемии в отсутствие мутации *JAK2*, субстрат миелопролиферативного новообразования следует отнести к МПН-Н.

При пересмотре ретроспективного материала, с учетом клинико-лабораторных, инструментальных данных, согласно критериям классификации ВОЗ 2017 года было выделено 3 основных исследуемых группы пациентов с диагнозами неклассической истинной полицитемии (ранней стадии истинной полицитемии, маскированной формы истинной полицитемии) и МПН-Н, *JAK2+*.

Проведенный детальный анализ с использованием морфологических и иммуногистохимических, лабораторных и инструментальных параметров позволил охарактеризовать каждую из исследованных групп и провести сопоставления между ними.

Для того, чтобы определить, насколько выделенные группы пациентов неклассической истинной полицитемии отличаются от классической (развернутой) истинной полицитемии была сформирована группа из 20 пациентов с диагнозом классической истинной полицитемии, медианой возраста 49 лет (возрастной диапазон 27-71 лет, соотношение М:Ж- 1,86:1). Группы пациентов с ранней стадией и маскированной формы истинной полицитемии были объединены в общую группу неклассической истинной полицитемии.

По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм наблюдалось в 50% наблюдений (максимально до 230 мм) в группе пациентов с классической (развернутой) истинной полицитемией. В 10% случаев в анамнезе были выявлены тромботические осложнения: в 5% случаев- тромбоз вен нижних конечностей, в 5% случаев- геморрагический инсульт.

При сравнении групп пациентов с неклассической истинной полицитемией и классической истинной полицитемией было обнаружено, что возникновение тромбозов при неклассической истинной полицитемии встречается в 24% (каждый четвертый пациент) против 10% при классической истинной полицитемии.

Известно, что в патогенезе тромбоза у пациентов с миелопролиферативным новообразованием ключевая роль отводится увеличенному количеству клеток крови, что в совокупности с соматическим статусом пациента (предшествующий анамнез тромботических событий, ожирение, гипертония, гиперлипидемия и другие) в разной степени способствует возрастанию риска возникновению тромбоза. Клональная пролиферация клеток миелопоэза влечет за собой не только увеличение количества циркулирующих клеток крови, но и качественные изменения крови с приобретением прокоагулянтных свойств, секрецией

воспалительных цитокинов и повышенной экспрессией молекул адгезии. При этом в ответ на повышение воспалительных цитокинов, гипервязкости и увеличения уровня протеаз, продуцируемых лейкоцитами (например, эластазы, катепсина-G, миелопероксидазы), в эндотелии сосудов наблюдаются протромботические изменения. В частности, повышенная активность рецепторов молекул эндотелиальной адгезии способствует прикреплению тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов к стенке сосудов с последующей локальной реакцией свертывания и образованием фибрина. Подобное состояние гиперкоагуляции приводит к повышенному образованию тромбов в сосудах микроциркуляторного русла паренхиматозных органов [29].

Кроме наличия прокоагулянтного фона возрастание частоты венозных тромбозов у пациентов с миелопролиферативным новообразованием (чаще- с истинной полицитемией) может быть также обусловлено тем, что эндотелиоциты микроциркуляторного русла селезенки и ее крупных сосудов в значительной части случаев несут в себе мутацию *JAK2V617F* [147]. Помимо этого у пациентов с тромбозами собственных вен печени в эндотелиоцитах сосудов печени также обнаруживают мутацию *JAK2V617F* [160]. Наличие данной мутации в эндотелиоцитах сосудов селезенки и печени, возможно, имеет решающее значение в патогенезе абдоминальных тромбозов/синдрома Бадда-Киари при миелопролиферативных новообразованиях, *JAK2+* с возникновением портальной гипертензии и спленомегалии, и может отражать локальный протромботический статус стенки сосудов.

Кроме того, увеличение размеров селезенки может быть связано с особенностями ее микрососудистой сети, в которой, в силу повышенного количества форменных элементов крови, и повышения вязкости крови, скорость кровотока снижается, форменные элементы задерживаются, что приводит к сладж-феномену.

Этим, вероятно, можно объяснить обнаруженную в данном исследовании спленомегалию (>120 мм) у 64% пациентов с неклассическими формами истинной полицитемии (ранней стадией и маскированной формой), изолированным тромбоцитозом (при несоответствии уровней Hb и Ht диагностическим критериям ВОЗ 2017), в то время как венозные тромбозы были обнаружены только у 24% пациентов. Так, по-нашему опыту, при гистологическом исследовании операционного материала селезенки пациентов с истинной полицитемией и спленомегалией в подобных случаях отмечаются морфологические признаки фиброконгестивной селезенки вследствие застоя крови и фиброза селезеночных тяжей, при отсутствии выраженных признаков экстрамедуллярного миелопоэза.

В общем анализе крови пациентов с классической (развернутой) истинной полицитемией отмечались высокие показатели Hb и Ht (180,5 (169-195) г/л, 52,1 (49,4-56,2)%, соответственно),

увеличенное количество эритроцитов ( $6,45 (5,97-6,8) \times 10^{12}/л$ ) и лейкоцитов ( $10,31 (8,23-11,2) \times 10^9/л$ ). В биохимическом анализе крови показатель сывороточного ЭПО был ниже нормальных пороговых значений.

Для неклассической истинной полицитемии характерны: изолированный тромбоцитоз ( $603,5 (553-715) \times 10^9/л$ ) без лейкоцитоза ( $7,79 (7,03-8,49) \times 10^9$  в 1), нормальные показатели Hb ( $139,8 (138-148)$  г/л), Ht ( $42,3 (41,6-44,2)\%$ ), и сывороточного ЭПО. Причины данных особенностей гемограммы неклассических форм истинной полицитемии с изолированным тромбоцитозом, возможно, кроются в уровне аллельной нагрузки. Неклассическая истинная полицитемия характеризуется невысокой аллельной нагрузкой *JAK2V617F*, составляющей в среднем 21,46 (10-24)%, медианой-14% против 36,7 (15-61,5)%, медианой-26% при классической истинной полицитемии. Таким образом, медиана уровня аллельной нагрузки *JAK2V617F* при развернутой форме истинной полицитемии в 1,85 раза выше, чем при неклассической истинной полицитемии. И если повышение показателей Hb и Ht коррелирует с более высокой аллельной нагрузкой *JAK2V617F* вследствие активации и влияния провоспалительных цитокинов на пролиферацию клеток эритроидного и гранулоцитарного ростков [193], то при невысоких показателях аллельной нагрузки *JAK2V617F* в наибольшей степени повышается количество тромбоцитов, что обусловлено усиленной пролиферацией и созреванием мегакариоцитов. Это объяснимо особенностями активации мегакариоцитопоэза, который можно разделить на два основных этапа: пролиферативный, с продукцией коммитированных клеток-предшественниц и их развитием до мегакариобластов, и дифференциальный, включающий в себя блок деления мегакариобластов с их последующим созреванием до мегакариоцитов. На оба этих этапа непосредственно влияет ТПО, который оказывает на элементы мегакариоцитарного роста как индуцирующий, так и ингибиторный эффект. ТПО-индуцированная пролиферация и дифференцировка зависят от уровней продукции белка при мутации генов *JAK2* и *MPL*: если показатель одного из этих белков невысокий, ТПО имеет слабый сигнал, который способствует пролиферации клеток. При более высоких уровнях белков генов *JAK2* и *MPL* ТПО способствует блоку продукции мегакариобластов и индуцирует их дифференцировку (созревание) [33]. Кроме того, спленомегалия может опосредованно приводить к нарастанию портальной гипертензии, в частности- предпеченочной, что приводит к локальной гипоксии в сосудах печени и сосудах почек, вызывает вторичную гипоксию в данных органах и активирует выработку ЭПО тубулярными и перитубулярными клетками почек, перисинусоидальными клетками печени по принципу обратной связи [5]. Это может являться еще одной причиной обнаруженной разницы в показателях сывороточного ЭПО у больных с неклассическими

формами истинной полицитемии и классической (развернутой) формой истинной полицитемии: 8,6 (2,3-13,0) МЕ/мл против 1,69 (0,55-3,18) МЕ/мл.

Неклассическая истинная полицитемия характеризуется сходными патоморфологическим признаками с развернутой истинной полицитемией, однако с различной частотой встречаемости ЭТ-подобных форм мегакариоцитарного ростка (60% при неклассической истинной полицитемии против 25% при классической (развернутой) истинной полицитемии ( $p=0.0078$ ). Таким образом, наличие ЭТ-подобных форм не является критерием исключения диагноза истинной полицитемии, как предполагалось ранее [22]. В то же время устойчивым морфологическим признаком мегакариоцитарного ростка при всех формах истинной полицитемии (классической и неклассической) являются крупные клетки с «кольцевидными» ядрами (96% при неклассической истинной полицитемии и 100% при классической форме истинной полицитемии).

В результате сравнительного анализа более чем 30 морфологических параметров были установлены следующие различия ранней стадии истинной полицитемии и маскированной формы истинной полицитемии: по степени ретикулинового фиброза MF-1 (18% против 43%), по частоте тромбозов вен портальной системы (3,5% против 29%) и частоте тромбозов собственных вен печени (0% против 14%), и, как следствие более частых тромбозов при маскированной истинной полицитемии; различия по показателям Hb и Ht: Hb 146,2 (143-155)г/л и Ht 44,2 (42-47)% при ранней стадии истинной полицитемии, Hb 131,5(122-142) г/л и Ht 40,7(42-47)% при маскированной форме истинной полицитемии.

В рамках дифференциальной диагностики реактивных состояний (вторичного эритроцитоза) и миелопролиферативных новообразований с клональной природой повышения Hb и Ht, на основании сходства основных морфологических черт субстрата заболевания, варианты истинной полицитемии были объединены в общую группу для сопоставления с группой пациентов с вторичным эритроцитозом, главными лабораторными проявлениями которого являлись высокие показатели Hb, Ht, эритроцитов.

Группа пациентов с вторичным (реактивным) эритроцитозом включала в себя 10 пациентов с медианой возраста 37 лет (возрастной диапазон 25- 49 лет), все пациенты оказались мужского пола. Мутации *JAK2V617F*, а также мутации *JAK2* экзон 12 ни в одном из случаев не было обнаружено. По данным УЗ-исследования увеличение селезенки свыше 120 мм не наблюдалось ни у одного из пациентов.

При гистологическом исследовании трепанобиоптатов костного мозга пациентов с вторичным (реактивным) эритроцитозом клеточность костного мозга выше нормы определялась в 30% случаев, не превышала нормальных значений (относительно возрастной

нормы) в 20% наблюдений, и была ниже нормы в 50% случаев. Расширение эритроидного ростка отмечалось в 70%, причем в 30% случаев эритроидный росток был в умеренном количестве. Гранулоцитарный росток в 90% случаев не превышал норму, а в 10% наблюдений был сужен, во всех случаях был представлен зрелыми формами, без признаков омоложения. Количество мегакариоцитов в 80% случаев не было увеличено, а в 20% наблюдений было ниже нормы.

При сравнительном анализе лабораторных данных было установлено, что характерные для вторичного эритроцитоза высокие показатели Hb (среднее 179 г/л) и Ht (среднее 49,8%), сходны с показателями для классической (развернутой) формы истинной полицитемии, но при отсутствии тромбоцитоза (среднее-  $230 \times 10^9/\text{л}$ ) и при нормальных показателях сывороточного ЭПО (среднее 9,73 МЕ/мл). При сравнении с неклассической истинной полицитемией отмечаются различия в показателях Hb (среднее 139,8 г/л при неклассической истинной полицитемии против 179,0 г/л при вторичном эритроцитозе) и Ht (среднее- 42,3% при неклассической истинной полицитемии против 49,8% при вторичном эритроцитозе), также при отсутствии тромбоцитоза.

В целях визуализации диагностически значимых особенностей иммуногистоархитектоники и морфологии мегакариоцитарного и эритроидного ростков при истинной полицитемии на материале трепанобиоптатов костного мозга всех групп пациентов было проведено иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b и CD71. В трепанобиоптатах костного мозга у пациентов с истинной полицитемией (классической и неклассической) при сопоставлении данных морфологической оценки гистоархитектоники эритроидного и мегакариоцитарного ростков с использованием гистологического исследования и с применением дополнительного иммуногистохимического исследования отмечались незначительные отличия. Расширение эритроидного ростка при гистологическом исследовании, детектированное в 100% наблюдений, при использовании ИГХ-метода наблюдалось в 88% случаев, в 12% случаев- не превышало норму. Это объясняется тем, что антитела к CD71 визуализируют преимущественно незрелый пул эритроидного ростка. Более зрелые формы эритрокариоцитов экспрессируют антитела к CD71 слабее, а на эритроцитах антитела к CD71 полностью отсутствуют. Расширение мегакариоцитарного ростка при гистологическом исследовании было обнаружено в 98% наблюдений, как и при ИГХ-исследовании. В 85% случаев при истинной полицитемии (классическая и неклассическая формы) и в 100% случаев при МПН-Н определялся клазматоз мегакариоцитов, что не было обнаружено в трепанобиоптатах пациентов с вторичным (реактивным) эритроцитозом. Таким образом, феномен клазматоза мегакариоцитов не характерен для вторичных (реактивных) изменений

миелопоэза, а его обнаружение при иммуногистохимическом исследовании может служить дополнительным дифференциальным признаком субстрата миелопролиферативного новообразования.

В отличие от неклассической и классической истинной полицитемии, для вторичного эритроцитоза характерны плотные кластеры эритрокариоцитов (70% при вторичном эритроцитозе против 0% при истинной полицитемии), отсутствие омоложения и мегалобластоподобных форм эритроидного ростка (90% и 82%, соответственно, при истинной полицитемии против 0% при вторичном эритроцитозе), отсутствие пролиферации и атипичных форм мегакариоцитарного ростка (98% и 100%, соответственно, при истинной полицитемии против 0% при вторичном эритроцитозе), отсутствие иммуногистохимических признаков клазматоза мегакариоцитов (85% при истинной полицитемии против 0% при вторичном эритроцитозе) и степени ретикулинового фиброза MF-1 (28% при истинной полицитемии против 0% при вторичном эритроцитозе). Обнаруженные различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).

В дополнение к этому, применение иммуногистохимического исследования с антителами к CD71 для объективизации гистоархитектоники и степени омоложения эритроидного ростка облегчает проведение дифференциальной диагностики в группе Rh-негативных МПН, что может быть рекомендовано для использования в сложных диагностических случаях.

Причинами врожденного вторичного эритроцитоза являются наличие гемоглобина с высоким сродством к кислороду, 2,3- дефицит бифосфолипидов мутаза. Выделяют так же эритропоэтин-рецептор-опосредованный врожденный вторичный эритроцитоз и болезнь фон Гиппеля-Линдау. Причинами приобретенного вторичного эритроцитоза являются ЭПО-опосредованная гипоксия, гипоксия центрального генеза, хроническая болезнь легких, наличие правосторонних сердечно-легочных сосудистых шунтов, отравление угарным газом, эритроцитоз курильщика, синдромы гиповентиляции, включая апноэ во сне, пребывание в высокогорье. Кроме этого, причинами приобретенного вторичного эритроцитоза могут быть локальная почечная гипоксия, стеноз почечной артерии, терминальная стадия заболеваний почек, гидронефроз, почечные кисты (поликистоз почек) с патологической гиперпродукцией ЭПО. К появлению приобретенного вторичного эритроцитоза приводит также ряд онкологических заболеваний, например, гепатоцеллюлярная карцинома, почечно-клеточный рак, гемангиобластома мозжечка, рак/аденома паращитовидной железы, лейомиома матки, феохромоцитомы, менингиома. Среди причин приобретенного вторичного эритроцитоза можно также выделить экзогенное повышение ЭПО, связанное с применением наркотических

препаратов, андрогенных препаратов, или пострасплантационное (ренальное) повышение ЭПО. Помимо этого, выделяют идиопатический эритроцитоз неустановленной этиологии [120].

Таким образом, тщательный сбор анамнеза на первом этапе обследования пациента имеет первостепенное диагностическое значение. Вторым этапом, независимо от характерных для вторичного эритроцитоза анамнестических данных, следует выполнить молекулярное исследование на наличие мутации *JAK2* (*JAK2V617F*, 12 exon). Проведение трепанобиопсии костного мозга необходимо для диагностики сложных случаев вторичных эритроцитозов, протекающих, например, с вторичным тромбоцитозом (при хроническом воспалении и иных причинах, не имеющих в своей основе клонального заболевания системы крови).

Несмотря на улучшающуюся с каждым годом диагностику клональных заболеваний крови с применением комплекса методов исследования, многие задачи дифференциальной диагностики остаются нерешенными. Одной из таких важных задач является дифференциальная диагностика МПН-Н. Для подтверждения или опровержения гипотезы о том, что пациенты с установленным диагнозом МПН-Н, *JAK2+* - это больные, находящиеся на ранней стадии истинной полицитемии (при исключении иных нозологий миелопролиферативных новообразований), был проведен сравнительный анализ морфологических характеристик и клинико-лабораторных данных групп пациентов с ранней стадией истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2+*. В группу МПН-Н, *JAK2+* вошли 10 пациентов, с медианой возраста 40 лет (возрастной диапазон 24- 64 лет), соотношением М:Ж- 1:4. Данная группа была сформирована с помощью всестороннего экспертного анализа на основании критериев редакции ВОЗ 2017 года, в процессе которого были исключены пациенты с диагнозами эссенциальной тромбоцитемии и пре-фиброзной стадии первичного миелофиброза.

При сравнительном анализе клинико-лабораторных, инструментальных и молекулярных данных статистически достоверных различий в группах МПН-Н, *JAK2+* и ранней стадии истинной полицитемии выявлено не было ( $p > 0.05$ ).

Установленные при сопоставлении отдельных морфологических параметров статистически достоверные различия по количественному отношению гранулоцитарного ростка ( $p=0.0009$ ) и клеточности костного мозга ( $p=0.02$ ) позволили предпринять попытку разработать экспертное правило дифференциальной диагностики. С помощью разработанного правила с использованием формальных алгоритмов и на основе морфологических критериев, наиболее соответствующих по ранней стадии истинной полицитемии, была сделана попытка переклассифицировать пациентов группы МПН-Н, *JAK2+* в группу ранней стадии истинной полицитемии. Возможно, в связи с тем, что численность исходных групп МПН-Н, *JAK2+* и ранней стадии истинной полицитемии были небольшими, получить статистически достоверные

результаты с использованием экспертного правила дифференциальной диагностики не удалось. Тем не менее, полученные данные свидетельствуют в пользу единого спектра заболевания, объединяющего группы ранней стадии истинной и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup>.

Еще одной задачей исследования являлось сопоставление аллельной нагрузки мутантного клона *JAK2* у пациентов с МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> и неклассической истинной полицитемией, без или с применением циторедуктивной терапии. Средние значения аллельной нагрузки мутантного клона *JAK2* составляли соответственно 21,46% и 18,2% с медианой 12% в обеих подгруппах. Было выявлено постепенное возрастание аллельной нагрузки *JAK2* при неклассической истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup>, что в среднем составило +0,39% в месяц, в то время как при проведении циторедуктивной терапии снижение аллельной нагрузки в данных группах происходило в 2 раза медленнее (-0,18% в месяц). Таким образом, за время наблюдения с мониторингом аллельной нагрузки *mut JAK2* в течение 3,5 лет в процессе циторедуктивной терапии в исследуемых группах пациентов не было обнаружено случаев молекулярной ремиссии. Кроме этого, полученные данные свидетельствуют о прогрессии заболевания, что, с учетом оценки вероятности начала терапии, в 50% случаев к 6 месяцам (медиана) от даты установления диагноза неклассической истинной полицитемии или МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> приводит к возникновению необходимости назначения циторедуктивной терапии.

С учетом подробного разностороннего анализа группы МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> с выделением из нее неклассических форм истинной полицитемии (ранней стадии и маскированной формы) следует отметить необходимость установления правильного диагноза на ранних этапах миелопролиферативных новообразований. Важная роль принадлежит в этом гистологическому исследованию трепанобиоптатов костного мозга. Количество, гистотопография и морфология клеток мегакариоцитарного ростка при Rh-негативных МПН во многом определяют признаки той или иной нозологии.

В процессе сравнительного анализа особенностей морфологии костного мозга пациентов с неклассической истинной полицитемией, классической истинной полицитемией, вторичным эритроцитозом, МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> были выделены главные черты атипичности мегакариоцитов, представленные в таблице 30.



Таблица 30. Частота встречаемости ЭТ-подобных форм и атипичных форм мегакариоцитов с «кольцевидными» ядрами в группах пациентов с неклассической и классической истинной полицитемией, вторичным эритроцитозом и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup>.

Морфология мегакариоцитов	Нозология				
	Неклассическая истинная полицитемия		Классическая истинная полицитемия	Вторичный эритроцитоз	МПН-Н, <i>JAK2</i> <sup>+</sup>
	Ранняя стадия	Маскированная форма			
ЭТ-подобные формы	61%	57%	25%	0%	40%
Формы с «кольцевидными» ядрами	96%	93%	100%	0%	100%

Следовательно, принятые ранее морфологические критерии дифференциальной диагностики эссенциальной тромбоцитемии и истинной полицитемии на сегодняшний день претерпевают ряд изменений, что связано, в первую очередь, с особенностями морфологии атипичных мегакариоцитов и частотой их встречаемости при данных нозологиях.

Неверное установление диагноза эссенциальной тромбоцитемии, *JAK2*<sup>+</sup> вместо истинной полицитемии оказывает влияние на прогностическую модель, приводит к снижению настороженности по отношению к потенциально инвалидирующим или угрожающим жизни тромботическим осложнениям вследствие постепенного увеличения количества форменных элементов и вязкости крови, и может быть причиной ошибочного представления о худшем прогнозе эссенциальной тромбоцитемии, *JAK2*<sup>+</sup> по сравнению с эссенциальной тромбоцитемией, *JAK2V617F*-негативной, или эссенциальной тромбоцитемией, *CALR*<sup>+</sup> [41, 111, 148].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы с использованием комплексного подхода к диагностике отдельных нозологических форм миелопролиферативных заболеваний, включающего анализ клинических, лабораторных, инструментальных и молекулярных данных, использование гистологического, гистохимического и иммуногистохимического методов исследования трепанобиоптатов костного мозга 82 пациентов, было показано, что наряду с классической (развернутой) истинной полицитемией следует выделять неклассическую истинную полицитемию, включающую в себя раннюю стадию и маскированную форму, при которых лабораторные показатели ниже референсных значений Hb и Ht согласно Классификации ВОЗ Опухолей кроветворной и лимфоидной тканей 2017 года. Ранняя стадия истинной полицитемии, характеризуется патоморфологическими признаками, сходными с маскированной формой истинной полицитемии, однако выявлены различия по степени ретикулинового фиброза, частоте возникновения тромбозов вен портальной системы и собственных вен печени. Статистически достоверные различия между ранней стадией и маскированной формой истинной полицитемии выявлены по показателям Hb ( $p=0.0015$ ) и Ht ( $p=0.0094$ ).

При исключении других нозологических форм из группы МПН-Н, *JAK2+* согласно критериям ВОЗ 2017 г., и проведении сравнительного анализа с МПН-Н, *JAK2+* и ранней стадией истинной полицитемии отмечается сходство клинико-лабораторных показателей, инструментальных данных. В то же время при сопоставлении морфологических показателей для МПН-Н, *JAK2+*, в отличие от ранней стадии истинной полицитемии, не характерно повышение клеточности костного мозга и расширение гранулоцитарного ростка. Эти данные свидетельствуют в пользу биологического континуума этих двух нозологий.

При схожести отдельных клинико-лабораторных показателей (Hb и Ht), между группами пациентов с вторичным эритроцитозом и истинной полицитемией (классической и неклассической формами) выявлены достоверные отличия по клинико-лабораторным, молекулярным, инструментальным и морфологическим показателям. Кроме того, при иммуногистохимическом исследовании обнаружены статистически значимые различия ( $p < 0.05$ ) по критерию выраженности незрелого пула эритроидного ростка (омоложения) и феномена клазматоза мегакариоцитов.

Полученные в результате этого исследования данные позволят совершенствовать диагностику неклассической истинной полицитемии с выделением ранней стадии и маскированной формы, что, в свою очередь, позволит пересмотреть стратификацию пациентов

по риску тромботических осложнений с последующим определением оптимальной долгосрочной терапевтической тактики у пациентов данной группы.

### **Практические рекомендации**

На основе проведенного клинико-патоморфологического исследования в клинической практике целесообразно выделять раннюю и маскированную формы истинной полицитемии, что может быть рекомендовано для применения в клинической практике.

Рекомендовано использование гистологического и гистохимического исследования костного мозга на ранних этапах заболевания для проведения дифференциальной диагностики неклассической истинной полицитемии, классической (развернутой) истинной полицитемией и вторичных эритроцитозов.

Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD42b и CD71 служит дополнительным критерием дифференциальной диагностики различных форм истинной полицитемии и вторичных эритроцитозов.

Учитывая высокую частоту тромботических осложнений (тромбозы вен портальной системы, тромбозы собственных вен печени) в группе больных неклассической истинной полицитемией необходим регулярный контроль УЗ-доплерографии.

В целях определения эффективности терапии и корректировки назначенного лечения мониторинг аллельной нагрузки *JAK2V617F*, с учетом ее медленного снижения при применении циторедуктивной терапии, может быть использован в дополнение к лабораторным показателям общего анализа крови.

Алгоритм дифференциальной диагностики различных форм истинной полицитемии, полученные данные по определению клинических особенностей вариантов истинной полицитемии на момент установления диагноза, внедрены в практику работы патологоанатомического отделения, отделения стандартизации методов лечения и консультативного гематологического отделения с дневным стационаром по проведению интенсивной высокодозной химиотерапии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Выделение неклассической истинной полицитемии влияет на структуру нозологических форм внутри группы МПН, прогностическую модель истинной полицитемии, стратификацию рисков тромботических осложнений.

**ВЫВОДЫ:**

1. Ранняя и маскированная формы неклассической истинной полицитемии характеризуются нормальными показателями Hb и Ht (соответствующие средние значения 146,2 г/л и 44,2%; 131,5 г/л и 40,7%), изолированным тромбоцитозом, увеличением селезенки (>120 мм по длиннику) – у 64% пациентов, и отличаются между собой по степени ретикулинового фиброза стромы костного мозга MF-1 (18% случаев при ранней стадии против 43% при маскированной форме), частотой тромбозов вен портальной системы (3,85% при ранней стадии против 29% при маскированной форме) и собственных вен печени (0% при ранней стадии против 14% при маскированной форме).

2. При иммуногистохимическом исследовании выявлены статистически значимые различия между истинной полицитемией (неклассической и классической формами) и вторичным эритроцитозом (85% против 0%,  $p < 0.0001$ ) по признаку клазматоза клеток мегакариоцитарного ростка, что может служить дополнительным дифференциальным признаком. При сопоставлении данных иммуногистохимического и гистологического исследований групп пациентов с истинной полицитемией и вторичным эритроцитозом обнаружено, что при вторичном эритроцитозе только в 50% случаев при иммуногистохимическом исследовании определяется расширение и омоложение эритроидного ростка (иммуногистохимическое исследование -88% против 50%,  $p=0.0092$ ; гистологическое исследование - 90% против 0%  $p < 0.0001$ ).

3. При проведении клинко-морфологического сопоставления по гистологическим, иммуногистохимическим, лабораторным и инструментальным параметрам, с исключением из группы МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> согласно критериям ВОЗ 2017 г. случаев эссенциальной тромбоцитопении и пре-фиброзной стадии первичного миелофиброза, МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> и ранняя стадия истинной полицитемии различаются только по клеточности костного мозга ( $p=0.02$ ) и выраженности гранулоцитарного ростка ( $p=0.0009$ ), что свидетельствует в пользу единой биологической основы данных нозологий, которые характеризуют разные стадии одного заболевания.

4. При неклассической истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> средние значения аллельной нагрузки мутантного клона *JAK2* в дебюте заболевания составляют соответственно 21,46% и 18,2%. Возрастание аллельной нагрузки *JAK2* при неклассической истинной полицитемии и МПН-Н, *JAK2*<sup>+</sup> составляет +0,39% в месяц. При молекулярном мониторинге в

течение 3,5 лет в процессе циторедуктивной терапии в исследуемых группах пациентов не обнаружено случаев молекулярной ремиссии.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдулкадыров К. М., Шуваев В. А., Мартынкевич И. С. Что нам известно об истинной полицитемии (обзор литературы и собственные данные) //Онкогематология. – 2015. – №. 3. – С. 28-42.
2. Абдуллаев А. О. и др. Количественная оценка мутации V617F гена JAK2 при хронических миелопролиферативных заболеваниях //Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – №. 7.
3. Аржанова О. Н., Кошелева Н. Г. Этиопатогенез невынашивания беременности //Журнал акушерства и женских болезней. – 2004. – Т. 53. – №. 1.
4. Бицадзе В. О. и др. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности //Практическая медицина. – 2012. – №. 9 (65).
5. Блиндарь В. Н., Зубрихина Г. Н. Диагностическая значимость определения уровня эритропоэтина в клинической практике (обзор литературы) //Вестник РОНЦ им. НН Блохина РАМН. – 2007. – Т. 18. – №. 1.
6. Ковригина А. М., Байков В. В. Истинная полицитемия: новая концепция диагностики и клинические формы //Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9. – №. 2. – С. 115-122.
7. Меликян А. Л. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Rh-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз) //Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59. – №. 4.
8. Меликян А. Л. и др. Клинические рекомендации по диагностике и терапии Rh-негативных миелопролиферативных заболеваний (истинная полицитемия, эссенциальная тромбоцитемия, первичный миелофиброз)(редакция 2018 г.)
9. Меликян А. Л., Суборцева И. Н. Биология миелопролиферативных новообразований //Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2016. – Т. 9. – №. 3.
10. Меликян А. Л., Суборцева И. Н., Суханова Г. А. Тромбогеморрагические осложнения у больных Rh-негативными миелопролиферативными заболеваниями //Кровь. – 2014. – Т. 2. – №. 18. – С. 21-25.
11. Недосейкина М. С. и др. Наш демографический тренд 2014–2018 гг. – 2019.
12. Ольховский И. А. и др. JAK2V617F-позитивный клональный гемопоэз неопределенного потенциала у беременных //Акушерство гинекология репродукция. – 2019. – Т. 13. – №. 3. С. 204-210.

13. Ольховский И. А. и др. Выявляемость пациентов с онкогенной соматической мутацией янускиназы-2 (V617F JAK2) в рамках программ диспансерного и профилактического осмотров //Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – №. 5. С. 275-278.
14. Симбирцев А. С. Цитокины-новая система регуляции защитных реакций организма //Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1. – №. 1. – С. 9-16.
15. Суборцева И. Н. и др. Истинная полицитемия: обзор литературы и собственные данные //Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2015. – Т. 8. – №. 4.
16. Трацевская Ж. В. и др. Развернутая и маскированная истинная полицитемия в структуре Ph-негативных миелопролиферативных заболеваний //Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2020. – Т. 13. – №. 1.
17. Шургая М. А. и др. Медико-социальные аспекты демографической ситуации в России //Медико-социальная экспертиза и реабилитация. – 2017. – Т. 20. – №. 4.
18. Щербаков А. Ю., Сумцов Д. Г., Щербаков В. Ю. Морфофункциональные особенности плаценты при невынашивании беременности различной этиологии //Международный медицинский журнал. – 2003.
19. Alvarez-Larrán A. et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events //American journal of hematology. – 2014. – Т. 89. – №. 5. – С. 517-523.
20. Alvarez-Larrán A. et al. WHO-histological criteria for myeloproliferative neoplasms: reproducibility, diagnostic accuracy and correlation with gene mutations and clinical outcomes //British journal of haematology. – 2014. – Т. 166. – №. 6. – С. 911-919.
21. Ballmaier M. et al. Thrombopoietin is essential for the maintenance of normal hematopoiesis in humans: development of aplastic anemia in patients with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2003. – Т. 996. – №. 1. – С. 17-25.
22. Barbui T. et al. Essential thrombocythemia with high hemoglobin levels according to the revised WHO classification //Leukemia. – 2014. – Т. 28. – №. 10. – С. 2092-2094.
23. Barbui T. et al. Masked polycythemia vera (mPV): results of an international study //American journal of hematology. – 2014. – Т. 89. – №. 1. – С. 52-54.
24. Barbui T. et al. Masked polycythemia vera diagnosed according to WHO and BCSH classification //American journal of hematology. – 2014. – Т. 89. – №. 2. – С. 199-202.
25. Barbui T. et al. Myeloproliferative neoplasms: morphology and clinical practice //American journal of hematology. – 2016. – Т. 91. – №. 4. – С. 430-433.

26. Barbui T. et al. Problems and pitfalls regarding WHO-defined diagnosis of early/prefibrotic primary myelofibrosis versus essential thrombocythemia //Leukemia. – 2013. – T. 27. – №. 10. – C. 1953-1958.
27. Barbui T. et al. Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera //Leukemia. – 2014. – T. 28. – №. 6. – C. 1191-1195.
28. Barbui T. et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion //Blood cancer journal. – 2018. – T. 8. – №. 2. – C. 1-11.
29. Barbui T., Finazzi G., Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2013. – T. 122. – №. 13. – C. 2176-2184.
30. Barosi G. et al. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 4.
31. Beentjes J. A. et al. In polycythemia vera human interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhance erythroid colony growth in the absence of erythropoietin //Experimental hematology. – 1989. – T. 17. – №. 9. – C. 981-983.
32. Berlin N. I., NI B. Diagnosis and classification of the polycythemias. – 1975.
33. Besancenot R. et al. JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – T. 124. – №. 13. – C. 2104-2115.
34. Borge O. J. et al. Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells in vitro. – 1996.
35. Borovecki A. et al. The unclassifiable myeloproliferative neoplasm--morphological, cytogenetic and clinical features //Acta medica Croatica: casopis Hravatske akademije medicinskih znanosti. – 2011. – T. 65. – C. 31-36.
36. Brousseau M. et al. Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus prefibrotic primary myelofibrosis //Histopathology. – 2010. – T. 56. – №. 6. – C. 758-767.
37. Budde U. et al. Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma.// *Blood*. – 1993. – T. 82. – №. 6. – C. 1749–1757.
38. Buhr T. et al. European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis //haematologica. – 2012. – T. 97. – №. 3. – C. 360-365.
39. Burkhardt R. et al. Working classification of chronic myeloproliferative disorders based on histological, haematological, and clinical findings //Journal of clinical pathology. – 1986. – T. 39. – №. 3. – C. 237-252.



40. Cantor A. B., Orkin S. H. Hematopoietic development: a balancing act //Current opinion in genetics & development. – 2001. – T. 11. – №. 5. – C. 513-519.
41. Cassinat B. et al. Classification of myeloproliferative disorders in the JAK2 era: is there a role for red cell mass? //Leukemia. – 2008. – T. 22. – №. 2. – C. 452-453.
42. Cerquozzi S., Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors //Blood cancer journal. – 2015. – T. 5. – №. 11. – C. 366-366.
43. Chang B. S. et al. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-xL and Bcl-2 //The EMBO journal. – 1997. – T. 16. – №. 5. – C. 968-977.
44. Chou Y. S. et al. Leukocytosis in polycythemia vera and splenomegaly in essential thrombocythemia are independent risk factors for hemorrhage //European journal of haematology. – 2013. – T. 90. – №. 3. – C. 228-236.
45. Coombs C. C. et al. Therapy-related clonal hematopoiesis in patients with non-hematologic cancers is common and associated with adverse clinical outcomes //Cell stem cell. – 2017. – T. 21. – №. 3. – C. 374-382.
46. Crisà E. et al. A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs //Annals of hematology. – 2010. – T. 89. – №. 7. – C. 691-699.
47. Cristina S. F., Polo B., Lacerda J. F. Somatic mutations in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms //Seminars in hematology. – WB Saunders, 2018. – T. 55. – №. 4. – C. 215-222.
48. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes //Blood. – 1951. – T. 6. – №. 4. – C. 372-375.
49. Dayal S., Pati H. P., Acharya S. K. Polycythemia vera: overt to latent form in a patient with Budd-Chiari syndrome //Journal of clinical gastroenterology. – 1996. – T. 22. – №. 1. – C. 76-77.
50. de Sauvage F. J. et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin //The Journal of experimental medicine. – 1996. – T. 183. – №. 2. – C. 651-656.
51. Delhommeau F. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers //New England Journal of Medicine. – 2009. – T. 360. – №. 22. – C. 2289-2301.
52. DeZern A. E., Malcovati L., Ebert B. L. CHIP, CCUS, and other acronyms: definition, implications, and impact on practice //American Society of Clinical Oncology Educational Book. – 2019. – T. 39. – C. 400-410.

53. Domen J., Gandy K. L., Weissman I. L. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 1998. – T. 91. – №. 7. – C. 2272-2282.
54. Domen J., Weissman I. L. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other //The Journal of experimental medicine. – 2000. – T. 192. – №. 12. – C. 1707-1718.
55. Dong H. Y., Wilkes S., Yang H. CD71 is selectively and ubiquitously expressed at high levels in erythroid precursors of all maturation stages: a comparative immunochemical study with glycophorin A and hemoglobin A //The American journal of surgical pathology. – 2011. – T. 35. – №. 5. – C. 723-732.
56. Enver T., Heyworth C. M., Dexter T. M. Do stem cells play dice? //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 1998. – T. 92. – №. 2. – C. 348-351.
57. Epstein E., Goedel A. Hämorrhagische thrombocythämie bei vasculärer schrumpfmilz //Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin. – 1934. – T. 292. – №. 2. – C. 233-248.
58. Falchi L., Newberry K. J., Verstovsek S. New therapeutic approaches in polycythemia vera //Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. – 2015. – T. 15. – C. 27-S33.
59. Finazzi G. et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study //Blood. – 2005. – T. 105. – №. 7. – C. 2664-2670.
60. Fjellner B., Hägermark Ö. Pruritus in polycythemia vera: treatment with aspirin and possibility of platelet involvement //Acta dermato-venereologica. – 1979. – T. 59. – №. 6. – C. 505-512.
61. Fox N. et al. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation //The Journal of clinical investigation. – 2002. – T. 110. – №. 3. – C. 389-394.
62. Frederiksen L. E. et al. Risk of adverse pregnancy outcomes at advanced maternal age //Obstetrics & Gynecology. – 2018. – T. 131. – №. 3. – C. 457-463.
63. Fujitani Y. et al. An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT //Oncogene. – 1997. – T. 14. – №. 7. – C. 751-761.
64. Genovese G. et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence //New England Journal of Medicine. – 2014. – T. 371. – №. 26. – C. 2477-2487.
65. Georgii A., Thiele J., Vykoupil K. F. Osteomyelofibrosis/-sclerosis: a histological and cytogenetic study on core biopsies of the bone marrow //Virchows Archiv A. – 1980. – T. 389. – №. 3. – C. 269-286.
66. Gianelli U. et al. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology //Leukemia & lymphoma. – 2006. – T. 47. – №. 9. – C. 1774-1781.

67. Gianelli U. et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms //Modern Pathology. – 2014. – T. 27. – №. 6. – C. 814-822.
68. Gianelli U. et al. The myeloproliferative neoplasms, unclassifiable: clinical and pathological considerations //Modern Pathology. – 2017. – T. 30. – №. 2. – C. 169.
69. Gillis N. K. et al. Clonal haemopoiesis and therapy-related myeloid malignancies in elderly patients: a proof-of-concept, case-control study //The Lancet Oncology. – 2017. – T. 18. – №. 1. – C. 112-121.
70. Girodon F. et al. Frequent reduction or absence of detection of the JAK2-mutated clone in JAK2V617F-positive patients within the first years of hydroxyurea therapy //haematologica. – 2008. – T. 93. – №. 11. – C. 1723-1727.
71. Gisslinger H. et al. Clinical impact of bone marrow morphology for the diagnosis of essential thrombocythemia: comparison between the BCSH and the WHO criteria //Leukemia. – 2016. – T. 30. – №. 5. – C. 1126-1132.
72. Gurney A. L. et al. Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice //Science. – 1994. – T. 265. – №. 5177. – C. 1445-1447.
73. Haferlach T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes //Leukemia. – 2014. – T. 28. – №. 2. – C. 241-247.
74. Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains //Science. – 1988. – T. 241. – №. 4861. – C. 42-52.
75. Heinrich M. C. et al. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies //Journal of clinical oncology. – 2002. – T. 20. – №. 6. – C. 1692-1703.
76. Heuck G. Zwei fälle von Leukämie mit eigenthümlichem Blut-resp. Knochenmarksbefund //Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin. – 1879. – T. 78. – №. 3. – C. 475-496.
77. Horowitz N. A. et al. Haematological malignancies in pregnancy: An overview with an emphasis on thrombotic risks //Thrombosis and Haemostasis. – 2016. – T. 116. – №. 10. – C. 613-617.
78. Ikuta K., Weissman I. L. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89. – №. 4. – C. 1502-1506.
79. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press. – 2001. – C. 32-35.

80. Jaffe ES. et al., Essential thrombocythaemia.//WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. //Press, Lyon – 2001 – C. 39.
81. Jaiswal S. et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes //New England Journal of Medicine. – 2014. – T. 371. – №. 26. – C. 2488-2498.
82. James C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera //nature. – 2005. – T. 434. – №. 7037. – C. 1144-1148.
83. Jekarl D. W. et al. JAK2V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia //The Korean journal of hematology. – 2010. – T. 45. – №. 1. – C. 46-50.
84. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors //New England Journal of Medicine. – 2006. – T. 354. – №. 19. – C. 2034-2045.
85. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis //The Journal of clinical investigation. – 2005. – T. 115. – №. 12. – C. 3339-3347.
86. Keller J. R., Ortiz M., Ruscetti F. W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. – 1995.
87. Kerndrup G. et al. Histomorphometrical determination of bone marrow cellularity in iliac crest biopsies //Scandinavian journal of haematology. – 1980. – T. 24. – №. 2. – C. 110-114.
88. Kiladjian J. J. et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2008. – T. 112. – №. 8. – C. 3065-3072.
89. Kiladjian J. J. et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2008. – T. 111. – №. 10. – C. 4922-4929.
90. Kimura S. et al. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 3. – C. 1195-1200.
91. Kralovics R. et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders //New England Journal of Medicine. – 2005. – T. 352. – №. 17. – C. 1779-1790.
92. Krystal G. W., Hines S. J., Organ C. P. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor //Cancer research. – 1996. – T. 56. – №. 2. – C. 370-376.
93. Kvasnicka H. M. et al. European LeukemiaNet study on the reproducibility of bone marrow features in masked polycythemia vera and differentiation from essential thrombocythemia //American Journal of Hematology. – 2017. – T. 92. – №. 10. – C. 1062-1067.

94. Kvasnicka H. M. et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis—a consensus-based study //Histopathology. – 2016. – T. 68. – №. 6. – C. 905-915.
95. Kvasnicka H. M. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): a critical update //Current hematologic malignancy reports. – 2013. – T. 8. – №. 4. – C. 333-341.
96. Kvasnicka H. M., Thiele J. Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification //American journal of hematology. – 2010. – T. 85. – №. 1. – C. 62-69.
97. Lagerlöf B., Franzén S. The ultrastructure of megakaryocytes in polycythaemia vera and chronic granulocytic leukaemia //Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology. – 1972. – T. 80. – №. 1. – C. 71-83.
98. Laiosa C. V., Stadtfeld M., Graf T. Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification //Annu. Rev. Immunol. – 2006. – T. 24. – C. 705-738.
99. Langabeer S. E. Chasing down the triple-negative myeloproliferative neoplasms: Implications for molecular diagnostics //Jak-stat. – 2016. – T. 5. – №. 2-4. – C. e1248011.
100. Langemeijer S. M. C. et al. TET2 mutations in childhood leukemia //Leukemia. – 2011. – T. 25. – №. 1. – C. 189-192.
101. Levine R. L. et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis //Cancer cell. – 2005. – T. 7. – №. 4. – C. 387-397.
102. Li C. L., Johnson G. R. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. – 1994.
103. Lin E. Y. et al. Characterization of A1, a novel hemopoietic-specific early-response gene with sequence similarity to bcl-2 //The Journal of Immunology. – 1993. – T. 151. – №. 4. – C. 1979-1988.
104. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells //The international journal of biochemistry & cell biology. – 1999. – T. 31. – №. 10. – C. 1053-1074.
105. Liou J. D. et al. Advanced maternal age and adverse perinatal outcomes in an Asian population //European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2010. – T. 148. – №. 1. – C. 21-26.
106. Lippert E. et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera //Blood. – 2006. – T. 108. – №. 6. – C. 1865-1867.
107. Liu K. D., Gaffen S. L., Goldsmith M. A. JAK/STAT signaling by cytokine receptors //Current opinion in immunology. – 1998. – T. 10. – №. 3. – C. 271-278.
108. Liu Y. et al. JAK2V617F mutation burden and its clinical implications in 415 patients with myeloproliferative neoplasm //Zhonghua xue ye xue za zhi= Zhonghua xueyexue zazhi. – 2015. – T. 36. – №. 3. – C. 191-195.

109. Lundberg P. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – T. 123. – №. 14. – C. 2220-2228.
110. Iurlo A. et al. Impact of the 2016 revised WHO criteria for myeloproliferative neoplasms, unclassifiable: comparison with the 2008 version //American journal of hematology. – 2017. – T. 92. – №. 4. – C. 48-51.
111. Lussana F. et al. A lower intensity of treatment may underlie the increased risk of thrombosis in young patients with masked polycythaemia vera //British journal of haematology. – 2014. – T. 167. – №. 4. – C. 541-546.
112. Lyman S. D., Jacobsen S. E. W. c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 1998. – T. 91. – №. 4. – C. 1101-1134.
113. Madelung A. B. et al. WHO-defined Classification of Myeloproliferative Neoplasms: Morphological Reproducibility and Clinical Correlations-The Danish Experience //American Journal of Hematology. – 2013.
114. Malcovati L. Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium and of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms //Blood. – 2011. – T. 118. – C. 6238-6246.
115. Malcovati L. et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2015. – T. 126. – №. 2. – C. 233-241.
116. Mardis E. R. et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome //New England Journal of Medicine. – 2009. – T. 361. – №. 11. – C. 1058-1066.
117. Marsee D. K., Pinkus G. S., Yu H. CD71 (transferrin receptor) an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens //American journal of clinical pathology. – 2010. – T. 134. – №. 3. – C. 429-435.
118. Matcuk Jr G. R. et al. Bone marrow cellularity MRI calculation and correlation with bone marrow biopsy //Clinical Imaging. – 2016. – T. 40. – №. 3. – C. 392-397.
119. Matthews W. et al. A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations //Cell. – 1991. – T. 65. – №. 7. – C. 1143-1152.
120. McMullin M. F. et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis //British journal of haematology. – 2005. – T. 130. – №. 2. – C. 174-195.

121. Meggendorfer M. et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML) //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2012. – T. 120. – №. 15. – C. 3080-3088.
122. Meggendorfer M. et al. The mutational landscape of 18 investigated genes clearly separates four subtypes of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms //haematologica. – 2018. – T. 103. – №. 5. – C. 192.
123. Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? //Blood. – 1993. – T. 82. – №. 12. – C. 3515-3523.
124. Michiels J. J. Bone marrow histopathology and biological markers as specific clues to the differential diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera and prefibrotic or fibrotic agnogenic myeloid metaplasia //The Hematology Journal. – 2004. – T. 5. – №. 2. – C. 93-102.
125. Michiels J. J. et al. Changing concepts of diagnostic criteria of myeloproliferative disorders and the molecular etiology and classification of myeloproliferative neoplasms: from Dameshek 1950 to Vainchenker 2005 and beyond //Acta haematologica. – 2015. – T. 133. – №. 1. – C. 36-51.
126. Michiels J. J., Juvonen E. Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group //Seminars in thrombosis and hemostasis. – Copyright© 1997 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1997. – T. 23. – №. 04. – C. 339-347.
127. Michiels J. J., Thiele J. Clinical and pathological criteria for the diagnosis of essential thrombocythemia, polycythemia vera, and idiopathic myelofibrosis (agnogenic myeloid metaplasia) //International journal of hematology. – 2002. – T. 76. – №. 2. – C. 133-145.
128. Miller C. L., Eaves C. J. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 25. – C. 13648-13653.
129. Miyazawa K. et al. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. – 1995.
130. Moonim M. T., Porwit A. Normal bone marrow histology //Blood and Bone Marrow Pathology E-Book. – 2011. – C. 45.
131. Morgan K. J., Gilliland D. G. A role for JAK2 mutations in myeloproliferative diseases //Annu. Rev. Med. – 2008. – T. 59. – C. 213-222.
132. Muller E. W., Wolf J. T. M. D., Haagsma E. B. Portal Hypertension as Presenting Feature of a Myeloproliferative Disorder: Diagnosis and Therapeutic Dilemmas //Scandinavian Journal of Gastroenterology. – 1993. – T. 28. – №. 200. – C. 74-79.
133. Nowell P. C., Hungerford D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes //Journal of the National Cancer Institute. – 1960. – T. 25. – №. 1. – C. 85-109.

134. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells // *Blood*. – 1993. – T. 81. – №. 11. – C. 2844-2853
135. Osler W. Chronic cyanosis, with polycythemia and enlarged spleen; a new clinical entity // *Trans. Ass. Amer. Phycns.* – 1903. – T. 18. – C. 299.
136. Papaemmanuil E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2013. – T. 122. – №. 22. – C. 3616-3627.
137. Papaemmanuil E. et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts // *New England Journal of Medicine*. – 2011. – T. 365. – №. 15. – C. 1384-1395.
138. Pardanani A. et al. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2 V617F-negative polycythemia vera // *Leukemia*. – 2007. – T. 21. – №. 9. – C. 1960-1963.
139. Park S. H. et al. The allele burden of JAK2 V617F can aid in differential diagnosis of Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasm // *Blood research*. – 2013. – T. 48. – №. 2. – C. 128-132.
140. Passamonti F. et al. Efficacy of pipobroman in the treatment of polycythemia vera: long-term results in 163 patients // *Haematologica*. – 2000. – T. 85. – №. 10. – C. 1011-1018.
141. Passamonti F. et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2011. – T. 117. – №. 10. – C. 2813-2816.
142. Passamonti F. et al. Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders // *Blood*. – 2006. – T. 107. – №. 9. – C. 3676-3682.
143. Policitemia G. I. S. Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years // *Annals of Internal Medicine*. – 1995. – T. 123. – №. 9. – C. 656-664.
144. Qi X. et al. Meta-analysis: the significance of screening for JAK2V617F mutation in Budd-Chiari syndrome and portal venous system thrombosis // *Alimentary pharmacology & therapeutics*. – 2011. – T. 33. – №. 10. – C. 1087-1103.
145. Ramos F. et al. Spanish Group for Myelodysplastic Syndromes (GESMD). Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis // *Oncotarget*. – 2017. – T. 7. – C. 30492-30503.
146. Rönstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit // *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. – 2004. – T. 61. – №. 19-20. – C. 2535-2548.
147. Rosti V. et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2 V617F mutation // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. – 2013. – T. 121. – №. 2. – C. 360-368.



148. Rumi E. et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2014. – T. 123. – №. 10. – C. 1544-1551.
149. Sauvageau G., Iscove N. N., Humphries R. K. In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells //Oncogene. – 2004. – T. 23. – №. 43. – C. 7223-7232.
150. Scherber R. et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – T. 118. – №. 2. – C. 401-408.
151. Scott L. M. et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis //New England Journal of Medicine. – 2007. – T. 356. – №. 5. – C. 459-468.
152. Scott L. M. et al. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia //Blood. – 2006. – T. 108. – №. 7. – C. 2435-2437.
153. Shih L. Y., Lee C. T. Identification of masked polycythemia vera from patients with idiopathic marked thrombocytosis by endogenous erythroid colony assay. – 1994.
154. Shlush L. I. et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia //Nature. – 2014. – T. 506. – №. 7488. – C. 328-333.
155. Siegel F. P., Tauscher J., Petrides P. E. Aquagenic pruritus in polycythemia vera: characteristics and influence on quality of life in 441 patients //American journal of hematology. – 2013. – T. 88. – №. 8. – C. 665-669.
156. Silver A. J., Jaiswal S. Clonal hematopoiesis: Pre-cancer PLUS //Advances in cancer research. – Academic Press, 2019. – T. 141. – C. 85-128.
157. Sitnicka E. et al. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. – 1996.
158. Smithgall T. E. Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation //Pharmacological reviews. – 1998. – T. 50. – №. 1. – C. 1-20.
159. Solar G. P. et al. Role of c-mpl in early hematopoiesis //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 1998. – T. 92. – №. 1. – C. 4-10.
160. Sozer S. et al. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome //Blood. – 2009. – T. 113. – №. 21. – C. 5246-5249.
161. Spivak J. L., Silver R. T. The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2008. – T. 112. – №. 2. – C. 231-239.
162. Spritz R. A. Molecular basis of human piebaldism //Journal of investigative dermatology. – 1994. – T. 103.

163. Staerk J. et al. JAK2, the JAK2 V617F mutant and cytokine receptors //Pathologie Biologie. – 2007. – T. 55. – №. 2. – C. 88-91.
164. Ständer S. et al. Pruritus--pathophysiology, clinical features and therapy--an overview //Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft= Journal of the German Society of Dermatology: JDDG. – 2003. – T. 1. – №. 2. – C. 105-118.
165. Steensma D. P. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2015. – T. 126. – №. 1. – C. 9-16.
166. Steensma D. P. et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes //Blood. – 2005. – T. 106. – №. 4. – C. 1207-1209.
167. Takahashi K. et al. Preleukaemic clonal haemopoiesis and risk of therapy-related myeloid neoplasms: a case-control study //The Lancet Oncology. – 2017. – T. 18. – №. 1. – C. 100-111.
168. Takano H. et al. Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs //The Journal of experimental medicine. – 2004. – T. 199. – №. 3. – C. 295-302.
169. Tefferi A. 354 Targeted Next-Generation Sequencing in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. – 2015.
170. Tefferi A. Essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: current management and the prospect of targeted therapy //American journal of hematology. – 2008. – T. 83. – №. 6. – C. 491-497.
171. Tefferi A. et al. Concomitant neutrophil JAK2V617F mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythaemia //British journal of haematology. – 2005. – T. 131. – №. 2. – C. 166-171.
172. Tefferi A. et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study //Leukemia. – 2013. – T. 27. – №. 9. – C. 1874-1881.
173. Tefferi A., Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management //American journal of hematology. – 2019. – T. 94. – №. 1. – C. 133-143.
174. Tefferi A., Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F //Seminars in thrombosis and hemostasis. – Copyright© 2007 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA., 2007. – T. 33. – №. 04. – C. 313-320.

175. Tefferi A., Vardiman J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms //Leukemia. – 2008. – T. 22. – №. 1. – C. 14-22.
176. Terradas-Terradas M. et al. Clonality in haematopoietic stem cell ageing //Mechanisms of Ageing and Development. – 2020. – T. 189.
177. Thiele J. et al. Agnogenic myeloid metaplasia (AMM)—correlation of bone marrow lesions with laboratory data: a longitudinal clinicopathological study on 114 patients //Hematological oncology. – 1989. – T. 7. – №. 5. – C. 327-343.
178. Thiele J. et al. Chronic megakaryocytic-granulocytic myelosis—An electron microscopic study //Virchows Archiv A. – 1977. – T. 373. – №. 3. – C. 191-211.
179. Thiele J. et al. Density distribution and size of megakaryocytes in inflammatory reactions of the bone marrow (myelitis) and chronic myeloproliferative diseases //Scandinavian journal of haematology. – 1983. – T. 31. – №. 4. – C. 329-341.
180. Thiele J. et al. Emperipolesis—a peculiar feature of megakaryocytes as evaluated in chronic myeloproliferative diseases by morphometry and ultrastructure //Virchows Archiv B. – 1984. – T. 46. – №. 1. – C. 253.
181. Thiele J. et al. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – T. 117. – №. 21. – C. 5710-5718.
182. Thiele J. et al. European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. Haematologica 2012; 97 (3): 360–5-Comment //haematologica. – 2012. – T. 97. – №. 3. – C. 5-6.
183. Thiele J. et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity //haematologica. – 2005. – T. 90. – №. 8. – C. 1128-1132.
184. Thiele J. et al. Histomorphometry of bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders with associated thrombocytosis-features of significance for the diagnosis of primary (essential) thrombocythaemia //Virchows Archiv A. – 1988. – T. 413. – №. 5. – C. 407-417.
185. Thiele J. et al. Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact //Leukemia & lymphoma. – 1996. – T. 22. – №. 3-4. – C. 303-317.
186. Thiele J. et al. Primary (essential) thrombocythemia versus initial (hyperplastic) stages of agnogenic myeloid metaplasia with thrombocytosis—a critical evaluation of clinical and histomorphological data //Acta haematologica. – 1989. – T. 81. – №. 4. – C. 192-202.

187. Thiele J. et al. Primary (essential) thrombocythemia versus polycythemia vera rubra. A histomorphometric analysis of bone marrow features in trephine biopsies //Analytical and quantitative cytology and histology. – 1988. – T. 10. – №. 5. – C. 375-382.
188. Thiele J., Kvasnicka H. M. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients //Annals of hematology. – 2003. – T. 82. – №. 3. – C. 148-152.
189. Thiele J., Kvasnicka H. M. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis //Current hematologic malignancy reports. – 2009. – T. 4. – №. 1. – C. 33-40.
190. Thiele J., Kvasnicka H. M., Orazi A. Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders—current diagnostic approach //Seminars in hematology. – WB Saunders, 2005. – T. 42. – №. 4. – C. 184-195.
191. Thiele J., Kvasnicka H. et al. Myeloproliferative neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Volume 2 //WHO classification of tumours. Francia: IARC. – 2008. – C.40-48, C.64.
192. Thiele J., Kvasnicka H. et al. Myeloproliferative neoplasms. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition//IARC: Lyon. – 2017 – C. 39-53, C.57-59.
193. Titmarsh G. J. et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis //American Journal of Hematology. – 2014. – T. 89. – №. 6. – C. 581-587.
194. Tuzuner N. et al. Bone marrow cellularity in myeloid stem cell disorders: impact of age correction //Leukemia research. – 1994. – T. 18. – №. 8. – C. 559-564.
195. Ugo V. et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera //Experimental hematology. – 2004. – T. 32. – №. 2. – C. 179-187.
196. Ungureanu D. et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling //Nature structural & molecular biology. – 2011. – T. 18. – №. 9. – C. 971-976.
197. Vainchenker W. et al. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms //Blood, The Journal of the American Society of Hematology. – 2011. – T. 118. – №. 7. – C. 1723-1735.
198. Valent P. et al. Proposed minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes (MDS) and potential pre-MDS conditions //Oncotarget. – 2017. – T. 8. – №. 43. – C. 73483.

199. Vannucchi A. M. et al. Clinical correlates of JAK2 V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal //Leukemia. – 2008. – T. 22. – №. 7. – C. 1299-1307.
200. Vannucchi A. M. et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up //Annals of oncology. – 2015. – T. 26. – №. 5. – C. 85-99.
201. Vannucchi A. M. Insights into the pathogenesis and management of thrombosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia //Internal and emergency medicine. – 2010. – T. 5. – №. 3. – C. 177-184.
202. Vaquez H. et al. Sur une forme spéciale de cyanose s' accompagnant d'hyperglobulie excessive et persistante //CR Soc Biol (Paris). – 1892. – T. 44. – C. 384-8.
203. Vaquez H. On a special form of cyanosis accompanied by excessive and persistent erythrocytosis //Comp Rend Soc Biol. – 1892. – T. 12. – C. 384-388.
204. Walter M. J. et al. Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes //Leukemia. – 2013. – T. 27. – №. 6. – C. 1275-1282.
205. Wang W. et al. Macrophage inflammation, erythrophagocytosis, and accelerated atherosclerosis in Jak2 V617F mice //Circulation research. – 2018. – T. 123. – №. 11. – C. 35-47.
206. Wang Y. et al. The impact of advanced maternal age and parity on obstetric and perinatal outcomes in singleton gestations //Archives of gynecology and obstetrics. – 2011. – T. 284. – №. 1. – C. 31-37.
207. Wanless I. R. et al. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy //Hepatology. – 1990. – T. 12. – №. 5. – C. 1166-1174.
208. Wolach O. et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms //Science translational medicine. – 2018. – T. 10. – №. 436. – C. 82-92.
209. Wolanskyj A. P. et al. JAK2 V617F Mutation in Essential Thrombocythemia: Clinical Associations and Long-Term Prognostic Relevance. – 2005.
210. Xie M. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies //Nature medicine. – 2014. – T. 20. – №. 12. – C. 1472.
211. Yang E. et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death //Cell. – 1995. – T. 80. – №. 2. – C. 285-291.
212. Yoshida K. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia //Nature. – 2011. – T. 478. – №. 7367. – C. 64-69.
213. Zha J. et al. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity //Journal of Biological Chemistry. – 1997. – T. 272. – №. 39. – C. 24101-24104.

214. Zhao G. et al. Diagnosis and treatment of portal hypertension secondary to myeloproliferative disorders: a report of three cases //Journal of digestive diseases. – 2011. – T. 12. – №. 4. – С. 312-316.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

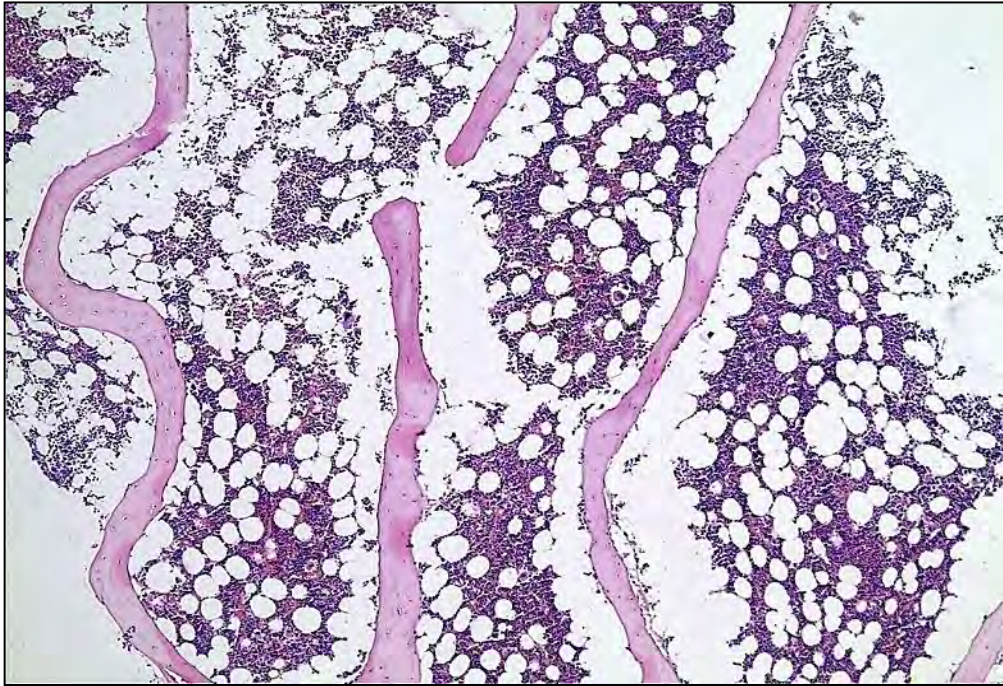


Рисунок 1. Трепанобиоптат костного мозга пациента 50 лет. Нормоклеточный костный мозг. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 50$ .

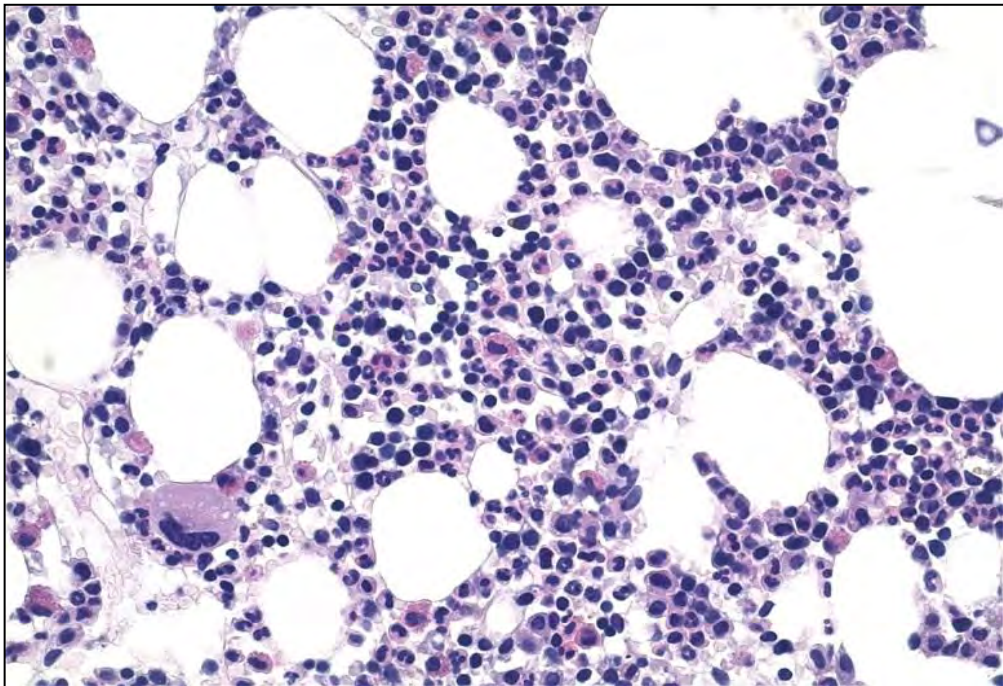


Рисунок 2. Трепанобиоптат костного мозга пациента 50 лет. Отношение гранулоцитарного ростка к эритроидному равно 3-4:1 Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



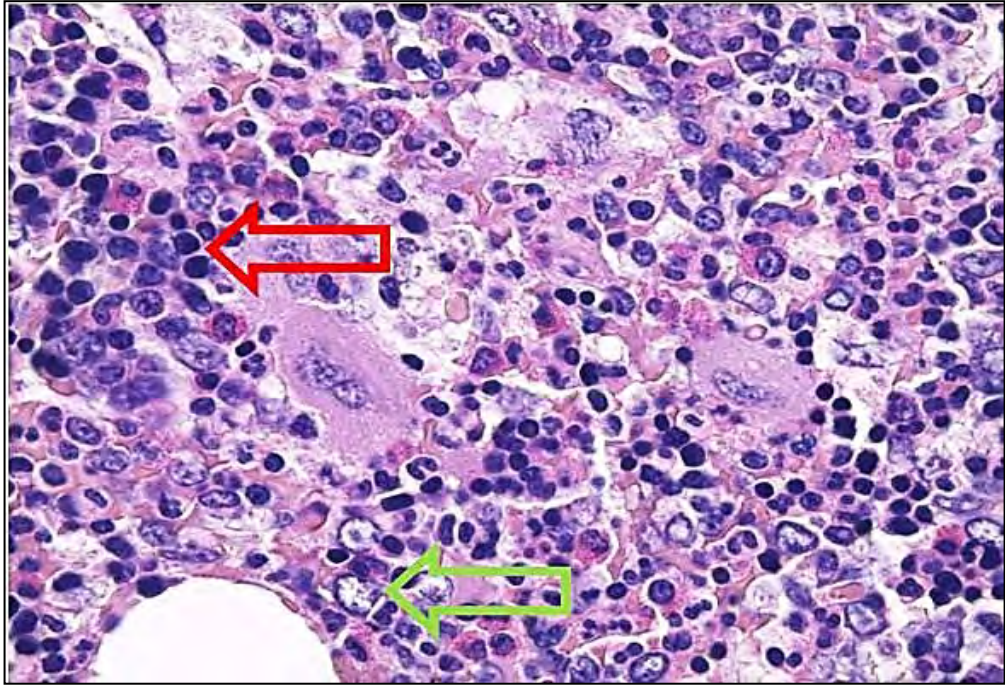


Рисунок 3. Трепанобиоптат костного мозга пациента 30 лет. Красная стрелка-эритрокарициты нормобластического ряда, зеленая стрелка- мегалобластоидные формы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

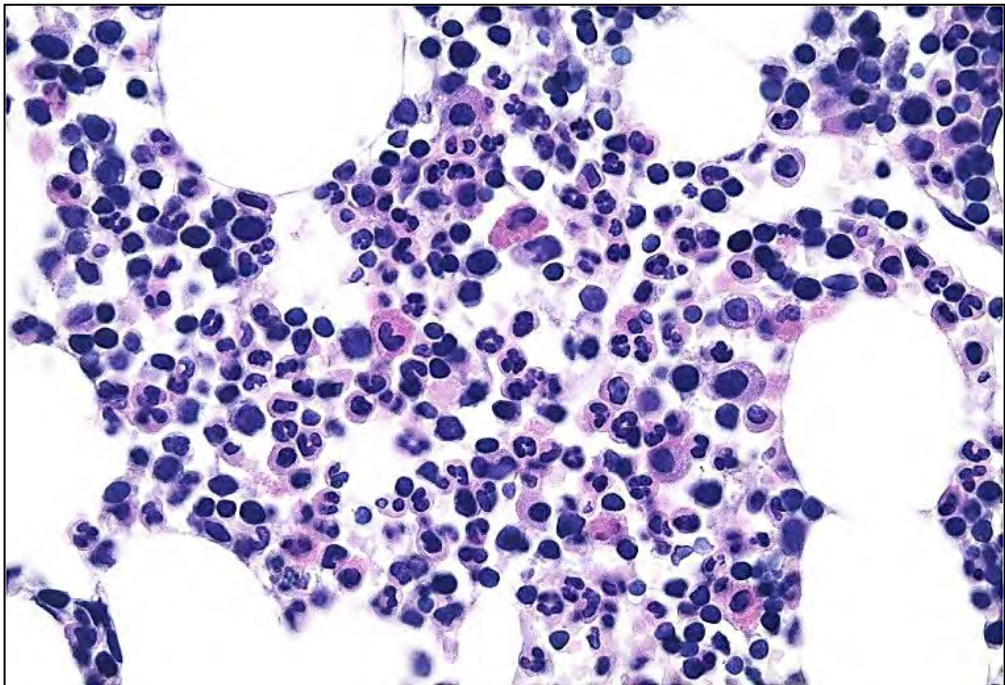


Рисунок 4. Трепанобиоптат костного мозга пациента 50 лет. Гранулоцитарный росток представлен зрелыми и промежуточными формами в соотношении 4:1. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



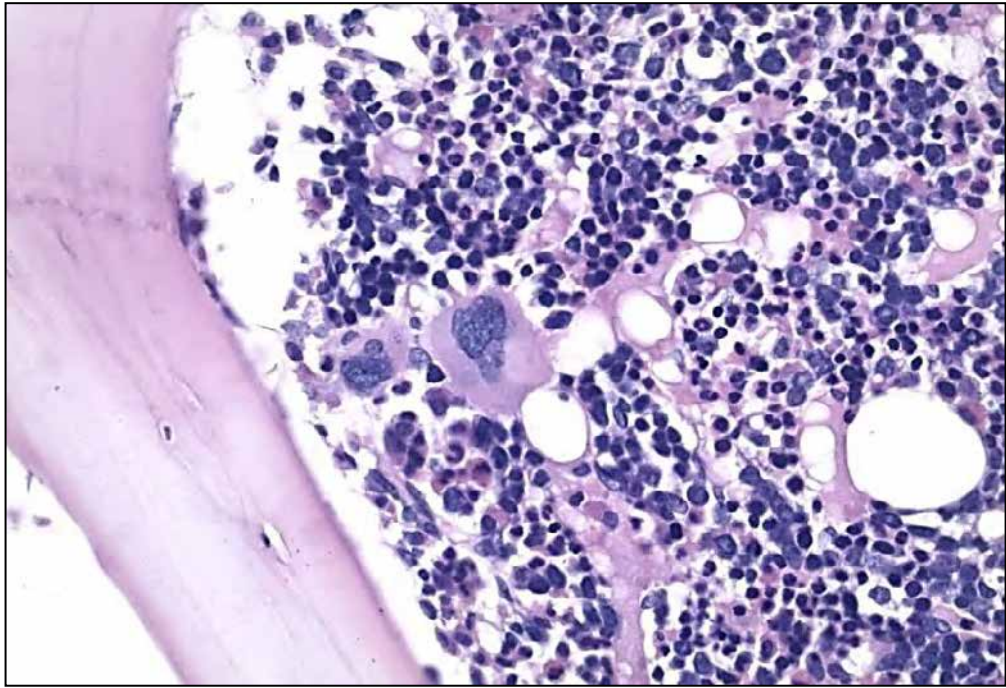


Рисунок 5. Трепанобиоптат костного мозга пациента 42 лет. Мегакариоциты с тенденцией к паратрабекулярному расположению. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

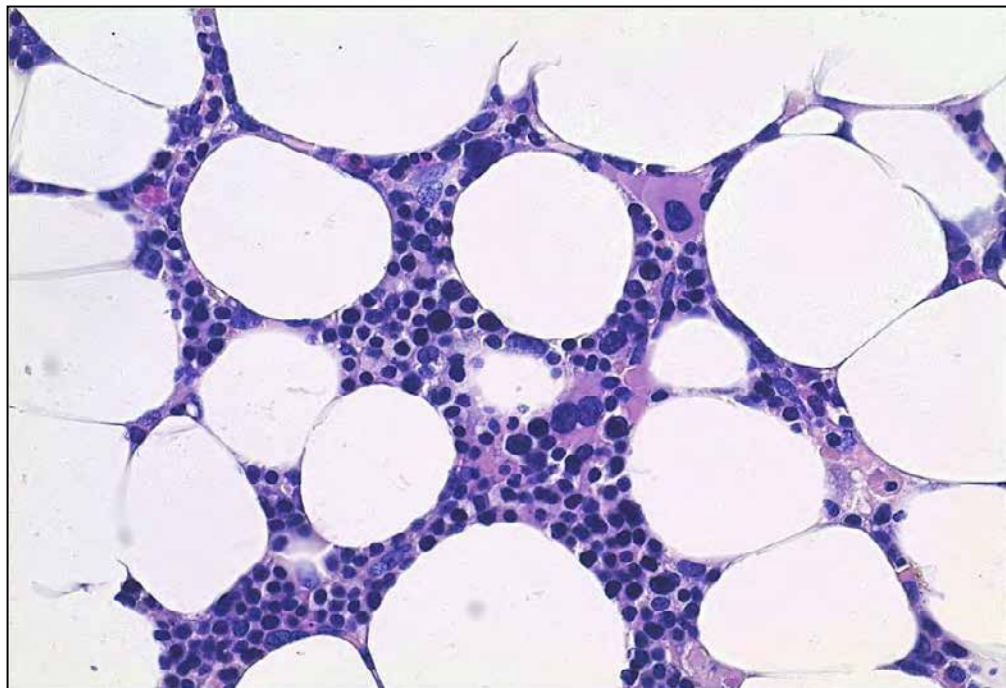


Рисунок 6. Трепанобиоптат костного мозга пациента 54 лет с МДС. Моно- и билобулярные формы мегакариоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

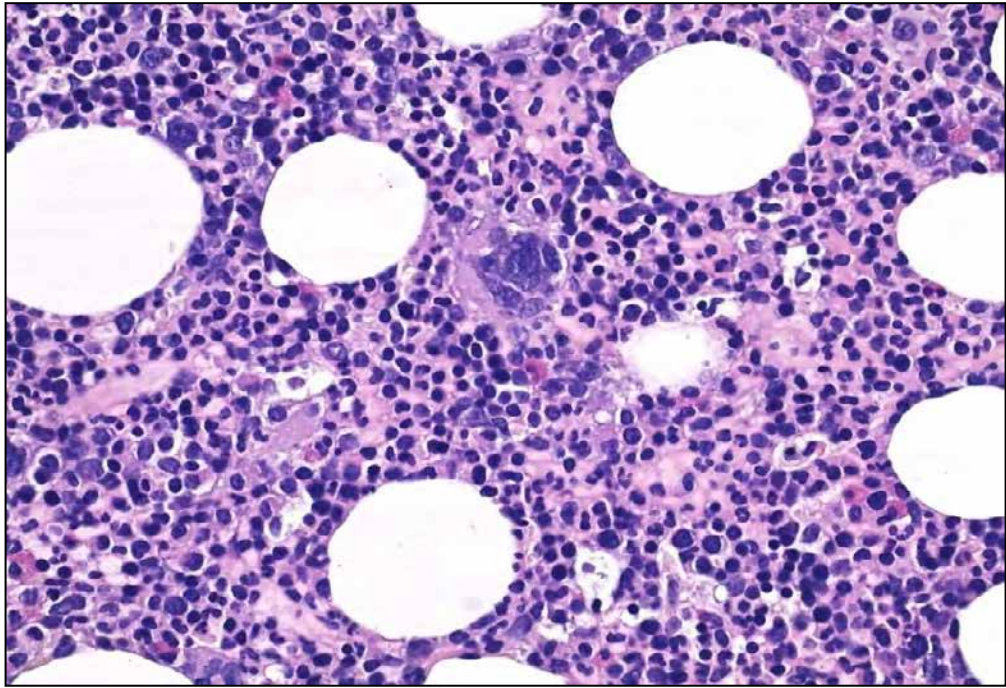


Рисунок 7. Трепанобиоптат костного мозга пациента 77 лет с Rh-негативным МПН. Атипичный крупный мегакариоцит с гиперхромным гиперсегментированным ядром. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

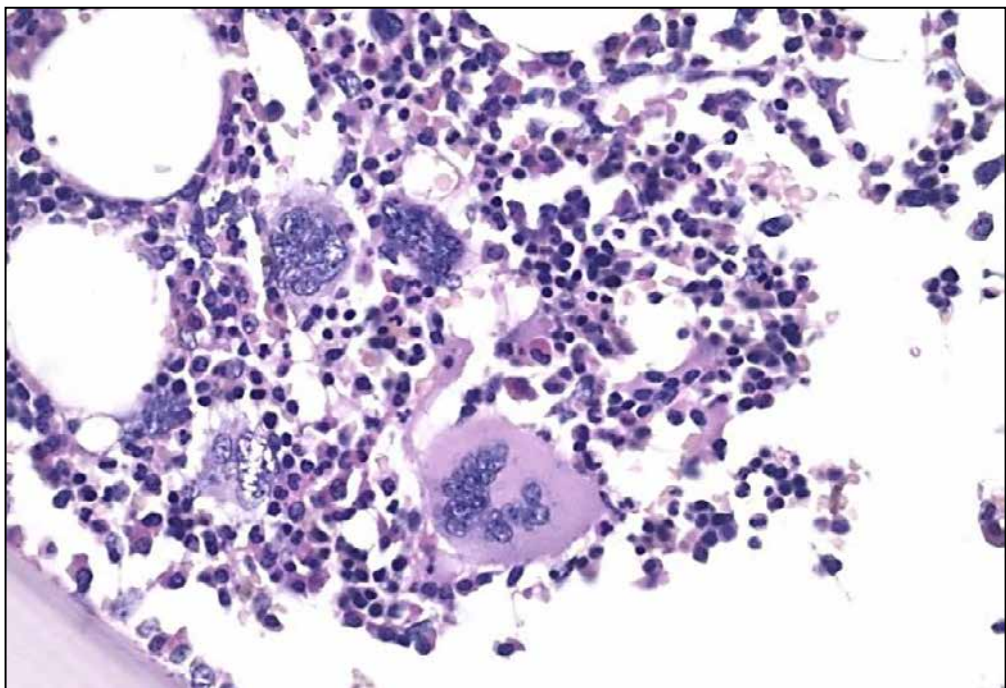


Рисунок 8. Трепанобиоптат костного мозга пациента с Rh-негативным МПН. Атипичные мегакариоциты с гиперлобулярными ядрами. Ядерно-цитоплазматическое соотношение нарушено в пользу цитоплазмы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



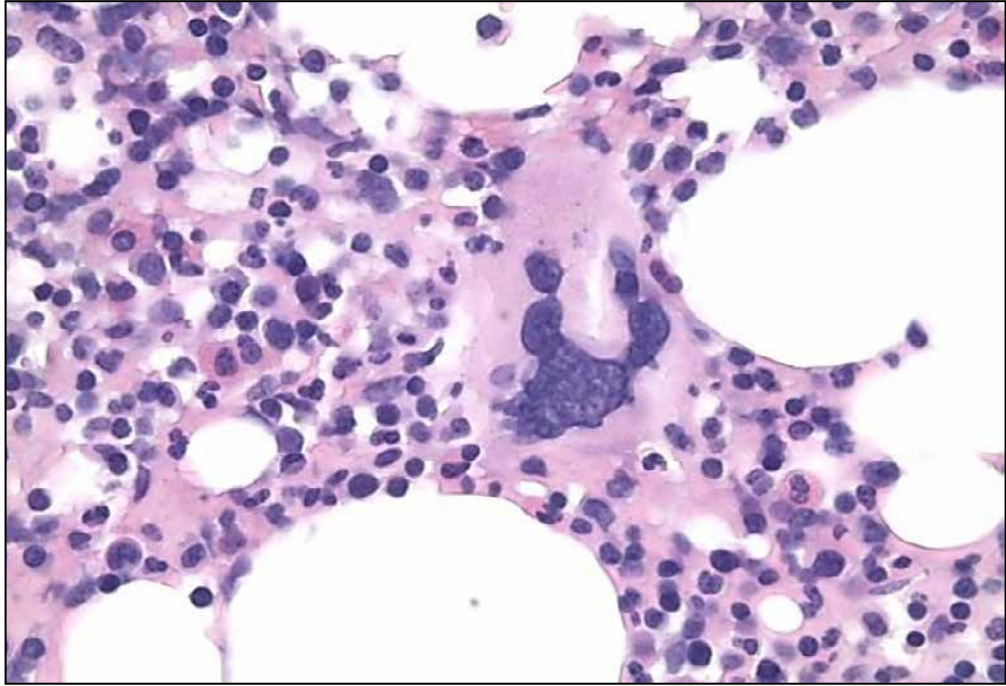


Рисунок 9. Трепанобиоптат костного мозга пациента 36 лет с Rh-негативным МПН. Атипичный гигантский мегакариоцит с широкой цитоплазмой, морфологией ядра по типу «рогов оленя», характерный для ЭТ. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 630$ .

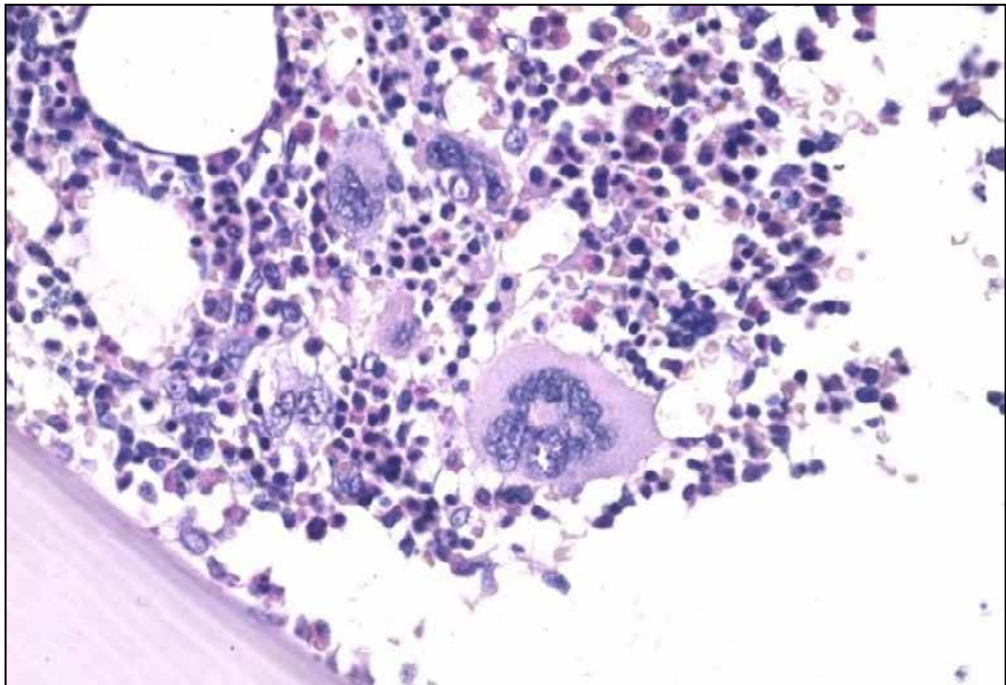


Рисунок 10. Трепанобиоптат костного мозга пациента 50 лет с Rh-негативным МПН. Атипичный гигантский мегакариоцит с «кольцевидным» ядром, характерным для истинной полицитемии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .

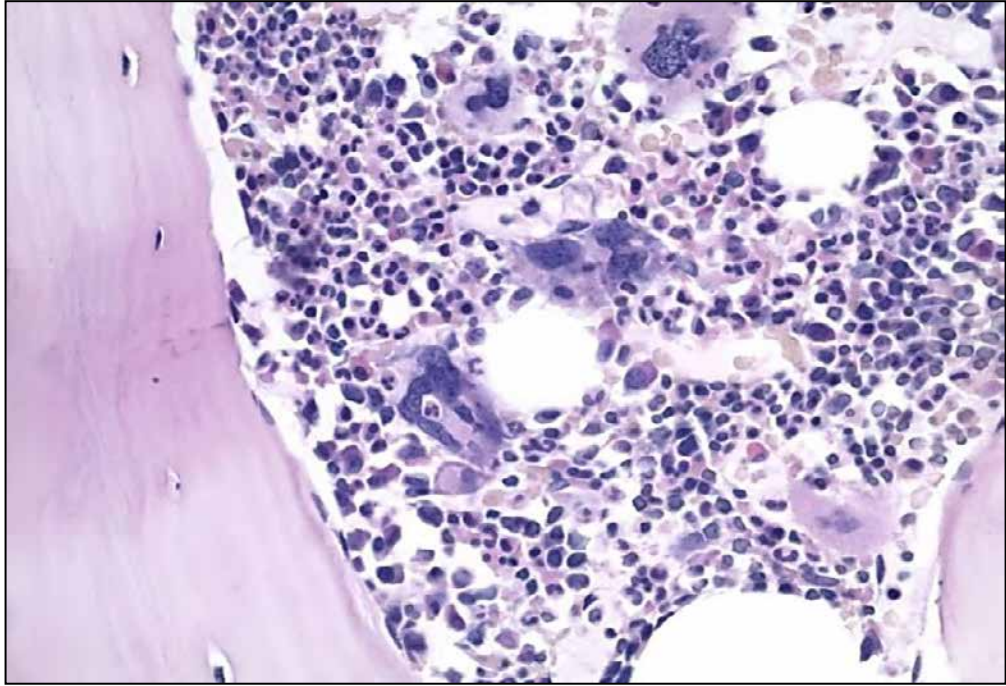


Рисунок 11. Трепанобиоптат костного мозга пациента 40 лет с Rh-негативным МПН. Эмпериоплез мегакарицита. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

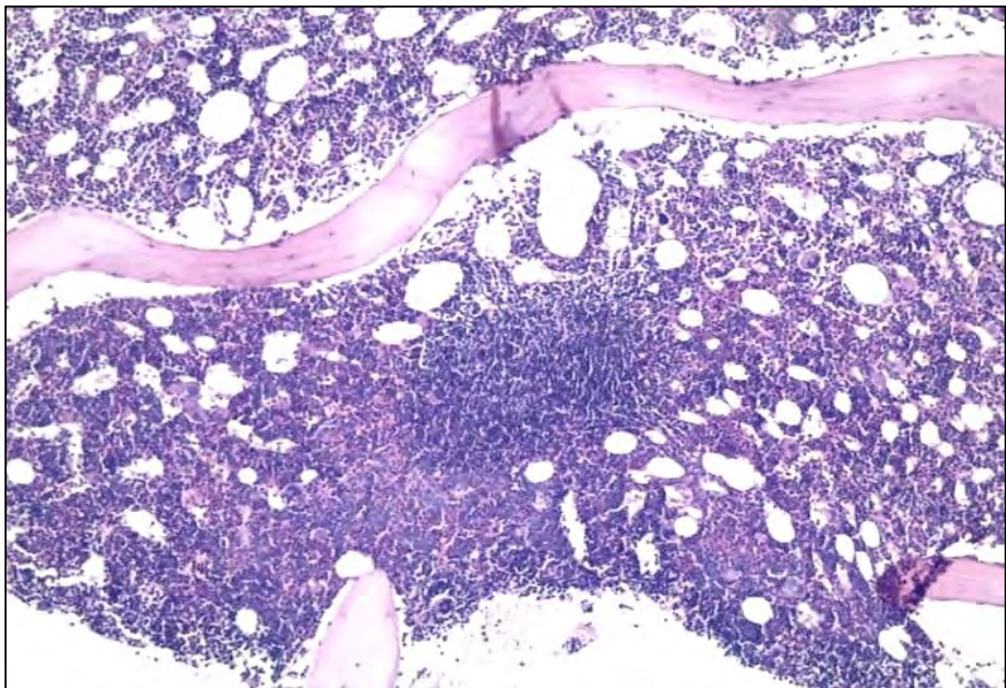


Рисунок 12. Трепанобиоптат костного мозга пациента 23 лет. Четко очерченный лимфоидный очажок с межтрабекулярным расположением (реактивной природы). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .



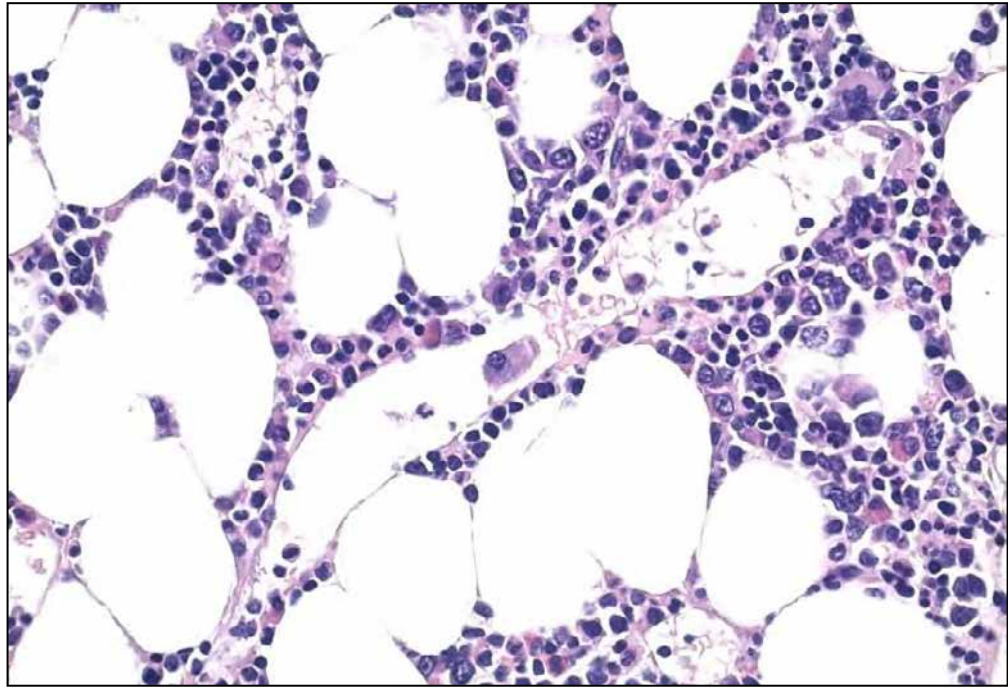


Рисунок 13. Трепанобиоптат костного мозга пациента 79 лет с Rh-негативным МПН. Мегакариоцит в просвете синуса. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ .



Рисунок 14. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 200$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0.



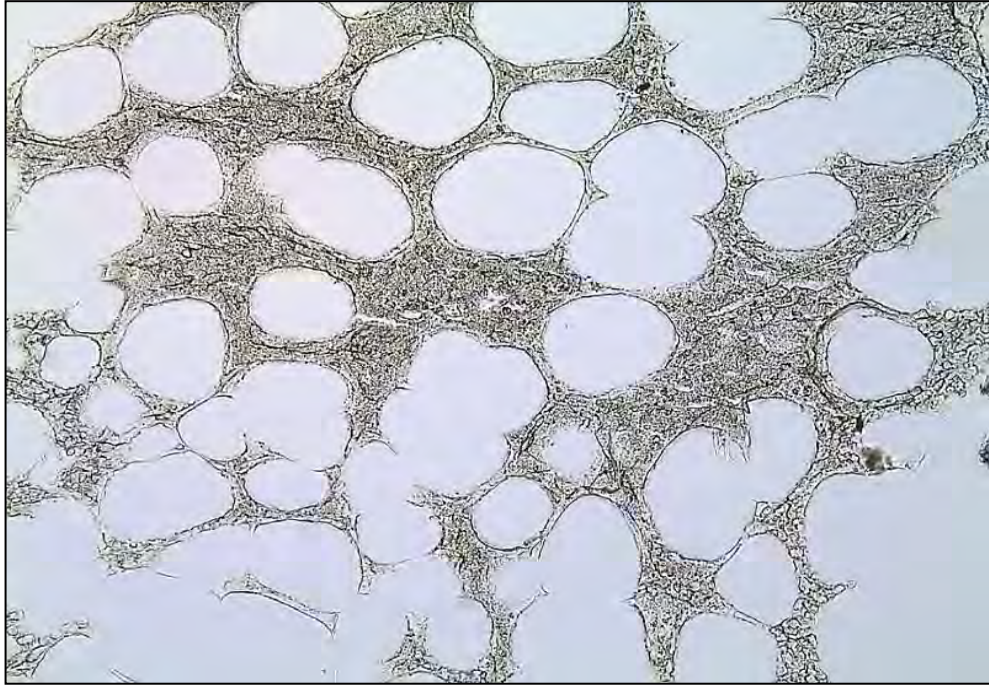


Рисунок 15. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Гомогі. Увеличение  $\times 200$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-0 с участками MF-1  $< 30\%$ .



Рисунок 16. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Гомогі. Увеличение  $\times 200$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-1.



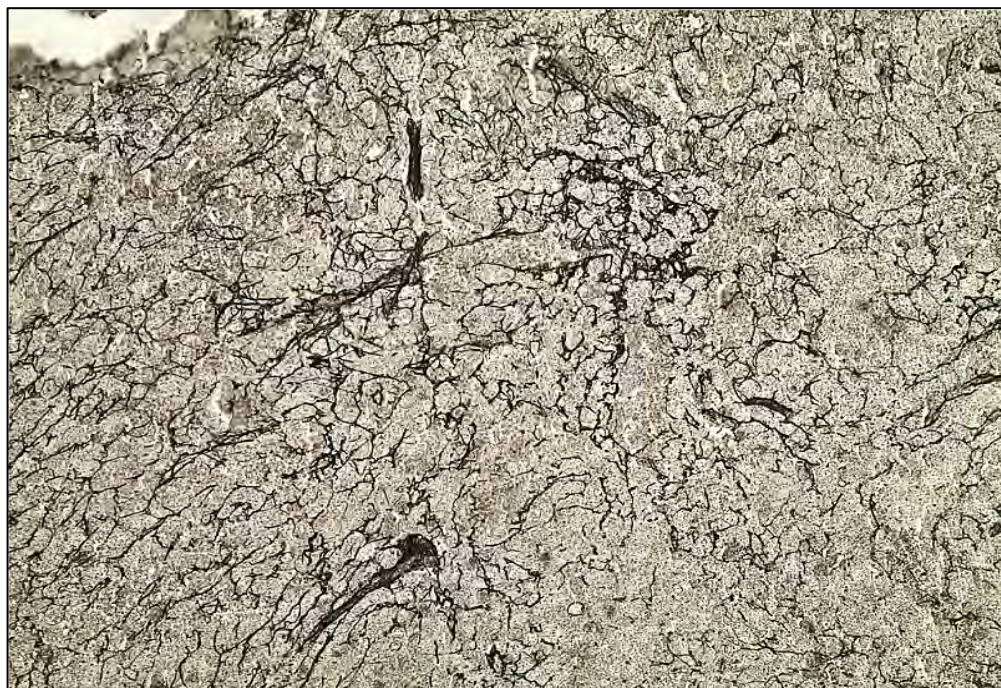


Рисунок 17. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 400$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-2.

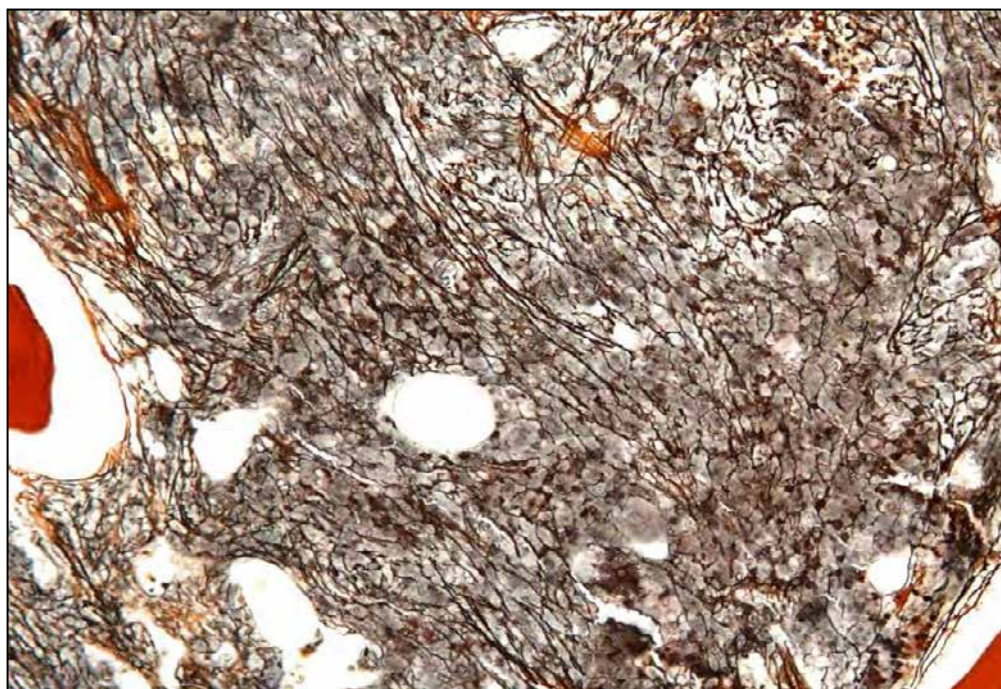


Рисунок 18. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Gomori. Увеличение  $\times 400$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-2 с фокусами MF-3  $< 30\%$ .



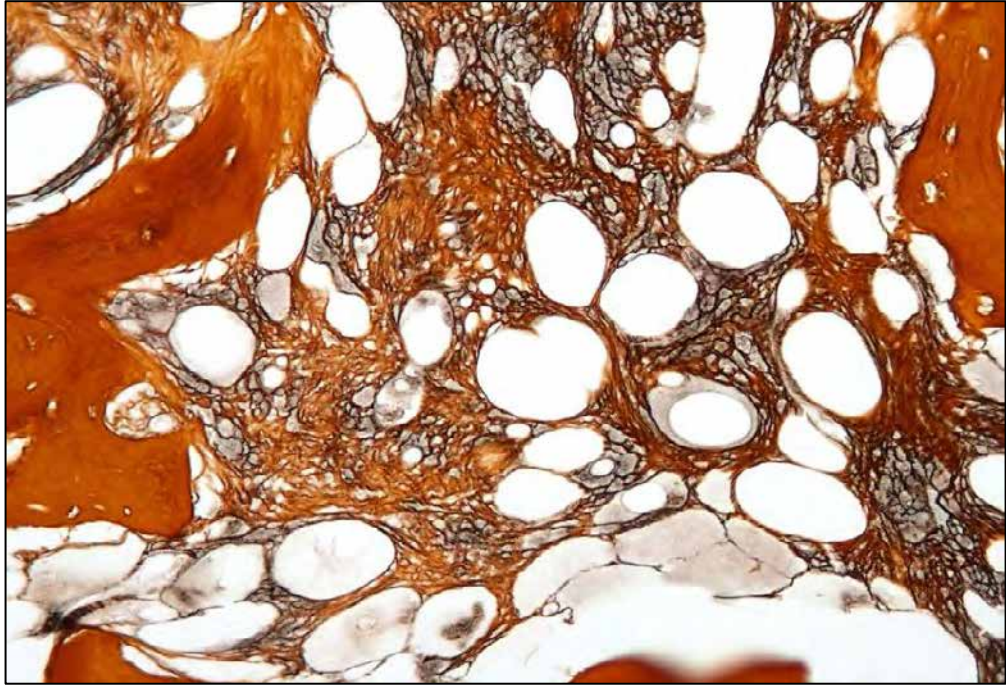


Рисунок 19. Трепанобиоптат костного мозга. Окраска по Гомогі. Увеличение  $\times 400$ . Степень ретикулинового фиброза стромы MF-3.